

## Antibacterial and Antibiofilm Activities of Leaf Extracts of *Stewartia koreana* against *Porphyromonas gingivalis*

Hye Soo Kim<sup>1</sup>, Min Jeong Park<sup>1</sup>, Soo Jeong Kim<sup>1</sup>, Bu Kyung Kim<sup>1</sup>, JunHo Park<sup>2</sup>, DaeHyun Kim<sup>2</sup> and Soo Jeong Cho<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmaceutical Engineering, Gyeongsang National University, 33 Dongjin-ro, Jinju 52725, Korea

<sup>2</sup>Forest Research Department, Gyeongsangnam-do Forest Environment Research Institute, 386 Sumokwon-ro, Jinju 52615, Korea

Received November 30, 2020 / Revised February 9, 2021 / Accepted March 11, 2021

This study was conducted to investigate the potential of *Stewartia koreana* as oral healthcare materials. The antibacterial activity of ethanol extracts from leaves and branches of *S. koreana* against oral bacteria was confirmed. The leaf and branch extracts (1 mg/disc) showed antibacterial activity against *P. gingivalis* only among several tested oral bacteria. The leaf extracts showed higher antibacterial activity, with values similar to those of chlorhexidine, which was used as a positive control. The MIC of the leaf extract against *P. gingivalis* was 0.4 mg/ml and showed bacteriostatic action. The inhibitory effects of the extract on biofilm formation and on gene expression related to biofilm formation by *P. gingivalis* were determined by biofilm biomass staining, scanning electron microscopy (SEM), and qRT-PCR analysis. The biofilm production rate and cell growth of *P. gingivalis* in the cultures treated with 0.2-2.0 mg/ml of *S. koreana* leaf extracts were significantly decreased in a concentration-dependent manner. The inhibitory effect on the formation of *P. gingivalis* biofilms at concentrations of 1 mg/ml was confirmed by SEM. The qRT-PCR analysis showed concentration-dependent suppression of the *fimA* and *fimB* gene expression associated with fimbriae formation in the cultures treated with 0.2-2.0 mg/ml *S. koreana* leaf extract. These results support the conclusion that *S. koreana* leaf extracts can be used as oral healthcare materials derived from natural materials, as demonstrated by the antibacterial action and inhibition of biofilm formation of *P. gingivalis*.

**Key words** : Antibacterial activity, antibiofilm formation, fimbriae, *P. gingivalis* KCTC5352, *Stewartia koreana*

### 서 론

구강미생물인 *Porphyromonas gingivalis*는 치은연하 치면세균막에 존재하는 그람음성 혐기성세균으로 *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*와 함께 red complex를 이루고 있으며, 콜라겐을 분해하여 구취를 유발하기도 하고 압모니아, 황화수소, 아민, 리포폴리사카라이드 등과 같은 내독소를 분비하여 치조골 파괴를 일으켜 치아 상실을 유발하기도 한다[7]. 또한, 최근들어 치주질환 원인균인 *P. gingivalis*는 동맥경화증과 같은 심혈관질환 뿐만 아니라 폐혈증, 유산, 조산, 폐렴, 당뇨병과도 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되고 있다[2]. *P. gingivalis*가 분비하는 대사산물들은 생체 면역계를 자극하고 *P. gingivalis*의 대사산물에 의해 자극된 체액성 및 세포

성 면역계는 활성 산소나 사이토카인을 분비하여 잇몸 염증을 유발하기도 하는데 *P. gingivalis*에 의해 유발된 잇몸 염증을 치주질환이라고 한다[7]. 치아우식증과 함께 구강 건강과 관련된 대표적인 질환 중 하나인 치주질환은 치아 주변 조직인 치은, 치조골, 치주인대 및 백악질에 염증이 발생하는 질환으로 치아 소실의 주요한 원인이 되고 있다.

구강 세균은 섭취된 음식을 영양원으로 이용하고 구강 내에서 구강 세균의 밀도가 높아지면 구강세균 중 일부는 치아표면에 치면세균막(dental biofilm)이라 불리는 생물막(biofilm)을 형성한다. 치면세균막은 약 700여 종 이상의 세균들이 부착하여 형성된 점착성 생물막으로 당 단백질(glycoprotein) 성분의 얇은 막으로 이루어져 있다[15]. 치면세균막은 물리적으로 두꺼운 층을 형성하고 있기 때문에 치면세균막 내부로 외부 물질이 침투하기 어렵고, 치면세균막 내부에서는 세포 간 상호작용을 통해 유전적 변이가 일어날 수 있기 때문에 부유 세균에 비해 항균 물질에 대한 저항성이 높다[20, 21]. 치면세균막이 제거되지 않은 상태로 시간이 지나면 치면세균막은 치면에 침착되어 치석이 된다. 치석이 제거되지 않은 상태로 방치되면 치은출혈, 부종, 치조골 흡수 등이 나타날 수 있는데 이는 치아 흔들림 현상뿐만 아니라 치아우식증과 치주질환의 원인이 된다[8]. 대표적인 구강질환인 치아우식증과 치

#### \*Corresponding author

Tel : +82-055-772-3397, Fax : +82-055-772-3399

E-mail : sjcho@gnu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

주질환은 아동에서부터 성인, 노인에 이르기까지 다양한 연령층에서 발생되고 있고 치아우식증과 치주질환에 의해 치아 손상이 발생되면 영구 손상으로 남는 경향이 높기 때문에 생애 전 주기에 걸쳐 삶의 질을 떨어뜨리는 원인이 되고 있다. 따라서 치아우식증과 치주질환은 치료뿐만 아니라 예방 및 치료예후가 중요하다[17].

치주질환을 예방하고 치료하는데 가장 중요한 것은 치면세균막을 제거하는 것이다. 치면세균막을 제거하는 가장 좋은 방법은 올바른 잇솔질을 통해 치아 교합면에 존재하는 세균막을 제거하는 것이지만 올바른 잇솔질만으로 치아 인접면에 있는 세균막까지 제거하는 것은 어렵다. 따라서 물리적으로 치면세균막을 제거하기 위해서는 올바른 잇솔질과 함께 항균성분이 함유된 치실을 비롯한 구강케어제품의 사용이 필요하다. 현재 구강케어제품에 사용되고 있는 항균성분으로는 화합물유래 항균제인 bis-biguanides (chlorhexidine)와 4급 암모늄(cetylpyridinium, benzalkonium chloride), 페놀화합물(triclosan) 등이 있다. 그러나 화합물 유래 항균제를 장기간 사용할 경우에는 치아나 연조직의 착색이 유발될 수 있고 미각변화의 가능성이 있다는 연구결과가 보고되면서 이를 대체할 수 있는 천연물유래 구강건강 개선소재가 주목을 받고 있다[7, 9, 12]. 또한 치주질환을 비롯한 구강질환 원인균을 억제하거나 제거하기 위해 사용되고 있는 항생제는 균교대현상과 항생제 내성 발현 등을 유발할 수 있다는 연구결과가 보고되면서 최근에는 부작용이 적다고 알려진 천연물유래 구강건강 소재에 관한 연구들이 많은 관심을 받고 있다. 최근 들어 오배자 추출물[24], 편백[14], 몰약[1], 라타니아[1], 카모밀레[1], 인도감나무 줄기 추출물[12], 오리나무 추출물[11] 등이 *P. gingivalis*에 대해 항균작용이 있음이 보고되면서 천연물로부터 인체에 무해하고 구강 병원미생물에 대해서는 항균활성이 우수한 구강건강 개선소재 개발에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다[3].

노각나무(*Stewartia koreana* Nakai)는 낙엽교목으로 지리산 권역에 자생하고 있는 차나무과(Theaceae)의 우리나라 고유 수종이다. 노각나무는 꽃이 크고 화려하여 관상용으로 재배되어 왔으며 목재는 단단하고 무늬가 아름다워 가구재, 장식재 등으로 사용되고 있고 숯은 연마재로 사용되어 왔다[25]. 노각나무의 수피와 근피는 한방에서 모란이라고 부르며 서근활혈의 효능이 있어서 타박상으로 인한 어혈, 근육 이완, 풍습성으로 인한 사지마비와 동통 등의 치료에 사용해왔고 노각나무 열매는 민간에서 곱란, 이뇨 약으로 사용하였다[10]. 노각나무의 가지 및 잎에는 dihydrochalcone, flavonoids, hyperin, lignin, phenolic compound, phenylpropanoid, spinasterol glycoside, sterols 등의 화합물이 포함되어있고 피부미백[26], 항산화[13], 항염증[13], 염증성 골 손실 방지[25], 파골세포 형성 및 분화 억제[23], 혈관 신생[18], 상처 치유[19] 등에 관한 생리활성 연구가 보고되었으나 구강미생물에 대한 노각나무 추출물의 생리활성에 관하여 보고된 바는 없다.

본 연구에서는 구강미생물인 *P. gingivalis*에 대한 노각나무 잎 추출물의 항균활성과 바이오필름 생성 억제 효과를 조사하여 천연물 유래 구강건강 개선소재로서 노각나무 잎 추출물의 이용 가능성을 알아보려고 한다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주 및 추출물

구강미생물에 대한 노각나무 추출물의 항균활성은 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)와 농업유전자원센터 씨앗은행(KACC)에서 분양받은 그람음성균인 *Porphyromonas gingivalis* KCTC5352와 그람양성균인 *Staphylococcus epidermidis* KACC13234, *Streptococcus anginosus* KCTC33397, *S. criceti* KCTC19642, *S. downei* KCTC3634, *S. gordonii* KCTC3286, *S. mutans* KCTC3065, *S. sanguinis* KCTC3284, *S. sobrinus* KCTC3308 등의 균주를 대상으로 확인하였다. *P. gingivalis*는 tryptic soy agar hemin menadione (TSAHM) 배지에 계대한 다음 37°C에서 혐기배양하였고 *S. anginosus*는 tryptic soy agar (TSA; BD, Franklin Lakes, USA)에 계대한 다음 37°C에서 혐기배양하였다. *S. mutans*와 *S. sobrinus*는 brain-heart infusion agar (BHIA; BD, Franklin Lakes, USA)에 계대한 다음 37°C에서 혐기배양하였고 *S. criceti*, *S. downei*, *S. gordonii*, *S. sanguinis*는 tryptic soy yeast extract medium에 계대한 다음 37°C에서 혐기배양하였다. *S. epidermidis*는 polypeptone phosphate medium (PP-medium) 배지에 계대한 다음 30°C에서 배양하였다.

지리산 자생 식물인 노각나무의 잎과 가지는 (주)농업회사법인 모리(경상남도 거창군 소재)에서 제공받아 사용하였다. 노각나무의 잎과 가지는 건조한 다음 분쇄하여 각각 70% 에탄올에 침지한 다음 80°C에서 2시간 동안 3회 반복 추출하였다. 추출물은 Whatman filter paper (No. 2)로 여과한 후 회전감압농축기(Eyela, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 용매를 완전히 제거한 다음 dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma Aldrich, St. Louis, USA)에 용해하여 사용하였다. 노각나무 잎과 가지 조추출물의 추출수율은 38.9%, 18.6%였다.

### 추출물의 항균활성

구강미생물에 대한 추출물의 항균활성은 agar diffusion method[5]에 따라 구강미생물인 *P. gingivalis*, *S. epidermidis*, *S. anginosus*, *S. criceti*, *S. downei*, *S. gordonii*, *S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. sobrinus*를 각각 고체배지에 도말한 다음 추출물의 농도가 1 mg/disc인 paper disc (8 mm diameter, ADVANTEC, Tokyo, Japan)를 구강미생물이 도말된 고체배지에 얹어 배양한 후 paper disc 주위에 나타난 clear zone의 크기를 측정하여 조사하였다. 또한 노각나무 추출물과 시판되고 있는 구강케어

제품에 사용되고 있는 항균제의 항균활성을 비교하기 위해 chlorhexidine (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), sodium lauryl sulfate (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), triclosan (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) 등을 양성 대조구로 사용하여 agar diffusion method에 따라 항균활성을 측정하였다. 음성 대조구로는 용매인 DMSO를 사용하였다.

**노각나무 잎 추출물의 최소성장억제농도(MIC)와 최소살균농도(MBC) 측정**

노각나무 잎 추출물의 최소성장억제농도(minimal inhibitory concentration, MIC)는 액체 배지 희석법을 이용하여 조사하였다[14]. *P. gingivalis*는 37°C에서 48시간 동안 혐기배양한 다음 10<sup>4</sup>-10<sup>6</sup> CFU가 되도록 액체배지에 배양액을 희석한 후 희석된 배양액에 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 2.0 mg/ml 농도로 추출물을 처리하였다. *P. gingivalis*에 대한 추출물의 최소성장억제농도는 추출물을 처리한 배양액을 37°C에서 48시간 동안 혐기배양한 후 흡광도(600 nm)를 측정하여 *P. gingivalis*가 증식되지 않은 추출물의 최소 농도로 정하였다. 추출물의 최소 살균농도(minimal bactericidal concentration, MBC)는 *P. gingivalis*에 대한 추출물의 최소성장억제농도 이상의 농도로 추출물이 처리된 배양액을 고체배지에 도말한 후 37°C에서 48시간 동안 혐기배양한 다음 *P. gingivalis*의 균수가 99.9% 사멸된 추출물의 농도로 정하였다.

**노각나무 잎 추출물의 추출물에 의한 *P. gingivalis*의 생물막 바이오매스(biofilm biomass) 형성 억제**

노각나무 잎 추출물이 구강미생물의 생물막 형성에 미치는 영향은 Zhou 등[29]의 방법을 이용하여 조사하였다. *P. gingivalis*는 고체배지에 도말한 다음 48시간 동안 혐기배양한 후 액체배지에 현탁하여(O.D<sub>600</sub>=0.4-0.6) 96-well plate에 분주하였다. 추출물은 0.2-2.0 mg/ml의 농도로 *P. gingivalis*가 분주된 96-well plate에 처리한 다음 37°C에서 혐기배양하면서 생물막 바이오매스 형성을 유도하였다. 96-well plate에 형성된 생물막 바이오매스는 멸균 증류수를 이용하여 2회 세척한 다음 건조한 후 0.25% crystal violet으로 20분 동안 염색하였다. 생물막 바이오매스 형성 억제효과는 crystal violet에 염색된 바이오필름을 70% 에탄올에 용해한 다음 spectrophotometer (Softmax M5, Molecular Devices, USA)로 575 nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였다.

**주사전자현미경을 이용한 *P. gingivalis*의 생물막 관찰**

노각나무 잎 추출물이 *P. gingivalis*의 생물막 형성에 미치는 영향은 주사전자현미경(Scanning electron microscope, SEM; JEOL LTD., JSM-6701F, Japan)을 이용하여 추출물 처리에 의한 *P. gingivalis*의 생물막 형성 여부를 확인하였다. Coverslip (12 mm, SPL Ltd, Korea)이 들어있는 48 well-plate에 10<sup>4</sup>-10<sup>6</sup> CFU가 되도록 TSHM액체배지에 현탁한 *P. gingivalis* 배양액을 분주한 다음 추출물을 1 mg/ml이 되도록 처리한 후 37°C에서 48시간 동안 혐기배양하였다. 혐기배양한 48 well-plate의 coverslip은 PBS (Phosphate buffer saline, Bioneer, Daejeon, Korea) 완충용액에 2회 세척하였고 2.5% glutaraldehyde (Sigma Aldrich Co., USA)로 고정한 다음 30, 50, 60, 70, 80, 95, 99.5%의 에탄올을 순차적으로 처리하여 완전히 탈수한 후 실온에서 건조하였다. 건조된 시료는 platinum으로 코팅한 후 주사전자현미경을 이용하여 추출물을 처리하지 않은 대조구와 추출물을 처리한 처리구(1 mg/ml)에서 *P. gingivalis*의 생물막 형성 여부를 관찰하였다.

**노각나무 잎 추출물 처리에 따른 *P. gingivalis*의 섬모(fimbriae) 관련 mRNA 발현 변화**

노각나무 잎 추출물이 *P. gingivalis*의 섬모 관련 mRNA 발현에 미치는 영향은 *fimA*와 *mfa1* 유전자를 primer로 사용한 qRT-PCR로 확인하였다. *P. gingivalis*는 37°C에서 48시간 동안 혐기배양한 후 액체배지에 현탁하였고(O.D<sub>600</sub>=0.4-0.6) 액체배지에 현탁한 *P. gingivalis*에 0.2-1.0 mg/ml 농도로 추출물을 처리한 다음 37°C에서 배양하였다. Total RNA는 RNeasy Kit (Qiagen, Hillden, Germany)를 이용하여 추출물이 처리된 *P. gingivalis* 배양액을 원심분리하여 얻은 pellet으로부터 분리하였다. cDNA는 iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad, USA)를 이용하여 합성하였고 qRT-PCR은 CFX96 touch™ qRT-PCR detection system (Bio-Rad, USA)을 이용하여 수행하였으며 실험에 사용된 primer는 Table 1과 같다[14, 27]. PCR 반응은 ssoadvanced™ universal SYBR® green supermix (Bio-Rad, USA)를 사용하여 95°C에서 5분 동안 denaturation 시킨 후 95°C에서 1분, 52°C에서 1분, 72°C에서 30초씩 35 cycle을 반복하여 수행하였다. 증폭된 유전자의 정확성은 PCR 반응이 완료된 후 melt-curve analysis를 통해 확인하였고 유전자의 상대적 발현량은 endogenous control로 사용한 *P. gingivalis*의 housekeeping gene인 16S rRNA에 대한 *fimA*와 *fimB* 유전자의 상대적 mRNA 발현량으로 나타내었다.

Table 1. Oligonucleotides used for qRT-PCR in this study

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
16S rRNA	5'-ATC ACG AGG AAC TCC GAT TG -3'	5'-CGT TTA CTG CGT GGA CTA CC -3'
<i>fimA</i>	5'-GCG CAG CCT ACG ATA ACA TT-3'	5'- AAT GTT ATC GTA GGC TGC GC -3'
<i>mfa1</i>	5'-CGG ATA TCA GAT GGG TTG TTG-3'	5'- GTT TCG TTC CTA CCA GCA GC-3'

**통계처리**

모든 실험은 5회 이상 반복실험을 수행하였으며 SAS (Statistical analysis system, USA) program을 사용하여 실험 결과의 평균값과 표준오차는 구하였고 통계적 유의성 검정은 Duncan's 다중검정법으로  $p < 0.05$  수준에서 실시하였다.

**결과 및 고찰**

**노각나무 추출물의 항균활성**

국내 자생 식물인 노각나무의 잎과 가지 에탄올 추출물의 구강미생물에 대한 항균활성을 측정된 결과, 노각나무 잎과 가지 추출물은 구강미생물 중 *P. gingivalis*에 대해서만 항균활

Table 2. Antimicrobial activities of ethanol extracts (1 mg/ml) from leaves and branch of *S. koreana* against oral microorganisms

Oral bacteria	Conditions	Ethanol extracts from <i>S. koreana</i> (1 mg/ml)	
		Leaves	Branch
<i>P. gingivalis</i> KCTC5352		++	+
<i>S. anginosus</i> KCTC33397		-	-
<i>S. criceti</i> KCTC19642		-	-
<i>S. downei</i> KCTC3634		-	-
<i>S. epidermidis</i> KACC13234		-	-
<i>S. gordonii</i> KCTC3286		-	-
<i>S. mutans</i> KCTC3065		-	-
<i>S. sanguinis</i> KCTC3284		-	-
<i>S. sobrinus</i> KCTC3308		-	-

\*Growth inhibition size of clear zone: -, not detected; +, less than 5 mm; ++, more than 5 mm.

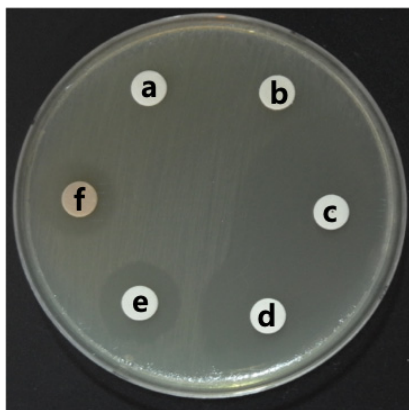


Fig. 1. Antimicrobial activity of ethanol extract of *S. koreana* leaves against *P. gingivalis* ATCC33277. a: DMSO as a negative control, b: ethanol as a negative control, c: sodium lauryl sulfate as a positive control (1 mg/disc), d: chlorhexidine as a positive control (1 mg/disc), e: triclosan as a positive control (1 mg/disc), f: ethanol extracts of *S. koreana* leaves (1 mg/disc).

성을 나타내었고 잎 추출물의 항균활성이 높게 나타났다 (Table 2). 시판되고 있는 구강케어제품에는 chlorhexidine, sodium lauryl sulfate, triclosan 등이 각각 0.1%, 0.2%, 0.3%의 농도로 사용되고 있다. *P. gingivalis*에 대한 chlorhexidine, sodium lauryl sulfate, triclosan의 항균활성과 *P. gingivalis*에 대한 추출물의 항균활성을 1 mg/disc의 농도에서 비교한 결과, 노각나무 잎 추출물은 *P. gingivalis*에 대해 triclosan과 유사한 항균활성을 나타내었다. 양이온성 항균 물질인 triclosan은 구강 내 세균들을 광범위하게 사멸시킬 수 있는 대표적인 항균제이지만 장기간 사용할 경우에는 치아나 연조직에 착색을 유발시킬 수 있고 미각변화의 가능성이 있는 것으로 알려지면서 이를 대체할 수 있는 항균소재에 대한 수요가 증가하고 있다[9]. 따라서 노각나무 잎 추출물은 *P. gingivalis*에 대해 항균활성이 있는 천연물유래 구강건강소재로써 개발 가능성이 있다고 판단된다.

***P. gingivalis* KCTC5352에 대한 노각나무 잎 추출물의 최소성장억제 농도(MIC) 및 최소살균농도(MBC)**

노각나무 잎 추출물은 구강미생물 중 *P. gingivalis*에 대해 우수한 항균활성을 나타내었으며 노각나무 잎 추출물 처리에 따른 *P. gingivalis*의 최소성장억제농도(MIC)는 0.4 mg/ml였으며 0.4-2 mg/ml의 추출물 처리농도에서 *P. gingivalis*에 대한 노각나무 잎 추출물의 항균활성은 농도의존적으로 증가하였다. *P. gingivalis*에 대한 노각나무 잎 추출물의 최소성장억제농도를 확인한 후 최소살균농도(MBC)를 확인한 결과, 최소성장억제농도인 0.4 mg/ml 및 그 이상의 농도에 해당하는 *P. gingivalis* 배양액을 노각나무 추출물이 첨가되지 않은 고체배지에 도말한 후 배양하였을 때 최소성장억제농도인 0.4 mg/ml 및 그 이상의 농도에서  $2 \times 10^2$  CFU/ml 이상의 colony가 관찰되었기 때문에 노각나무 추출물은 *P. gingivalis*에 대해 정균작용을 하는 것으로 판단된다(Table 3).

황기 추출물의 *P. gingivalis* 억제효과에 관한 Choi 등[4]의 연구에서 황기추출물은 5 mg/ml 이상의 농도에서 *P. gingivalis*에 대해 유의적인 성장억제 효과를 나타내었고 10 mg/ml, 20 mg/ml에서 사멸효과를 나타내었다. 따라서 노각나무 추출물은 황기 추출물에 비해 낮은 농도에서 항균활성을 나타내기 때문에 노각나무 추출물을 천연물유래 구강건강소재로써 사용할 경우 경제성이 있을 것으로 판단된다.

**노각나무 잎 추출물이 *P. gingivalis*의 생물막 바이오매스 형성에 미치는 영향**

노각나무 잎 추출물이 *P. gingivalis*의 생물막 바이오매스 형성에 미치는 영향은 Zhou 등[31]의 양적 분석방법을 이용하여 조사하였으며 *P. gingivalis* 배양액에 추출물을 0.4-2.0 mg/ml 농도로 처리하였을 때, *P. gingivalis*의 생물막 형성이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 2.0

Table 3. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of leaf extracts of *S. koreana* against *P. gingivalis*

	Concentration (mg/ml)						
	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	2.0
Minimum inhibitory concentration	+ <sup>a</sup>	+	+/- <sup>c</sup>	- <sup>b</sup>	-	-	-
Minimum bactericidal concentration	+	+	+	+	+	+	+

<sup>a</sup>, growth on test medium; <sup>b</sup>, no growth on test medium; <sup>c</sup>, slow growth on test medium.

mg/ml 농도의 추출물이 처리된 배양액에서 *P. gingivalis*의 바이오필름 형성율은 각각 96.9±0.99%, 73.4±0.82%, 70.2±0.66%, 62.1±0.24%, 38.7±0.1%, 29.2±0.15%로서 추출물의 농도가 높아질수록 생물막 형성이 농도의존적으로 억제되는 것을 확인할 수 있었고 *P. gingivalis*의 생육도 추출물의 농도 (0.2-2.0 mg/ml)가 높아질수록 농도의존적으로 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 이는 강황에서 분리된 curcumin의 *P. gingivalis*의 생물막 생성 억제와 병원성인자(virulence factor) 발현 억제에 관한 연구에서 curcumin의 농도가 높아질수

록 생물막 생성을 및 병원성인자의 발현이 억제된다는 Kumbar등[16]의 보고와도 일치하는 결과이다. 따라서 노각나무 추출물은 치주질환 원인균인 *P. gingivalis*에 대해 항균활성과 생물막 형성 억제 효과가 있는 천연물유래 구강건강소재로써 개발 가능성이 있다고 판단된다.

**노각나무 잎 추출물이 *P. gingivalis*의 생물막 형성에 미치는 영향 관찰**

노각나무 잎 추출물이 *P. gingivalis*의 생물막 형성에 미치는

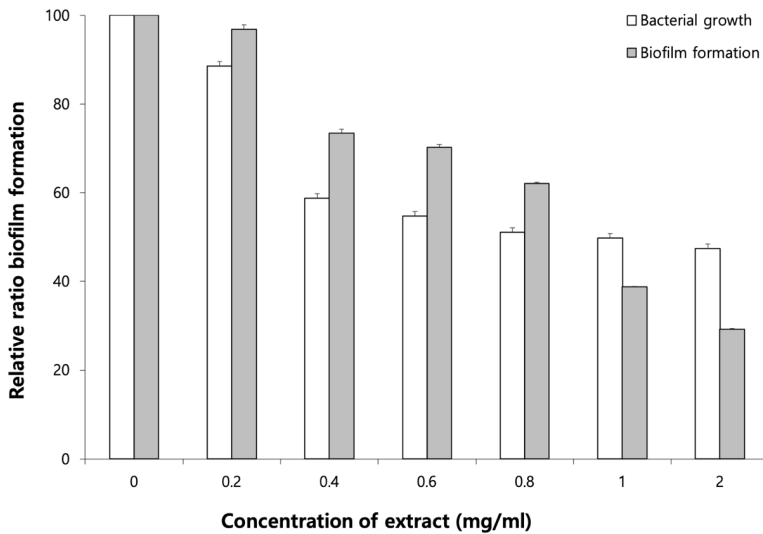


Fig. 2. Bacterial growth and biofilm formation of *P. gingivalis* KCTC5352 in tryptic soy hemin menadione broth treated with ethanol extract of *S. koreana* leaves (0.2-2.0 mg/ml). Growth and biofilm formation were measured under anaerobic condition. All assays were performed in triplicate, and mean values and standard deviations are shown.

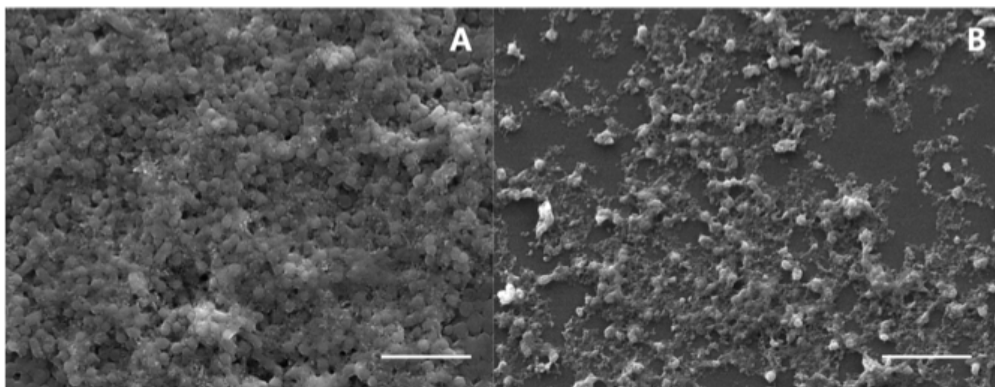


Fig. 3. Scanning electron microscopy (SEM) micrographs, at 10,000X magnification, of *P. gingivalis* KCTC5352 biofilms in the absence (A) and presence (D) of *S. koreana* leaves extract (1 mg/ml). Scale bar, 5 μm.

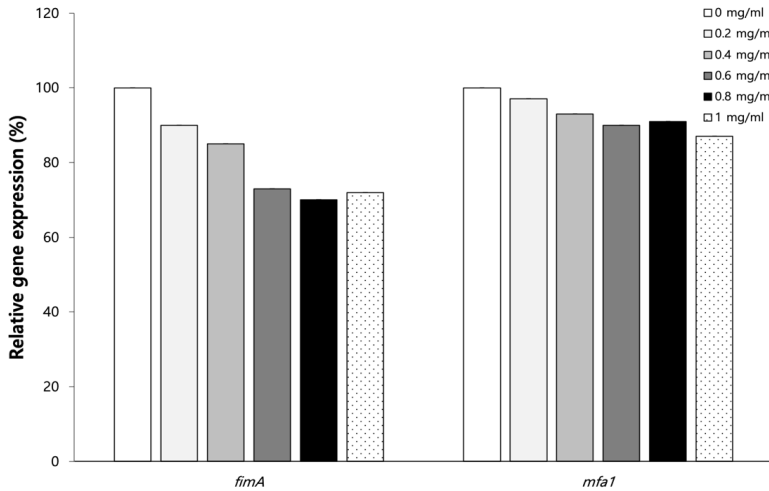


Fig. 4. Effects of ethanol extract of *S. koreana* leaves on mRNA expression of *fimA* and *mfa1* genes in *P. gingivalis* KCTC5352 by qRT-PCR analysis. The mRNA expression was normalized to 16S rRNA gene used as a reference gene. Results are shown as the  $\pm$  SD of five replicates. \* $p < 0.05$ , as compared with the control.

영향을 확인하기 위해 노각나무 잎 추출물을 1 mg/ml의 농도로 처리한 *P. gingivalis*와 추출물을 처리하지 않은 대조구를 주사전자현미경으로 관찰한 결과는 Fig. 3과 같다. 추출물을 처리하지 않은 대조구는 추출물 처리구에 비해 *P. gingivalis*가 군집을 이루며 모여 있고 *P. gingivalis* 주변에 생물막이 형성된 것을 관찰할 수 있었지만 1 mg/ml 농도의 추출물이 처리된 처리구는 대조구에 비해 *P. gingivalis*가 독립적으로 존재하고 있었으며 *P. gingivalis* 주변에서 생물막이 관찰되지 않았다 (Fig. 3). Zhang 등[28]의 *P. gingivalis*에 대한 정향(*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry) 오일(oil)에서 분리된 eugenol의 항균활성과 바이오필름 억제에 관한 보고에 의하면 eugenol을 처리하지 않은 대조구의 경우 *P. gingivalis*는 군집을 이루고 있고 바이오필름을 형성된 반면 31.25  $\mu$ M의 eugenol을 처리한 처리구의 *P. gingivalis*는 흩어져 있으며 바이오필름의 파괴와 두께가 감소한 것을 확인할 수 있었다. 본 연구결과도 추출물을 처리한 처리구의 *P. gingivalis*가 군집을 이루지 않고 독립적으로 존재한다는 점에서는 Zhang 등[28]의 보고와 일치하였다.

#### 노각나무 잎 추출물 처리에 따른 *P. gingivalis*의 섬모 (fimbriae) 관련 mRNA 발현 변화

노각나무 잎 추출물이 *P. gingivalis*의 섬모 관련 mRNA 발현에 미치는 영향은 *fimA*와 *mfa1* 유전자를 primer로 이용한 qRT-PCR로 확인하였으며 그 결과는 Fig. 4에 나타내었다. qRT-PCR을 이용하여 추출물(0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/ml) 처리 농도에 따른 *fimA*와 *mfa1* 유전자의 발현 변화를 확인한 결과, *P. gingivalis*의 *fimA*와 *mfa1* 유전자의 발현은 추출물의 농도가 높아질수록 농도의존적으로 억제되는 경향을 나타내었다.

*P. gingivalis*는 치아표면에 부착하여 바이오필름을 형성하면서 병원성 인자인 섬모와 단백질분해효소를 암호화하는 유전자 *fimA*, *hagA* 및 *hagB*와 *rgpA*, *rgpB* 및 *kgp*를 가지고 있다. 이 중에서 섬모(fimbriae)는 세균의 외막에 부착된 단백질성

부속기(proteinaceous appendages)로서 생물막 형성과정 중 초기 부착단계에 관여한다. *P. gingivalis*의 외막에는 긴 섬모와 짧은 섬모가 있는데 긴 섬모는 FimA subunit으로 구성되어 있고 짧은 섬모는 Mfa1 subunit으로 구성되어 있다. 긴 섬모인 FimA는 *P. gingivalis*가 치은 섬유모세포와 상피 세포 부착하는데 필수적이기 때문에 치면세균막 형성에 관여하고 *P. gingivalis*와 *S. gordonii*의 autoaggregation에도 관여한다[6]. 섬모를 암호화하는 유전자인 *fimABCDE* 유전자는 *fim* 클러스터(cluster)를 이루고 있으며 *fimA* 유전자 결손 돌연변이체는 인간 치은 섬유 모세포 및 상피 세포에 대한 부착을 감소시켜 *P. gingivalis*가 치은연하(subgingival)에서 바이오필름을 형성할 수 없다[24]. 따라서 노각나무 잎 추출물의 처리 농도에 따라 *fimA*와 *mfa1* 유전자 발현이 감소하였다는 것은 바이오필름 형성 단계에서 *P. gingivalis*의 초기 치은 섬유 모세포 및 상피 세포 부착이 저해됨을 나타낸다. 이상의 결과를 종합하면 노각나무 추출물은 *P. gingivalis*에 대한 항균 활성뿐만 아니라 바이오필름 형성을 억제할 수 있기 때문에 노각나무 추출물이 구강건강 개선소재로 개발된다면 치주질환을 유발하는 원인균의 생육을 억제하거나 사멸시키는 것이 아니라 치주질환을 유발하는 원인균의 병원성 인자 발현을 억제하여 항균활성을 나타내는 새로운 치주질환 예방 및 치료 전략을 제시할 수 있을 것으로 기대된다.

#### 감사의 글

본 연구는 2020년 노각나무 유래 식의약품 소재개발 및 산업화 연구 용역 지원에 의하여 수행된 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

#### The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest

with the contents of this article.

## References

- Back, H. S., Kang, S. K., Auh, K. S., Chun, Y. S. and Hong, J. P. 2013. Effect of antibacterial effects of myrrh, rhatany, chamomomilla against to oral microorganisms. *J. Oral Med. Pain* **38**, 299-312.
- Bui, F. Q., Almeida-da-Silva, C. L. C., Huynh, B., Trinh, A., Liu, J., Woodward, J., Asad, H. and Ojcius, D. M. 2019. Association between periodontal pathogens and systemic disease. *Biomed. J.* **42**, 27-35.
- Choi, H. J., Heo, N. S., Choi, Y. W., Lee, Y. G., Jeong, Y. K. and Joo, W. H. 2012. Antimicrobial and anti-halitosis effects of *Alnus firma* extracts. *J. Life Sci.* **22**, 1071-1076.
- Choi, Y. R., Choi, M. S., Kwun, H. S. and Nam, S. H. 2019. The inhibitory effect of *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) on *Astragali radis* extract. *J. Kor. Soc. Oral Health* **7**, 46-50.
- Davidson, P. M. and Parish, M. E. 1989. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technol.* **43**, 148-152.
- Gerits, E., Verstraeten, N. and Michiels, J. 2017. New approaches to combat *Porphyromonas gingivalis* biofilms. *J. Oral Microbiol.* **9**, 1300366.
- Han, S. M., Hong, I. P., Woo, S. O., Park, K. K. and Chang, Y. C. 2016. Anticariogenic activity purified bee venom (*Apis mellifera* L.) against four cariogenic bacteria. *Kor. J. Pharmacogn.* **47**, 43-48.
- Hwang, Y. J., Cho, Y. S. and Lee, S. Y. 2015. Awareness and satisfaction of health insurance coverage of dental scaling. *J. Dent. Hyg. Sci.* **15**, 620-627.
- James, P., Worthington, H. V., Parnell, C., Harding, M., Lamont, T., Cheung, A., Whelton, H. and Riley, P. 2017. Chlorhexidine mouthrinse as an adjunctive treatment for gingival health. *Cochrane Database Syst. Rev.* **3**, CD008676.
- Jang, J. H. 2011. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of phenolic compounds from stems of *Stewartia koreana* Nakai. M.S. dissertation, Chung-ang University, Seoul, Korea.
- Kim, H. S. and Cho, S. J. 2019. Antibacterial and antibiofilm activities of *Alnus japonica* stem extract against *Porphyromonas gingivalis*. *J. Life Sci.* **29**, 1386-1392.
- Kim, H. S., Kwon, H. S., Kim, C. H., Lee, S. W., Sydara, K. and Cho, S. J. 2018. Effects of methanol extracts from *Diospyros malabarica* stems on growth and biofilm formation of oral bacteria. *J. Life Sci.* **28**, 110-115.
- Kim, M. H., Jang, J. H., Oh, M. H., Heo, J. H. and Lee, M. W. 2014. The comparison of DPPH-scavenging capacity and anti-inflammatory effects of phenolic compounds isolated from the stems of *Stewartia koreana* Nakai. *Nat. Prod. Res.* **28**, 1409-1412.
- Kim, S. Q., Shin, M. K., Auh, Q. S., Lee, J. Y., Hong, J. P. and Chun, Y. H. 2007. Effect of phytoncide on *Porphyromonas gingivalis*. *J. Oral Med. Pain* **32**, 137-150.
- Kim, S. Y., Woo, D. H., Lee, M. A., Kim, J. S. and Lee, J. H. 2017. Red fluorescence of oral bacteria interacting with *Porphyromonas gingivalis*. *J. Kor. Acad. Oral Health* **41**, 22-27.
- Kumbar, V. M., Peram, M. R., Kugaji, M. S., Shah, T., Patil, S. P., Muddapur, U. M. and Bhat, K. G. 2020. Effect of curcumin on growth, biofilm formation and virulence factor gene expression of *Porphyromonas gingivalis*. *Odontology* doi: 10.1007/s10266-020-00514-y.
- Lee, J. Y. and Lee, M. O. 2016. Influential factors for the knowledge and awareness of adults on periodontal diseases and their belief. *JKCA.* **16**, 295-307.
- Lee, T. H., Lee, G. W., Kim, C. W., Bang, M. H., Baek, N. I., Kim, S. H., Chung, D. K. and Kim, J. 2010. *Stewartia koreana* extract stimulates proliferation and migration of human endothelial cells and induces neovasculization *in vivo*. *Phytother. Res.* **24**, 20-25.
- Lee, T. H., Lee, G. W., Park, K. H., Mohamed, M. A., Bang, M. H., Baek, Y. S., Son, Y., Chung, D. K., Baek, N. I. and Kim, J. 2014. The stimulatory effects of *Stewartia koreana* extract on the proliferation and migration of fibroblasts and the wound healing activity of the extract in mice. *Int. J. Mol. Med.* **34**, 145-152.
- Marsh, P. D. 2004. Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res.* **38**, 204-211.
- Marsh, P. D. 2006. Dental plaque as a biofilm and a microbial community-implications for health and disease. *BMC Oral Health* **6**, S14.
- Nagano, K., Abiko, Y., Yoshida, Y. and Yoshimura, F. 2012. *Porphyromonas gingivalis fimA* fimbriae: roles of the *fim* gene cluster in the fimbrial assembly and antigenic heterogeneity among *fimA* genotypes. *J. Oral Biosci.* **54**, 160-163.
- Park, C. K., Kim, H. J., Kwak, H. B., Lee, T. H., Bang, M. H., Kim, C. M., Lee, Y. K., Chung, D. K., Baek, N. I., Kim, J., Lee, Z. H. and Kim, H. H. 2007. Inhibitory effects of *Stewartia koreana* on osteoclast differentiation and bone resorption. *Int. Immunopharmacol.* **7**, 1507-1516.
- Park, H. R. and Hong, S. J. 2015. Research on natural medicine for wellness and oral health. *J. Digital Convergence* **13**, 357-363.
- Roh, H. J. 2015. Phytochemical constituents and whitening effects of *Stewartia pseudocamellia* Maxim. leaves. M.S. dissertation, Sungkyunkwan University, Seoul, Korea.
- Roh, H. J., Noh, H. J., Na, C. S., Kim, C. S., Kim, K. H., Hong, C. Y. and Lee, K. R. 2015. Phenolic compounds from the leaves of *Stewartia pseudocamellia* Maxim. and their whitening activities. *Biomol. Ther.* **23**, 283-289.
- Van der Ploeg, J. R., Giertsen, E., Lüdin, B., Mörgeli, C., Zinkernagel, A. S. and Gmür, R. 2004. Quantitative detection of *Porphyromonas gingivalis fimA* genotypes in dental plaque. *FEMS Microbiol. Lett.* **232**, 31-37.
- Zhang, Y., Wang, Y., Zhu, X., Cao, P., Wei, S. and Lu, Y. 2017. Antibacterial and antibiofilm activities of eugenol from essential oil of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry (clove) leaf against periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Microb. Pathog.* **113**, 396-402.
- Zhou, L., Ding, Y., Chen, W., Zhang, P., Chen, Y. and Lv, X. 2013. The *in vitro* study of ursolic acid and oleanolic acid inhibiting cariogenic microorganisms as well as biofilm. *Oral Dis.* **19**, 494-500.

## 초록 : *Porphyromonas gingivalis*에 대한 노각나무 잎 추출물의 항균활성 및 생물막 형성 억제 효과

김혜수<sup>1</sup> · 박민정<sup>1</sup> · 김수정<sup>1</sup> · 김부경<sup>1</sup> · 박준호<sup>2</sup> · 김대현<sup>2</sup> · 조수정<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>경상국립대학교 제약공학과, <sup>2</sup>경남산림환경연구원)

본 연구에서는 천연물유래 구강건강 개선소재로써 노각나무의 이용 가능성을 알아보기 위해 노각나무 잎과 줄기를 에탄올에 추출한 다음 구강미생물에 대한 추출물의 항균활성을 조사하였다. 노각나무 잎과 줄기 추출물(1 mg/disc)은 구강미생물 중 *P. gingivalis* KCTC5352에 대해서만 항균활성을 나타내었으며 줄기보다는 잎 추출물의 항균활성이 우수하였다. 시판되고 있는 구강케어제품에 사용되고 있는 항균제와 노각나무 잎 추출물의 항균활성을 비교한 결과, *P. gingivalis*에 대한 노각나무 잎 추출물과 양성대조구로 사용한 triclosan의 항균활성은 유사하게 나타났으며, *P. gingivalis*에 대한 노각나무 잎 추출물의 MIC는 0.4 mg/ml이고 정균작용을 하였다. 노각나무 잎 추출물이 0.2-2.0 mg/ml 농도로 처리된 배양액에서 *P. gingivalis* KCTC5352의 생물막 형성과 세균 생육은 추출물의 농도가 증가할수록 농도의존적으로 억제되는 경향을 보였다. 또한 노각나무 잎 추출물(1 mg/ml) 처리가 *P. gingivalis*의 생물막 형성에 미치는 영향을 주사전자현미경으로 관찰한 결과에 의하면 추출물을 처리하지 않은 대조구는 추출물 처리구에 비해 *P. gingivalis*가 군집을 이루며 모여 있었고 세포 주변에서 생물막이 관찰되었지만 추출물을 처리한 처리구의 세포 주변에서는 생물막을 관찰할 수 없었다. qRT-PCR을 이용하여 생물막 형성 초기 과정에서 치면 부착에 필수적인 섬모(fimbriae)관련 mRNA 발현 양상을 조사한 결과, 노각나무 잎 추출물이 0.2-2.0 mg/ml의 농도로 처리된 배양액에서 *fimA*와 *mfa1* 유전자 발현은 추출물의 농도가 높아질수록 농도의존적으로 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 이상의 결과를 종합하면 노각나무 잎 추출물은 치주질환 원인균인 *P. gingivalis*에 대한 항균 활성과 생물막 형성 억제능이 우수하기 때문에 천연물유래 구강건강 개선소재로써 이용 가능성이 높을 것으로 판단된다.