Journal of The Korea Convergence Society
Vol. 13. No. 4, pp. 653-657, 2022
e-ISSN 2713-6353
DOI : https://doi.org/10.15207/JKCS.2022.13.04.653

댓잎 추출물이 구강미생물에 미치는 항산화 및 항균 효과

황혜정[1], 김도경[2], 강경희[3*]
[1]건양사이버대학교 보건의료복지학과 교수, [2]가톨릭대학교 의과대학 박사후연구원, [3]건양대학교 치위생학과 교수

Antioxidant and antibacterial effect of bamboo leaves extract on oral bacteria

Hye-Jeong Hwang[1], Dokyeong Kim[2], Kyung-hee Kang[3*]
[1]Professor, Department of Health & Welfare Management, Konyang Cyber University
[2]Researcher, Precision Medicine Research Center, College of Medicine, The Catholic University of Korea
[3]Professor, Department of Dental Hygiene, Konyang University

요 약 구강 질환은 전 세계적으로 심각한 건강 및 경제적 부담을 야기하여 사람들의 삶의 질을 크게 저하시킨다. 대표 구강질환인 치아우식증은 *S. mutans*에 의해 발생한다. 또한, 구강 병원성 미생물에는 면역 반응이 일어나면서 다양한 구강 질환을 유발할 수 있는 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS)가 함유되어 있다. 본 연구의 목적은 구강 질환을 조절하기 위해서 대나무 잎 추출물(BLE)의 항산화 및 항균 효과를 조사하는 것이다. THP-1, oral fibroblasts, S mutans 배양액에 댓잎 추출물을 0-8% 농도별로 처리하여 실험을 진행하였다. 그 결과 단핵세포주와 구강섬유아세포에서 BLE 농도에 따른 항산화 효과를 확인하였다. 또한, BLE 농도에 따른 S. mutans의 항균 효과를 입증하였다. 따라서 BLE가 구강질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있음을 시사한다.

주제어 : *S. mutans*, LPS, 대나무 잎 추출물, 항산화, 항균, 융합

Abstract Oral disease causes a significant health and economic burden worldwide, significantly reducing people's quality of life. Dental caries, a representative oral disease, is caused by *S. mutans*. Oral pathogenic microorganisms contain lipopolysaccharide (LPS), which can cause an immune response and cause various oral diseases. The purpose of this study was to investigate the antioxidant and antibacterial effects of bamboo leaf extract (BLE) to control oral diseases. THP-1, oral fibroblasts, and S mutans culture medium were treated with bamboo leaf extract at different concentrations of 0-8% to conduct the experiment.. As a result, the antioxidant effect according to the BLE concentration was confirmed in mononuclear cell lines and oral fibroblasts. In addition, the antibacterial effect of S. mutans according to the BLE concentration was demonstrated. Therefore, BLE can be used for the prevention or treatment of oral diseases.

Key Words : *S. mutans*, LPS, Bamboo leaves extract, Antioxidant, Antibacterial, Convergence

*This work was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government (Ministry of Education) (NRF-2017R1D1A1B03035544).
*Corresponding Author : Kyung-hee Kang(dhkhkang@konyang.ac.kr)
Received March 16, 2022 Revised March 26, 2022
Accepted April 20, 2022 Published April 28, 2022

1. 서론

사람의 구강에는 약 700여종의 미생물들이 서식하고 있으며, 치아우식증 및 치주질환과 같은 다양한 구강질환과 밀접한 관련이 있다[1]. 구강 질환은 전 세계적으로 가장 만연한 질병 중 하나로 심각한 건강 및 경제적 부담을 야기하고 사람들의 삶의 질을 크게 저하시킨다. 특히, 대표적인 구강 질환 중 치아우식증은 구강에 상재하고 있는 *Streptococcus mutans*(*S. mutans*)에 의해서 발생하고, 치주질환을 일으키는 미생물은 *Porphyromonas gingivalis*(*P. gingivalis*), *Prevotella intermedia*(*P. intermedia*), *Tannerella forsythia*(*T. forsythia*), *Fusobacterium nucleatum*(*F. nucleatum*), *Treponema denticola*(*T. denticola*) 등이 관련이 있다[2,3]. 이들 대부분의 병원성 미생물은 대식세포, 수지상세포 등의 면역 세포를 활성화할 수 있는 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS)를 갖고 있어 면역반응이 일어나면서 구강 질환을 유발할 수 있다. 이러한 구강 질환을 예방 및 치료하는 방법으로는 스케일링이나 칫솔질을 이용하여 물리적으로 미생물을 제거하거나 화학제재를 이용하는 방법이 있다. 또한, 구강 내 미생물의 증식을 억제 또는 방지할 수 있는 기능성 경구 제품이 많이 개발되고 있다[4,5]. 그러나 최근 들어 인체에 대한 위해작용 및 내성 등의 부작용에 대한 우려로 안전하게 사용할 수 있는 천연물에 대한 관심이 높아지고 있다.

대나무(Bamboo)는 다년생 식물로 한국, 중국, 일본, 러시아를 비롯한 아시아 국가에 널리 분포되어 있다[6]. 대나무 식물의 뿌리와 잎은 식용과 약용으로 널리 사용되었다. 대나무 잎 추출물(bamboo leaves extract, BLE)은 플라보노이드, 폴리페놀 및 활성 다당류와 같은 활성 성분이 포함되어 있고, 항염, 항지방생성, 항산화, 항염 및 항균 효과가 있는 것으로 알려져 있다[7,8,9]. 이전 연구에서 BLE를 양치액으로 사용하면 구강 병원성 미생물이 현저히 감소한 것으로 보고되었다[10]. 하지만 세포를 이용한 BLE의 항산화 및 항균 효과에 대한 연구가 선행되지 않았다.

본 연구에서는 사람 유래 면역세포와 구강섬유모세포에 LPS를 자극해서 BLE의 항산화를 검증하고, 치아우식증을 일으킨다고 알려진 대표 균주인 *S. mutans*에서 BLE의 항균 효과를 규명하고자 하였다.

2. 연구방법

2.1 추출물 준비

국내산 100% 솔잎가루를 연구재료로 구입하여 사용하였다. Ethanol 600 mL에 솔잎가루 60g을 혼합하여 24시간 동안 상온에서 보관 후, 침전물을 vacuum 여과기를 이용하여 여과시켰다. 여과된 추출물은 감압농축기를 이용하여 농축하고, 동결건조 후 보관하여 연구에 사용하였다.

2.2 세포 배양

인간 단핵세포주인 THP-1은 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 분양받았다. 인간 구강섬유모세포(human normal oral fibroblasts, hNOF)는 사람 치은에서 채취하였고 hTERT를 transfection하여 불멸화시킨 세포로 hTERT-hNOF라 표기하였다. 이 세포는 연세대학교 치과대학 구강병리학교실에서 제공받았다. THP-1 세포는 RPMI 1640가 기본 배양액이며, hTERT-hNOF는 DMEM/F12 medium을 3:1로 섞은 배양액이 기본 배양액으로 각 배양액에 10% fetal bovine serum (FBS)와 0.1 mg/mL streptomycin, 100 U/mL penicillin를 첨가해서 37℃, 5% CO_2 조건을 유지하는 배양기에서 배양하였다.

2.3 ROS 측정

THP-1는 6-well plates(2×10^5 cells/well), hTERT-hNOF는 6-well plates(3×10^5 cells/well)에 seed하고 추출물을 농도별로 2시간 동안 전처리한 후 LPS (InvivoGen, San Diego, CA, USA)를 24시간 동안 자극시켰다. 자극된 세포는 PBS로 세척한 후 DCFDA (Abcam, Cambridge, MA, USA)로 30분간 염색되었고 총 10,000개의 세포로 계산되었다. 생존 가능한 세포는 their forward- and side-scatter profile을 기반으로 게이트 되었다. 시료는 BD FACSCalibur Flow Cytometer (BD Biosciences)를 사용하여 측정하였고 데이터는 BD CellQuest Pro 소프트웨어(BD Biosciences)를 사용하여 분석되었다.

2.4 *S. mutans* 배양

한국생물자원센터(KCTC)으로부터 *S. mutans* KCTC 3065를 분양받아 37℃ 배양기에서 Brain Heart

Infusion(BHI, Difco, USA) 액체배지에 12시간 배양했다. 박테리아는 플레이트 리더(BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)를 이용해서 광학밀도(optical density, OD)600에서 0.5로 측정해서 ~10^9 농도로 맞추고 실험을 진행하였다.

3. 연구결과

3.1 단핵세포주에서 추출물 농도에 따른 항산화 효과

THP-1에 LPS로 염증을 유도하고 댓잎추출물을 농도별로 처리하여 세포 내 ROS 발현을 조절하는지 알아보기 위해서 flow cytometry로 확인하였다. LPS 자극에 의해 ROS 발현이 현저하게 증가되는 것을 확인하였다. 댓잎추출물을 1~4% 농도별로 전처리하고 LPS를 자극시키면 ROS 발현이 농도 의존적으로 감소되었다(Fig. 1).

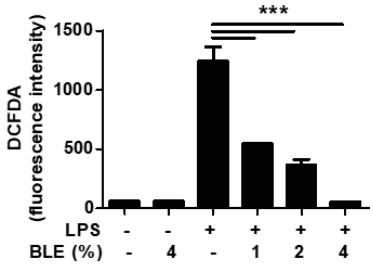

Fig. 1. Effect of reducing ROS expression of BLE on THP-1 cells

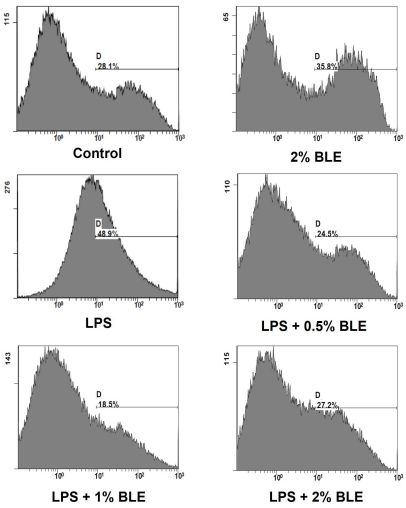

Fig. 2. Effect of inhibiting ROS expression of BLE on hTERT-hNOF cells

3.2 구강섬유모세포에서 추출물 농도에 따른 항산화 효과

hTERT-hNOF에서 댓잎추출물의 항산화 효과를 확인하기 위해서 세포에 LPS로 염증을 유도하고 댓잎추출물을 농도별로 처리하여 ROS 변화를 확인하였다. 그 결과, LPS 자극에 의해 증가된 ROS의 발현이 댓잎추출물을 0.5, 1, 2%로 처리하였을 때 감소한 것을 관찰하였다(Fig. 2).

3.3 추출물 농도에 따른 *S. mutans*의 항균효과

댓잎추출물이 치아우식증을 일으키는 대표 균주인 *S. mutans*에 대한 항균 효과에 영향을 미치는지 조사했다. BHI 액체배지에 *S. mutans*을 ~10^7 농도에 댓잎추출물 0, 2, 4, 8%를 각각 첨가해서 12시간 동안 37℃ 배양기에 배양한 뒤 100 μL씩 시료 채취하여 흡광도를 측정하였다. *S. mutans*를 단독으로 배양했을 때보다 댓잎추출물과 같이 배양한 시료에서 균 성장이 유의적으로 감소하였다(Fig. 3).

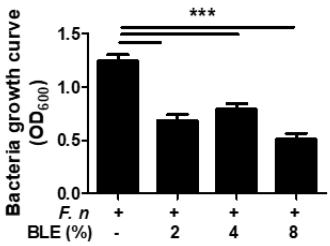

Fig. 3. Antibacterial effect of BLE on *S. mutans*

4. 고찰 및 결론

구강 질환은 만성질환 중 가장 흔한 질환으로 유병률, 개인과 사회에 미치는 영향, 치료비용 등으로 인해 중요한 공중보건 문제이다[11]. 사람들의 삶의 질이 향상되고 수명이 연장됨에 따라 구강 건강에 대한 관심도가 높아지고 있다. 대부분의 구강질환은 구강 병원미생물 감염에 의해 발생하며 전신 건강과도 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되고 있다[11].

구강 병원미생물에 의한 염증반응으로 대표적인 LPS가 있다. LPS는 그람 음성세균의 핵심 병독력인자로 다양한 염증-매개물질을 유도하여 단핵구/대식세포, 림프구와 같은 면역세포를 질환부위로 몰려오게 한다[12,13]. 염증으로 인해 세포내 산화 스트레스가 ROS을 증가시켜 세포손상을 일으키는 유전자 산물인 미토콘

드리아의 손상, 세포 또는 조직의 손상과 염증, 노화와 관련한 변성, 종양 생성 등을 생성한다[14]. ROS를 조절하는 방어기전으로 항산화 효소들이 존재하고 질병의 발생은 항상성이 이들 사이에서 깨지게 되면 증가하게 된다. 따라서 본 연구에서는 BLE가 단핵세포주인 THP-1에서 LPS에 의해 증가되는 ROS의 발현을 조절하는지 확인하였다. 또한, 구강섬유모세포인 hTERT-hNOF는 치주조직의 치유와 재생에 중요하며 ROS에 의한 조직파괴를 BLE가 억제할 수 있는지 확인하였다. 이에 BLE가 THP-1 및 hTERT-hNOF에서 LPS에 의한 ROS 발현을 BLE가 현저하게 감소시키는 것을 나타냈다 (Fig. 1과 2).

구강질환 중에서 치아우식증을 일으키는 *S. mutans*을 대표해서 BLE의 항균 효과를 관찰하였다.이전 연구에서 한국인 대상으로 BLE를 양치액을 사용해 본 결과, 구강 병원미생물의 수가 감소하였다[10]. 따라서 *S. mutans*을 단독으로 배양해서 BLE의 직접적인 항균 효과를 보았을 때 유의적으로 박테리아 성장이 억제되는 것을 확인하였다. BLE 이외에도 오래전부터 천연유래 물질을 이용하여 각종 질병을 예방하고 치료하기 위기 위한 연구가 진행되어 왔다. 감귤류 산업의 폐기물인 레몬 껍질을 사용해서 *S. mutans*, *P. intermedia* 및 *P. gingivalis*에 대해 높은 항균과 항산화 활성이 보고되었다[15]. 또한, 국화과의 인진쑥은 *P. intermedia* 및 *P. gingivalis* 에 대해 항균 효과가 있는 것으로 보고되었다[16].

본 연구에서 몇가지 한계점이 있다. 먼저, BLE의 항산화 현상을 보여주었고 기전에 대한 연구가 부족하다. 또한, 항염증에 대한 연구가 진행되지 않았다. 따라서 향후 BLE를 이용하여 항산화 기전과 항염증 작용에 대한 연구를 진행하고자 한다.

REFERENCES

[1] Jørn A Aas et al. (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. Journal of Clinical Microbiology, 43(11):5721-32.
DOI : 10.1128/JCM.43.11.5721-5732.2005

[2] W. J. Loesche. (1986). Role of Streptococcus mutans in human dental decay. *Microbiology Reviews, 50(4),* 353-380.
DOI : 10.1128/mr.50.4.353-380.1986

[3] J. M Lovegrove. (2004). Dental plaque revisited: bacteria associated with periodontal disease. *Journal of the New Zealand Society of Periodontology, (87),* 7-21.

[4] S. H. Shin & O. J. Baek (2020). Anti-microbial Activity of Bamboo Extract Against Oral Microbes. *The Journal of the Korea Contents Association, 20(12),* 454-459.
DOI : 10.5392/JKCA.2020.20.12.454

[5] P. James et al. (2017). Chlorhexidine mouthrinse as an adjunctive treatment for gingival health. *Cochrane Database of Systematic Reviews, (3),* CD008676.
DOI : 10.1002/14651858.CD008676.pub2

[6] S. Okabe et al. (2017). Stimulatory effect of the water extract of bamboo grass (Folin solution) on gastric acid secretion in pylorus-ligated rats. *Japanese Journal of Pharmacology, 25(5),* 608-9.
DOI : 10.1254/jjp.25.608.

[7] C. Hu et al. (2000). Evaluation of antioxidant and prooxidant activities of bamboo Phyllostachys nigra var. henonis leaf extract in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48(8),* 3170-6.
DOI : 10.1021/jf0001637

[8] J. H. Yang et al. (2017). Potent Anti-Inflammatory and Antiadipogenic Properties of Bamboo (Sasa coreana Nakai) Leaves Extract and Its Major Constituent Flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 65(31),* 6665-6673.
DOI : 10.1021/acs.jafc.7b02203

[9] Y. Zhang et al. (2008). Isolation and purification of four flavone C-glycosides from antioxidant of bamboo leaves by macroporous resin column chromatography and preparative high-performance liquid chromatography. *Food Chemistry, 107(3),* 1326-1336.
DOI : 10.1016/j.foodchem.2007.09.037

[10] G. O. Jung, S. Y. Seo & S. U. Yoon. (2020). Anti-microbial Activity of Bamboo Extract Against Oral Microbes. *The Journal of the Korea Contents Association, 20(12),* 454-459.
DOI : 10.5392/JKCA.2020.20.12.454

[11] J. J. Crall et al. (2018). A Life Course Health Development Perspective on Oral Health. Handbook of Life Course Health Development, 299-320.
DOI : 10.1007/978-3-319-47143-3_13

[12] K. M. Kopydlowski et al. (1999). Regulation of macrophage chemokine expression by lipopolysaccharide in vitro and in vivo. *The Journal of Immunology, 163(3),* 1537-44.

[13] O. J. Park, M. K. Cho, C. H. Yun & S. H. Han. (2015). Lipopolysaccharide of Aggregatibacter actinomycetemcomitans induces the expression of chemokines MCP-1, MIP-1α, and IP-10 via similar but distinct signaling pathways in murine macrophages. *Immunobiology, 220(9),* 1067-74. DOI : 10.1016/j.imbio.2015.05.008

[14] Z. Liu et al. (2018). Role of ROS and Nutritional Antioxidants in Human Diseases. *Frontiers in Physiology, 9*, 477. DOI : 10.3389/fphys.2018.00477

[15] Y. Miyake & M. Hiramitsu (2011). Isolation and extraction of antimicrobial substances against oral bacteria from lemon peel. *Journal of Food Science and Technology, 48(5),* 635-9. DOI : 10.1007/s13197-011-0330-3

[16] G. C. Chae et al. (2009). Antibacterial activity of Artemisa capillaris THUNB on oral bacteria. *Journal of Oral Medicine and Pain, 34(2),* 169-177.

황 혜 정(Hye-Jeong Hwang) [종신회원]

· 2010년 2월 : 건양대학교 일반대학원 예방의학과(의학박사)
· 2012년 3월 ~ 현재 : 건양사이버대학교 보건의료복지학과 부교수
· 관심분야 : 보건교육, 감염관리, 예방의학, 웰에이징
· E-Mail : hhj@kycu.ac.kr

김 도 경(Dokyeong Kim) [정회원]

· 2018년 2월 : 연세대학교 치과대학 구강병리학교실 (치의학박사)
· 2021년 2월 ~ 현재 : 가톨릭대학교 성의교정 의과대학 박사후연구원
· 관심분야 : 치위생, 구강암, 구강질환, 미생물
· E-mail : dkkim2908@gmail.com

강 경 희(Kyung-hee Kang) [종신회원]

· 2010년 2월 : 경북대학교 미생물학과 (이학박사)
· 2008년 3월 ~ 현재 : 건양대학교 치위생학과 교수
· 관심분야 : 치위생, 구강질환, 미생물, 웰에이징
· E-mail : dhkhkang@konyang.ac.kr