

## 작약 추출물의 구강병원균에 대한 항균성 및 구강암 세포 증식 억제효과

박현숙<sup>†</sup> · 민경진 · 차춘근\* · 송진욱\* · 손진창\*\*

계명대학교 공중보건학과, \*계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터,  
\*\*경상북도 보건환경연구원

## Antimicrobial Activities Against Oral Microbes and Growth-inhibitory Effect on Oral Tumor Cell by Extract of *Paeonia lactiflora*

Hyun Suk Park<sup>†</sup> · Kyung Jin Min · Chun Geun Cha\* · Jin Wook Song\* · Jin Chang Son\*\*

Department of Public Health, Keimyung University

\*The Center for Traditional Microorganism Resources, Keimyung University

\*\*Gyeongsangbuk-do Institute of Health and Environment

(Received December 6, 2006/Accepted January 15, 2007)

### ABSTRACT

*Paeonia lactiflora* was stepwise extracted with hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol and water. Anti-microbial activity of each extract was investigated. Methanol extract of *P. lactiflora* revealed anti-microbial activity against *S. mutans*, *C. albicans*, and *S. aureus*. Also, hexane fraction revealed anti-bacterial activity against *S. mutans* and ethyl acetate fraction acted as potent anti-microbial agent on *C. albicans* and *S. aureus*. The relative growth ratio (RGR) of hexane fraction of *P. lactiflora* against *S. mutans* were determined as 77.8% in concentration of 0.125 mg/ml, 98.46% in 0.25 mg/ml and 100% in 0.5 mg/ml. The ethyl acetate fraction of *P. lactiflora* revealed RGR against *C. albicans* as 52.5% in concentration of 0.125 mg/ml, 60.83% in 0.25 mg/ml and 78.33% in 0.5 mg/ml. It indicate that increasing concentration increase RGR. The measured minimal inhibitory concentration (MIC) of hexane fraction on *S. mutans* KCTC 5316 strain was 0.5 mg/ml and MIC of ethyl acetate fraction on *C. albicans* KCTC 7270 was 2.0 mg/ml. The experiment of inhibition to growth of KB cell (oral squamous cell carcinoma) result 61.9% in butanol, 76.7% in hexane extract of *P. lactiflora*. The hexane extract exhibit potent inhibition effect to the growth of KB cell. These results suggest that the hexane extract of *Paeonia lactiflora* has antimicrobial activity against *S. mutans* and has preventive effect to dental caries in addition to potent inhibition to KB cell growth.

**Keywords:** *S. mutans*, antimicrobial activity, oral tumor, KB cell, *Paeonia lactiflora* extracts

### I. 서 론

구강은 외계와 직접 통하고 있기 때문에 항상 미생물의 침입을 받고 있으며 구강의 환경은 영양적, 생리적으로 세균이 증식하는데 적합하여 항상 많은 세균이 정착하는 상재 세균총을 이룬다.<sup>1)</sup> 치아우식증과 치주질환은 치아발거원인의 대부분을 차지하는 구강병이다.<sup>2)</sup> 우

리나라의 경우 2003년 국민구강건강실태조사 결과, 국민의 영구치우식경험자율이 75.88%로 높았고 의치장착자율은 65-74세에서 71.4%로 나타나 앞으로도 지속적으로 체계적인 국민 구강보건 사업의 추진이 필요하다.<sup>3)</sup>

치아우식증은 치면세균막내 세균, 음식물, 타액의 상호작용에 의하여 유발되는 다인성 질환으로서 치면세균막내 세균 중에서도 *Streptococcus mutans*(*S. mutans*)가 주된 원인균으로 알려져 있다.<sup>4)</sup> *S. mutans*는 균체외 또는 균체 표층에 치아우식의 유발효소인 glucosyltransferase(GTase)라는 효소를 분비하고 이 GTase가 음식물 중 자당(sucrose)을 분해하여 치면에

<sup>†</sup>Corresponding author : Department of Public Health, Keimyung University  
Tel: 82-53-580-5229, Fax: 82-53-580-5469  
E-mail : kim422@kmu.ac.kr

불용성 glucan을 형성한다. Glucan이 구강내 다른 미생물들과 치면에 부착하여 치면세균막(dental plaque)을 생성한다.<sup>5,6)</sup> 여기에 치아우식 유발균과 혐기성 세균이 증식하면서 생성시킨 산에 의해 치아가 탈회되어 치아우식증을 유발한다.<sup>7)</sup>

치주질환은 치면세균막이 축적되어 치은의 염증이 다른 치아주위조직으로 확산되어 치근막과 백악질을 변성시키고 치조골을 파괴시켜 치아상실의 중요한 요인이 된다.<sup>8)</sup> 주요 원인 미생물은 *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*로<sup>9)</sup> 특히, *P. gingivalis*는 성인형 치주염과 급속진행형 치주염의 주요 원인균으로서 치조골의 심한 파괴와 함께 활발한 진행성, 화농성 치주염을 유발하는 것으로 보고되고 있다.<sup>10,11)</sup>

한편 *Candida albicans*(*C. albicans*)는 정상 구강 세균의 하나이며, 효모상태에서 독성이 낮으므로 상대적으로 과대성장과 조직 침투에 적절한 국소적인 환경 변화가 일어나야 발병된다. 조직의 저항력 감퇴와 상피표면의 변화로 구각염, 의치에 의한 점막염, 다형성 홍반, 백반증 및 파열된 수포성 병소 등이다.<sup>12)</sup>

*Staphylococcus aureus*(*S. aureus*)는 건강인의 비강, 인후의 점막이나 피부에 정상 세균총으로 기회감염을 통하여 국소 및 전신감염을 유발하는 그람양성구균으로 화농성 감염의 80% 이상을 차지하는 감염성 질환의 주요 원인균이다.<sup>13,14)</sup>

따라서 구강 내에서 *S. mutans*, *P. gingivalis*, *C. albicans*, *S. aureus*의 성장을 억제할 수 있다면 구강병을 크게 감소시킬 수 있을 것이다. 현재까지 주로 사용하고 있는 클로로헥시딘은 구강 내에 사용할 수 있는 효과적인 항균제로 널리 사용하고 있으나 고농도로 사용하거나 혹은 저농도로 오랫동안 사용할 경우, 혀나 치아에 착색을 일으키고 구강점막이 벗겨지거나 미각 이상을 일으키는 등 부작용이 발생할 수 있다.<sup>15)</sup>

구강암의 발생율은 전체 악성 종양의 약 3~5%에 해당되며,<sup>16)</sup> 구강암의 90% 이상이 편평상피세포암으로 보고되고 있다.<sup>17)</sup> 화학요법에 사용되는 항암제는 많은 발전에도 불구하고 독성문제는 해결하지 못하고 있다.<sup>18)</sup> 이에 항균제 및 항암제의 부작용을 최소화하기 위해 천연물을 이용한 천연 항균·항암제 개발이 지속적으로 시도되고 있다.

이 연구에서는 작약, 매실, 지황, 갈근, 상심, 신당안, 인동초, 익모초, 진범, 백지, 백편두를 포함하는 11종의 식물의 methanol 추출물을 사용하여 치아우식증 원인균으로 알려진 *S. mutans*와 치주질환의 원인균인 *P. gingivalis*, 기회감염과 구내염을 일으키는 효모균인 *C.*

*albicans*에 대한 항균성을 조사한 다음 그 중 항균성이 뛰어난 작약 추출물에 대하여 핵산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올, 물 등의 용매 분획별 항균성을 조사하였고, 구강편평상피세포인 KB 세포에 대한 증식 억제 효과에 대한 결과를 보고하고자 한다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 실험 재료

이 실험에서 사용한 작약, 매실, 지황, 갈근, 상심, 신당안, 인동초, 익모초, 진범, 백지, 백편두는 시중 한약재상에서 건조 상태의 것을 구입하여 사용하였다 (Table 1).

### 2. 기기 및 시약

실험에 사용한 기기로는 회전감압농축기(Eyela, N-1000, Japan), 배양기(Sanyo, MIR-153, Japan), ELISA reader(Molecular Device, SpecTRA MAX 340, Austria), microplate shaker(FINEPCR, SH30, Korea), 원심분리기(Hanil, Supra22K, Korea) 등이었고, 그 외 실험실에서 사용하는 일반기구들을 사용하였다.

시료의 추출 및 분획에 사용된 용매로써 메탄올, 핵산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올은 J. T. Baker사(USA)의 특급시약을 사용하였으며, dimethyl sulfoxide(DMSO), Brain Heart Infusion broth, Brain Heart Infusion agar, Mitis Salivarius agar, Muller Hinton broth, Muller Hinton agar 등은 Difco사(U.S.A) 제품을 사용하였다. 세포배양에 사용된 RPMI1640 with L-glutamine(300 mg/l), 25 mM HEPES and 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, fetal bovine serum은 Gibco BRL사(USA)의 시약을 사용하였고, MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide] solution은

Table 1. List of plants used for antimicrobial experiments

Botanical name	Korean name	Parts used
<i>Paeonia lactiflora</i> var. <i>hortensis</i>	Jakyak	Radix
<i>Prunus mume</i> S. et Z.	Maesil	Fruit
<i>Rehmannia glutinosa</i> Liboschitz	Jihwang	Radix
<i>Pueraria thunbergiana</i> Benth	Galgoun	Radix
<i>Morus alba</i> L.	Sangsim	Fruit
<i>Bulnesia sarmienti</i>	Sindangan	Tea(leaves)
<i>Lonicera japonica</i> Thumb	Indongcho	Fruit
<i>Leonurus sibiricus</i> L.	Exmocho	Whole
<i>Aconitum pseudolaeve</i> var. <i>erectum</i>	Jinbum	Radix
<i>Angelica dahurica</i> var.	Backji	Radix
<i>Dolichos lablab</i> L.	Backpeundu	Fruit

Sigma사(U.S.A), 그 외 시약은 특급 이상을 사용하였다.

### 3. 시료의 추출 및 분획

#### 1) 메탄올 추출

분쇄한 각 시료에 10배량(w/v)의 80% methanol을 가하여 24시간씩 3회 정치하여 추출하고, 추출액은 여과지(Adventec toyo2, Japan)를 사용하여 2회 감압 여과하고 농축하였다. 이를 동결건조 후 건조기에 보관하여 사용하였다.

#### 2) 메탄올 추출물의 용매분획

메탄올 추출물의 용매분획은 항균성 검색에서 항균활성이 가장 높게 나타난 작약 추출물을 일정량의 증류수를 가하여 현탁시킨 후 증류수와 동량의 헥산을 가하여 진탕하고 방치한 다음 분획 후 농축하여 헥산 분획을 얻었다. 남아있는 수용성층을 이와 같은 방법으로 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올을 첨가하여 순차 분획한 후 농축하여 각각 클로로포름 분획, 에틸아세테이트 분획 및 부탄올 분획을 얻었고 남은 수용성층은 농축하여 물 분획으로 하였다. 위 시료들은 동결건조 후 건조기에 보관하여 사용하였다.

### 4. 항균성 시험

#### 1) 사용균주 및 배지

이 실험에 사용한 균주들은 *S. mutans* KCTC 5316, *P. gingivalis* KCTC 5121, *C. albicans* KCTC 7270, *S. aureus* KCTC 1927로 한국생명공학연구소로부터 분양 받아 사용하였다.

#### 2) 디스크 확산법

시료의 항균성 검색은 paper disk( $\phi$ 6 mm)를 이용한 agar diffusion법<sup>19,20</sup>으로 실험하였다. Agar plate에 미리 배양한 균 배양액을 McFarland No. 0.5 농도가 되게 희석시킨 후 멸균 면봉으로 도말하고 추출물을 DMSO에 용해한 후 paper disk에 30  $\mu$ l 흡수시켜 건조시켰다. 용매를 완전히 휘발시킨 다음 agar plate 표면에 paper disk를 놓아 밀착시키고 멸균수 20  $\mu$ l로 확산시켰다. 박테리아는 37°C 배양기에서, 효모형 곰팡이는 24°C 배양기에서 24~48시간 배양한 후, disk 주위의 inhibition zone(mm)의 직경을 측정하였다.

#### 3) 헥산 및 에틸아세테이트 추출물의 농도에 따른 성장 억제효과

*S. mutans*는 Brain heart infusion(BHI) broth, *C. albicans*는 Muller hinton broth를 사용하였다. Broth에 시료 최고농도 0.5 mg/ml에서 최저농도 0.004 mg/ml까지 단계 희석한 시료를 첨가하였다. 균 배양액을

McFarland No. 0.5 농도가 되게 희석한 후, 다시 100배 희석한 균액을 각 well에 분주하여 박테리아는 37°C 배양기에서, 효모형 곰팡이는 24°C 배양기에서 24시간 배양한 다음 ELISA reader를 사용하여 625 nm에서 흡광도를 측정하여 성장변화를 관찰하였다.

#### 4) 액체배지희석법

작약 헥산·에틸아세테이트 추출물의 최소성장억제농도(minimal inhibitory concentration, MIC)를 측정하기 위해 액체배지희석법<sup>19</sup>을 이용하였다. 96-microwell plate에 broth를 분주한 후 시료 최고농도 16 mg/ml에서 최저농도 0.0625 mg/ml까지 연속적으로 단계 희석하였다. 균 배양액을 McFarland No. 0.5 농도가 되게 희석한 후, 다시 100배 희석한 균액을 각 well에 분주하여 박테리아는 37°C 배양기에서, 효모형 곰팡이는 24°C 배양기에서 24시간 배양한 후, 균의 증식이 없는 농도를 최소성장억제농도로 하였다.

#### 5) 농도에 따른 생존수 측정

작약 헥산 추출물의 *S. mutans*에 대한 생육저해작용은 BHI broth에 초기 균수가 약  $10^6$  CFU/ml가 되도록 조정하여 측정하였다. 헥산 추출물을 0.25, 0.5, 1 mg/ml의 농도로 첨가 후, 37°C, CO<sub>2</sub> 배양기에 24시간 배양하면서 일정량의 배양액을 Mitis Salivarius agar(1% potassium tellurite, 0.2 unit bacitracin)에 접종하여 배양시간에 따른 생존수를 측정하였다.

작약 에틸아세테이트 추출물의 *C. albicans*에 대한 생육저해작용은 Muller Hinton broth에 *C. albicans*의 초기 균수가 약  $10^6$  CFU/ml가 되도록 조정하였다. 에틸아세테이트 추출물을 0.5, 1, 2 mg/ml의 농도로 첨가 후, 24°C에서 24시간 배양하면서 일정량의 배양액을 Muller Hinton agar에 접종하여 배양시간에 따른 생존수를 측정하였다.

### 5. 작약 분획의 KB 세포 증식 억제효과 측정

#### 1) 세포주 및 배양조건

세포 증식 억제효과를 측정하기 위하여 사용된 세포는 인체 구강평평상피암주인 KB cell(KCLB 10017, Korean Cell Line Bank)이었으며, 한국 세포주 은행으로부터 분양받아 사용하였다. 세포 배양은 10% fetal bovine serum과 1% antibiotics(penicillin/streptomycin)를 함유한 RPMI 1640 with L-glutamine(300 mg/l), 25 mM HEPES and 25 mM NaHCO<sub>3</sub>(Gibco) 배지를 사용하여 37°C에서 95% O<sub>2</sub>와 5% CO<sub>2</sub>를 공급하고 100% 습도가 유지되는 배양기내에서 배양하였다.

#### 2) MTT assay법

세포의 대사활성이나 증식 및 세포독성을 측정하는데

사용되는 MTT 정량분석법<sup>21)</sup>으로 측정하였다. 실험을 위해 배양한 세포를 trypsin-EDTA 용액으로 처리하여 부착된 세포를 1000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 버린 후 배양액으로 세포 부유액을 만들고 세포수가  $1 \times 10^4$  cells/well이 되도록 분주 후 배양하였다. 다음날 배양액을 교환하고 시료를 DMSO로 녹여 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 mg/ml의 농도를 각 well에 첨가하여 3일간 배양하였다. Well에 MTT(2 mg/ml) 50  $\mu$ l를 가한 후 37°C 배양기에서 3시간 동안 방치하였다. MTT 용액을 제거하고, blue formazen 결정을 용해시키기 위해 DMSO를 200  $\mu$ l/well씩 넣어 5분간 실온 방치하였다. 세포활성의 정도는 ELISA reader에 의한 흡수파장 540 nm에서의 흡광도로 측정하였다. 증식 억제효과는 세포성장 저해율로 평가하였다.

### 6. 통계처리

실험은 모두 3회 반복 실험하였으며, 얻은 결과는 SPSS 12.0을 사용하여 평균과 표준편차로 제시하였으며, 일원분산분석(one-way ANOVA) 후 Duncan's multiple range test로 각 실험군별 유의성을 검증하였다. 유의성 검증은  $\alpha=0.05$  수준에서 실시하였다.

## III. 결과 및 고찰

### 1. 항균성시험

#### 1) 메탄올 추출물의 항균성

구강미생물에 대한 항균성을 검색하기 위하여 식물 11종을 메탄올로 추출하여 1차 항균성을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 11종 식물 중에서 작약 메탄올 추출물이 가장 광범위한 항균성을 나타내었다. 작약은 *S. mutans*, *C. albicans*, *S. aureus* 3종의 균주에 대해 항균성이 있었고 지황, 갈근은 *S. mutans* 균주에 대하여 항균성이 나타났으며, 신당안, 인동초, 익모초, 진법, 백지, 백편두는 *S. aureus* 균주에 대해 항균성이 있었다. 그러나 매실, 상심 추출물은 모든 실험균주에 대해 항균성이 나타나지 않았다.

황 등<sup>22)</sup>은 작약 메탄올 추출물의 식품부패 미생물에 대한 항균성 측정시 *S. aureus*에 효과가 나타났다고 보고하여 이 실험의 작약 메탄올 추출물의 항균성과 같은 결과를 보였다. 진<sup>20)</sup>는 생약자원 80여종 메탄올 추출물의 *S. mutans*에 대한 항균성 측정 결과, 80여종 중에서 작약이 효과가 있었다고 하여 이 실험과 같은 결과를 보고한 바 있다. 그리고 같은 연구에서 갈근이 미약하나마 항균력이 있다고 하였으나 이 실험에서는 효과가 없었다. 김 등<sup>23)</sup>은 매실과 오미자가 효모균인

**Table 2.** Antimicrobial activities of methanol extract of some herbs against bacterial strains

Botanical name	Inhibition zone (mm)*			
	<i>S. mutans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. gingivalis</i>
<i>Paeonia lactiflora</i> var. <i>hortensis</i>	17	10	10	-
<i>Prunus mume</i> S. et Z.	-	-	-	-
<i>Rehmannia glutinosa</i> Liboschütz	14	-	-	-
<i>Pueraria thunbergiana</i> Benth	15	-	-	-
<i>Morus alba</i> L.	-	-	-	-
<i>Bulnesia sarmienti</i>	-	-	8	-
<i>Lonicera japonica</i> Thumb.	-	-	9	-
<i>Leonurus sibiricus</i> L.	-	-	9	-
<i>Aconitum pseudolaeve</i> var. <i>erectum</i>	-	-	7	-
<i>Angelica dahurica</i> var.	-	-	10	-
<i>Dolichos lablab</i> L.	-	-	11	-

\*: Diameter, -: No inhibition

*C. albicans*에 대해 강한 항균력이 있었고 *S. aureus*에서는 항균력이 미약하다고 보고하여 이 실험과 상이한 결과를 보였다. 이는 식물의 생산 지역별로 항균성을 나타내는 성분이 차이가 나기 때문인 것으로 생각된다.

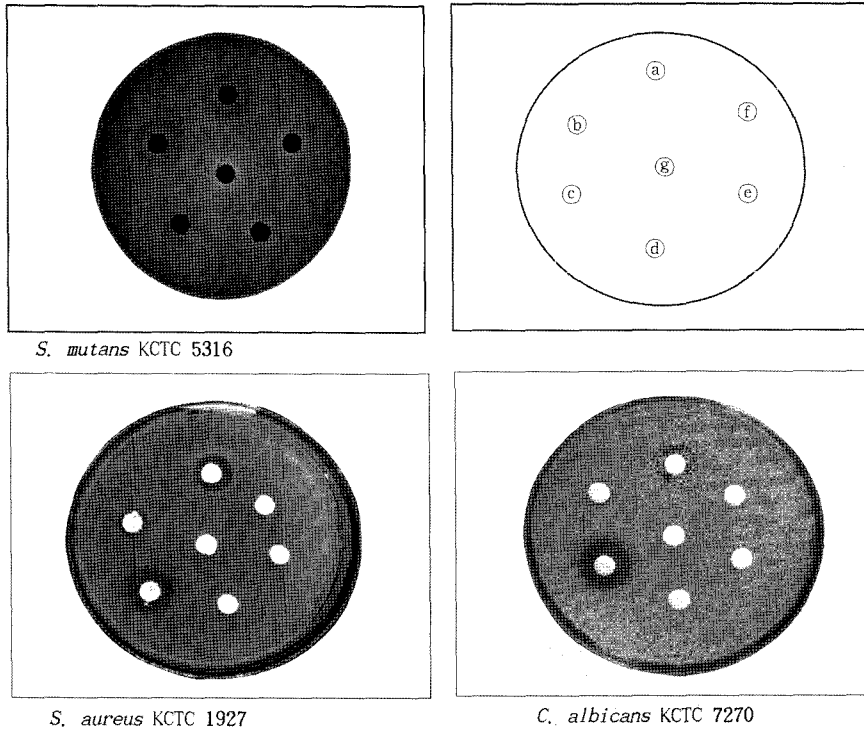
#### 2) 작약 메탄올 추출물의 용매 분획별 항균성

항균활성이 가장 광범위하게 나타난 작약의 메탄올 추출물을 각종 용매로 분획하여 항균활성을 측정된 결과는 Table 3 및 Fig. 1과 같다. 작약의 성분 중에는 benzoic acid가 함유되어 있는 것으로 보고되고 있어<sup>24,25)</sup> Fig. 1에서 benzoic acid만의 항균력도 함께 측정하였다. Benzoic acid는 합성 보존료로 널리 사용되는 물질로 *Vibro*속 세균에 대해 항균력이 있음이 보고되었다.<sup>26)</sup> 그러나 이 실험에서 benzoic acid는 *C. albicans*, *S. aureus* 균주 모두에 대해서 효과가 없었다. 또한 benzoic acid는 1차 항균력 실험에서 *S.*

**Table 3.** Antimicrobial activities of various solvent fractions from methanol extract of *Paeonia lactiflora* against bacterial strains (10 mg/ml)

Strains	Inhibition zone(mm)*			
	Hexane	Chloroform	Ethyl acetate	Butanol Water
<i>S. mutans</i>	23±0.7	17.1±0.9	9.1±1.2	-
<i>C. albicans</i>	-	-	16±1.5	-
<i>S. aureus</i>	12±1.1	8.1±1.0	14.2±1.6	-

Each value represents the mean of 3 experiments, \*: Diameter



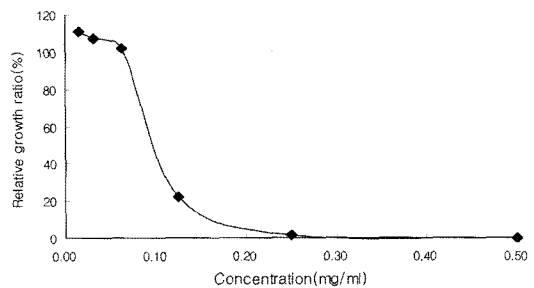
**Fig. 1.** Antimicrobial activities of each fraction from methanol extract of *Paenonia lactiflora* against bacterial strains (10 mg/ml).  
 Ⓐ: Hexane fraction, Ⓑ: Chloroform fraction, Ⓒ: Ethyl acetate fraction, Ⓓ: Butanol fraction, Ⓔ: Water fraction, Ⓕ: Benzoic acid, Ⓖ: Control(DMSO).

*mutans*에 대하여 효과가 나타나지 않아서 용매분획별 항균성 측정시 배제하였다(Fig. 1의 *S. mutans*). 헥산 추출물은 실험균주 *S. mutans*, *S. aureus* 2종에서 나타났으며, 그 중 *S. mutans*에서 강한 항균성이 있었고, 클로로포름 추출물에서도 *S. mutans*, *S. aureus* 2종에서 항균성을 나타내었으며, 에틸아세테이트 추출물은 *S. mutans*; *C. albicans*, *S. aureus* 3균주 모두에 대해 항균력이 있었고 그 중 *C. albicans*, *S. aureus* 균주에서 강한 항균성을 나타내었다.

황 등<sup>22)</sup>은 작약의 용매분획별 항균성 측정에서 에틸아세테이트 추출물이 *S. aureus*에 대해 항균성이 있다고 보고하여 이 실험과 같은 결과를 보였다. 손<sup>26)</sup>은 작약의 용매분획별 항균성 측정시 에틸아세테이트 분획이 *Vibrio*속 세균에 대해 가장 효과가 우수하다고 보고하였다.

3) 헥산 추출물의 농도에 따른 *S. mutans*의 성장억제 효과

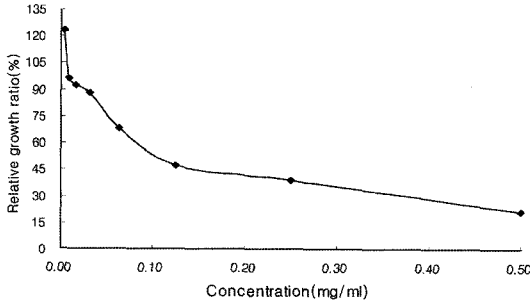
*S. mutans*에 대한 항균성 시험에서 작약의 헥산 분획 추출물이 가장 우수한 항균성을 보였다. 따라서 *S. mutans*에 대한 성장억제효과는 작약 헥산 추출물을 농



**Fig. 2.** Relative growth ratio (%) of *S. mutans* cultured at different concentrations of hexane extract of *Paenonia lactiflora*.

Note: standard deviation was too small to be appeared in graph.

도별(mg/ml)로 처리하여 24시간동안 배양한 후 세균의 성장변화와 추출물을 넣지 않은 대조군에 대한 성장변화를 상대성장률(Relative Growth Ratio, RGR)로 산출하였다. 0.125 mg/ml에서  $77.78 \pm 0.18\%$ , 0.25 mg/ml에서  $98.46 \pm 0.02\%$ , 0.5 mg/ml 농도에서는  $100 \pm 0.04\%$ 로 성장이 완전히 억제되었다. 따라서, 추출물의



**Fig. 3.** Relative growth ratio (%) of *C. albicans* cultured at different concentrations of ethyl acetate extract of *Paeonia lactiflora*.  
Note: standard deviation was too small to be appeared in graph.

농도가 증가함에 따라 성장이 억제되는 것을 볼 수 있다(Fig. 2).

4) 에틸아세테이트 추출물의 농도에 따른 *C. albicans*의 성장억제효과

*C. albicans*에 대한 항균성 시험에서 작약의 에틸아세테이트 분획 추출물의 항균성이 가장 높게 나타났으며, *C. albicans*에 대한 작약 에틸아세테이트 추출물의 농도별(mg/ml) 상대성장률은 0.125 mg/ml에서 52.5±0.06%, 0.25 mg/ml에서 60.83±0.04%, 0.5 mg/ml 농도에서는 78.33±0.14%로 성장이 억제되었다. 농도가 증가함에 따라 성장이 억제되는 것을 볼 수 있다(Fig. 3).

5) 작약 추출물의 최소성장억제농도

작약 hexan 추출물의 *S. mutans*에 대한 최소성장억제농도(minimal inhibitory concentration, MIC)를 측정할 결과, 0.5 mg/ml로 나타났고 작약 에틸아세테이트 추출물의 *C. albicans*에 대한 MIC를 측정할 결과는 2.0 mg/ml이었다(Table 4). 황 등<sup>22)</sup>은 작약 에틸아세테이트 추출물이 *S. aureus*에 대해 0.5 mg/ml에서도 항균력이 있었다고 보고하였으나 이 실험에서는 1 mg/ml의 농도에서도 *S. aureus*에 대해 항균력이 나타나지 않았으므로 MIC 측정에서 배제하였다.

최근에 천연물을 이용한 미생물 억제 연구는 활발히

**Table 4.** Minimal inhibitory concentrations of hexane·ethyl acetate extracts on the growth of oral bacteria

Strains	Fraction	Minimal growth inhibitory conc. of <i>Paeonia lactiflora</i> extracts (mg/ml)
<i>S. mutans</i>	Hexane	0.5
<i>C. albicans</i>	Ethyl acetate	2.0

Each value represents the mean of 3 experiments

이루어지고 있다. 대표적인 천연물질로 sanguinarine, propolis, flavonoid 등이 있다. Sato 등<sup>27)</sup>은 *Erythrina variegata*에서 분리한 isoflavonoids 중 erycrist agallin이 *S. mutans* 균주에 대한 MIC가 6.25 µg/ml이었고, Hayacibara 등<sup>28)</sup>은 propolis를 분획하여 *S. mutans*에 대해 MIC를 측정할 결과, hexan과 클로로포름 분획이 25~400 µg/ml 범위에서 항균력이 나타났다고 하였다. 임 등<sup>29)</sup>은 알로에 베라와 propolis가 *S. mutans*와 *C. albicans*에 대해 항균효과가 있다고 보고하였고, 그 밖에 상백피의 분획별 추출물이 *S. mutans*와 *P. gingivalis*에 대한 항균력은 에틸아세테이트 추출물에서 나타나 이를 분리 정제한 결과 Kuwanon G로 확인되었다.<sup>30)</sup> 이와 같은 선행연구는 작약보다 모두 낮은 농도에서 MIC가 나타났으나 이들은 순수 물질을 분리하여 측정할 결과이므로 작약 또한 순수 물질을 분리하면 더 낮은 농도에서 MIC가 나타날 것으로 추정된다.

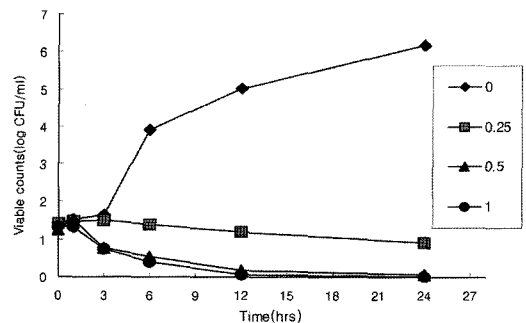
작약의 뿌리는 주로 부인병, 진통, 소염제 등 약재로 이용되고 있으나<sup>26)</sup> 이 실험에서 *S. mutans*와 *C. albicans*에 대한 항균효과가 나타나 천연항균제로서 이용이 가능할 것으로 생각된다.

6) 농도에 따른 생균수 측정

(1) hexan 추출물의 농도에 따른 *S. mutans* 생균수 측정

생균수를 측정하기 위해 BHI broth에 *S. mutans*가 약 10<sup>6</sup> CFU/ml 정도가 되도록 조정하였다. 작약 hexan 추출물의 *S. mutans*에 대한 MIC 측정 결과를 토대로 추출물의 농도를 0, 0.25, 0.50, 1.00 mg/ml를 첨가한 후 37°C, 24시간 배양하면서 일정 시간별로 생균수를 측정할 결과는 Fig. 4와 같다.

*S. mutans*의 생균수를 측정할 결과 작약 hexan 추출물을 첨가하지 않은 대조군에는 3시간 이후부터 급격히 균수가 증가하였다. 0.25 mg/ml의 농도를 첨가한 경우는 6시간까지는 생균수의 변화가 거의 없었다. 0.5 mg/



**Fig. 4.** Inhibitory effect of hexane fraction of *Paeonia lactiflora* on the growth of *S. mutans* (mg/ml).

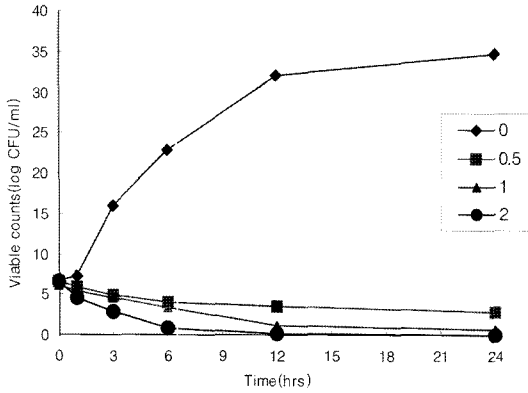


Fig. 5. Inhibitory effect of ethyl acetate fraction of *Paonia lactiflora* on the growth of *C. albicans* (mg/ml).

ml를 첨가한 경우는 1시간 이후부터 균수가 감소하기 시작하여 24시간 이후에는 균이 사멸하였다. 1.0 mg/ml의 농도에서도 첨가 1시간부터 급격히 감소하여 24시간 이후에는 균수가 완전히 사멸하였고, 농도가 증가함에 따라 *S. mutans*의 생균수가 감소하였다. 또한 0.5 mg/ml 농도에서 24시간 이후 균이 사멸한 것은 MIC가 0.5 mg/ml인 것과 일치하였다.

(2) 에틸아세테이트 추출물의 농도에 따른 *C. albicans* 생균수 측정

생균수를 측정하기 위해 Muller Hinton broth에 *C. albicans*가 약  $10^6$  CFU/ml 정도가 되도록 조정하였다. 작약 에틸아세테이트 추출물의 *C. albicans*에 대한 MIC 실험 결과를 토대로 추출물의 농도 0, 0.5, 1.0, 2.0 mg/ml를 첨가한 후 24°C, 24시간 배양하면서 일정 시간별로 생균수를 측정된 결과는 Fig. 5와 같다. *C. albicans*의 생균수를 측정된 결과 작약 에틸아세테이트 추출물을 첨가하지 않은 대조군에는 1시간 이후부터 급격히 생균수 증식이 일어났다. 0.5 mg/ml의 농도를 첨가한 경우는 1시간까지는 균수의 변화가 거의 없었고 그 이후부터는 일정하게 균수가 감소되었다. 1.0 mg/ml를 첨가한 경우는 1시간 이후부터 균수가 감소하기 시작하였고 그 이후부터는 일정하게 균수가 감소되었다. 2.0 mg/ml의 농도에서는 첨가 순간부터 급격히 감소하여 24시간 이후에는 균이 완전히 사멸하였다. 실험 결과 농도의 증가에 따라 *C. albicans*의 생균수가 감소하였으며, 2 mg/ml 농도에서 24시간 이후 균이 사멸한 것은 MIC가 2 mg/ml로 나타난 결과와 일치하였다.

## 2. 작약 분획의 KB 세포 증식 억제효과

KB 세포주에 작약의 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이

Table 5. Growth-inhibitory effect of extracts of *Paonia lactiflora* on KB cell

Fractions	Concentration (mg/ml)	Mean $\pm$ S.D. <sup>2)</sup>	Inhibition rate (%) <sup>1)</sup>
Hexane	control	1.21 $\pm$ 0.14 <sup>a3)</sup>	0
	0.05	0.84 $\pm$ 0.29 <sup>b</sup>	30.6
	0.10	0.57 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	53.0
	0.25	0.37 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	69.2
	0.50	0.28 $\pm$ 0.03 <sup>bd</sup>	76.7
F		29.054	
P		0.000	
Butanol	control	1.21 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	0
	0.05	0.69 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>	43.1
	0.10	0.71 $\pm$ 0.30 <sup>b</sup>	41.0
	0.25	1.01 $\pm$ 0.19 <sup>c</sup>	16.7
	0.50	0.46 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	61.9
F		12.160	
P		0.000	

<sup>1)</sup>Inhibition rate (%) = [1 - (treated O.D./control O.D.)]  $\times$  100

<sup>2)</sup>Values are mean  $\pm$  S.D.

<sup>3)</sup>Values with different superscripts in the same column are significant different(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

트, 부탄올, 물 추출물을 각각 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 mg/ml씩 첨가하여 배양한 후 MTT 정량분석법을 이용하여 증식 억제효과를 측정된 결과는 Table 5와 같다. 작약 추출물 0.5 mg/ml를 첨가하였을때의 KB 세포 증식 억제효과는 헥산과 부탄올 추출물에서 각각 76.7%, 61.9%의 저해율을 보여 대조군에 비하여 유의한 억제효과를 보였다(p<0.05). 부탄올 추출물보다 헥산 추출물에서 KB 세포 억제효과가 높게 나타났다. 반면 클로로포름, 에틸아세테이트, 물 추출물에서는 대조군에 비해 오히려 성장이 증식되었다. 구강암 치료의 화학요법은 많은 발전에 불구하고 독성문제는 해결하지 못하고 부작용을 최소화하기 위해 천연물을 이용한 항암제 개발이 지속적으로 연구되고 있다. 포공령 물 추출물에서는  $10^{-2}$  mg/ml 농도 경우 72.2%의 성장이 억제되었고 보고하였고 또한 농길리 추출물에서는  $10^{-2}$  mg/ml 농도의 경우 74.8%의 억제효과를 보였다고 보고하였다.<sup>31,32)</sup> 이상은 이 연구보다 항암활성이 좋은 연구들이었다. 된장 및 콩 추출물을 KB에 대한 억제효과 측정 시 된장이 콩 추출물보다 효과가 뛰어났으며 5 mg/ml의 된장 에틸아세테이트 분획에서 89.8% 증식이 억제된다고 보고하였다.<sup>33)</sup> 이 등<sup>16)</sup>은 14종의 약용식물을 70% 메탄올 추출물로 얻어 KB 세포의 성장억제 효과를 실험한 결과, 0.5 mg/ml에서 파두, 독활, 당댕이 나무가 각각 30, 15, 62%였다고 보고하여 작약 헥산 추

출물이 위 선행연구에 비교하여 효과가 높은 것으로 나타났다. 많은 식물을 거의 제한없이 섭취하는 우리나라 실정으로 보면 효능과 부작용에 대한 더 많은 연구가 요구되며 고농도에서 사용시 정상세포에서도 부작용이 있을 것으로 우려된다. 작약 핵산 추출물이 낮은 농도에서 KB 세포 증식 억제효과가 나타나 앞으로 유용하게 사용되리라 생각된다.

#### IV. 결 론

11종 식물의 메탄올 추출물을 이용하여 항균활성을 조사하고 그 중 가장 항균성이 양호하게 나타난 작약 메탄올 추출물을 극성별 용매 분획하여 구강병원인균에 대한 항균성 및 구강편평상피세포인 KB 세포의 증식 억제효과를 알아본 결과는 다음과 같다.

작약의 핵산 추출물은 실험균주 2종에서 나타났으며, *S. mutans*에서 강한 항균성이 있었고, 클로로포름 추출물에서도 2종에서 항균성이 나타났다. 에틸아세테이트 추출물은 3균주 모두에서 항균성이 나타났고 그 중 *C. albicans*, *S. aureus* 균주에서 강한 항균성이 있었다.

*S. mutans*에 대해 작약 핵산 추출물의 농도별(mg/ml) 상대성장률(Relative Growth Ratio)은 0.125 mg/ml 농도에서 77.78%, 0.25 mg/ml 농도에서 98.46%로 성장 억제효과가 나타났고, 0.5 mg/ml 농도에서는 100%로 성장이 완전히 억제되었다. *C. albicans*에 대해 작약 에틸아세테이트 추출물의 농도별(mg/ml) 상대성장률은 0.125 mg/ml 농도에서 52.5%, 0.25 mg/ml 농도에서 60.83%로 성장억제효과가 나타났고, 0.5 mg/ml 농도에서는 78.33%로 성장이 억제되었다.

작약 분획별 KB 세포의 증식 억제효과는 작약 추출물 0.5 mg/ml을 첨가하였을 때, 핵산 추출물은 76.7%의 저해율을, 부탄올 추출물은 61.9%의 저해율을 보였다. 작약 핵산 추출물에서 KB 세포 증식 억제효과가 가장 높았다.

이상의 결과에서 작약은 핵산 추출물에서 치아우식원인균인 *S. mutans*의 항균효과가 가장 높았고, 에틸아세테이트 추출물에서는 구각염, 의치에 의한 점막염의 원인균인 *C. albicans*에 대하여 항균효과가 있었다. 그리고 구강편평상피세포인 KB 세포에 대한 증식 억제효과가 있어서 치아우식예방효과와 암예방 효과를 기대할 수 있을 것으로 생각된다. 향후, 작약 핵산 성분을 분리, 정제하여 항균력이 있는 성분과 KB 세포 증식 억제작용이 있는 성분을 밝히는 연구가 더 필요하다고 생각된다.

#### 감사의 글

본 연구는 산업자원부지원 계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터의 지원에 의한 것입니다.

#### 참고문헌

1. 이성림, 김종규 : 콩 추출물의 구강미생물에 대한 항균효과. 한국환경보건학회, **32**(2), 192-197, 2006.
2. 김종배 : 공중구강보건학. 고문사, 2004.
3. 보건복지부 : 2003 국민구강건강실태조사, 2004.
4. Loesche, W. J., Rowan, J., Straffon, L. H. and Loos, P. J. : Association of *Streptococcus mutans* with human dental decay. *Infection and Immunity*, **11**, 1252-1260, 1975.
5. Hanada, N. and Takehara, T. : (1-3)-alpha-D-glucan synthase from *Streptococcus mutans* AHT(serotype g) dose not synthesise glucan without primer. *Carbohydrate Research*, **168**, 120-124, 1987.
6. Hamada, S. and Slade, H. D. : Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiological Reviews*, **44**(2), 331-384, 1980.
7. Takahashi, N. : Microbial ecosystem in the oral cavity: Metabolic diversity in an ecological niche and its relationship with oral diseases. *International Congress Series*, **1284**, 103-112, 2005.
8. 이만섭: 치주과학, 현대의학사, 1991.
9. Tanaka, S., Murakami, Y., Ogiwara, T., Shoji, M., Seto, K. and Nagasaki, M. : The high frequency of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Prevotella nigrescens* in subgingival plaque may be associated with periodontal diseases in subjects aged 30 to 49 years. *Journal of Evidence-Based Dental Practice*, **3**, 103-104, 2003.
10. Mayanagi, G., Sato, T., Shimauchi, H. and Takahashi, N. : Microflora profiling of supragingival plaque of healthy and Periodontitis subjects by nested PCR. *International Congress Series*, **1284**, 195-196, 2005.
11. 최인식 : Polyphosphate의 *Porphyromonas gingivalis*에 대한 항균효과. 경희대학교 박사학위논문, 1998.
12. 대한구강내과학회 편 : 구강진단학개론. 고문사, 1995.
13. 김강주: 치과영역 포도상구균(*Staphylococcus*)의 분포 및 항생제 내성. 대한치과의사협회지, **34**(2), 110-118, 1996.
14. 정경석, 이희주 : 인천시내 일부 종합병원 종사자와 대학생의 비강내 *Staphylococcus aureus*의 보균상태 및 항균제에 대한 감수성. 한국환경보건학회, **19**(1), 71-76, 1993.
15. 배광학, 전은주, 이선미, 이은정, 백대일, 김진범 : CTS 50 키토산이 수종의 구강병원인균에 미치는 항균효과. 대한구강보건학회지, **29**(1), 58-66, 2005.
16. 이영훈, 김여갑, 김정희 : 구강암에 대한 약용식물 추출물의 항암효과에 관한 연구. 대한구강악안면외과학회지, **26**(1), 53-58, 2000.
17. 이종수, 김여갑, 김정희 : 소목 추출물의 구강암 및 골육종 세포주에 대한 항암작용에 관한 연구. 대한구강



- 악안면외과학회지, **27**(4), 281-288, 2001.
18. 이종환, 김명진 : 구강편평세포암 세포주에서의 cisplatin 과 5-fluorouracil의 항암감수성의 측정. 대한구강악안면외과학회지, **24**(2), 165-171, 1998.
  19. 국립보건원 : 병원미생물검사기준, 국립보건원, 1985.
  20. 전형오 : *Streptococcus mutans*에 대한 오미자(*Schizandra chinensis*)의 항균활성 성분. 충남대학교 석사학위논문, 2000.
  21. Mosmann, T. : Rapid colorimetric assay for celler growth and survival : Application to proliferation and cytotoxicity assay. *Journal of Immunological Methods*, **65**, 55-63, 1983.
  22. 황재선, 전희정, 한영실 : 백작약으로부터 식품부패 미생물에 대한 항균성 물질의 분리 및 동정. 한국조리과학회지, **16**(5), 445-452, 2000.
  23. 김영숙, 박영선, 임무현 : 매실과 오미자 추출물의 항균성과 기능성 고추장의 제조. 한국식품과학회지, **35**(5), 893-897, 2003.
  24. 서울대학교 천연물과학연구소 : 동양의약과학대전, 학술편수관, 2003.
  25. 지승택, 이성진, 이강은, 손용태, 정요경 : 작약(*Paeoniae radix*) 추출물의 식후 과혈당 억제작용. 한국식품영양과학회지, **31**(1), 131-135, 2002.
  26. 손진창 : 수 종 식물추출물의 병원성 *Vibrio*속 세균에 대한 항균성. 계명대학교 박사학위논문, 2002.
  27. Sato, M., Tanaka, H., Fujiwara, S., Hirata, M., Yamaguchi, R., Etoh, H. and Tokudal, C. : Antibacterial property of isoflavonoids isolated from *Erythrina variegata* against cariogenic oral bacteria. *Phytomedicine*, **9**, 427-433, 2002.
  28. Hayacibara, Mitsue F., Hyun Koo, Pedro L. Rosalen, Simone Duarte, Eliane M. Franco, William H. Bowen, Masaharu Ikegaki, and Jaime A. Cury : In vitro and in vivo effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. *Journal of Ethnopharmacology*, **101**, 110-115, 2005.
  29. 임지영, 문유선, 정승희, 이규임, 유수연, 심창섭, 박원봉 : 알로에 베라 및 프로폴리스 혼합 추출물의 구강내 원인균에 대한 항균활성. 한국식품영양과학회지, **31**(5), 899-904, 2002.
  30. 유재선 : 상백피로부터 분리된 Kuwanon G의 *Streptococcus mutans*에 대한 항균활성 연구. 강원대학교 박사학위논문, 2001.
  31. 이명호, 한두석 : 포공령 물추출물이 배양 인체 구강유상피암종세포에 미치는 항암효과. 원광생체재료·매식, **7**(2), 79-92, 1998.
  32. 박종운, 한두석 : 농길리 추출물의 인체 구강유상피암종세포에 대한 세포독성. 원광치의학, **11**(1), 303-315, 2002.
  33. 이성림, 김종규 : 한국 전통 된장 및 추출물의 KB 세포에 대한 증식 억제효과. 한국환경보건학회, **31**(5), 444-450, 2005.