

단삼(*Salvia miltiorrhiza*) 추출물의 치주질환유발 세균의 생육억제 및 Collagenase 저해 활성

민응기¹ · 김용해¹ · 금상일² · 한영환*

동국대학교 자연과학대학 생명과학과,
¹신화제약(주), ²동국대학교 대학원 생물학과

단삼(*Salvia miltiorrhiza*) 추출물의 치주질환유발 세균에 대한 생육억제 활성 및 collagenase 저해 활성을 측정하였다. 단삼 에탄올 추출물은 치주질환유발 세균에 대해 우수한 생육억제 활성을 나타내었다. 유기용매 분획물중, hexane에서 생육억제능이 가장 우수하였다. 치주질환유발 세균 *C. curvus*, *C. rectus*, *E. corrodens*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* 및 *W. succinogenes*에 대한 단삼 추출물의 최소생육저해농도(MIC)는 200, 50, 50, 250, 150, 250 및 200 µg/ml로 각각 우수한 생육억제능을 나타내었다. 단삼 유기용매 분획물의 collagenase 저해 활성은 동일 농도의 minocycline에 비해 우수한 저해 활성을 나타내었으며, chloroform 분획물의 경우 88.2%의 저해 활성을 나타내었다.

Key words □ collagenase, periodontal diseases, *Salvia miltiorrhiza*

치주질환(Periodontal diseases)은 세균에 의해 야기되는 치아 지지 조직의 염증상태를 말하는데, 건강한 치은에서의 치태 세균 조성은 치주질환 치은에서의 세균 조성과는 다르다. 일반적으로 Gram negative, facultative anaerobic, anaerobic 또는 microaerophilic 미생물이 치주질환에 관련된 주세균으로 *Porphyromonas gingivalis*, *Campylobacter rectus*, *Wolinella succinogenes*, *Eikenella corrodens*, *Prevotella intermedia*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* 등이 발병 능력과 질환부에서의 증가양상 때문에 질환과 관련된 세균으로 알려져 있다(10, 11). 치주질환유발세균에 의해 생산되는 collagenase, hyaluronidase, gelatinase 등과 같은 효소들도 치주질환의 발생과 진행에 기여하는데, 이중 치주조직 파괴과정에서 중요한 것은 치주조직의 주성분인 collagen의 분해이다. 치주낭내 collagenase는 주로 숙주세포에서 유래되지만 *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*와 같은 세균도 collagenase를 분비, collagen을 분해한다(12, 13). 따라서 치주질환의 치료에 관한 연구는 치태, 특히 치은연하치태 세균을 효과적으로 제거함으로써 치주질환의 진행을 억제하려는 데 중점을 두고 진행되어져 왔다.

현재의 치주질환 치료는 비외과적 혹은 외과적인 치석제거술, 치근활택술, 치은소파술 및 치주조직 재생술이 기본적으로 실시되고 있고, 보조치료 및 예방제제로서 여러종류의 화학성 항균용제 및 항생제가 사용된다. 항균구강용제로 chlorhexidine, phenolic compound 등이 사용되고 있는데, 이들 제제는 항균효

과는 우수하지만, 구강내 조직에 대한 독성을 나타내 상피탈락 및 케양발현 등의 부작용 및 치아착색 등의 문제점들을 안고 있다(6, 7). 특히 tetracycline 계열의 항생제인 minocycline 및 doxycycline의 경우 항균효과와 더불어 collagenase와 gelatinase의 활동을 방해함으로써 골흡수를 억제하며 이로 인한 결손 골조직의 재생에 간접적으로 기여한다고 보고 되고 있으나, 항생제 내성균주의 출현, 과민반응 및 위장장애 등의 심각한 부작용으로 인해 임상에서의 사용이 제한되고 있는 실정이다(9).

이러한 기존 사용 제제들의 문제점을 보완하고자 천연물로부터 치주질환 유발균의 생육억제활성 및 collagenase 저해 활성을 나타내는 새로운 제제 개발의 필요성이 대두되고 있으나 치주질환유발 세균의 난배양성으로 인해 제한적인 연구가 이루어지고 있다. 이(2) 등의 천연추출물의 치주병 원인균에 대한 항균효과 및 세포독성에 관한 연구, 장(3) 등의 magnolol과 honokiol이 항균, 교원질분해효소 저해, 세포독성 및 cytokine 생산에 미치는 영향에 대한 연구등 미미한 연구결과만이 보고 되고 있는 실정이다.

단삼(丹蔘, *Salvia miltiorrhiza* Bunge)은 꿀풀과에 속하는 다년생 초본으로 굵은 뿌리의 표피에 적색색소가 침착되어 있으며 말린 근경(rhizomae)을 한약재로 사용하며, 혈관확장작용, 진정진통작용, 항균작용등이 있는 것으로 알려져 있다(4). 성분으로는 quinone-type 화합물인 tanshinone I, II, cytoshanshinone, tanshindiol, methyltanshinone, hydrotanshinone, isotanshinones 등이 있으며, 항산화능이 우수한 것으로 보고 되고 있다(14). Gao(5) 등은 단삼 추출물을 실험용 쥐나 토끼에 경구투여하여 실험한 결과 독성을 나타내지 않았다고 보고 하였다.

본 연구에서는 치주질환의 원인이 되는 유발균의 생육을 억제

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 054-770-2213, Fax: 054-770-2515
E-mail : yhhan@dongguk.ac.kr

하고 치주질환 진행에 관련된 효소 활성을 억제하는 천연물을 탐색하고자 수종의 천연물 중 선별된 단삼 추출물의 치주질환유발 세균에 대한 생육저지 활성 및 치주조직의 주성분인 collagen 분해 효소 collagenase 활성 저해능을 측정하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 시료의 제조

본 실험에 사용한 단삼(*Salvia miltiorrhiza*)은 경동시장으로부터 구입하여 사용하였다. 시료의 추출은 단삼 300 g을 세절하여 condenser가 부착된 soxhlet을 이용하여 시료의 3배 정도의 ethanol(v/w)을 첨가한 후, 80°C에서 5시간 동안 3회 추출하였다. 추출액은 filter paper(Whatman No. 2)를 사용하여 여과 한 후, rotary vacuum evaporator(Eyela Co.)로 감압 농축하였으며, 동결 건조기(Ilsin Co.)로 건조하여 ethanol 추출물을 얻고, 이를 증류수로 용해시키고 용매의 극성도가 증가하는 순서대로 hexane, chloroform 및 ethyl acetate로 분획한다. 분획된 각각의 유기용매 층을 감압농축시키고 동결건조하여 각각의 시료로 사용하였다.

사용균주 및 배양

본 실험에 사용한 치주질환유발 세균은 한국생명공학연구원 생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures, KCTC), 한국 미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms, KCCM) 및 American Type Culture Collection(ATCC)로 분양 받아 사용하였다(Table 1).

치주질환 유발균의 배양에 사용한 배지는 brucella media(Difco Co.), columbia media(Difco Co.)에 10% FBS(fetal bovine serum, Gibco Co.) 또는 5% sheep blood(Sigma Co.)를 첨가하여 제조된 배지를 사용 하였다. 혐기적 및 미호기적 조건하에서 배양하기 위해 혐기성 배양기(anaerobic jar system, BBL Co.)를 배양기로 써 사용하였고, 가스혼합시스템(Gas mixture system)을 이용하여 각각의 세균의 성장 요구 조건에 따라 산소(O₂), 수소(H₂) 및 이산화탄소(CO₂)의 양을 조절하여 혐기적 및 미호기적 조건을 조절하였다(Table 1).

단삼 추출물의 치주질환유발 세균의 생육저지 활성 측정

단삼 추출물의 치주질환유발 세균에 대한 생육저지 활성은 측

정은 각각의 균주를 액체배지에서 24~48시간 전배양한 후 10% FBS 또는 5% sheep blood가 첨가된 brucella 및 columbia 평판 배지에 100 µl 씩 도말 한 후, 단삼 추출물을 흡수시킨 paper disc(8 mm, Advantec, Toyo Co.)를 평판배지에 올리고, 각각의 치주질환유발 세균을 적정 배양 조건하에서 24~48시간 배양 후 형성된 저지환(clear zone)의 크기를 측정하였다.

단삼 추출물의 최소생육저해농도 측정

단삼 추출물의 최소생육저해농도(Minimal Inhibitory Concentration, MIC)의 측정은 각각의 균주를 액체배지에서 24~48시간 전 배양한 배양액 100 µl를 단삼 추출물의 농도가 3.175, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 µg/ml의 농도로 첨가된 brucella 액체배지 접종 하여 24~48시간 배양 후, spectrophotometer(UV-160A, Shimadzu)로 660 nm에서 각 세균의 생육 정도를 측정하여, 각각 세균의 생육저해 최소 농도를 결정하였다.

단삼 추출물의 collagenase 활성 저해능 측정

단삼 추출물의 collagenase 활성 저해능 측정은 collagen의 chromogenic substance인 azocoll(Sigma Co.)을 기질로 이용한 방법을 사용하였다 (8). Collagenase 저해 활성 측정은 50 mM potassium phosphate buffer(pH 6.6) 900 µl, azocoll 3 mg, collagenase (Sigma Co.) 100 µl 및 단삼 추출물 50 µl를 첨가하여 43°C에서 1시간 동안 효소 반응을 유도한 후, 3000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 불용성 물질을 침전시킨 후 spectrophotometer를 이용, 520 nm에서 흡광도를 측정 후, 다음의 식에 의해 collagenase 활성 저해능을 구하였다.

$$\text{Inhibition of collagenase activity (\%)} = [1 - (S-B)/C] \times 100$$

S : 효소액 및 시료용액 첨가시의 흡광도 값

B : 효소액 대신 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.6) 첨가시의 흡광도 값

C : 시료용액 대신 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.6) 첨가시의 흡광도 값

결과 및 고찰

단삼 추출물의 치주질환 유발세균 생육저지 활성

단삼 에탄올 추출물의 치주질환유발 세균에 대한 생육저지 활성을 측정한 결과, 치주질환유발 세균 *C. rectus* 및 *E. corrodens*에 대한 생육저지 활성이 매우 우수하였고, *P. gingivalis*, *W. succinogenes*, *P. intermedia* 및 *F. nucleatum*에 대해서도 각각 우수한 생육저지 활성을 나타내었다(Table 2). 단삼 에탄올 추출물을 이용한 유기용매 분획물의 치주질환유발 세균에 대한 생육저지 활성은 사용한 유기용매 중 hexane 및 chloroform 분획물이 실험에 사용한 치주질환 유발균에 대해 매우 우수한 생육 저지 활성을 나타내었고, ethyl acetate 분획물도 우수한 생육저지 활성을 나타내었다(Table 2). 췌(4) 등의 식품을 변질시키는 세균에

Table 1. Lists of periodontopathogens used for antimicrobial activity test and their relations to oxygen

Organisms	Strain	Relation to oxygen
<i>Campylobacter curvus</i>	ATCC 35224	
<i>Campylobacter rectus</i>	ATCC 33238	Microaerophilic
<i>Wolinella succinogenes</i>	ATCC 29543	
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	KCCM 11958	
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	KCTC 2488	Anaerobic
<i>Prevotella intermedia</i>	KCTC 3692	
<i>Eikenella corrodens</i>	ATCC 23834	Facultative anaerobic

Table 2. Antimicrobial activity of ethanol extracts and organic solvent fractions from *Salvia miltiorrhiza* against various microorganisms causing periodontal disease

Organisms	Clear zone (mm)				
	Extract	Organic solvent fractions			
		Ethanol	Hexane	Chloroform	Ethyl acetate
<i>C. curvus</i>	12.2 ± 1.2 ^a	24.2 ± 1.3	18.0 ± 1.0	14.0 ± 1.0	10.5 ± 0.5
<i>C. rectus</i>	18.3 ± 2.1	36.4 ± 0.9	27.3 ± 1.4	22.5 ± 1.2	14.5 ± 1.0
<i>E. corrodens</i>	20.1 ± 1.4	38.5 ± 0.4	31.0 ± 1.5	14.0 ± 1.0	10.5 ± 1.5
<i>F. nucleatum</i>	12.7 ± 1.2	22.7 ± 1.3	20.3 ± 1.2	11.0 ± 1.0	0
<i>P. gingivalis</i>	15.3 ± 1.7	28.1 ± 1.5	20.2 ± 0.8	14.5 ± 0.5	0
<i>P. intermedia</i>	12.6 ± 0.8	21.6 ± 1.8	24.0 ± 1.0	15.0 ± 1.0	10.0 ± 0.0
<i>W. succinogenes</i>	13.2 ± 1.1	26.0 ± 0.5	26.5 ± 0.5	17.3 ± 1.2	11.2 ± 0.5

^aDisc diameter (8 mm) was included

대한 단삼 에탄올 추출물의 생육저지 활성이 11~17 mm로 본 연구의 에탄올 추출물의 생육저지 활성과 비슷한 결과를 나타내었고, 단삼 chloroform 분획물이 식품부패미생물에 대해 다른 유기용매에 비해 높은 항균활성을 나타낸 연구결과와 목(1) 등의 용매와 추출조건에 따른 단삼 추출물의 항균력에 대한 연구에서 단삼 에탄올 추출물을 hexane으로 분획할 경우 대부분의 항균성분이 hexane 분획물로 이동한다는 보고와 일치하는 결과를 나타내었다.

단삼 추출물의 최소생육저해농도(MIC) 측정

단삼 추출물의 치주질환유발 세균에 대한 최소생육저해농도(MIC)를 측정한 결과, *E. corrodens*, *C. rectus*, *P. gingivalis*, *C. curvus*, *W. succinogenes*, *P. intermedia* 및 *F. nucleatum*에 대해 50, 50, 150, 200, 200, 250 및 250 µg/ml로 나타났다(Table 3). 목(4) 등의 *Bacillus cereus*에 대한 단삼 추출물의 MIC가 3.125 µg/ml, *Staphylococcus aureus*에 대한 MIC가 6.25 µg/ml, *Streptococcus mutans*에 대한 MIC가 12.5 µg/ml로 본 실험의 결과에 비해 낮은 MIC값을 나타내었으나, 이는 시료의 추출 조건 및 대상 미생물의 종류에 따라 상이한 결과를 나타낸 것으로 사료된다.

단삼 추출물의 collagenase 활성 저해능 측정

단삼 추출물의 collagen 분해 효소 collagenase 활성 저해능을

Table 3. Minimal inhibitory concentration (MIC) of *Salvia miltiorrhiza* ethanol extracts against microorganisms causing periodontal disease

Organisms	MIC (µg/ml)
<i>C. curvus</i>	200
<i>C. rectus</i>	50
<i>E. corrodens</i>	50
<i>F. nucleatum</i>	250
<i>P. gingivalis</i>	150
<i>P. intermedia</i>	250
<i>W. succinogenes</i>	200

Table 4. Inhibition of collagenase activity by minocycline, ethanol extract and various solvent fractions from *Salvia miltiorrhiza*

Sample	Inhibition of collagenase activity (%)
Ethanol extract	43.1 ± 4.5
Hexane fractions	63.7 ± 3.7
Chloroform fractions	88.2 ± 2.1
Ethyl acetate fractions	55.5 ± 4.3
Water fraction	5.8 ± 8.2
Minocycline	45.5 ± 6.4

측정한 결과를 Table 4에 나타내었다. 1% 단삼 에탄올 추출물의 collagenase 활성 저해능은 43.1±4.5%를 나타내었다. 단삼 에탄올 추출물 hexane, chloroform 및 ethyl acetate 유기용매 분획물의 collagenase 저해 활성은 63.7±3.7%, 88.2±2.1% 및 55.5±4.3%로 단삼 chloroform 분획물의 collagenase 활성 저해능이 가장 우수하였다. 양성 대조군으로 사용한 minocycline의 경우 같은 농도에서 45.5±6.4%의 collagenase 활성 저해능을 나타내었다(Table 4). 항균활성 및 collagenase 저해 활성이 우수한 tetracycline계 항생제 minocycline과 비교하여 단삼 에탄올 추출물의 경우 비슷한 collagenase 활성 저해능을 나타내었고, 유기용매 분획물의 경우 더 우수한 collagenase 활성 저해능을 나타내었다.

이상의 결과로서 단삼 추출물의 치주질환 유발세균에 대해 우수한 생육저지 활성과 교원질 분해를 통한 치주조직 파괴를 유발하는 collagenase 활성 저해능을 확인하였으며, 추후 활성물질 분리등과 같은 부가 연구를 통해 새로운 천연물추출물 치료제 및 치약, 가글과 같은 구강청정제 첨가 원료로써 사용이 기대된다.

참고문헌

1. 목종수, 박옥연, 김영목, 장동석. 1994. 용매와 추출조건에 따른 단삼(*Salvia miltiorrhiza*) 추출물의 항균력. 한국영양식량학회지 23, 1001-1007.
2. 이승렬, 정종평, 최상묵, 배기환. 1992. 천연물추출물의 치주병인균에 대한 항균효과 및 세포독성에 관한 연구.

- 대한치주과학회지 22, 515-526.
3. 장범석, 손성희, 정종평, 배기환. 1993. Magnolol과 honokiol이 항균, 교원질분해효소, 세포독성 및 cytokine생산에 미치는 영향. 대한치주과학회지 23, 145-158.
 4. 최해연, 한영실. 2003. 단삼으로부터 식품부패미생물에 대한 항균성 물질의 분리 및 동정. 한국식품영양과학회지 32, 22-28.
 5. Gao, Y.G., Y.M. Song, Y.Y. Yang, W.F. Lie, and J.X. Tang. 1979. Pharmacology of transhinone. *Acta. Pharm. Shin.* 14, 75.
 6. Goldschmidt, P., R. Cogen, and S. Taubman. 1977. Chlorhexidine on human cells. *J. Periodontol.* 48, 212-215.
 7. Greenstein, G., C. Berman, and R. Jaffin. 1986. Chlorhexidine; An adjunct to periodontal therapy. *J. Periodontol.* 57, 370-377.
 8. Jones, K. L and J. M. Grainger. 1983. The application of enzyme activity measurements to a study of factors affecting protein, starch and cellulose fermentation in domestic refuse. *Eur. J. Appl. microbiol. Biotechnol.* 18, 181-185.
 9. Michael, B. and N.B Carol. 1988. Antimicrobial agents in prevention and treatment of periodontal disease. *Dent. Clin. North America.* 217-241.
 10. Savitt, E.D and S.S Socransky. 1984. Distribution of certain subgingival microbial species in selected periodontal conditions. *J. Clin. Periodontal. Res.* 19, 11-123.
 11. Slots, J. 1979. Subgingival microflora and periodontal disease. *J. Clin. Periodontal.* 6, 351-382.
 12. Sorsa, T., K. Soumalainen and V.J Uitto. 1990. The role of gingival crevicular fluid and salivary interstitial collagenases in human periodontal interstitial collagenase in human periodontal diseases. *Archs. Oral Biol.* 35, 193-196.
 13. Uitto, V.J., H. Turto and L. Saxen. 1978. Extraction of collagenase from human gingiva. *J. Periodont. Res.* 12, 207-214.
 14. Zhang, K.Q., Y. Bao, P. Wu, T.R Robert, and C. Ho. 1990. Antioxidative components of tanshen (*Salvia miltiorrhiza* Bunge). *J. Agric. Fodd Chem.* 38, 1194-1197.

(Received 27 May, 2004/Accepted 11 June, 2004)

ABSTRACT : Inhibition of Growth and Collagenase Activity of the Extract from *Salvia miltiorrhiza* against Microorganisms Causing Periodontal Diseases

Eung-Gi Min¹, Yong-Hae Kim¹, Sang-il Kum², and Yeong-Hwan Han* (Department of Life Science, College of Natural Science, Dongguk University, Gyeongju 780-714, Korea, ¹Shin-Hwa Pharm. Research Inst., Gyeongju 780-921, Korea, ²Department of Biology, Graduate School, Dongguk University, Gyeongju 780-714, Korea)

This study was carried out to evaluate the inhibition of growth and collagenase activity of *Salvia miltiorrhiza* Bunge against microorganisms causing periodontal diseases. The ethanol extract of *Salvia miltiorrhiza* showed significant growth inhibition against microorganisms causing periodontal diseases. Ethanol extract was further fractionated with organic solvents in the order of hexane, chloroform and ethyl acetate. Among the fractions tested, the hexane fraction showed the highest cell growth inhibition. The minimal inhibitory concentration (MIC) of the extract against *C. curvus*, *C. rectus*, *E. corrodens*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* and *W. succinogenes* were 200, 50, 50, 250, 150, 250 and 200 µg/ml, respectively. The inhibition of collagenase activity by organic solvent fractions were higher than that of minocycline, and the inhibition ratio of collagenase activity was 88.2± 2.1% in the chloroform fraction.