

Antibacterial and Antibiofilm Activities of *Alnus japonica* Stem Extract against *Porphyromonas gingivalis*

Hye Soo Kim and Soo Jeong Cho*

Department of Pharmaceutical Engineering, Gyeongnam National University of Science and Technology, 33 Dongjin-ro, Jinju 52725, Korea

Received November 12, 2019 / Revised November 29, 2019 / Accepted December 2, 2019

This study investigated the potential of dye plants as natural oral health products. The antibacterial activity of ethanol stem extracts of *A. japonica*, *R. verniciflua* Stokes, *G. jasminoides*, *D. morbi-fera*, *P. amurense* Rupr., and *S. japonica* against *P. gingivalis* KCTC 5352, *S. mutans* KCTC3065, *S. downei* KCTC3634, *S. sanguinis* KCTC3284, and *S. gordonii* KCTC 3286 was confirmed. Among the stem extracts from 6 dye plants grown in Korea, ethanol extract from *A. japonica* stem (1 mg/disc) showed the highest antibacterial activity against *P. gingivalis* KCTC5352. The *A. japonica* stem extracts showed antibacterial activity similar to chlorhexidine, which was used as a positive control. The MIC and MBC of *P. gingivalis* KCTC5352 were 0.4 mg/ml and 0.6 mg/ml, respectively. The biofilm production rate and cell growth of *P. gingivalis* KCTC5352 in the cultures treated with 0.2-2.0 mg/ml of *A. japonica* extract were significantly decreased in a concentration-dependent manner. In addition, the mRNA expression of the superoxide dismutase and *fimA* associated with fimbriae formation in these cultures was suppressed, also in a concentration-dependent manner. Based on these results, it is concluded that *A. japonica* stem extracts can be used as an oral health product derived from natural materials, as demonstrated by its antibacterial action against and inhibition of biofilm formation of *P. gingivalis* KCTC5352.

Key words : *Alnus japonica* stem, antibacterial activity, biofilm formation, *fimA*, *P. gingivalis* KCTC5352

서 론

구강 건강과 관련된 질환 중 치아우식증과 치주질환은 아동에서부터 성인, 노인에 이르기까지 다양한 연령층에서 발병되는 구강질환으로 한 번 손상이 발생되면 영구손상으로 남는 경향이 높아 생애 전 주기에 걸쳐 삶의 질을 떨어뜨리는 원인이 되고 있다[19]. 치아우식증과 치주질환은 구강 내 존재하는 세균에 의해 발병되는 세균감염성 질환이며 구강 세균은 음식물 섭취를 통해 영양분을 공급받고 세균 밀도가 높아지면 치아표면에 치면세균막(dental biofilm)이라 불리는 세균막(biofilm)을 형성하게 된다. 치면세균막은 치아 표면에 부착된 당 단백질(glycoprotein) 성분의 얇은 막에 약 700여 종 이상의 세균들이 부착하여 형성된 점착성 세균막이다[16]. 구강 내 치면세균막은 물리적으로 두꺼운 층을 형성하기 때문에 외부 물질의 침투가 어렵고, 세포 간 상호작용을 통해 유전적 변이가 일어나기 때문에 부유 세균에 비해 항균 물질에 대한 저항

성이 높다[24, 25]. 치면세균막이 적절하게 제거되지 못하면 치면에 침착하게 되고 시간이 지나면서 치석으로 변하게 된다. 치석은 계속 방치하게 되면 치은출혈, 부종, 치조골 흡수로 인한 치아 흔들림이 발생될 수 있고 치아우식증과 치주질환의 원인이 된다[10]. 치주질환은 치아 주변 조직인 치은, 치조골, 치주인대 및 백악질에 염증이 발생하는 질환으로 치아 소실의 주요한 원인이며 동맥경화증과 같은 심혈관질환뿐만 아니라 폐혈증, 유산, 조산, 폐렴 및 당뇨병과도 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되었다. 치주질환과 관련된 세균들은 주로 치은연하 치면세균막에 존재하는 그람음성 혐기성세균으로 *P. gingivalis*가 대표적이다[5, 8]. *P. gingivalis*는 콜라겐을 분해하고 암모니아, 황화수소, 아민, 리포폴리사카라이드 등과 같은 독소를 분비하여 치주조직에 직접적인 영향을 미친다[9, 18, 23]. 또한, *P. gingivalis*의 대사산물들은 생체 면역계를 자극하고 자극된 체액성 및 세포성 면역계는 여러 작용에 의해 활성산소, 인터루킨과 같은 사이토카인을 분비하여 잇몸 염증을 유발하기도 한다[9]. 그러므로 치주질환을 예방하고 치료하는데 있어 치면세균막을 제거하는 것은 필수적이다. 치면세균막을 제거하는 가장 좋은 방법은 올바른 잇솔질이지만 잇솔질로는 치아 교합면에 존재하는 세균막이나 치아 인접면에 있는 세균막까지는 제거하기 어렵다. 이러한 단점을 보완하기 위해 치실이나 항균제가 첨가된 구강케어제품을 사용하고 있다. 현재 구강용 항균제로는 bisbiguanides 제제(chlorhexidine), 4급암모늄 제제(cetylpyridium, benzalkonium chloride), 페놀화

*Corresponding author

Tel : +82-55-751-3397, Fax : +82-55-751-3399

E-mail : sjcho@gntech.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.

합물(triclosan)이 많이 사용되고 있으나 이들 화합물 유래 항균제는 장기간 사용시 치아나 연조직에 착색이 유발되고 미각 변화 가능성 등이 보고되고 있어서 이를 대체할 수 있는 천연물유래 구강건강소재 개발에 관한 연구가 주목을 받고 있다[9, 11, 13]. 최근 들어 오배자 추출물[29], 편백[14], 몰약[2], 라타니아[2], 카모밀레[2], 인도감나무 줄기 추출물[13] 등이 *P. gingivalis*에 대해 항균작용이 있음이 보고되면서 천연물로부터 인체에 무해하고 구강 병원미생물에 대해서는 항균활성이 우수한 구강건강소재 개발에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다[4].

오리나무(*Alnus japonica*)는 자작 나무과(Betulaceae)에 속하는 낙엽 교목으로 우리나라 중부 이북의 해발 200-900 m 지역에 주로 분포하고 있으며 꽃은 취산화서이다. 한방에서는 오리나무 수피를 적양이라고 부르며 해열, 지혈, 수렴 등의 효능이 있어 오래전부터 장염, 설사, 외상출혈, 혈변 등의 치료에 사용해왔고 민간에서는 숙취해소에 사용하였다[1]. 오리나무에는 lupenon, β -amylin, glutenol, taraxerol, betulinic acid 등 여러 종류의 triterpenoid 외에 β -sitosterol, heptacosane, 지방족 alcohol, pyrocatechol 계열 tannin과 pillioin, salvigenin 및 5-hydroxy-4', 7-dimethoxyflavone 등의 flavonoids 화합물이 포함되어 있으며[3, 12, 17, 21, 26, 32] 오리나무의 항암 효과[30], 항산화효과[15, 22], 항염효과[20], 간보호효과[19] 등에 관한 생리활성 연구가 보고되었지만 구강미생물에 대한 오리나무 줄기 추출물의 항균활성에 관한 연구는 미비한 실정이다.

본 연구에서는 구강미생물인 *P. gingivalis*에 대한 오리나무 줄기 추출물의 항균활성과 바이오필름 생성 억제 효과를 조사하여 천연물 유래 구강 건강소재로써 오리나무 줄기 추출물의 이용 가능성을 알아보고자 한다.

재료 및 방법

사용 균주 및 추출물

구강미생물에 대한 국내 자생 염료식물의 항균활성을 알아보기 위해 사용된 균주는 그람음성균인 *Porphyromonas gingivalis* KCTC5352와 그람양성균인 *Streptococcus mutans* KCTC 3065, *Streptococcus downei* KCTC3634, *Streptococcus sanguinis* KCTC3284, *Streptococcus gordonii* KCTC3286 등으로 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)에서 분양받아 사용하였다. *P. gingivalis*는 tryptic soy agar hemin menadione 배지에 계대한 다음 37°C에서 혐기배양하였고 *S. mutans*는 brain-heart infusion agar (BHIA; BD, Franklin Lakes, USA)에 계대한 다음 37°C에서 혐기배양하였다. *S. downei*, *S. sanguinis*, *S. gordonii*는 tryptic soy yeast extract medium 배지에 계대한 다음 37°C에서 혐기배양하였다.

국내 자생 염료식물인 오리나무(*A. japonica*), 옷나무(*Rhus*

verniciiflua Stokes), 치자나무(*Gardenia jasminoides*), 황칠나무(*Dendropanax morbifera*), 황벽나무(*Phellodendron amurense* Rupr.), 회화나무(*Sophora japonica*) 등의 줄기는 서울 경동시장 도매상가에서 건조된 것을 구매한 다음 분쇄하여 사용하였다. 분쇄한 오리나무, 옷나무, 치자나무, 황칠나무, 황벽나무, 회화나무 등의 줄기는 각각 80% 에탄올에 침지한 다음 상온에서 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 DMSO에 용해하여 사용하였다. 조추출물의 추출수율은 각각 약 37.5%, 30.3%, 32.1%, 27.8%, 18.9%, 22.6% 였다.

추출물의 항균활성

추출물의 구강미생물에 대한 항균활성은 agar diffusion method [6]에 따라 *P. gingivalis*, *S. mutans*, *S. downei*, *S. sanguinis*, *S. gordonii*가 각각 도말된 고체배지에 추출물의 농도가 1 mg/disc인 paper disc (8 mm diameter, ADVANTEC, Tokyo, Japan)를 얹어 배양한 다음 paper disc 주위에 나타난 clear zone의 크기를 측정하여 조사하였다. 양성 대조구로는 구강케어제품에 사용되고 있는 항균제인 chlorhexidine (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), sodium lauryl sulfate (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), triclosan (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) 등을 사용하였다.

추출물의 최소성장억제 농도(MIC)와 최소살균농도(MBC) 측정

추출물의 최소성장억제 농도(minimal inhibitory concentration, MIC)는 액체 배지 희석법을 이용하여 조사하였다[14]. 구강미생물은 37°C에서 24시간 동안 혐기배양한 다음 배양액을 액체배지에 희석하였다(O.D₆₀₀=0.4-0.6). 희석된 배양액에 추출물을 0.2-2.0 mg/ml 농도로 처리한 다음 37°C에서 24시간 동안 혐기배양한 후 600 nm에서 흡광도를 측정하여 구강미생물의 증식이 나타나지 않는 최소 농도를 최소성장억제 농도로 정하였다. 추출물의 최소살균농도(minimal bactericidal concentration, MBC)는 최소성장억제 농도로 확인된 추출물 농도로부터 그 이상의 농도에 해당하는 배양액을 고체배지에 도말하여 37°C에서 24시간 동안 혐기배양한 다음 균수의 99.9%가 사멸된 추출물의 농도로 정하였다.

추출물에 의한 구강미생물의 바이오필름(biofilm) 생성 억제

추출물이 구강미생물의 바이오필름 형성에 미치는 영향은 Zhou 등[34]의 방법을 이용하여 조사하였다. 구강미생물은 고체배지에 도말하여 24시간 동안 혐기배양한 다음 액체배지에 현탁하여(O.D₆₀₀=0.4-0.6) 96-well plate에 분주하였다. 0.2-2.0 mg/ml 농도의 추출물을 구강미생물이 분주된 96-well plate에 처리한 다음 37°C에서 혐기배양하면서 바이오필름 생성을

유도하였다. 96-well plate에 형성된 바이오필름은 멸균 증류수로 2회 세척한 다음 건조한 후 0.5% crystal violet으로 20분 동안 염색하였다. 바이오필름 생성 억제능은 crystal violet에 염색된 바이오필름을 70% 에탄올에 용해한 후 575 nm에서 spectrophotometer (Softmax M5, Molecular Devices, USA)로 흡광도를 측정하여 확인하였다.

추출물 처리에 따른 *P. gingivalis*의 superoxide dismutase (SOD)와 섬모(fimbriae)에 대한 mRNA 발현 변화

추출물이 구강미생물의 SOD와 섬모에 대한 mRNA 발현에 미치는 영향은 *sod*와 *fimA* 유전자를 primer로 사용한 real-time PCR로 조사하였다. Total RNA는 37°C에서 24시간 동안 혐기 배양한 후 액체배지에 현탁한 구강미생물(O.D₆₀₀=0.4-0.6)에 0.2-2.0 mg/ml 농도의 추출물을 처리한 다음 37°C에서 배양한 배양액을 원심분리하여 얻은 pellet으로부터 RNeasy Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 분리하였다. cDNA는 superscript VILO cDNA synthesis (Thermo Fisher Scientific, USA)를 이용하여 합성하였고 real-time PCR은 CFX96 touch™ real-time PCR detection system (Bio-Rad, USA)을 이용하여 수행하였으며 실험에 사용된 primer는 Table 1과 같다 [14, 31]. PCR 반응은 ssoadvanced™ universal SYBR® green supermix (Bio-Rad, USA)를 사용하여 95°C에서 30초, 95°C에서 10초, 60°C에서 20초씩 35 cycle을 반복하여 수행하였다. PCR 반응 종결 후 melt-curve analysis를 수행하여 유전자 증폭의 정확성을 재확인하였으며 유전자의 상대적 발현량은 endogenous control로 사용한 *P. gingivalis*의 housekeeping gene인 *gyrA*에 대한 *sod*와 *fimA*의 상대적 유전자 발현 값으로 나타내었다.

통계처리

모든 실험은 5회 이상 반복실험을 수행하여 얻어진 결과이며 실험결과와 평균값과 표준오차는 SAS (Statistical analysis system, USA) program을 사용하여 구하였고 Duncan's 다중 검정법으로 *p*<0.05 수준에서 통계적 유의성 검정을 실시하였다.

결과 및 고찰

오리나무 줄기 추출물의 항균활성

국내 자생 염료식물인 오리나무, 율나무, 치자나무, 황벽나

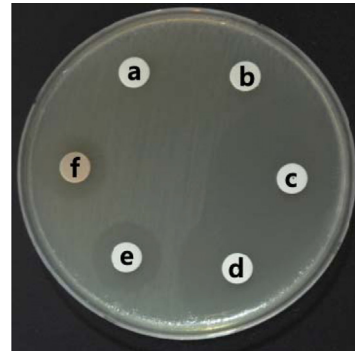


Fig. 1. Antibacterial activity of ethanol extracts (1 mg/disc) from *A. japonica* stem against *P. gingivalis* KCTC5352. a: DMSO as a negative control, b: ethanol as a negative control, c: sodium lauryl sulfate (1 mg/ml), d: triclosan (1 mg/ml), e: chlorhexidine (1 mg/ml), f: ethanol extracts from *A. japonica* stem.

무, 황칠나무, 회화나무 등의 줄기를 추출한 에탄올 추출물의 구강미생물에 대한 항균활성을 측정된 결과, 오리나무 줄기 추출물은 *P. gingivalis*와 *S. sanguinis*에 대해서, 율나무 줄기 추출물은 *P. gingivalis*와 *S. mutans*, *S. downei*, *S. sanguinis*, *S. gordonii*에 대해서, 치자나무 줄기 추출물은 *P. gingivalis*에 대해서, 황벽나무와 황칠나무 줄기 추출물은 *P. gingivalis*와 *S. sanguinis*에 대해서, 회화나무 줄기 추출물은 *P. gingivalis*, *S. downei*, *S. sanguinis*, *S. gordonii*에 대해서 항균활성을 나타내었으며 이 중 오리나무 줄기 추출물의 *P. gingivalis*에 대한 항균활성이 가장 우수하였다(Table 2). *P. gingivalis*에 대한 오리나무 줄기 추출물의 항균활성을 구강케어제품에 사용되고 있는 chlorhexidine, sodium lauryl sulfate, triclosan과 비교한 결과는 Fig. 1과 같다. 시판되고 있는 구강케어제품에서 chlorhexidine, sodium lauryl sulfate, triclosan은 각각 0.1%, 0.2%, 0.3%의 농도로 사용되고 있으며 본 실험에서는 오리나무 줄기 추출물과 chlorhexidine, sodium lauryl sulfate, triclosan의 항균활성을 1 mg/disc의 농도에서 비교하였다. 그 결과, 오리나무 줄기 추출물은 *P. gingivalis*에 대해 chlorhexidine과 유사한 항균활성을 나타내었다. 양이온성 항균 물질인 chlorhexidine은 구강 내에 존재하는 세균들을 광범위하게 사멸시킬 수 있는 대표적인 항균제이지만 장기간 사용 시 치아나 연조직에 착색이 유발되고 미각변화 가능성이 보고되고 있기 때문에 이를 대체할 항균제의 개발이 필요한 실정이다[11]. 따라서 오리나무 줄기 추출물은 *P. gingivalis*에 대해 항균활성이 있는

Table 1. Oligonucleotides used for real-time PCR in this study

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>gyrA</i>	5'-AAT ATC ATC CCC TCT TCC ACC -3'	5'-GTT GGA GTA TCC GAT TTC- GTT-3'
<i>sod</i>	5'-CCT ATG TGG ACA ACC TCA AT-3'	5'-GGC TTC CTT ATG TAT TGG TG-3'
<i>fimA</i>	5'-CTG TGT GTT TAT GGC AAA CTT C-3'	5'-AAC CCC GCT CCC TGT ATT CCG A -3'

Table 2. Antimicrobial activities of ethanol extracts (1 mg/ml) from stem of dye plants against oral microorganisms

Oral microorganisms	Ethanol extracts from stem of dye plants (1 mg/ml)					
	<i>A. japonica</i>	<i>R. verniciflua</i> Stokes	<i>G. jasminoides</i>	<i>D. morbifera</i>	<i>P. amurense</i> Rupr.	<i>S. japonica</i>
<i>P. gingivalis</i> KCTC5352	+++*	+	+	+	+	+
<i>S. mutans</i> KCTC3065	-	+	-	-	-	-
<i>S. downei</i> KCTC3634	-	+	-	-	-	+
<i>S. sanguinis</i> KCTC3284	+	+	-	+	+	+
<i>S. gordonii</i> KCTC3286	-	+	-	-	-	+

*Growth inhibition size of clear zone: -, not detected; +, less than 4 mm; ++, 4-8 mm; +++, more than 8 mm.

천연물유래 구강건강소재로써 개발 가능성이 있다고 판단되어 오리나무 줄기 추출물을 선별하여 추가적인 실험을 수행하였다.

***P. gingivalis* KCTC5352에 대한 오리나무 줄기 추출물의 최소성장억제 농도 및 최소살균농도**

오리나무 줄기 추출물은 구강미생물 중 *P. gingivalis*에 대해 우수한 항균활성을 나타내었으며 오리나무 줄기 추출물 처리에 따른 *P. gingivalis*의 MIC는 0.4 mg/ml였다. *P. gingivalis*의 MBC는 MIC인 0.4 mg/ml 및 그 이상의 농도에 해당하는 *P. gingivalis* 배양액을 고체배지에 배양하였을 때 0.6 mg/ml 및 그 이상의 농도에서 colony를 관찰할 수 없었으므로 0.6 mg/ml로 결정하였다(Table 3).

오리나무 줄기 추출물이 바이오필름 생성에 미치는 영향

오리나무 줄기 추출물이 *P. gingivalis*의 생물막 형성에 미치는 영향은 Zhou 등[34]의 양적 분석방법을 이용하여 조사하였다. *P. gingivalis* 배양액에 추출물을 0.2-2.0 mg/ml 농도로 처리하였을 때, *P. gingivalis* 배양액에서 생물막 생성이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 추출물이 0.2-2.0 mg/ml 농도로 처리된 배양액에서 *P. gingivalis*의 생물막 생성율은 각각 80.9±0.09%, 65.4±0.08%, 31.2±0.06%, 27.1±0.02%, 24.8±0.01%, 25.3±0.02%로 추출물의 농도가 높아질수록 생물막 생성이 억제되는 것을 확인할 수 있었고 균주의 생육도 추출물의 농도(0.2-2.0 mg/ml)가 높아질수록 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 이는 에센셜 오일에서 추출한 유제놀의 *P. gingivalis*에 대한 항균활성 및 생물막 생성 억제에 관한 연구에서 유제놀(eugenol)의 농도가 높아질수록 생물막 생성을 및 균주의

생육이 감소한다는 Zhang [33] 등의 보고와도 일치하는 결과이다. 따라서 오리나무 추출물은 *P. gingivalis*의 생육을 억제할 수 있을 뿐만 아니라 생물막 생성도 억제할 수 있는 천연물유래 구강건강소재로써 개발 가능성이 있다고 판단된다.

오리나무 줄기 추출물이 *P. gingivalis*의 superoxide dismutase (SOD)에 대한 mRNA 발현에 미치는 영향

오리나무 줄기 추출물이 *P. gingivalis*의 SOD에 대한 mRNA 발현에 미치는 영향은 *sod* 유전자를 primer로 이용한 real time-PCR로 확인하였으며 그 결과는 Fig. 3에 나타내었다. Real time-PCR을 이용하여 추출물(0.2-2.0 mg/ml) 처리 농도에 따른 *sod* 유전자의 발현 변화를 확인한 결과 *P. gingivalis*의

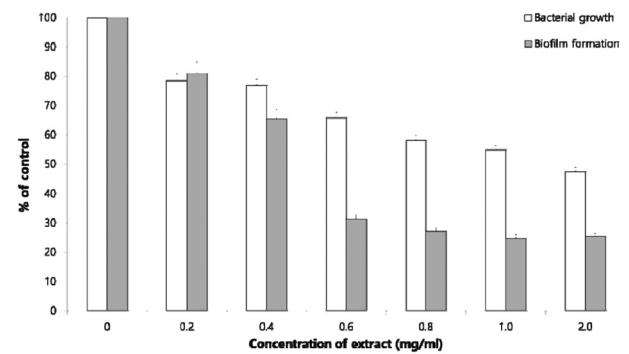


Fig. 2. Bacterial growth and biofilm formation of *P. gingivalis* KCTC5352 in brain-heart infusion broth (BHIB) treated with ethanol extracts of *A. japonica* stem (0.2-2.0 mg/ml). Growth and biofilm formation were measured under anaerobic condition. All assays were performed in triplicate, and mean values and standard deviations are shown.

Table 3. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of ethanol extract of *A. japonica* stem against *P. gingivalis*

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

^a, growth on test medium; ^b,nogrowthontestmedium;^c,slowgrowthontestmedium;^d,non-detection.

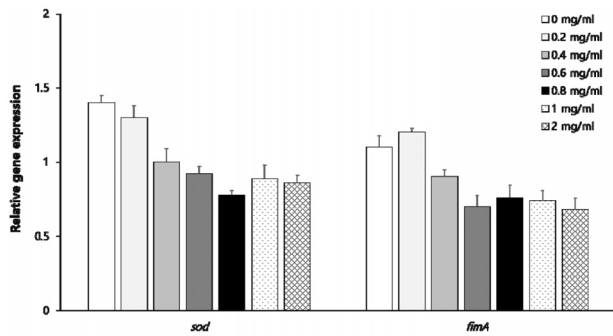


Fig. 3. Effects of *A. japonica* stem extract on expression of *sod* and *fimA* genes in *P. gingivalis* KCTC5352 by real-time PCR analysis. The expression was normalized to *gyrA* gene used as a reference gene. Results are shown as the \pm SD of five replicates. * $p < 0.05$, as compared with the control.

sod 유전자는 0.8 mg/ml 까지는 추출물의 농도가 높아질수록 감소하는 경향을 나타내었다. SOD는 초과산화이온을 산소와 과산화수소로 바꿔주는 불균등화 반응을 촉매하는 효소로써 산소에 노출되는 거의 모든 세포의 항산화방어기전으로 중요하다. 초과산화이온이 가지고 있는 자유라디칼 음이온은 세포 손상을 초래하기 때문에 SOD에 의해 초과산화이온이 산소와 과산화수소로 바뀌므로서 독성으로부터 세포를 방어하는 역할을 한다. *P. gingivalis*의 초과산화이온을 약화시키는 SOD에 대한 mRNA 발현은 0.4 mg/ml의 오리나무 줄기 추출물에 노출되었을 때 현저히 감소되었다. 이 결과는 산화물질이 축적될 때 축적된 산화물질의 독성을 중화시켜줄 수 있는 *P. gingivalis*의 능력이 감소한다는 것을 나타내며 Kim 등[14]의 보고에서도 0.005% 피톤치드에 노출시켰을 때 *P. gingivalis*의 *sod* 발현은 현저히 감소되었다. Nakayama 등[28]은 *P. gingivalis*는 SOD를 생성하기 때문에 편성혐기성균임에도 불구하고 산소가 미량 존재하는 환경에서도 어느정도 저항성이 있다고 보고하였다. 따라서 오리나무 줄기 추출물의 처리 농도에 따라 SOD에 대한 mRNA 발현이 감소하였다는 것은 오리나무 줄기 추출물에 노출되면 산화물질의 중화 능력이 감소하기 때문에 *P. gingivalis*의 생존력도 감소됨을 나타낸다.

오리나무 줄기 추출물이 *P. gingivalis*의 섬모에 대한 mRNA 발현에 미치는 영향

오리나무 줄기 추출물이 *P. gingivalis*의 섬모에 대한 mRNA 발현에 미치는 영향은 *fimA* 유전자를 primer로 이용한 real time-PCR로 확인하였으며 그 결과는 Fig. 3에 나타내었다. Real time-PCR을 이용하여 추출물(0.2-2.0 mg/ml) 처리 농도에 따른 *fimA* 유전자의 발현 변화를 확인한 결과, *P. gingivalis*의 *fimA* 유전자는 추출물의 농도가 높아질수록 감소하는 경향을 나타내었다.

섬모(fimbriae)는 세균의 외막에 부착된 단백질성 부속기

(proteinaceous appendages)로서 생물막 형성과정 중 초기 부착단계에 관여하며 *P. gingivalis* 표면에는 FimA subunit으로 구성된 긴 섬모와 Mfa1 subunit으로 구성된 짧은 섬모가 존재하고 있다. 긴 섬모는 생물막 형성과정에서 *P. gingivalis*의 치은 섬유 모세포 및 상피 세포 부착에 필수적일 뿐만 아니라 *P. gingivalis*와 *Actinomyces viscosus*, *Treponema denticola*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus oralis*의 aggregation 및 *P. gingivalis*의 autoaggregation에도 관여한다[7]. 섬모관련 유전자인 *fimX*, *pgmA* 및 *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 생물막을 형성할 수 없다[27]. 따라서 오리나무 줄기 추출물의 처리 농도에 따라 *fimA* 유전자 발현이 감소하였다는 것은 생물막 형성 단계에서 *P. gingivalis*의 초기 치은 섬유 모세포 및 상피 세포 부착이 저해됨을 나타낸다.

감사의 글

본 연구는 2018년 경남과학기술대학교 대학회계 연구비 지원에 의하여 수행된 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

References

1. An, S. W., Kim, Y. G., Kim, M. H., Lee, B. I., Lee, S. H., Kwon, H. I., Hwang, B. and Lee, H. Y. 1999. Comparison of hepatic detoxification activity and reducing serum alcohol concentration of *Hovenia dulcis* Thumb and *Alnus japonica* Steud. *Kor. J. Med. Crop Sci.* **7**, 263-268.
2. 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.
3. Buitelaar, R. M., Langenhoff, A. A. M., Heidstra, R. and Tramper, J. 1991. Growth and thiophene production by hairy root culture in various two liquid phase bioreactors. *Enz. Microbiol. Technol.* **13**, 487-494.
4. 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.
5. Darveau, R. P., Tanner, A. and Page, R. C. 1997. The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol.* **2000** **14**, 12-32.
6. Davidson, P. M. and Parish, M. E. 1989. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technol.* **43**, 148-152.
7. Gerits, E., Verstraeten, N. and Michiels, J. 2017. New approaches to combat *Porphyromonas gingivalis* biofilms. *J. Oral Microbiol.* **9**, 1300366.
8. Haffajee, A. D. and Socransky, S. S. 1994. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol.* **2000** **5**, 78-111.
9. 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.
10. 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.
 11. 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.
 12. Kim, H. J., Yeom, S. H., Kim, M. K., Shim, J. G., Paek, I. N. and Lee, M. W. 2005. Nitric oxide and prostaglandin E2 synthesis inhibitory activities of diarylheptanoids from the barks of *Alnus japonica* Steudel. *Arch. Pharm. Res.* **28**, 177-179.
 13. 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.
 14. 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.
 15. Kim, S. T., Kim, J. D., Ahn, S. H., Ahn, G. S., Lee, Y. I. and Jeong, Y. S. 2004. Hepatoprotective and antioxidant effects of *Alnus japonica* extracts on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Phytother. Res.* **18**, 971-975.
 16. 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.
 17. Kuroyanagi, M., Shimomae, M., Nagashima, Y., Muto, N., Okuda, T., Kawahara, N., Nakane, T. and Sano, T. 2005. New diarylheptanoids from *Alnus japonica* and their antioxidative activity. *Chem. Pharm. Bull.* **53**, 1519-1523.
 18. Kwon, H. J., Parkm J. W., Yoon, M. S., Chung, S. K. and Han, M. D. 2008. Dental hygiene and dental education: Factors associated with self-reported halitosis in Korean patients. *J. Kor. Acad. Oral Health* **32**, 231-242.
 19. Lee, J. Y. and Lee, M. O. 2016. Influential factors for the knowledge and awareness of adults on periodontal diseases and their belief. *J. Kor. Cont. Associ.* **16**, 295-307.
 20. Lee, M. W., Kim, J. H., Jeong, D. W., Ahn, K. H., Toh, S. H. and Surh, Y. J. 2000. Inhibition of cyclooxygenase-2 expression by diarylheptanoids from the bark of *Alnus hirsuta* var. *Sibirica*. *Biol. Pharm. Bull.* **23**, 517-518.
 21. Lee, M. W., Tanaka, T., Nonaka, G. I. and Nishioka, I. 1992. Dimeric ellagitannins from *Alnus japonica*. *Phytochemistry* **31**, 2835-2839.
 22. Lee, Y. A., Kim, K. H., Kim, J. S., Cho, S. M., Kim, S. W. and Lee, M. W. 2000. Antioxidative effects of diarylheptanoids from *Alnus hirsuta*. *Arch. Pharm. Res.* **44**, 193-196.
 23. Lopez, N. J. 2000. Occurrence of actinobacillus actinomycetemcomitans, *Porphyromonas gingivalis*, and *Prevotella intermedia* in progressive adult periodontitis. *J. Periodontol.* **71**, 948-954.
 24. Marsh, P. D. 2004. Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res.* **38**, 204-211.
 25. Marsh, P. D. 2006. Dental plaque as a biofilm and a microbial community-implications for health and disease. *BMC Oral Health* **6**, S14.
 26. Na, C. S., Lee, S. B., Kim, J. B., Chung, H. S. and Dong, M. S. 2012. Effect of hot water extract of *Alnus japonica* Steud on the experimentally-induced acute gastritis and peptic ulcers in rats. *Kor. J. Pharmacogn.* **43**, 72-78.
 27. 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.
 28. Nakayama, K. J. 1994. Rapid viability loss on exposure to air in a superoxide dismutase-deficient mutant of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Bacteriol.* **176**, 1939-1943.
 29. Park, H. R. and Hong, S. J. 2015. Research on natural medicine for wellness and oral health. *J. Digital Convergence* **13**, 357-363.
 30. Stevic, T., Savikin, K., Zdunic, G., Stanojkovic, T., Juranic, Z., Jankovic, T. and Menkovic, N. 2010. Antioxidant, cytotoxic, and antimicrobial activity of *Alnus incana* (L.) ssp. *incana* Moench and *A. viridis* (Chaix) DC ssp. *viridis* extracts. *J. Med. Food* **13**, 700-704.
 31. 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.
 32. Wada, H., Tachibana, H., Fuchino, H. and Tanaka, N. 1998. Three new diarylheptanoid glycosides from *Alnus japonica*. *Chem. Pharm. Bull.* **46**, 1054-1055.
 33. 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.
 34. 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 오리나무 줄기 추출물의 항균활성 및 생물막 형성 억제 효과

김혜수 · 조수정*

(경남과학기술대학교 제약공학과)

본 연구에서는 천연물유래 구강건강소재로써 염료식물의 이용 가능성을 알아보기 위해 오리나무, 윗나무, 치자나무, 황칠나무, 황벽나무, 회화나무 줄기 추출물의 구강미생물에 대한 항균활성을 조사하였다. 6 종의 국내 자생 염료식물의 줄기에서 추출한 에탄올 추출물 중 오리나무 줄기 추출물(1 mg/disc)이 치주질환 원인균인 *P. gingivalis* KCTC5352에 대해 가장 우수한 항균활성을 나타내었다. 오리나무 줄기 추출물은 *P. gingivalis* KCTC5352에 대해 양성대조구로 사용한 chlorhexidine과 유사한 항균활성을 나타내었으며 *P. gingivalis* KCTC5352의 MIC는 0.4 mg/ml였고 MBC는 0.6 mg/ml였다. 오리나무 줄기 추출물이 0.2-2.0 mg/ml 농도로 처리된 배양액에서 *P. gingivalis* KCTC5352의 바이오필름 생성율과 세균 생육은 추출물의 농도가 증가할수록 저해되는 경향을 보였다. 또한 *P. gingivalis* KCTC5352의 superoxide dismutase (SOD)와 섬모에 대한 mRNA 발현도 추출물의 농도가 높아질수록 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이상의 결과를 종합하면 오리나무 줄기 추출물은 치주질환 원인균인 *P. gingivalis* KCTC5352에 대한 항균활성과 생물막 생성 억제능이 우수하기 때문에 천연물유래 구강건강소재로써 이용 가능성이 높을 것으로 판단된다.