

한국전통식품에서 분리한 *Weissella cibaria* SPM402와 *Lactobacillus* SPM412의 항치주염 효능

강소원 · 서채현 · 최성숙*
삼육대학교 약학대학

Anti-periodontitic Effects of *Weissella cibaria* SPM402 and *Lactobacillus paracasei* SPM412 Isolated from Korean Traditional Foods

So Won Kang, Chae Hyeon Seo, Sungsook Choi*
College of Pharmacy, Sahmyook University, Seoul, Korea

(Received July 15, 2024/Revised August 20, 2024/Accepted August 20, 2024)

ABSTRACT - This study aimed to develop probiotics with anti-periodontitic effects to help treat inflammation in the tissues surrounding the teeth. We isolated *Weissella cibaria* (*W. cibaria*) SPM402 and *Lactobacillus paracasei* (*L. paracasei*) SPM412 from homemade kimchi and used their cell-free supernatants. At a concentration of 10 mg/mL of *L. paracasei* SPM412 (LP412) inhibited the formation of *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) biofilm by 95.99±0.73%. In addition, 10 mg/mL of LP412 reduced the RQ value of *fimA*, an adhesin gene of *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) to 0.08±0.05, and the RQ value of *radD*, an adhesin gene of *F. nucleatum*, to 0.08±0.008. When the *P. gingivalis* outer membrane vesicle (Pg OMV) induced inflammation in YD-38 cells, the RQ value of TNF-α was increased to 36.68±1.85, but was reduced to 4.15±0.37 in the presence of 1 mg/mL of *W. cibaria* SPM402 (WC402). Similarly, in Pg OMV-induced inflammation in THP-1 cells, the RQ value of IL-1β increased to 2,330.65±204.61 but was reduced to 15.19±4.57 in the presence of 15 mg/mL of WC402. In *F. nucleatum*-induced inflammation in YD-38 cells, the RQ value of IL-8 increased to 15.10±1.11 and was decreased to 2.67±0.50 in the presence of 1 mg/mL of LP412. In conclusion, *W. cibaria* SPM402 and *L. paracasei* SPM412 showed potent anti-inflammatory effects against oral pathogenic bacteria and hold promise as functional probiotics with anti-periodontitic activity.

Key words: Probiotics, Antiperiodontitic effect, Biofilm, TNF-α, IL-8

치주질환은 만성 염증성질환으로 2017년 통계에 따르면 전 세계 약 8억 인구가 치주질환을 갖고 있는 것으로 보고되고 있고 이는 삶의 질을 매우 저하시키는 것으로 알려져 있다^{1,2}. 치주질환은 잇몸 출혈, 치아 손실 등 직접적인 구강 건강에 영향을 줄 뿐 만 아니라 고혈압, 당뇨, 심혈관 질환, 골다공증, 알츠하이머와 같은 여러 전신성 질병과도 관련이 있다^{3,4}. 치주질환의 위험 인자는

구강 병원성 세균과 생물막, 숙주면역력 및 환경요인 등 3가지로 분류할 수 있다⁵. 구강 병원성 세균과 숙주의 면역력이 균형을 이루고 있는 조건에서는 건강한 상태가 유지되고 질병 발생이 억제되지만, 지속적인 세균의 공격과 그에 따른 세균의 병원성이 증가하면 이러한 균형은 깨어지고 그 결과 숙주의 과도한 면역반응이 유발되어, 각종 염증성 사이토킨의 분비 증가, 파골세포의 활성화, 잇몸인대 조직의 파괴 및 잇몸의 붓기로 이어진다^{6,7}. 직접적인 치주질환의 원인균은 치석 형성에 관여하는 최상위 균집이며, 치주염 진행에 가장 크게 기여하여 위험하단 의미의 red complex로 분류되는 *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Treponema denticola*와 *Tannerella forsythia*로 구성된다⁸. 한편 red complex에 속한 균만큼 위험하진 않으나 치주질환 발병에 일부 기여하여 orange

*Correspondence to: Sungsook Choi, College of Pharmacy, Sahmyook University, Seoul 01795, Korea
Tel: +82-2-3399-1606; Fax: +82-2-3399-1616
E-mail:sschoi@syu.ac.kr

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal 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.

complex로 분류하는 *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*), *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus* 등의 세균은 red complex군 세균의 정착을 도와 치주질환을 악화시킨다⁹). *P. gingivalis*는 혐기성 그람 음성균이며, 치주질환을 일으키는 가장 대표적인 세균으로 알려져 있다. *P. gingivalis*의 병인 인자인 선모는 숙주세포에 부착과 생물막을 형성하는데 기여하며 외막 성분인 lipopolysaccharide (LPS)는 숙주세포의 toll-like receptor 2(TLR2) 및 TLR4에 부착하여 전염증성사이토카인인 IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17, TNF- α 의 생성을 유도하여 치주염을 악화시킨다¹⁰). 전염증성사이토카인의 분비는 염증반응의 중증화, 조골세포 억제 및 파골세포 활성화를 유도하여 치아의 손실을 유도한다. *P. gingivalis*는 직접적인 염증 유발로 구강 건강을 악화시킬 뿐 아니라 *hagA*, *hagB* 및 *fimA* 유전자에 의해 합성되는 부착소는 생물막 형성 및 다른 병원성 세균과의 연결고리 역할을 하는 또 다른 병인 인자이다^{11,12}). *F. nucleatum*은 혐기성 그람 음성세균으로 *F. nucleatum*의 LPS는 숙주세포의 TLR4에 부착하여 전염증성사이토카인인 IL-6, IL-8, TNF- α 의 생성을 유도하여 염증반응을 유도한다¹³). *F. nucleatum*에 의해 유도된 IL-6, IL-8, TNF- α 는 염증반응을 유도하고 matrix metalloproteinases (MMP)의 생성 증가 및 분비, 다형핵 백혈구 활성화, 파골세포 형성 및 뼈 재흡수 반응 유도 및 세포사(apoptosis)를 유도하여 치주조직을 손상시킨다. 단백질 분해 효소의 하나인 MMP-13는 collagen 합성 저해 및 분해를 촉진하여 치주조직의 직접적인 파괴를 유도한다. *F. nucleatum*의 부착소인 FadA는 숙주세포에 균이 부착할 수 있도록 하여, 감염을 일으키고 염증반응을 유도하며¹⁴) 부착소 RadD는 *F. nucleatum*의 직접적인 부착에 관여할 뿐 아니라 다른 구강 병원성 세균들의 연결고리가 되어 생물막 형성에 기여한다¹⁵). Probiotics는 살아있는 유익한 미생물로 유해균의 성장 억제, 장내 세균총 조절, 항균 및 항염 등 다양한 기능이 알려져 있고 최근에는 구강 건강 유지에도 긍정적인 영향을 준다고 알려져 있다^{16,17}). 최근 *Lactobacillus rhamnosus*와 *Bifidobacterium longum* 등 일부 유산균이 구강 병원성 세균의 감소에 기여하는 것으로 보고되고 있다¹⁸). *Weissella cibaria*는 포자를 형성하지 않는 그람 양성세균으로 김치와 같은 발효식품에서 주로 발견이 된다¹⁹). *Weissella*속은 *Staphylococcus aureus*와 구강 병원성 세균에 대한 항균효과, 생물막 형성 억제 효능이 있는 것으로 알려져 있으며, 항암효과도 알려져 있다²⁰). *Lactobacillus paracasei*는 장내 및 구강 병원성 세균에 대한 항균효과 및 항염효과, *Streptococcus mutans* (*S. mutans*)의 생물막 형성을 억제 한다고 알려져 있다²¹). 본 연구는 한국전통식품인 김치에서 분리, 동정한 *Weissella cibaria* SPM402와 *Lactobacillus paracasei* SPM412의 항치주염 효능을 확인하여 보고하고자 한다.

Materials and Methods

유산균 및 배양 상등액 조제

본 실험에 사용한 유산균 *Weissella cibaria* SPM402 (*W. cibaria* SPM402)와 *Lactobacillus paracasei* SPM412 (*L. paracasei* SPM412)는 일반가정에서 만든 김치에서 De Man, Rogosa, Sharpe 고체 배지(MRS, BD Difco™, Franklin Lakes, NJ, USA)를 이용하여 분리 후 마크로젠 (Macrogen, Seoul, Korea)에서 16S rRNA 서열을 이용한 동정 후 실험실에 보관하고 있었던 균주를 사용하였다. 유산균 배양 상등액의 조제를 하기 위해서 두 균주를 MRS 액체배지 100 mL에 각각 접종 후 37°C, 48시간 배양 후 4°C, 8,000 g에서 15분간 원심분리하여 상등액을 얻었으며 배양이 끝난 배양액의 세균수는 약 2×10⁹ CFU/mL이었다. 원심분리 후 상등액을 0.1 N NaOH로 pH를 7.0±0.2로 조정 후 냉동온도 -40°C, 펌프압력 100 mTorr, 선반온도 -60°C 조건에서 동결 건조 후, 100 mg/mL로 stock soln. 조제 후 0.22 μ m 여과지로 여과하여 사용하였다. *W. cibaria* SPM402와 *L. paracasei* SPM412의 배양상등액을 동결건조한 시료를 각각 WC402와 LP412로 명명하고 본 연구에 시료로 사용하였다.

구강 병원성 세균의 배양

본 실험에 사용한 구강 병원성 세균인 *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) KCTC5352, *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* (*F. nucleatum*) KCTC2640은 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC, Jeongeup, Jeonbuk, Korea)에서 분양받아 사용하였다. *P. gingivalis*와 *F. nucleatum*는 5% horse blood defibrinated (MBcell, KisanBio, Seoul, Korea), 2% vitamin K-hemin 용액(MBcell, KisanBio)을 첨가한 Brain Heart Infusion (BHI, BD Difco™, Franklin Lakes, NJ, USA)배지에 AnaeroBag (Chongqing PangTong Medical Devices Co., Ltd, Hangzhou, China)을 사용하여 37°C 혐기 배양하였다. *P. gingivalis* outer membrane vehicle (*Pg* OMV)는 초고속 원심분리법을 이용하여 다음과 같은 방법으로 해당 분획을 얻었다²²). *P. gingivalis*을 BHI배지 100 mL에 5% L-cysteine, 5% horse serum, 2% vitamin K-hemin 용액을 첨가 후 정체가까지 배양하였다. 배양 후 4°C, 8,000 ×g에서 10분간 원심분리하여 균체를 제거하고 *Pg* OMV를 함유한 상등액을 100,000 ×g, 4°C에서 120분 초고속원심분리하고, 침전을 phosphate buffered saline (PBS)에 현탁해 0.22 μ m filter하였다. 분리한 *Pg* OMV는 NANOSPOT (Malvern Panalytical, Malvern, UK) 분석으로 평균 입자 크기가 164.6±2.4 nm임을 확인 후 bicinchoninic acid (BCA)법으로 정량 후 -80°C 보관하고 사용하였다.

YD-38세포주 및 THP-1세포주 배양

사람 잇몸 상피 세포주 YD-38와 사람 단핵구 세포주 THP-1은 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 분양을 받았으며, 세포의 배양은 RPMI1640배지(w/ L-glutamine, NaHCO₃) (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA)에 10% fetal bovine serum (FBS, HyClone™, Waltham, MA, USA), 25 mM HEPES (Sigma-Aldrich Co.), 1% penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich Co.)를 첨가하여 37°C, 5% CO₂의 대기중에 배양하였으며, 48시간 간격으로 계대 배양하였다.

생물막 형성 분석

생물막 분석은 Kim 등²³⁾의 방법을 참고하여 실시하였다. 48 well plate에 *P. gingivalis*, *F. nucleatum*를 1×10⁹ CFU/well 되도록 접종 후, WC402, LP412를 선행연구에서²⁴⁾ 얻은 MIC (50 mg/mL)보다 낮은 5 mg/mL, 10 mg/mL 농도로 처리 후 37°C, 48시간 배양하였다. 대조군으로는 두 균주에 시료를 처리하지 않고 동일한 방법으로 배양하여 사용하였다. 상등액을 제거한 후, 10% formaldehyde를 각 well 당 300 µL를 가하고 실온에서 30분 반응시켰다. Formaldehyde를 제거한 후, 3차 증류수로 3회 세척하고, 0.5% crystal violet을 300 µL를 가하여 30분 동안 염색하였다. 염색 시약을 제거한 후, 3차 증류수로 3회 세척하였다. Isopropyl alcohol 300 µL를 가하고 1시간 동안 반응시켜 염색된 crystal violet을 용출 후 490 nm에서 흡광도를 측정하여 생물막 억제 정도를 확인하였다.

$$\text{Biofilm inhibition rate (\%)} = (1 - \text{OD}_{\text{treatment}} / \text{OD}_{\text{control}}) \times 100$$

생물막 관련 부착유전자 발현에 대한 영향

P. gingivalis, *F. nucleatum*의 생물막 형성과 관련된 부착유전자의 발현에 대한 WC402, LP412의 영향을 확인하고자 하였다. *P. gingivalis*와 *F. nucleatum*을 각 배양 배지에 전배양 한 후 전배양한 균을 균수가 3×10⁹ CFU/mL이 되도록 새 배지로 옮긴 후, WC402, LP412를 선행연구에서²⁴⁾ 얻은 MIC (50 mg/mL)보다 낮은 5 mg/mL, 10 mg/mL 각각 처리하고 8시간 동안 37°C에서 배양 후, 원심분리하여 상등액을 제거하였다. PBS에 균체를 세척하여 배지 성분을 제거 후 total RNA 분리를 GeneAll Hybrid-R™ reagent (GeneAll, Seoul, Korea)를 이용해 제조사의 지시에 따라 실시하였다. 분리한 RNA는 Optizzen NanoQ (KLAB, Daejeon, Korea)를 이용하여 정량 후, total RNA 0.1 µg을 template로 하여 AccuPower CycleScript RT premix (dN12) (Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 제품의 안내에 따라 역전사반응으로 cDNA를 합성하였다. *P. gingivalis*의 부착 관련 유전자 *fimA*, *hagA*, *hagB*^{11,12)}와 *F. nucleatum*의 부착 관련 유전자 *fadA*와 *radD*^{14,15)}의 유전자 발현의 변화를 확인하고자 Quantitative real time PCR (qRT-PCR)을 실시하였다. 본 실험에서 사용한 primer는 Table 1에 나타내었으며^{11,12,14,15)}, 각각의 primer는 제노텍(Genotech, Daejeon, Korea)에서 합성하여 사용하였다. qRT-PCR 반응은 cDNA 3 µL, 각 primer 10 pmol 1 µL, PowerSYBR Green PCR Mastermix (Life Technologies Pty Ltd, NY, USA) 10 µL를 넣고 nuclease free water를 넣어 최종 부피가 20 µL가 되도록 하였다. 이후 StepOne realtime PCR System (Life Technologies Pty Ltd.)을 사용하여 95°C에서 10분간 변성 후, 95°C에서 15초, 60°C에서 60초간 합성을 40회 반복 수행 후, 95°C에서 1.6°C/sec로 60°C까지 낮추

Table 1. Primer sequences for adhesin genes for qRT-PCR analysis

| Target gene | Sequence (5'→3') | Tm (°C) | | |
|----------------------|------------------|--|---|--|
| <i>P. gingivalis</i> | <i>16S rRNA</i> | TGTAGATGACTGATGGTGAAA ACTGTTAGCAACTACCGATGT | 55.4 57.5 | |
| | <i>fimA</i> | CAGCAGGAAGCCATCAAATC CAGTCAGTTCAGTTGTCAAT | 58.4 59.4 | |
| | | <i>hagA</i> | ACAGCATCAGCCGATATTCC CGAATTCATTGCCACCTTCT | 58.4 60.1 |
| | <i>hagB</i> | TGTCGCACGGCAAATATCGCTAAAC CTGGCTGTCCCTCGTCGAAAGCATA | 62.8 61.5 | |
| | | <i>F. nucleatum</i> | <i>16S rRNA</i> | AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG GTCATCGTGACACAGAATTGCTG |
| | <i>fadA</i> | | CACAAGCTGACGCTGCTAGA TTACCAGCTCTTAAAGCTTG | 59.3 53.2 |
| <i>radD</i> | | | GGATTATCTTTGCTAATTGGGGAAATTATAG ACTATTCCATATTCTCCATAATATTCCCATAG | 61.8 62.4 |

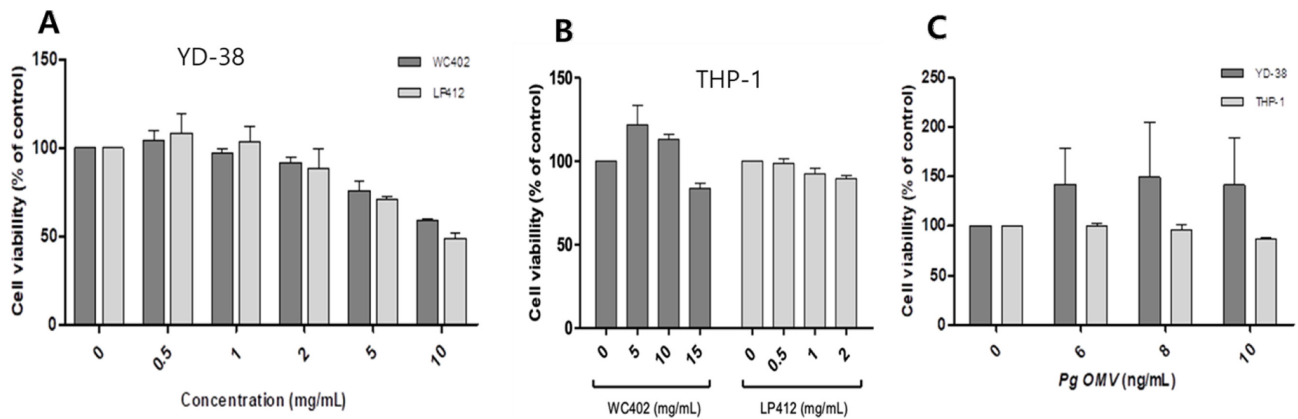


Fig. 1. Evaluation of the cell viability by MTT assay. (A) Cytotoxicity of WC402 and LP412 in YD38 cells (B) Cytotoxicity of WC402 and LP412 in THP-1 cells (C) Cytotoxicity of *Pg* OMV in YD-38 cells and THP-1 cells. All data were performed in triplicate and expressed as mean±SD.

어 1분간 정지 후 0.1°C/sec 95°C까지 올리는 단계를 거쳐 생성된 PCR 산물의 melting curve를 분석하였다. 결과 분석은 시료를 처리하지 않고 배양한 두 균의 house keeping gene인 *16S rRNA*를 기준으로 부착 관련 유전자 발현을 상대 정량분석 하는 ddCt 분석을 하였으며, 1.5배 이상의 차이를 유의적인 발현 변화로 판단하였다²⁵⁾.

세포독성 측정

세포실험을 통해 항염효과를 확인하고자 WC402, LP412 및 *Pg* OMV의 세포독성을 MTT assay로 확인하였다. 6 well plate에 YD-38 cell과 THP-1 을 5×10⁵ cells/well 농도로 각각 분주 후, 24시간 배양 후 WC402, LP412는 0.5-15 mg/mL 농도로, *Pg* OMV는 6-10 ng/mL농도로 처리하고 24시간 배양하였다. 배양 상등액을 제거하고 MTT 시약 500 μL (0.5 mg/mL)를 첨가하여 4시간 동안 반응 후 상등액을 제거하고 500 μL의 dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich Co.)를 첨가하여 5분 동안 추가 반응 후 spectrophotometer (Molecular Devices, VERSA max, San Jose, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정

하였다. 시료를 처리하지 않고 배양한 YD-38 및 THP-1 cell의 생존율을 100%로 하여 이와 비교하여 90% 이상의 생존율을 보이는 농도를 독성이 없는 농도로 간주하여 세포실험에 사용할 WC402, LP412 및 *Pg* OMV농도를 결정하였다(Fig. 1).

WC402와 LP412의 전염증성사이토카인 유전자 발현에 대한 영향

WC402와 LP412의 항염작용을 확인하기 위하여 전염증성사이토카인 유전자 발현에 대한 효과를 측정하였다. *P. gingivalis* 균주의 직접 감염에 의한 독성 때문에 살아있는 *P. gingivalis* 대신 세포의 소포체인 *Pg* OMV를 사용하여 염증반응을 유도하였다. 6 well plate에 YD-38 세포와 THP-1세포를 5×10⁵ cell/well 농도로 각각 분주 후 24시간 동안 배양 후 YD-38 세포에 WC402는 0.5 mg/mL와 1 mg/mL 농도로(Fig. 1A), LP412는 *Pg* OMV에 의한 염증반응에는 0.125-1 mg/mL농도로 30분 전처리하였다. THP-1 세포에는 WC402는 5 mg/mL-15 mg/mL, LP412는 0.1 mg/mL-1 mg/mL농도로 30분 전처리하였다(Fig. 1B). 30분 후 10 ng/

Table 2. Primer sequences for proinflammatory cytokine genes for qRT-PCR analysis

| Target gene | Sequence (5'→3') | Tm (°C) |
|----------------|-------------------------|---------|
| <i>β-actin</i> | ACCAACTGGGACGACATGGAG | 61.8 |
| | GTGAGGATCTTCATGAGGTAGTC | 60.6 |
| <i>IL-1β</i> | AAGCTGATGGCCCTAAACAG | 57.3 |
| | AGGTGCATCGTGCACATAAG | 57.3 |
| <i>IL-8</i> | AACTTCTCCACAACCCTCTG | 57.3 |
| | TTGGCAGCCTTCCTGATTTC | 57.3 |
| <i>TNF-α</i> | AAGACCACCACTTCGAAACC | 57.3 |
| | GGCCTAAGGTCCACTTGTGT | 59.3 |

mL농도의 *Pg* OMV (Fig. 1C) 처리하여 염증반응을 유도하고자 37°C, 5% CO₂에서 6시간 배양하였다. 한편 *F. nucleatum* 감염에 의한 염증반응을 유도하기 위해서는 항생제가 첨가되지 않은 배지를 사용하여 6 well plate에 YD-38 세포를 5×10⁵ cell/well 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후, WC402와 LP412를 0.5 mg/mL와 1 mg/mL 농도로(Fig. 1A) YD-38 세포에 30분 전처리한 후, *F. nucleatum*을 1:100비율로 감염시켜(100 MOI)²⁶⁾ 37°C, 5% CO₂에서 6시간 배양하였다. 각 세포에 *Pg* OMV 또는 *F. nucleatum*처리 6시간 후 상등액 제거 및 PBS로 3번 세척 후, mRNA 분리는 GeneAll Hybrid-RTM reagent (GeneAll)를 사용하여 분리하였다. 분리한 RNA는 Optizen NanoQ (KLAB)를 이용하여 정량 후, RNA 0.1 µg을 template로 하여 AccuPower CycleScript RT premix (dN12) (Bioneer)를 사용하여 제품의 안내에 따라 역전사반응으로 cDNA를 합성하였다. WC402와 LP412의 항염증작용을 확인하고자 qRT-PCR을 실시하였다. 본 실험에서 사용한 primer는 Table 2에 나타내었다²⁶⁾. 각각의 primer는 Genotech에서 합성하여 사용하였다. qRT-PCR 반응은 cDNA 3 µL, 각 primer 10 pmol 1 µL 및 PowerSYBR Green PCR Mastermix (Life Technologies Pty Ltd.) 10 µL를 넣고 nuclease free water를 넣어 최종부피가 20 µL가 되도록 하였다. 이후 StepOne realtime PCR System (Life Technologies Pty Ltd.)를 사용하여 다음과 같은 조건에서 반응하였다. 95°C에서 10분간 변성 후, 95°C에서 15초, 60°C에서 60초간 합성을 40회 반복 수행 후, 95°C에서 1.6°C/sec로 60°C까지 낮추어 1분간 정지 후 0.1°C/sec로 95°C까지 올리는 단계를 거쳐 생성된 PCR 산물의 melting curve를 분석하였다. 결과 분석은 house keeping gene인 β -actin을 기준으로

해당 cytokine mRNA를 상대 정량분석하는 ddCt 분석을 실시하였다²⁵⁾.

통계분석

결과는 평균±표준편차(mean standard deviation)를 사용하였다. 실험결과는 GraphPad Prism[®] Version 5.0 (GraphPad Software, USA)를 사용하여 One-way analysis of variance (ANOVA)로 분석 후 통계 처리하였다. 사후검정은 Dunn's Multiple Comparison test를 이용하여 분석하였다.

Results and Discussion

WC402와 LP412의 *P. gingivalis*와 *F. nucleatum*의 생물막 생성 억제 효과

WC402와 LP412의 *P. gingivalis*와 *F. nucleatum* 생물막 형성 억제능을 측정된 결과, WC402 10 mg/mL농도에서 *P. gingivalis*의 생물막 형성이 37.30±8.23%, LP412 10 mg/mL에서 51.36±5.95% 억제되었고, *F. nucleatum*의 경우 WC402 10 mg/mL에서 76.77±2.77%, LP412 10 mg/mL에서 95.99±0.73% 억제되었다(Fig. 2). 특히 *P. gingivalis*보다는 *F. nucleatum*에 대한 생물막 형성 억제능이 매우 우수함을 알 수 있으며 이는 부착소 유전자 발현 억제의 실험결과에서도 *F. nucleatum*의 유전자 발현이 효과적으로 억제됨을 확인할 수 있었다(Fig. 3,4). 한국 발효식품에서 분리한 *Lactobacillus brevis*의 경우 배양상등액을 이용하여 MIC농도의 1/2농도에서 *S. mutans*의 생물막 형성을 약 40% 억제한다는 연구결과²³⁾와 비교하였을 때 동일균주는 아니지만 WC402, LP412의 구강 세균에 대한 생물막 억제 효과가 매우 우수함을 알 수 있었다.

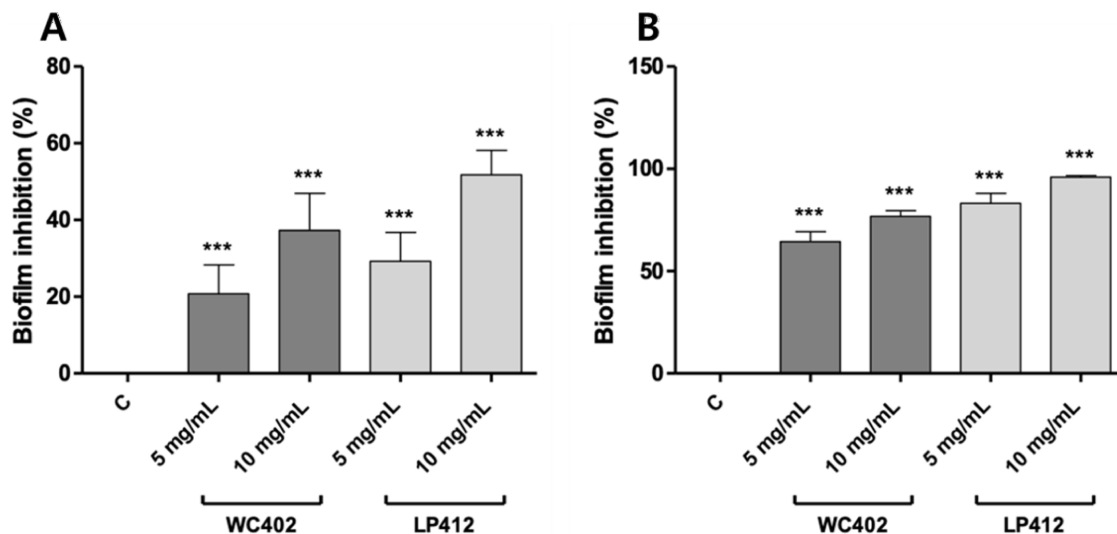


Fig. 2. Effect of WC402 and LP412 on the biofilm formation of *P. gingivalis* and *F. nucleatum*. A; *P. gingivalis*. B; *F. nucleatum*. All data were performed in triplicate and expressed as mean±SD. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001 compared with control.

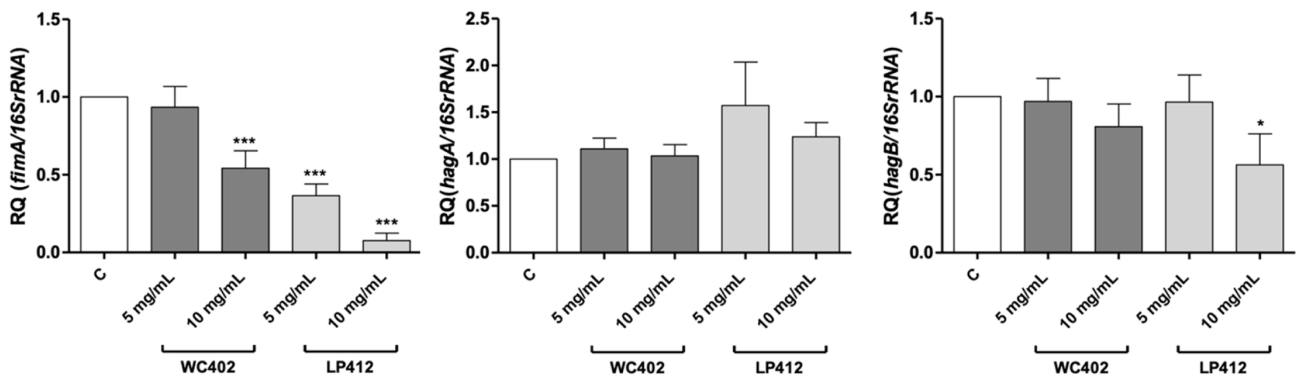


Fig. 3. Effect of WC402 and LP412 on the expression of adhesin genes of *P. gingivalis* related to biofilm formation. All data were performed in triplicate and expressed as mean±SD. **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001 compared with control.

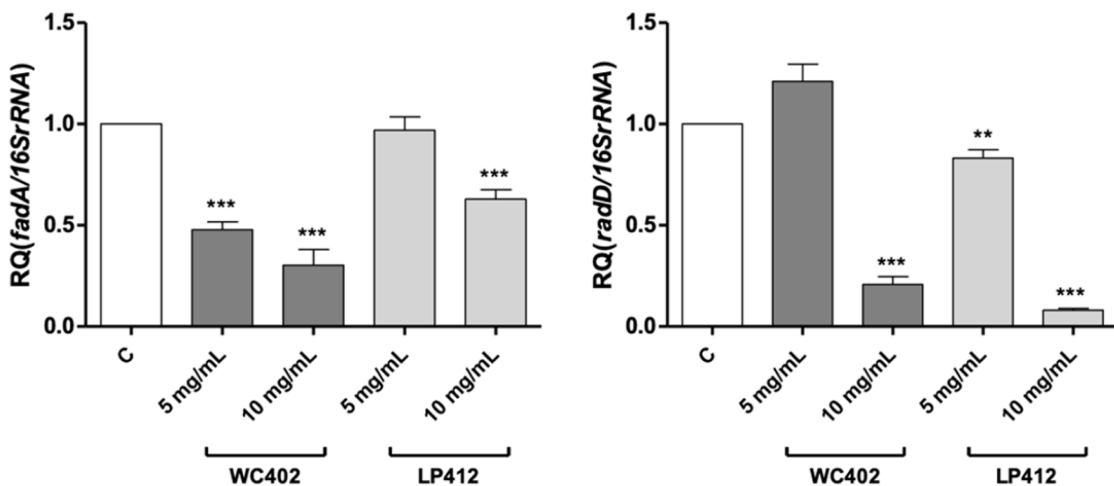


Fig. 4. Effect of WC402 and LP412 on the expression of adhesin genes of *F. nucleatum* related to biofilm formation. All data were performed in triplicate and expressed as mean±SD. **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001 compared with control.

***P. gingivalis* 및 *F. nucleatum*의 부착소 유전자 발현 억제 효과**

*P. gingivalis*와 *F. nucleatum*에 MIC보다 낮은 농도의 WC402와 LP412 5 mg/mL, 10 mg/mL를 처리 후, *P. gingivalis*의 부착소유전자 *hagA*, *hagB* 및 *fimA*와 *F. nucleatum*의 부착소유전자인 *fadA*와 *radD* 발현을 비교하였다. *P. gingivalis*의 경우 WC402 10 mg/mL에서 *hagA*의 RQ는 1.03±0.12, *hagB*의 RQ는 0.81±0.16으로 haemagglutinin A, B (*hagA*, *hagB*) 모두 유의미한 억제 효과는 없는 것을 확인하였으나 *fimA*는 0.54±0.11로 약 2배 감소함을 확인하였다. LP412 10 mg/mL에서 *hagA*의 RQ는 1.24±0.15, *hagB*의 RQ는 0.56±0.19으로 *hagB*가 약 2배 감소하였으며 *fimA*는 0.08±0.05로 약 12배 감소함을 확인하였다. WC402, LP412 모두 *P. gingivalis*의 대표적인 부착소 펴브리야 유전자 *fimA*의 발현을 효과적으로 억제하였으며 이는 생물막 형성 억제에 직접적인 원인으로 판단된다(Fig. 3). 한편 *F. nucleatum*의 경우, WC402 10 mg/mL에서 *fadA*의 RQ 값은 0.3±0.08로

약 3배 정도 억제되었고 *radD*의 RQ값은 0.21±0.03으로 약 5배 정도 억제되었다. 한편 LP412 10 mg/mL에서 *fadA*의 RQ 값은 0.63±0.05, *radD*의 RQ값은 0.08±0.008으로 *radD*의 발현이 거의 90배 이상 억제되었다(Fig. 4). *P. gingivalis*는 성인의 치주질환의 대표적인 세균으로 특히 잇몸 아래에 생물막을 형성하여 오랜 시간 생존하며 잇몸 질환을 일으키는 균이다⁷⁾. 생물막 형성에 기여하는 대표적인 병원 인자 펴브리야를 암호화하는 *fimA* 유전자의 발현이 LP412에 의해 12배가량 억제된 것은 매우 의미 있는 결과로 *P. gingivalis*의 잇몸 아래 영역에서 생물막 형성 및 생존을 크게 억제할 수 있을 것으로 판단된다. 한편 *F. nucleatum*은 red complex에 속하는 *P. gingivalis*등 직접적인 구강 병원균과의 상호작용을 매개하는 orange complex에 해당하는 세균이다⁸⁾. *F. nucleatum*의 부착소 FadA는 숙주세포에 균이 부착할 수 있도록 하여, 감염을 일으키고 염증반응을 유도하며¹⁴⁾ 부착소 RadD는 세포의 막 단백질로 *F. nucleatum*의 직접적인 부착뿐 아니라 다

른 세균들의 연결고리가 되어 생물막 형성에 기여한다^{15,28}). 본 연구결과 *F. nucleatum*의 생물막 형성이 WC402에 의해 약 77%, LP412에 의해 약 95% (Fig. 2)이상 억제된 것은 *F. nucleatum*의 부착소 *radD* 유전자 발현이 WC402와 LP412에 현저히 억제된 것과(Fig. 4) 밀접한 관련이 있는 것으로 볼 수 있다.

YD-38 및 THP-1세포주에서 *Pg* OMV에 의해 유도된 TNF- α , IL-1 β 유전자 발현 억제효과

WC402와 LP 412의 항염효능을 보기 위해 *P. gingivalis*를 직접 감염시켜 염증반응을 유도하고자 하였으나 독성이 강해 세포의 소포체인 *Pg* OMV를 이용하여 염증반응을 유도하였다. *Pg* OMV에 의한 염증반응을 유도한 결과 잇몸 상피세포주인 YD-38에서는 TNF- α 의 변화만 확인할 수 있어 대식세포의 일종인 THP-1에서의 효과를 함께 확인하였다. 먼저 YD-38 세포주에 *Pg* OMV 10 ng/mL를 처리한 결과 TNF- α 의 RQ값은 36.68 \pm 1.85로 염증반응이 유도되었고 WC402 1 mg/mL를 처리한 결과 RQ값이 4.15 \pm 0.37로 감소하여 TNF- α 의 발현이 약 8.8배 억제됨을 확인하였다. YD-38 세포주에 MTT assay를 실시하여 독성이 없는 것으로 확인한 LP412 1 mg/mL농도에 10 ng/mL의 *Pg* OMV를 동시 처리하면 독성이 나타나, LP412의 농도를 0.25 mg/mL 이하 농도로 낮추어 실험을 진행하였고 LP412 0.25 mg/mL에서 TNF- α 의 RQ값이 3.59 \pm 0.56으로 약 10배 감소함을 확인하였다. 사람 대식세포인 THP-1세포주에서 10 ng/mL의 *Pg* OMV를 처리한 결과 IL-1 β 의 RQ는 2,330.65 \pm 204.61로 *Pg* OMV에 의한 염증반응이 유도됨을 확인하였고, WC402 15 mg/mL를 처리한 경우 IL-1 β 의 RQ값이 15.19 \pm 4.57로 약 150배 가량 억제되었다.

THP-1 세포주에 LP412를 처리하는 경우 MTT assay를 실시하여 독성이 없는 것으로 확인한 LP412 1 mg/mL농도에 10 ng/mL의 *Pg* OMV를 동시 처리하면 독성이 나타나, LP412의 농도를 0.1 mg/mL농도로 낮추어 실험을 진행하였다. 0.1 mg/mL의 LP412를 처리한 결과 IL-1 β 의 RQ값이 626.52 \pm 154.59로 약 3.6배가량 억제됨을 확인하였다. THP-1에서 TNF- α 의 발현을 비교한 결과 *Pg* OMV 단독 처리시 RQ값이 84.54 \pm 7.85이며 WC402 15 mg/mL처리시 0.94 \pm 0.19로 약 400배 가량 억제되었고, LP412 0.1 mg/mL 처리시 6.32 \pm 3.06으로 약 13배 억제됨을 확인하였다(Fig. 5). 본 연구 결과는 유산균에 의해 IL-1 β , TNF- α 의 발현이 현저히 감소한다는 보고를 한 Albuquerque-Souza등의 연구 결과와도 일치하며²⁹⁾ *Pg* OMV에 의해 유도된 염증반응이 WC402, LP412에 의해 억제됨을 알 수 있었다.

YD-38세포주에서 *F. nucleatum*에 의해 유도된 IL-1 β , IL-8유전자 발현 억제 효과

YD-38 cell에 *F. nucleatum*을(100 MOI)감염시킨 후, 0.5 mg/mL와 1 mg/mL의 WC402, LP412를 처리하여 6시간 배양 후, YD-38 cell에서 발현되는 IL-1 β 와 IL-8 mRNA 발현량을 비교하였다. *F. nucleatum*만 처리한 경우 IL-1 β 의 RQ는 2.94 \pm 0.29로 염증반응의 유도를 확인하였고, WC402 1 mg/mL를 처리한 결과 IL-1 β RQ값은 1.71 \pm 0.07로 유의미한 억제로 볼 수 없으나 LP412 1 mg/mL를 처리했을 때 IL-1 β RQ값은 1.14 \pm 0.11으로 약 2.5 배 정도 억제되었다(Fig. 6A). *F. nucleatum*만 처리한 경우 IL-8의 RQ는 15.10 \pm 1.11으로 염증반응이 유도되었음을 확인하였고, WC402 1 mg/mL를 처리한 결과 IL-8 RQ값은 5.80 \pm 0.29로 약 3배 정도, LP412 1 mg/mL를 처리했을 때 IL-

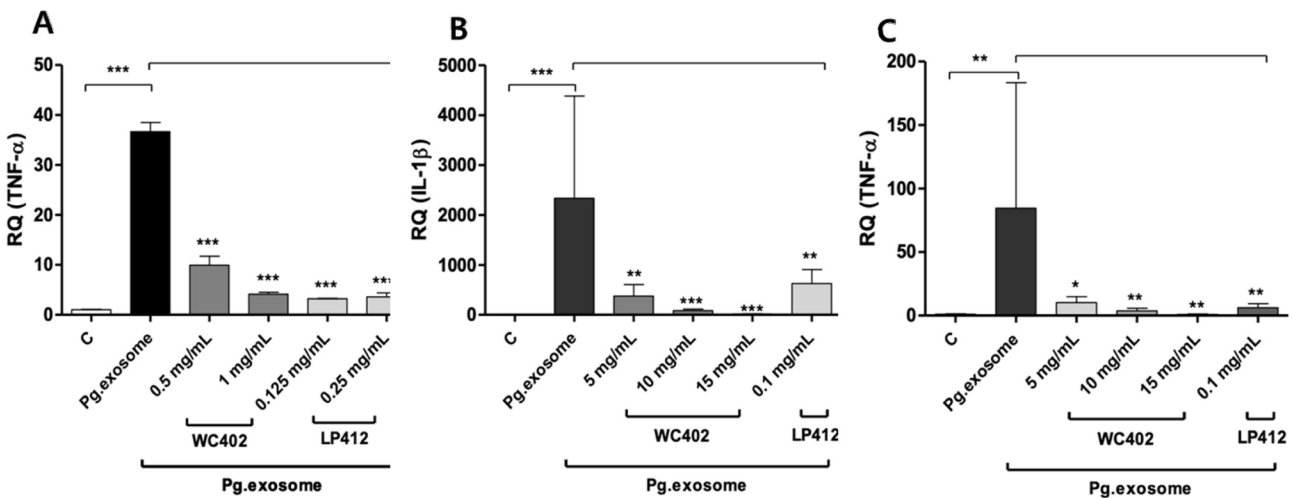


Fig. 5. Effect of WC402 and LP412 on *Pg* OMV induced expression of IL-1 β and TNF- α mRNA in YD-38 cells and THP-1 cells (A) Fold changes in TNF- α mRNA expression in YD-38 cells. (B) Folds changes in IL-1 β mRNA expression in THP-1 cells. (C) Fold changes in TNF- α mRNA expression in THP-1 cells. All data were performed in triplicate and expressed as mean \pm SD. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001 compared with control.

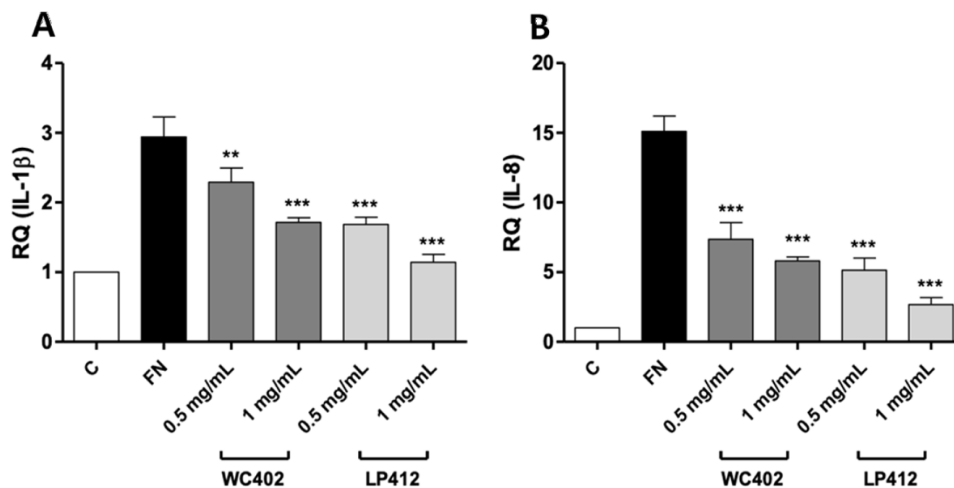


Fig. 6. Effect of WC402 and LP412 on *F. nucleatum* induced expression of IL-1 β and IL-8 mRNA in YD-38 cells. (A) Fold changes in IL-1 β mRNA expression. (B) Fold changes in IL-8 mRNA expression. All data were performed in triplicate and expressed as mean \pm SD. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001 compared with control.

8 RQ값은 2.67 ± 0.50 으로 약 5.6배 정도 억제되어 전염증성 사이토카인인 IL-8을 효과적으로 억제함을 확인하였다 (Fig. 6B). *F. nucleatum*에 의해 발현이 증가하는 대표적인 전염증성 사이토카인인 IL-8의 발현이 WC402에 의해 약 5배 억제된 것은 *W. cibaria* SPM402의 항염효과가 우수함을 알 수 있으며 기존 *W. cibaria*의 면역조절기능에 대한 연구 결과와 일치한다^{13,19}.

이상의 결과로 볼 때 WC402, LP412는 구강 병원성 세균에 대한 직접적인 항균효과는 물론²⁴), red complex에 속하는 *P. gingivalis*에 대한 생물막 형성 억제능과 항염작용이 있음을 확인하였다. Orange complex에 속하는 *F. nucleatum*에 대한 생물막 형성 억제능과 항염작용도 우수함을 알 수 있었다. 현재까지 알려진 대표적인 치주질환의 치료는 비수술적 치료, 수술적 치료 및 보조적 약물치료 등이 있다³⁰. 본 연구결과에서 확인된 두 유산균은 치주질환에 대한 우수한 효과를 나타낼 것으로 사료되는 구강 건강기능성 유산균 제품으로의 가능성을 시사하고 있다.

Acknowledgments

본 연구는 삼육대학교 교내연구비 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

국문요약

본 연구는 한국전통식품인 김치에서 분리한 *W. cibaria* SPM402, *L. paracasei* SPM412의 포괄적인 항 치주염 효과를 확인하였다. WC402 10 mg/mL 농도에서 *P. gingivalis*의 생물막 형성이 $37.30\pm 8.23\%$, LP412 10 mg/mL에서 $51.36\pm 5.95\%$ 억제되었고, *F. nucleatum*의 생물막 형성의

경우 WC402 10 mg/mL에서 $76.77\pm 2.77\%$, LP412 10 mg/mL에서 $95.99\pm 0.73\%$ 억제되었다. LP412 10 mg/mL에서 *P. gingivalis* 부착소인 *fimA*의 RQ값이 0.08 ± 0.05 로 약 12배 감소함을 확인하였고, *F. nucleatum*의 부착소인 *radD*의 RQ값은 0.08 ± 0.008 으로 *radD*는 거의 90배 이상 억제되었다. 사람 잇몸 상피세포주인 YD-38에 *Pg* OMV에 의한 염증반응을 유도 후 WC402 15 mg/mL 처리 결과 IL-1 β 유전자 발현이 약 150배 가량 억제되었고, LP412 0.1 mg/mL 처리 결과 IL-1 β 유전자 발현이 약 3.6배 가량 억제됨을 확인하였다. YD-38세포주에 *F. nucleatum*에 의한 염증반응을 유도 후 1 mg/mL의 WC402를 처리한 결과 IL-8 유전자 발현이 약 3배 정도, 1 mg/mL의 LP412를 처리한 결과 IL-8 유전자 발현이 약 5.6배 정도 억제되었다. 이상의 결과를 볼 때 *W. cibaria* SPM402, *L. paracasei* SPM412는 구강 병원성 세균의 생물막 형성 관련 병원인자 발현 억제, 직접적인 생물막 형성 억제 및 병원성 세균에 의해 유도된 염증반응을 효과적으로 억제하는 기능을 보유한 균주로 구강질환에 대한 치료제나 구강 건강에 도움이 되는 구강 건강기능성 식품으로 사용될 가능성이 있음을 확인하였다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

So Won Kang <https://orcid.org/0009-0000-1756-0926>
 Chae Hyeon Seo <https://orcid.org/0009-0007-7006-9709>
 Sungsook Choi <https://orcid.org/0000-0002-0303-0999>

References

1. Bernabe, E., Marcenes, W., Hernandez, C.R., Bailey, J., Abreu, L.G., Alipour, V., Amini, S., Arabloo, J., Arefi, Z., Arora, A., Ayanore, M.A., Bärnighausen, T.W., Bijani, A., Cho, D.Y., Chu, D.T., Crowe, C.S., Demoz, G.T., Demsie, D.G., Forooshani, Z.S., Du, M., El Tantawi, M., Fischer, F., Folayan, M.O., Futran, N.D., Geramo, Y.C.D., Haj-Mirzaian, A., Hariyani, N., Hasanzadeh, A., Hassanipour, S., Hay, S.I., Hole, M.K., Hostiuc, S., Ilic, M.D., James, S.L., Kalhor, R., Kemmer, L., Keramati, M., Khader, Y.S., Kisa, S., Kisa, A., Koyanagi, A., Laloo, R., Le Nguyen, Q., London, S.D., Manohar, N.D., Massenburg, B.B., Mathur, M.R., Meles, H.G., Mestrovic, T., Mohammadian-Hafshejani, A., Mohammadpourhodki, R., Mokdad, A.H., Morrison, S.D., Nazari, J., Nguyen, T.H., Nguyen, C.T., Nixon, M.R., Olanju, T.O., Pakshir, K., Pathak, M., Rabiee, N., Rafiei, A., Ramezanzadeh, K., Rios-Blancas, M.J., Roro, E.M., Sabour, S., Samy, A.M., Sawhney, M., Schwendicke, F., Shaahmadi, F., Shaikh, M.A., Stein, C., Tovani-Palone, M.R., Tran, B.X., Unnikrishnan, B., Vu, G.T., Vukovic, A., Warouw, T.S.S., Zaidi, Z., Zhang, Z.J., Kassebaum, N.J., Global, regional, and national levels and trends in burden of oral conditions from 1990 to 2017: a systematic analysis for the global burden of disease 2017 study. *J. Dent. Res.*, **99**, 362-373 (2020).
2. Hasturk, H., Schulte, F., Martins, M., Sherzai, H., Floros, C., Cugini, M., Chiu, C.J., Hardt, M., Van Dyke, T., Safety and preliminary efficacy of a novel host-modulatory therapy for reducing gingival inflammation. *Front. Immunol.*, **12**, 704163 (2021).
3. Olsen, I., Potempa, J.. Strategies for the inhibition of gingivitis for the potential treatment of periodontitis and associated systemic diseases. *J. Oral Microbiol.*, **6**, 24800 (2014).
4. Peng, X., Cheng, L., You, Y., Tang, C., Ren, B., Li, Y., Xu, X., Zhou, X., Oral microbiota in human systematic diseases. *Int. J. Oral Sci.*, **14**, 14 (2022).
5. Yamamoto, M., Aizawa, R., Maintaining a protective state for human periodontal tissue. *Periodontol.*, **86**, 142-156 (2021).
6. Graves, D., Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J. Periodontol.*, **79**, 1585-1591 (2008).
7. Moutsopoulos, N.M., Konkel, J.E., Tissue-specific immunity at the oral mucosal barrier. *Trends Immunol.*, **39**, 276-287 (2018).
8. Mohanty, R., Asopa, S.J., Joseph, M.D., Singh, B., Rajguru, J.P., Saidath, K., Sharma, U., Red complex: Polymicrobial conglomerate in oral flora: A review. *J. Family Med. Prim. Care*, **8**, 3480-3486 (2019).
9. de Andrade, K.Q., Almeida-da-Silva, C.L.C., Coutinho-Silva, R., Immunological pathways triggered by *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*: therapeutic possibilities? *Mediators Inflamm.*, **2019**, 7241312 (2019).
10. Jia, L., Han, N., Du, J., Guo, L., Luo, Z., Liu, Y., Pathogenesis of important virulence factors of *Porphyromonas gingivalis* via toll-like receptors. *Front. Cell Infect. Microbiol.*, **9**, 262 (2019).
11. Bélanger, M., Kozarov, E., Song, H., Whitlock, J., Progulske-Fox, A., Both the unique and repeat regions of the *Porphyromonas gingivalis* hemagglutinin A are involved in adhesion and invasion of host cells. *Anaerobe*, **18**, 128-134 (2011).
12. Wang, H., Zhang, W., Wang, W., Zhang, L., The prevalence of *fimA* genotypes of *Porphyromonas gingivalis* in patients with chronic periodontitis: A meta-analysis. *PLoS One*, **15**, e0240251 (2020).
13. Signat, B., Roques, C., Poulet, P., Duffaut, D., Role of *Fusobacterium nucleatum* in periodontal health and disease. *Curr. Issues Mol. Biol.*, **13**, 25-36 (2011).
14. Liu, P., Liu, Y., Wang, J., Guo, Y., Zhang, Y., Xiao, S., Detection of *Fusobacterium nucleatum* and *fadA* adhesin gene in patients with orthodontic gingivitis and non-orthodontic periodontal inflammation *PLoS One*, **9**, e85280 (2014).
15. Kaplan, C., Lux, R., Shi, W., The *Fusobacterium nucleatum* outer membrane protein RadD is an arginine-inhibitible adhesin required for inter-species adherence and the structured architecture of multispecies biofilm. *Mol. Microbiol.*, **1**, 35-47 (2009).
16. Jansen, P.M., Abdelbary, M.M.H., Conrads, G., A concerted probiotic activity to inhibit periodontitis-associated bacteria. *PLoS One*, **16**, e0248308 (2021).
17. Kaźmierczyk-Winciorek, M., Nędzi-Góra, M., Słotwińska, S.M., The immunomodulating role of probiotics in the prevention and treatment of oral diseases. *Cent. Eur. J. Immunol.*, **46**, 99-104 (2021).
18. Seminario-Amez, M., López-López, J., Estrugo-Devesa, A., Ayuso-Montero, R., Jané-Salas, E., Probiotics and oral health: A systematic review. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.*, **22**, e282-e288 (2017).
19. Park, H.E., Kang, K.W., Kim, B.S., Lee, S.M., Lee, W.K., Immunomodulatory potential of *Weissella cibaria* in aged C57BL/6J Mice. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **27**, 2094-2103 (2017).
20. Kang, M.S., Park, G.Y., In vitro evaluation of the effect of oral probiotic *Weissella cibaria* on the formation of multi-species oral biofilms on dental implant surfaces. *Microorganisms*, **9**, 2482 (2021).
21. de Alvarenga, J.A., de Barros, P.P., de Camargo, Ribeiro F., Rossoni, R.D., Garcia, M.T., Dos Santos Velloso, M., Shukla, S., Fuchs, B.B., Shukla, A., Mylonakis, E., Junqueira, J.C., Probiotic effects of *Lactobacillus paracasei* 28.4 to inhibit *Streptococcus mutans* in a gellan-based formulation probiotics. *Antimicrob. Probiotics Antimicrob. Proteins*, **13**, 506-517 (2021).
22. Livshits, M.A., Khomyakova, E., Evtushenko, E.G., Lazarev, V.N., Kulemin, N.A., Semina, S.E., Generozov, E.V., Govorun, V.M., Isolation of exosomes by differential centrifugation: theoretical analysis of a commonly used protocol. *Sci. Rep.*, **5**, 17319 (2015).
23. Kim, J.H., Jang, H.J., Lee, N.K., Paik, H.D., Antibacterial and antibiofilm effect of cell-free supernatant of *Lactobacil-*

- lus brevis* KCCM 202399 isolated from Korean fermented food against *Streptococcus mutans* KCTC 5458. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **32**, 56-63 (2021).
24. Seo, C.H., Kang, S.W., Choi, S.S., Inhibition Effects of *Weisiella cibaria* SPM402 and *Lactobacillus paracasei* SPM412 against Gingipains as a Major Virulence Factor for *Porphyromonas gingivalis*. *J. Food Hyg. Saf.*, **38**, 544-550 (2023).
 25. Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., Lin, X., An improvement of the 2⁻(-delta delta CT) method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat. Bioinforma. Biomath.*, **3**, 71-85 (2013).
 26. Lee, J.H., Yim, D.S., Choi, S.S., Antibacterial activity and anti-inflammatory effect of methanol extracts of *Salvia miltiorrhiza* against oral pathogenic bacteria. *Kor. J. Pharmacogn.*, **52**, 41-48 (2021).
 27. Vermilyea, D.M., Ottenberg, G.K., Davey, M.E., Citrullination mediated by PPAD constrains biofilm formation in *P. gingivalis* strain 381. *NPJ Biofilms Microbiomes.*, **5**, 7 (2019).
 28. Chen, Y., Shi, T., Li, Y., Huang, L., Yin, D., *Fusobacterium nucleatum*: The opportunistic pathogen of periodontal and peri-implant diseases. *Front Microbiol.*, **13**, 860149 (2022).
 29. Albuquerque-Souza, E., Balzarini, D., Ando-Sugimoto, E.S., Ishikawa, K.H., Simionato, M.R.L., Holzhausen, M., Mayer, M.P.A., Probiotics alter the immune response of gingival epithelial cells challenged by *Porphyromonas gingivalis*. *J. Periodontal Res.*, **54**, 115-127 (2019).
 30. Khattri, S., Kumbargere Nagraj, S., Arora, A., Eachempati, P., Kusum, C.K., Bhat, K.G., Johnson, T.M., Lodi, G., Adjunctive systemic antimicrobials for the non-surgical treatment of periodontitis. *Cochrane Database Syst. Rev.*, **11**, CD012568 (2020).