

*P. gingivalis*에 대한 피톤치드의 항균효과

경희대학교 치과대학 구강내과학교실¹, 경희대학교 치과대학 구강생물학연구소²
경희대학교 치과대학 구강미생물학교실³

김선규¹ · 신미경² · 어규식¹ · 이진용^{2,3} · 홍정표^{1,2} · 전양현¹

피톤치드란 '산림향'이라고 부르는, 나무가 갖는 특유의 향을 발산하는 휘발성 화학물질로서, 우리 몸을 쾌적하게 해 줄 뿐만 아니라 항균, 방충, 소취 등 다양한 기능을 가지고 있다. 치주질환과 구취를 유발시키는 중요한 원인균인 *P. gingivalis*에 대한 피톤치드의 항균효과와 항균작용을 연구하기 위하여, 편백 피톤치드와 함께 *P. gingivalis* 2561을 배양한 후 *P. gingivalis* 2561의 성장정도, 생존력 및 형태적, 분자생물학적 변화를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 피톤치드는 *P. gingivalis*에 매우 강한 항균력을 보였고, 이 항균력은 살균작용에 의한 것으로 나타났다. *P. gingivalis*에 대한 피톤치드의 최소억제농도는 0.008%, 최소살균농도는 0.01%로 결정되었다.
2. 피톤치드와 함께 배양된 *P. gingivalis*는 ampicillin, cefatoxime, penicillin, tetracycline에 대한 감수성이 변하지 않았으나 amoxicillin에 대한 감수성은 증가하였다.
3. 피톤치드와 같이 배양된 *P. gingivalis*를 투과전자현미경으로 관찰한 결과, 핵이 뚜렷해지고 전자밀도가 높은 과립이 증가하였고 리보솜이 세포질 가장 자리로 분포하였으며, 피톤치드 양이 증가할 수록 유령세포, 특히 소포가 특징적으로 크게 증가하였다.
4. RT-PCR 분석 결과, 피톤치드는 *P. gingivalis*의 superoxide dismutase의 발현을 억제하는 것으로 나타났다.
5. SDS-PAGE와 immunoblot 분석 결과, 피톤치드는 *P. gingivalis*의 단백질 발현에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

이상의 결과로 미루어 피톤치드는 *P. gingivalis*에 대해 강한 항균효과를 갖고 있으며 이것은 살균작용에 의한 것으로 판단된다. 즉, 피톤치드는 단백질 발현에는 영향을 미치지 못하지만 *P. gingivalis*의 항산화물질 생산능력을 감소시키거나 아직 밝혀지지 않은 기전을 통해 스트레스 상황을 유도하여 생존능력을 억제하여 결과적으로 세균세포의 구조적 형태 변화와 함께 사멸을 유도하는 것으로 사료된다.

주제어 : 피톤치드, 항균작용, 입냄새, *P. gingivalis*, 구강병원균

I. 서 론

사람의 구강 내에는 500여종의 수많은 세균이 존재하며, 이들은 구강 내 상주균과 병의 원인이 되는 병원

균으로 구성되어 있지만 상호 작용하여 구강건강을 유지할 수 있도록 균형을 유지하고 있다. 이들은 치아 우식증, 치주질환 등의 질환을 일으켜 통증 및 섭식기능에 장애를 일으키고 치아상실을 초래하기도 하며, 치료를 위하여 많은 시간과 비용을 소비하게 하기도 한다. 특히 치아우식증이나 치주질환 같은 구강질환은 한 번 손상이 가해지면 영구손상으로 남는 경향이 높으므로, 이들에 대해서는 치료뿐만 아니라 질환의 예방과 치료 예후 관리가 중요하게 여겨진다.

특히 치주질환은 성인에 있어 치아상실을 가져오는 가장 중요한 원인으로써, 치태를 구성하고 있는 복잡한 세균군, 즉 혼합감염에 대한 치아 주변조직의 반응

교신저자 : 전양현

서울시 동대문구 회기동 1번지

경희대학교 치과대학 구강내과학교실

전화: 02-958-9359

Fax: 02-968-2043

E-mail: chunyh@khu.ac.kr

원고접수일 : 2007-03-18

심사완료일 : 2007-05-02

에 따른 염증진행에 의하여 야기된다.¹⁾ 이 중에서도 red complex에 속하는 *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*)가 치주질환의 가장 중요한 원인균으로 알려져 있다.²⁾ *P. gingivalis*는 그람음성 혐기세균이며 태생적으로 일부 항생제에 대하여 저항성을 갖는 동시에 다른 많은 항생제에 저항성을 획득하는 경향을 보이는 세균으로서, 구강 세균 중에서 가장 강하고 많은 독성인자를 갖고 있는 세균이다.³⁾ 치주질환이 있을 때 치주병소 내 *P. gingivalis*의 수가 증가되며⁴⁾ 치주질환이 진행됨에 따라 열구상피에 침투하는 *P. gingivalis*가 빈번히 발견된다.⁵⁾ *P. gingivalis*는 치주 치료를 하면 감소되거나 제거되며, 치주질환이 재발되는 병소에서는 또 다시 발견된다.⁶⁾ *P. gingivalis*는 숙주조직과 세포에 부착 또는 침투하는 과정에서 대사 산물이나 독소를 만들어 치주조직에 직접 해를 미치기도 하지만 *P. gingivalis*와 반응하는 이들 세포에서 생산되는 cytokine, 그리고 cytokine에 반응하는 숙주 세포에서 생산된 물질로 치주조직을 더욱 파괴시킨다. 예를 들어 *P. gingivalis*와 반응하는 다형핵백혈구는 collagenase를 분비하고 *P. gingivalis*는 이를 활성화시켜 치주조직을 파괴한다.^{7,8)}

구취는 구강이나 비강을 통하여 나오는 악취를 말하며,⁹⁾ 적어도 50%의 사람들은 만성적인 구취로 고통 받고 있다. 그들의 절반 정도는 개인의 불편함이나 사회적 난처함과 같은 심각한 문제를 경험하고 있으며,¹⁰⁾ 대다수 성인들에게서 구취는 사회생활을 영위하는데 중대한 영향을 미치는 공통된 문제점으로 대두되고 있다. 구취의 원인으로 중요한 것은 구강 내 미생물이 타액 또는 조직 단백질을 가수분해하고 더 나아가 아미노산을 분해하는 과정에서 생성되는 암모니아, 휘발성 황화합물, 젖산과 같은 성분들이다. *P. gingivalis*는 구취를 유발하는 데 가장 중요한 휘발성 황화합물 생성 세균으로 알려져 있다.¹¹⁾

구강 내에서 미생물을 제거하여 치주질환이나 구취를 예방할 수 있는 방법은 기계적으로 치태를 제거해 내거나 화학적으로 미생물의 수를 줄여 주는 것이다. 기계적으로 줄여 주는 방법은 양치질이나 치실을 사용하고, 화학적으로는 항생제 등의 약물을 이용하여 세균들을 조절하는 방법이 제시되고 있으나 구강 상주균을 건강하게 유지시킨 채로 병인균 만을 억제시킨다는 차원에서 최근 천연 추출물의 활용이 대두되고 있다.^{12,13)}

피톤치드(phytoncide)는 식물체를 수증기로 증류하여 얻는 휘발성 방향성분을 말하는데, 이들 휘발성분

들은 수십 종에서 많은 것은 200여 종에 달하는 phenolics, terpenoid, alkaloid, phenylpropane, acetogenin, steroid 등의 화합물로 구성되어 있다.¹⁴⁻¹⁶⁾ 이들은 미생물 등의 공격으로부터 수목 자신을 보호하는 역할을 하는 것으로 알려져 있고, 이러한 현상은 식물의 방어기작으로 인지되고 있으며, 이를 알레로파시(allelopathy)라고 한다.¹⁷⁾ 정유라고 일컫는 피톤치드는 항균력, 즉 항세균 효과, 항진균 효과¹⁸⁾가 있는 것으로 보고되고 있다.

본 연구는 항균력이 있는 것으로 알려져 있는 편백나무(*Chamaecyparis obtusa* Sieb. et Zucc.) 피톤치드가 치주질환 및 구취와 밀접한 연관성이 있는 *P. gingivalis*에 대하여 항균효과가 있는지를 관찰하고 항균작용을 규명하는 데에 목적이 있다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험균주의 배양

생균수 측정 및 항생제 감수성 검사를 위해 실험균주로 *P. gingivalis* 2561를 사용하였다. 실험균주를 yeast extract (5 mg/ml), hemin (5 µg/ml) 및 vitamin K1 (0.2 µg/ml)이 첨가된 half-strength brain heart infusion (BHI) 액체배지와 면양적혈구가 5% 첨가된 BHI 혈액한천배지에서 24시간 37°C에서 혐기적으로 배양하였다. 배양된 실험균주를 분광광도계(Ultra-spec 2000, Pharmacia Biotech, USA)로 600 nm에서 흡광도가 0.1이 되도록 새 BHI 액체배지에 희석하였다. 한편, 투과전자현미경 및 생화학적, 분자생물학적 관찰을 위해서는 실험균주를 BHI 액체배지에 접종하여 37°C 혐기배양기에서 분광광도계로 600 nm에서 흡광도가 0.4가 되도록 배양하였다.

2. 피톤치드의 항균력 관찰

1) 최소억제농도 측정

실험균주에 대한 피톤치드의 최소억제농도(minimum inhibitory concentration; MIC)를 측정하기 위해, 우선 실험균주를 24시간 배양한 후 배양 균액의 일정액을 새 BHI 액체배지에 접종하여 McFarland #1 흡광도의 1/2 농도, 즉 10 ml 액체배지의 흡광도가 0.1(600 nm)이 되도록 균액 농도를 조정된 후 피톤치드를 0~0.4%(vol/vol) 첨가하였다. 실험균주가 접종된 BHI 액체배지를 각 실험균주의 배양조건에 따라 24시

간 배양한 후 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 실험 균주에 대한 MIC는 육안으로 실험균주의 증식이 보이지 않는 최소농도¹⁹⁾이나 정확을 기하기 위해 흡광도를 측정하여 흡광도가 0.1±0.01 또는 그 이하로 측정되는 균 배양액에 첨가된 피톤치드의 농도를 그 실험균주에 대한 MIC로 결정하였다.

2) 최소살균농도 측정

실험균주에 관한 피톤치드의 항균효과가 살균작용에 의한 것인지를 확인하고, 최소살균농도(minimum bactericidal concentration; MBC)를 결정하기 위하여 생균수를 측정하였다. 배양된 실험균주(흡광도 0.1)에 피톤치드를 0.005, 0.01, 0.1% 첨가한 후 24 시간 배양하였다. 배양 후 균의 농도가 균일하게 되도록 가볍게 진탕하고 나서 100 µl을 취하여 생리식염수가 900 µl이 담긴 1.5 ml microcentrifuge tube에 넣고 vortex하여 10배 희석균액을 만들었다. 희석균액을 다시 100 µl 취하여 생리식염수 900 µl가 담긴 새 1.5 ml microcentrifuge tube에 넣고 vortex하는 과정을 반복하여 10⁻⁷~10⁻⁹까지 단계희석하였다. 단계희석된 균액 100 µl을 BHI 혈액한천배지에 적하한 다음, 멸균된 유리밀대를 사용하여 균액을 한천배지 전면에서 고루 도말하였다. 도말된 한천배지를 37°C 혐기 배양기에서 4~5일간 배양한 후 형성된 *P. gingivalis* 집락이 200 개 정도로 나타난 한천배지를 선택하여 집락수를 센 다음, 이 배지에 도말했던 균액의 희석배수를 역산하여 균액 원액 100 µl당 생균수를 계산하였다. 생균수를 측정하여 대조군과 비교해 사멸된 균수가 99.99%를 넘는 피톤치드의 최소농도를 MBC로 결정하였다.^{20,21)}

3) 항생제 감수성 검사

피톤치드에 노출된 *P. gingivalis*의 항생제에 대한 감수성 변화를 관찰하기 위하여 disc 확산법을 시행하였다. 항생제 감수성 검사에 앞서 예비실험을 통해 disc 확산법으로 나타난 억제환(inhibition zone)의 크기가 20~40 mm 정도가 되어 관찰하고 측정하기 용이하도록 항생제 농도를 미리 결정하였다. 다음, 멸균된 8 mm 직경의 paper disc에 항생제 용액을 20 µl씩 적하하여 각 paper disc 당 항생제 농도가 위에서 결정된 적정농도, 즉 amoxicillin 5 µg, ampicillin 5 µg, cefotaxime 15 µg, penicillin 5 µg, tetracycline 15 µg이 되도록 최종농도를 조절하였다. 항생제 용액이 적하된 paper disc는 50°C 배양기에서 무균상태로 건조시켰다.

피톤치드를 0.005% 첨가한 상태로 24시간 배양한 *P. gingivalis* 균액을 100 µl씩 도말한 BHI 혈액한천 배지에 적정농도의 항생제 disc를 올려놓은 상태로 37°C에서 혐기적으로 4~5일간 배양한 후 항생제 disc 주변에 형성된 억제환의 직경을 측정하였다. 피톤치드를 0.005% 첨가하였을 때 *P. gingivalis*의 생존율이 피톤치드를 첨가하지 않고 배양했을 때의 약 30%이었기 때문에, 피톤치드를 첨가하지 않고 *P. gingivalis*를 24시간 배양한 후 배양 균액을 새 BHI 액체배지와 혼합하여 30% 희석 균액을 만들어 100 µl를 도말한 것을 대조군으로 사용하였다.

3. 투과전자현미경 관찰

P. gingivalis 2561균주의 세포막과 세포질 내 구조를 관찰하기 위하여 투과전자현미경으로 관찰하였다. 우선 실험균주를 액체배지에 접종하여 37°C 혐기성 상태에서 24시간 배양한 다음 배양액 100 ml를 새로운 액체배지 10 ml에 접종한 후 분광광도계(600 nm)로 흡광도 0.4가 될 때까지 혐기적으로 배양하였다. 배양한 실험균주에 피톤치드를 0.005, 0.01% 첨가하고, 또는 피톤치드 없이 6시간을 추가로 배양하였다. 배양액을 10,000 ×g로 30분간 4°C에서 원침시킨 후 회수된 균 pellet을 PBS로 3회 세정한 다음 2% glutaraldehyde와 0.2% ruthenium red가 포함된 1차 고정액 1 ml에 4°C 1시간 동안 전고정하였다. 다음, PBS로 3회 세정하고 2차 고정액인 2% OsO₄를 1 ml 첨가하여 4°C에서 1시간 30분 동안 후고정하였다. 표본은 ethanol로 탈수시킨 후 Epon 812, DDSA (dodeceny succinioanhydride), NMA (nadic methyl anhydride), DMP-30 (tridimethyl amino- methyl phenol)를 혼합하여 포매한 다음 초박질 표본을 제작하여 uranyl acetate와 lead citrate로 염색한 후 전자현미경(H-7100; Hitachi, Japan)하에서 관찰하였다.

4. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

1) Total RNA 추출

*P. gingivalis*의 fimbriae 유전자인 *fimA*와 superoxide dismutase 유전자인 *sod* 발현의 변화를 전사수준에서 살펴보기 위하여 RT-PCR를 시행하였으며 이를 시행하기 위하여 먼저 RNA를 분리하였다. 우선 실험균주를 액체배지에 접종하여 37°C 혐기성

상태에서 24시간 배양한 다음 배양액 100 ml를 새 액체배지 10 ml에 접종한 후 흡광도 0.4(600 nm)까지 배양하였다. 배양액에 피톤치드를 0.005% 농도로 첨가, 또는 피톤치드 없이 2시간 배양하였다. 배양액을 1 ml씩 취하여 얼음에서 냉각시킨 RNase free microcentrifuge tube에 옮긴 다음 Qiagen Total RNA Isolation Kit (Valencia, CA, U.S.A.)를 사용하여 total RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 분광광도계로 각 260 nm, 280 nm에서 흡광도를 측정하여 추출량을 정량하고 순도를 계산하였다.

2) RT

Qiagen RT-PCR Kit (Valencia, CA, U.S.A.)를 사용하여 RT를 시행하였다. 정량하여 농도를 동일하게 맞춘 Total RNA (50 ng~100 ng/ μ l) 1~5 μ l, RNasin (40 Units/ μ l) 0.2 μ l, 2 mM dNTPs 2 μ l, oligo dT primer (10 pmol) 1 μ l, MgCl₂ (2~5 mM) 2~4 μ l, RNase inhibitor (40 Units/ μ l) 1 μ l를 혼합하고 증류수로 최종량을 20 μ l로 조절하였다. 이들 RT 혼합액을 50°C에서 30분, 95°C에서 15분간 시행하고 4°C에서 반응을 정지시켜 cDNA를 얻었다.

3) PCR

PCR에 앞서, Dickinson 등²²⁾이 보고한 *P. gingivalis* 381의 *fimA* 염기서열을 토대로 하여 *fimA* 전체를 포함하는 forward (5'-GCT TTT GGA GTT GGC GAT GAC-3'), reverse (5'-TTA CCA AGT AGC ATT CTG ACC-3') primer를 제작하였고, *sod* 유전자의 PCR을 위해서는 Nakayama²³⁾가 보고한 *P. gingivalis* ATCC 33277의 *sod* 염기서열 일부를 포함하는 forward (5'-CCT ATG TGG ACA ACC TCA AT-3'), reverse (5'-GGC TTC CTT ATG TAT

TGG TG-3') primer를 제작하였다.

그리고 PCR에 사용되는 template의 동량화를 위한 대조군으로 Nelson 등²⁴⁾이 보고한 *P. gingivalis*의 게놈 전체 염기서열 중에서 housekeeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gapA*) 일부를 포함하는 forward (5'-AAT ATC ATC CCC TCT TCC ACC-3'), reverse (5'-GTT GGA GTA TCC GAT TTC GTT-3') primer를 제작하였다 (Table 1).

PCR을 위하여 cDNA (10~50 ng/ μ l) 1~5 μ l, primer 각각 10 pmol, Taq DNA polymerase (5 Units/ μ l; TaKaRa Korea) 0.25 μ l, 2 mM dNTP 2~5 μ l, 10 \times buffer 2~5 μ l, MgCl₂ (2~5 mM) 2~4 μ l를 혼합하고 증류수로 최종량을 50 μ l로 조절하였다. PCR 혼합액을 95°C에서 5분간 변성시킨 다음, PCR cycle은 94°C에서 30~60초, 52~55°C에서 30~60초, 72°C에서 60~90초로 25~30회 반복하고, 72°C에서 10분간 반응한 후 4°C에서 반응을 정지하여 PCR 산물을 얻었다. PCR 산물은 1% agarose gel에 전기영동한 후 ethidium bromide (0.5 μ g/ μ l)로 염색한 다음 UV 광선 하에서 나타난 띠의 크기와 상대적인 양을 확인하고, 확인한 결과는 사진촬영으로 기록하였다.

5. SDS-PAGE

실험균주를 액체배지에 접종하여 37°C 혐기성 상태에서 24시간 배양한 다음 배양액 100 μ l를 새 액체배지 10 ml에 접종하고 피톤치드를 0.005% 첨가, 또는 피톤치드 없이 24시간 혐기적으로 배양하였다. 배양액을 10,000 $\times g$ 로 30분간 4°C에서 원심시킨 후 균체를 PBS로 세정한 균 부유액을 초음파파쇄기로 1분간 파쇄시킨 후 원심 분리하여 상층액의 단백질을

Table 1. Primers to be used in RT-PCR

Primers	Sequence (5' to 3')	Amplicon size (bp)
<i>fimA</i> -forward	GCT TTT GGA GTT GGC GAT GAC	1,014
<i>fimA</i> -reverse	TTA CCA AGT AGC ATT CTG ACC	
<i>sod</i> -forward	CCT ATG TGG ACA ACC TCA AT	517
<i>sod</i> -reverse	GGC TTC CTT ATG TAT TGG TG	
<i>gapA</i> -forward	AAT ATC ATC CCC TCT TCC ACC	354
<i>gapA</i> -reverse	GTT GGA GTA TCC GAT TTC GTT	

Bradford 방법으로 정량하여 각 시료의 단백질 총량을 동일하게 조정하였다. 농도가 조정된 상층액에 5× sample buffer (β-mercaptoethanol 포함) 4 μl를 첨가하여 100°C에서 10분간 처리한 후 SDS-10% polyacrylamide gel에 적하한 후 Tall Mighty Small gel apparatus (SE280; Hoefer Scientific Instruments, U. S. A.) 상에서 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동이 끝난 polyacrylamide gel은 Coomassie blue로 염색한 다음 염색된 단백질을 관찰하였다.

6. Immunoblot

같은 *P. gingivalis* 시료로 전기영동을 끝낸 또 다른 set의 gel은 Semi-Dry Blotting unit (Fisher Scientific, U. S. A.)를 이용하여 1시간 동안 2.5 mA/cm² gel의 출력으로 PVDF 막(Roche Diagnostic, Mannheim, Germany)에 전이시켰다. 단백질이 전이되지 않은 부위의 PVDF 막은 1% BSA-TBS (20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 0.5M NaCl)로 1시간 차단한 다음 1% BSA-TBS에 1:500로 희석한 anti-fimbrillin 항혈청, anti-whole cell 항혈청을 각각 첨가 한 후 4°C에서 하룻밤 반응시켰다. 다음 PVDF 막을 Tris-Tween 20 완충용액(10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 0.05% Tween 20 [v/v], 0.01% NaN₃)으로 매 5분씩 3회 세정한 다음 1% BSA-TBS에 1:1,000로 희석한 goat anti-rabbit IgG(H+L)-alkaline phosphatase conjugate (Sigma, St. Louis, MO, U. S. A.)로 상온에서 1시간 반응시켰다. 반응 후 Tris-Tween 20 완충용액으로 PVDF 막을 매 10분씩 5회 세척한 다음 substrate BCIP/NPT (Sigma, St. Louis, MO, U. S. A.)로 처리하여 발색되는 단백질 띠를 관찰하였다.

III. 실험결과

1. *P. gingivalis*에 대한 피톤치드의 항균효과

피톤치드와 함께 배양한 *P. gingivalis*를 BHI 액체 배지에 접종하고 배양한 다음 배양 균액의 흡광도를 측정해 피톤치드의 항균효과를 관찰하였다(Table 2). 피톤치드를 첨가하지 않고 24시간 배양했을 때 *P. gingivalis*의 흡광도는 0.991이었으나 피톤치드의 첨가량이 0.002% 이상이면 흡광도가 급격히 감소하고 0.008%일 때 흡광도가 0.016이 되어 *P. gingivalis*에 대

한 피톤치드의 MIC는 0.008%로 결정되었다(Table 2).

피톤치드와 함께 배양한 *P. gingivalis*를 BHI 혈액 한천배지에 도말한 다음 형성된 집락의 수, 즉 생균수로 피톤치드의 살균효과를 관찰하였다. 피톤치드를 첨가하지 않고 배양한 대조군 *P. gingivalis*는 생균수가 100 μl당 2.69 × 10⁹이었으나, 피톤치드와 함께 배양했을 때는 생균수가 크게 줄어 피톤치드 첨가량이 0.005%일 때 생균수 7.83 × 10⁸, 0.01%일 때 2.50 × 10⁶로 각각 29.6와 0.01%의 생존률을 보였다. 전체 균의 99.99%이상을 살균할 수 있는 최소농도가 MBC이기 때문에^{20,21)} *P. gingivalis*에 대한 피톤치드의 MBC는 0.01%로 결정되었다. 피톤치드의 농도를 높여 0.1%까지 첨가하면 생존하는 세균이 전혀 없었다(Table 3).

2. 피톤치드에 의한 *P. gingivalis*의 항생제 감수성 변화

피톤치드를 첨가하고 배양한 *P. gingivalis*를 대상으로 하여 disc 확산법으로 항생제 감수성 검사를 시행한 후 형성된 항생제 disc의 억제환 크기를 피톤치드를 첨가하지 않고 배양한 대조군 *P. gingivalis*를 사

Table 2. Change in the growth of *P. gingivalis* in the presence of phytoncide

Phytoncide added(%)	O. D. at 600 nm
0	0.991
0.001	0.924
0.002	0.518
0.004	0.101
0.006	0.468
0.008	0.016
0.010	0.003
0.020	-0.035
0.040	-0.031

P. gingivalis 2561 was grown in BHI in the presence of phytoncide at different concentrations for 24 h. Changes in the bacterial growth by phytoncide were determined by measuring the optical density (O. D.) of the bacterial culture at 600 nm. The result shown here is the representative of several experiments unless otherwise indicated.

Table 3. Effect of phytoncide on viability of *P. gingivalis* 2561

Phytoncide added (%)	Number of viable cells (%)
0	2.69 x 10 ⁹ (100.0)
0.005	7.83 x 10 ⁸ (29.06)
0.01	2.50 x 10 ⁶ (0.01)
0.10	0 (0.0)

P. gingivalis 2561 was grown, adjusted the optical density to 0.1 at 600 nm, and incubated for 24 h anaerobically in the presence of phytoncide at 0.005~0.1% (v/v). After the incubation, 100 μl of the cultured bacterial cells was smeared on a blood agar plate. Number of the viable cells (colony forming unit) in the 100-μl bacterial cells was counted after 4~5-day incubation. The results shown here are the representative of several experiments unless otherwise indicated.

Table 4. Effect of phytoncide on antibiotic sensitivity of *P. gingivalis* 2561

Antibiotics	No phytoncide	0.005% phytoncide
Amoxicillin (5 μg)	20.0±0.00 ^a	22.6±0.37 [*]
Ampicillin (5 μg)	22.6±0.37	22.0±0.00
Cefotaxime (15 μg)	21.6±0.37	21.6±0.37
Penicillin (5 μg)	14.3±0.37	14.3±0.37
Tetracycline (15 μg)	33.6±0.37	34.0±0.00

P. gingivalis was grown in the presence of 0.005% phytoncide for 24 h and 100 μl of the cultured cells was smeared on a blood agar plate and then subjected to antibiotic sensitivity test for 4~5 days using different antibiotic discs. Diameter of the inhibition zone was measured and compared with that of the inhibition zone created on the plate of *P. gingivalis* that had been incubated in the absence of phytoncide.

^a; diameter of the inhibition zone (mm).

^{*}; diameter of the inhibition zone formed by amoxicillin was significantly increased when 0.005% phytoncide added (95% confidence, P=0.0013).



Fig. 1. A transmission electron microphotograph of *P. gingivalis* incubated without phytoncide. *P. gingivalis* 2561 grown up to optical density of 0.4 at 600 nm was further incubated without phytoncide for 6 h. The bacterial cells were harvested, fixed, embedded, ultrathin-sectioned, and then stained with uranyl acetate and lead citrate. Notice that the inner and outer membranes of the cells are discernible and ribosomes are scattered in the cytoplasm but more toward the cell membrane. Some cells are undergoing cell division and have electron dense granules which are thought to be polyphosphate reserve materials. (X 40,000 mag.)

용했을 때에 형성된 억제환 크기와 비교함으로써 피톤치드가 *P. gingivalis*의 항생제 감수성에 변화를 유도하는지 관찰하였다. 피톤치드가 첨가되어도 *P. gingivalis*는 ampicillin, cefotaxime, penicillin, tetracycline에 대한 감수성에는 전혀 변화가 없었다. 그러나 amoxicillin에 대해서는 대조군 *P. gingivalis*를 사용했을 때(20.0 mm)와 비교하면 피톤치드와 함께 배양한 *P. gingivalis*는 항생제 감수성 검사에서 억제환의 크기가 22.6 mm로 증가하여 one-way ANOVA (n=3) 검사로 통계적 유의성(95% confidence, P=0.0013)을 보였다(Table 4).

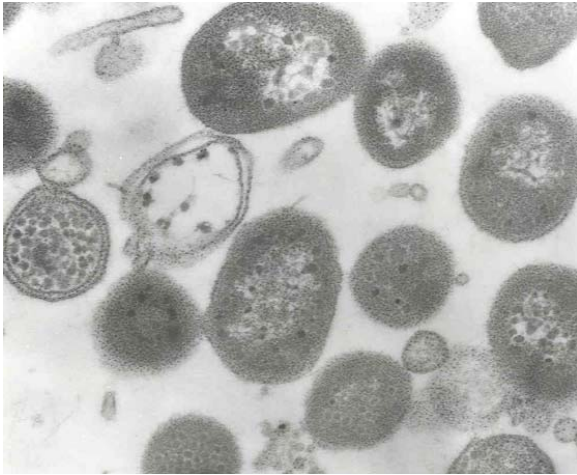


Fig. 2. A transmission electron microphotograph of *P. gingivalis* incubated with 0.005% phytoncide. *P. gingivalis* 2561 grown up to optical density of 0.4 at 600 nm was further incubated with 0.005% phytoncide for 6 h. Morphologically abnormal cells are prominent, which have distinct nucleotide and more electron dense granules. Ribosomes in the cytoplasm are densely located more toward the membrane. A few lysed ghost cells with sparse remnant of the cell body are observed and abnormally smaller sized, degenerated cells are also detected. (X 40,000 mag.)

3. 피톤치드에 의한 *P. gingivalis*의 형태변화

피톤치드에 의한 *P. gingivalis*의 형태변화를 투과전자현미경으로 관찰하였다. 피톤치드를 첨가하지 않고 배양한 *P. gingivalis*는 뚜렷하게 내막과 외막이 관찰되고 리보솜이 세포막 쪽으로 다소 편중된 상태로 균일한 밀도를 갖는 정상적인 형태를 보였다. 일부 균에서 세포분열이 진행되고 있고, 또 다른 균에서는 세포질 내에 전자밀도가 높은 과립이 관찰되었다. 그리고 외막에서 떨어져 나와 형성된 소수의 소포(vesicle, 또는 bleb)가 발견되었다(Fig. 1).

피톤치드를 0.005% 첨가하고 배양한 *P. gingivalis*는 비정상적인 형태변화를 보였다. 많은 균들에서 핵의 위치를 분별할 수 있을 만큼 핵이 뚜렷해졌고, 세포질 내 리보솜의 전자밀도가 더욱 뚜렷해지고 전자밀도가 높은 과립의 수도 증가하였다. 또한 소포의 수

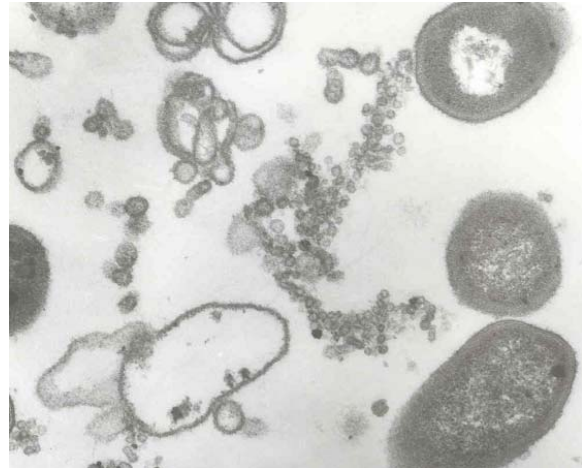


Fig. 3. A transmission electron microphotograph of *P. gingivalis* incubated with 0.01% phytoncide. *P. gingivalis* 2561 grown up to optical density of 0.4 at 600 nm was further incubated with 0.01% phytoncide for 6 h. Note that occurrence of ghost cells becomes prominent and numerous small-sized vesicles are scattered. (X 40,000 mag.)

도 증가하였다. 세포질 내용물이 사라지거나 거의 사라진 상태에서 두개의 막만이 존재하는 유령세포(ghost cell)의 출현이 빈번해졌다. 또한 정상보다 작은 크기의 균도 많이 관찰되고 이들 균은 대부분 비정상적인 형태를 보였다(Fig. 2).

피톤치드 첨가량이 0.01%로 증가되었을 때, *P. gingivalis*는 더욱 비정상적인 형태를 보였다. 유령세포의 수도 크게 증가하였고, 특징적으로 다양한 크기의 수많은 소포들이 밀집되어 나타나는 것이 관찰되었다(Fig. 3).

4. 피톤치드에 의한 *P. gingivalis*의 유전자 발현의 변화

RT-PCR로 superoxide dismutase mRNA의 발현 정도를 관찰한 결과, 0.005% 피톤치드와 함께 배양했을 때 피톤치드를 첨가하지 않고 배양한 *P. gingivalis*보다 크게 감소하였다. 반면 *fimA*의 발현에는 차이가 나타나지 않았다 (Fig. 4).

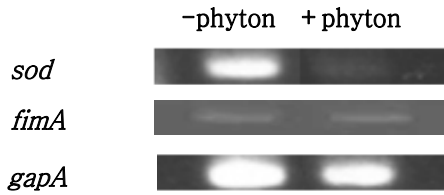


Fig. 4. Change in expression of superoxide dismutase (SOD) mRNA of *P. gingivalis* after the addition of phytoncide as determined by RT-PCR. *P. gingivalis* 2561 grown up to optical density of 0.4 at 600 nm was further incubated with 0.005% phytoncide for 2 h. The cultured cells of *P. gingivalis* were centrifuged to collect the cell pellet. Total RNA was extracted from the cell pellet and subjected to RT-PCR to examine the expression of superoxide dismutase gene (*sod*) and fimbriin gene (*fimA*), and GapA housekeeping gene (*gapA*) as a control. Note that the expression of *sod* was dramatically decreased after the incubation with phytoncide.

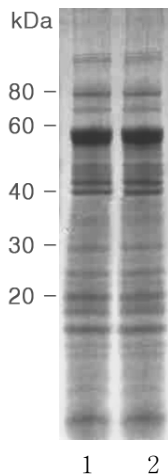


Fig. 5. SDS-PAGE analysis of *P. gingivalis* with or without phytoncide. *P. gingivalis* 2561 grown up to optical density of 0.4 at 600 nm was further incubated with 0.005% phytoncide for 6 h. The bacterial cells were centrifuged to collect the cell pellet, boiled in sample buffer for 10 min, and subjected to SDS-10% polyacrylamide gel electrophoresis. Lanes: 1, *P. gingivalis* without phytoncide; 2, *P. gingivalis* with 0.005% phytoncide.

5. 피톤치드에 의한 *P. gingivalis*의 단백질 발현의 변화

*P. gingivalis*를 0.005% 피톤치드와 함께 배양한 후 단백질 양상의 변화를 SDS-PAGE로 분석한 결과 단백질들의 발현 정도는 피톤치드를 첨가하지 않고 배양한 *P. gingivalis*와 비교했을 때 차이가 없는 것으로 나타났다(Fig. 5).

SDS-PAGE으로 발견할 수 없는 미세한 단백질 발현의 변화를 찾을 수 있다는 가능성 때문에 anti-whole cell 항혈청을 사용하여 immunoblot을 시행하였다. 그러나 SDS-PAGE와 마찬가지로 피톤치드를 첨가하고 *P. gingivalis*를 배양하더라도 단백질 profile에는 변화가 나타나지 않았다(Fig. 6).

IV. 총괄 및 고안

식물들은 화학물질을 생성하여 주위로 방산함으로써 다른 식물들에게 직간접적으로 해를 입히는 알레

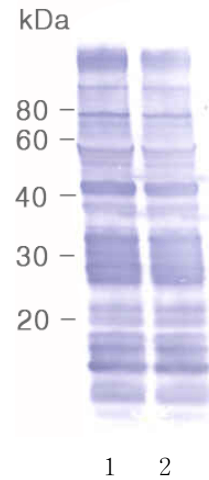


Fig. 6. Immunoblot analysis of *P. gingivalis* with or without phytoncide. The boiled sample prepared in Fig. 5 was subjected to immunoblot. The separated proteins in the sample by SDS-PAGE were transferred to a PVDF membrane. The membrane was blocked and incubated anti-*P. gingivalis* whole cell antibodies and then with secondary antibodies conjugated with alkaline phosphatase. Lanes: 1, *P. gingivalis* without phytoncide; 2, *P. gingivalis* with 0.005% phytoncide.

로파시(allelopathy) 기능을 가지고 있다.¹⁷⁾ 이들 알레로파시 효과에 관여하는 물질로 알려진 것들은 대개 allelochemicals라는 2차 대사산물들로서, phenolics, terpenoid, alkaloid, phenylpropane, acetogenin, steroid 등이 있다.¹⁴⁻¹⁶⁾ Allelochemicals 중 휘발성 물질은 자연 상태에서 주위환경 내로 퍼져나가 서식처의 환경변화를 가져올 수 있게 하며, 이들 물질이 식물들의 생존과 적응에 상당한 역할을 하게 된다.¹⁶⁾ 식물에서 생성되는 이들 화학물질은 증기, 압축, 추출 등의 방법으로 정유(essential oil)의 형태로 정제할 수 있다. 이 정유는 기능적인 측면에서 피톤치드라고도 불린다. 피톤치드는 일반적으로 휘발성(방향성)이며 그 주성분은 ‘테르펜(terpene)’ 이라고 하는 유기 화합물이다.²⁵⁾ 산림 속에 있을 때 느낄 수 있는 독특한 향은 산림을 이루고 있는 각각의 나무에서 나오는 방향성 피톤치드에 의해 결정된다. 산림에서는 악취의 원인이 되는 동물의 사체나 썩은 나무 등이 있음에도 불구하고 상쾌한 공기를 느낄 수 있는데 이것은 피톤치드의 공기정화능력, 특히 악취를 없애는 소취능력이 탁월하기 때문이다. 또한 피톤치드는 자율신경을 효과적으로 안정시키며, 간 기능을 개선하거나 숙면을 유도하는 기능도 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 최근에 유행하는 산림욕은 쾌적감을 제공한다는 단순한 차원을 넘어 실제 건강을 증진시키는 적극적 수단이 될 수도 있다.

식물이 피톤치드를 생산하는 1차적인 목적은 주변 위협으로 부터의 개체를 보호하는 것이다. 피톤치드는 주위의 식물에 대한 알레로파시 기능 이외에도 식물 주변에 존재하는 다양한 종류의 포식자들, 예를 들어 초식동물을 비롯하여 곤충, 진드기, 미생물에 대한 방어기능이 있다.²⁶⁾ 이런 이유로 피톤치드를 일상생활에서 사용하려는 노력이 이루어지면서 식품의 방부제, 육질의 곰팡이 제거용 살균제, 실내용 방향·방충제, 집먼지 진드기 퇴치용 구제제 등이 개발되어 현재 상품화되고 있다. 치의학적으로 보다 큰 관심을 끄는 것은 세균, 진균, virus 등 다양한 병원미생물에 대한 피톤치드의 항균효과인데 아직까지는 임상에 이용하려는 시도가 활발히 이루어지고 있지 않다.

편백나무(*Chamaecyparis obtusa* Sieb. et Zucc.)는 현재 일본과 대만, 그리고 북한의 백두산 부근 등에서 자생하고 있는 측백나무과 편백나무속의 상록 침엽 교목으로 줄기에 독특한 향기가 있다. 편백나무는 건재 등에 사용되고 있으며, 그 정유는 향료, 살충제, 방향제 등에 이용되고 한다. 편백나무에서 추출한 휘발

성 피톤치드는 광범위한 세균 및 진균종에 대해 강한 항균효과를 가지고 있다. 편백 피톤치드에 감수적인 미생물로는 그람 양성세균인 *Staphylococcus epidermidis*, 그람 음성세균인 *Vibrio parahaemolyticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, 효모형 곰팡이인 *Candida albicans*, 사상형 곰팡이인 *Aspergillus nidulas*, *Alternaria mali*, *Fusarium oxysporum* 등이 잘 알려져 있다.¹⁸⁾

최근, 오랜 기간 화학적 항생제를 사용하여 항생제에 내성을 가진 병원균이 점점 늘어나고 있는 현실에서 항균효과가 있는 천연물질을 임상적으로 이용하려는 시도가 이루어지고 있다. 편백 피톤치드와 같이 항균효과가 잘 알려진 천연물질을 구강감염질환의 예방이나 치료목적으로 사용이 가능한 지를 연구하는 것은 의미 있는 일이라고 생각된다.

치주질환은 30세 이상의 성인에서 이환율이 점점 증가하여 40~50대가 되면 60~90%가 이환되는 것으로 보고되고 있다. 치주질환은 성인에서 치아상실의 가장 큰 원인이기 때문에 50대 이상 대다수의 성인들은 치아상실의 가능성에 항상 노출되어 있다고 할 수 있고 이것은 결국 삶의 질 저하로 연결된다. 한편, 경제적으로 여유로워지면서 구취에 대한 관심도 높아졌고 이로 인해 불편함을 토로하는 사람들이 증가하고 있다. 사람들은 구강위생에 관심을 갖게 되었고 상대적으로 예전에 비해 구취에 대해서도 점차 예민해지면서 구취가 있는 사람을 기피하게 됨으로써 구취가 있는 사람은 구취가 삶을 질을 저하시키는 중요한 원인으로 생각하는 경향이 커지고 있다. 치주질환 진행과정 중에 치주조직 단백질이 분해되어 황화합물과 같은 부패물질이 많이 생성되기 때문에 치주질환은 구취의 중요한 원인이 된다. 따라서 치주질환의 가장 중요한 원인균 중 하나인 *P. gingivalis*는 구취의 유발인자로서도 중요한 역할을 하고 있다.⁶⁾

본 연구에서는 *P. gingivalis*에 대한 편백 피톤치드의 항균효과를 관찰하였다. *P. gingivalis*는 배지에 첨가된 피톤치드의 양이 증가할수록 성장이 억제되었다. *P. gingivalis*는 피톤치드가 0.008%일 때 성장이 완전히 억제되어 MIC는 0.008%로 결정되었다. MBC를 결정하기 위해 시행한 생균수 검사에서 피톤치드 첨가량이 증가할 수록 생균수는 급격히 감소하여 0.01% 농도에서 거의 모든 *P. gingivalis*가 사멸하였고 (99.99%), 0.1%에서는 완전히 사멸하였다(Table 3). 항균제제는 정균작용을 갖는 것보다는 살균작용을 갖는 것이 이상적이기 때문에 편백 피톤치드가 강한 살

균력을 갖고 있다는 것은 고무적이다. 편백나무 이외에도 많은 식물들로부터 정유를 얻고 있고 이들 정유의 *P. gingivalis*에 대한 항균효과가 보고되어 있으나 본 연구와 다른 조건에서 연구가 수행되었기 때문에 이들 다른 식물의 정유와 피톤치드의 항균효과를 직접 비교하기는 어렵다. Takarada 등¹⁹⁾은 manuka, tea tree, eucalyptus, lavandula, rosmarinus 정유의 항균효과를 본 연구에서 사용한 *P. gingivalis* 2561와 똑같은 유전적 성상을 갖는 균주 ATCC 33277에 대해 96-well plate를 사용하여 관찰하였다. 그 결과, manuka 정유는 *P. gingivalis* ATCC 33277에 대한 MIC가 0.03%로 가장 낮게 나타났고 나머지는 0.13% 이상에서 MIC가 결정되었다(Table 2). 한편, manuka의 MBC는 0.06%, 나머지 정유들은 0.5% 이상의 농도에서 *P. gingivalis* ATCC 33277을 완전히 살균할 수 있었다(Table 3). 따라서 직접적인 비교는 어렵지만 편백 피톤치드는 이들 정유보다 훨씬 강한 살균효과를 갖는 것으로 판단된다. *P. gingivalis* W83에 대한 여러 정유(chamomile, myrrh, rhatany, echinacin, peppermint, rosemary, sage, tulsi, tea tree, eugenol, thymol)의 효과를 96-well plate에서 관찰한 Shapiro 등²⁰⁾의 연구에서 sage와 tea tree가 가장 강한 항균효과를 보였다. Sage와 tea tree의 MIC는 각각 0.06, 0.11%였고, MBC는 sage가 0.37%였으나 tea tree는 0.6% 이상 농도에서만 살균이 가능하였다. 정유의 성분인 thymol과 eugenol를 정제하여 사용하였을 때는 정유 자체보다는 강한 항균효과를 보였다. Thymol과 eugenol의 MIC는 각각 0.03, 0.06% 이었고, MBC는 각각 0.05, 0.18% 이었다. MBC는 초기 접종 세균의 99.99%까지 살균할 수 있는 최소농도로 본다면^{20,21)} 본 연구에서 측정된 *P. gingivalis*에 대한 MBC는 0.01%이기 때문에 편백 피톤치드는 다른 정유에 비해 훨씬 강력한 항균(살균)효과를 갖고 있다고 판단된다.

항생제나 살균제 등의 세균막 투과성을 높이는 화학물질을 permeabilizer라고 하고, 이들 물질 중 대표적인 것으로 잘 알려진 것이 polyphosphate이다.²⁷⁾ Permeabilizer들은 특정 항생제의 항균효과를 높여줄 수도 있기 때문에 피톤치드가 만약 permeabilizing 효과를 갖는다면 자체 항균력 이외에 항생제 항균력을 증진시키는 부가적인 효과를 기대할 수 있다. 이 가능성을 확인하기 위해 *P. gingivalis*를 피톤치드와 배양한 다음 항생제에 대한 감수성이 변하는 지를 관찰하였다. Amoxicillin, ampicillin, cefotaxime, penicillin, tetracycline 등 *P. gingivalis*에 대한 항균효과가 크고

²⁸⁾ 임상에서 많이 사용되는 항생제 군에 속하는 대표 항생제를 선택하였다. 이들 항생제 중에서 amoxicillin만 항균효과가 피톤치드에 의해 증가한 것으로 나타났다(Table 4). 항생제에 따라 permeabilizing 효과는 같은 permeabilizer라도 다르게 나타날 수 있다.^{27,29)} 편백 피톤치드의 경우 amoxicillin에 대해서는 항균효과를 높여주는 하였지만 이미 보고된 다른 연구들의 결과처럼 뚜렷한 차이를 보이는 것이 아니기 때문에 permeabilizing 효과가 크다고 보기에는 한계가 있다. 그러나 Nguefack 등³⁰⁾은 일부 정유들이 *Listeria*, *Staphylococcus*의 세포막 투과성을 높여준다고 보고하였기 때문에 향후 다른 계열의 여러 항생제를 대상으로 관찰하는 것이 필요하다고 생각된다.

정유의 항균기전에 대해선 알려진 것이 별로 없다. 위에서 언급한 것같이 일반적으로 세균의 세포막 투과성 증가와 이에 따른 세포질 유리에 의한 것으로 보인다. 이외에 세균 호흡대사에 영향을 미침으로써 항균효과를 발휘하는 것으로 생각된다.^{26,31)} Carson 등³²⁾은 *Staphylococcus aureus*에 대한 tea tree 정유의 항균기전을 연구하였다. 이 결과 tea tree 정유는 세포용해를 일으킬 만큼 직접적으로 세균 세포벽에 손상을 주는 것은 아니고 세포벽이 약해지고 그 결과 세포막이 삼투압 변화에 의해 파괴되며, 동시에 자가분해효소가 활성화되어 시간이 지남에 따라 세균의 자가분해(autolysis)를 야기한다고 추측하였다. 이들 연구자는 이런 항균기전 이외에도 다른 기전이 존재할 것으로 예상하였다. Oussalah 등³⁰⁾은 Spanish oregano, Chinese cinnamon, savory 정유가 *Escherichia coli* O157:H7 와 *Listeria monocytogenes*의 세포막 통합성(integrity)에 영향을 미치고 세포내 ATP의 감소, 세포질 내용물 유출의 증가, 세포내 pH가 감소하는 현상이 나타난다고 보고하였다. 한편, 이들 연구자는 전자현미경으로 세균 세포막이 손상된 것을 관찰하였다.

본 연구에서 편백 피톤치드를 첨가하고 6시간 배양한 후 *P. gingivalis*를 전자현미경으로 관찰하였다. 피톤치드를 0.005% 첨가한 경우, 많은 균들에서 핵의 위치를 분별할 수 있을 만큼 핵이 뚜렷해 졌고, 세포질 내 리보솜의 전자밀도가 더욱 뚜렷해지고 전자밀도가 높은 과립의 수도 증가하였다(Fig. 2). 이들 과립은 세포 내에서 생성된 과립이라고 생각되는 데 인공합성 polyphosphate를 첨가하고 배양했을 때도 *P. gingivalis*에서 관찰되는 현상이다.³⁴⁾ 세포 내의 polyphosphate는 성장 정지기 때처럼 영양이 부족할 상태와 같은 외부 스트레스 요인에 대한 방어작용으

로 세포질 내에 생성되는 것이기 때문에³⁵⁾ 아마도 피톤치드가 *P. gingivalis*에 대한 스트레스로 작용하고 있다는 것을 반영하는 것으로 생각된다. 이 polyphosphate 과립은 피톤치드 첨가량을 0.01%로 증가시켰을 때 오히려 감소하고 있다(Fig. 3). 이것은 피톤치드에 의한 스트레스가 한계가 넘었기 때문에 나타나는 현상이라고 생각되는 데 전자현미경 소견에 따르면 *P. gingivalis*에서는 polyphosphate 생성이 아니라 세균 세포의 파괴양상을 보여주는 증거가 더욱 뚜렷하게 나타나고 있다. 피톤치드가 0.005% 첨가되었을 때 이미 세포질 내용물이 완전히 빠져나가고 외막과 내막(세포막)만이 존재하는 유령세포가 빈번히 나타났고, 이 유령세포의 막 통합성에 손상이 있는 것도 관찰할 수 있었다. 또 하나의 두드러진 특징은 소포(vesicle)의 출현이다. 소포는 *P. gingivalis*를 배양하는 시간이 증가하면서 정상적으로 나타날 수 있지만 성장 정지기에 있거나 주변 환경여건이 악화되었을 때 더 많이 나타난다.³⁶⁾ 피톤치드를 MBC 농도인 0.01%를 첨가하였을 때에는 특징적으로 다양한 크기의 수많은 소포들이 밀집되어 나타나는 것이 관찰되었다. 이는 아직 학계에 발표되지 않은 독특한 현상으로 매우 흥미로운 발견이라고 할 수 있다. 소포의 출현은 피톤치드의 항균작용과 연관되어 있을 것으로 예상되기 때문에 앞으로 이에 대한 연구가 필요하다고 사료된다.

항균물질은 치사농도 이하의 농도에서 세균을 살균시키지 못하더라도 세균의 생리·생화학적 성장에 영향을 미쳐 세균의 병원성을 감소시킬 수도 있다.³⁷⁾ 본 연구에서는 독성산화물질을 약화시키는 효소인 superoxide dismutase에 대한 mRNA 발현을 관찰하였다(Fig. 4). *P. gingivalis*는 0.005% 피톤치드에 노출되었을 때 superoxide dismutase의 발현이 현저히 감소하였다. 이 결과는 *P. gingivalis* 주변에 산화물질이 축적될 때 이 산화물질의 독성을 중화시켜줄 수 있는 능력이 떨어진다는 것을 반영한다. *P. gingivalis*는 편성 혐기균임에도 불구하고 산소가 미량 존재하는 환경에서 어느 정도 저항성이 있을 것으로 추측되는 데 피톤치드에 노출되면 산화물질 중화능력이 감소하기 때문에 생존력이 감소하게 될 것이라고 예상된다.³⁸⁾

배양 온도가 증가하거나³⁹⁾ 영양분 공급이 제한적인 환경⁴⁰⁾에서는 *P. gingivalis fimA*의 발현이 감소하는 등 환경변화에 의해 *fimA* 발현에 차이가 나타나는 것으로 보고되고 있다. 그러나 본 연구의 RT-PCR 분석에서 *fimA* 유전자 발현은 피톤치드의 영향을 받지 않

는 것으로 나타났다(Fig. 4). 이 같은 결과는 단백질의 변화를 관찰한 SDS-PAGE와 immunoblot 분석에서도 확인되었는데, Fig 5와 6에서와 같이 *fimA*가 coding하는 43-kDa fimbrillin은 피톤치드와의 배양 여부와 관계없이 발현의 양은 같았다.

한편 fimbrillin와 함께 *P. gingivalis*의 표면에 다량 존재하며 fimbrillin과는 다른 성격의 minor fimbriae를 구성하는 75 kDa 단백질도 온도와 영양제한 환경에서 감소하는 것으로 알려져 있으나 피톤치드에 의해서는 발현에 차이가 나타나지 않았다(Fig. 5, 6). 이외에 다른 단백질이 피톤치드에 의해 변화가 나타나는지를 SDS-PAGE와 immunoblot으로 비교하였으나 역시 차이가 없는 것으로 나타났다.

SDS-PAGE나 immunoblot를 통해 관찰할 수 있는 단백질들은 대부분 발현양이 상대적으로 훨씬 많은 외막단백질이고, 대사 등에 관여하는 효소와 같은 단백질은 너무 소량이라 SDS-PAGE나 immunoblot으로 관찰되지 않기 때문에 본 결과만으로 피톤치드가 *P. gingivalis*의 단백질 양상에 영향을 미치지 못했다고 판단할 수는 없을 것이다. 위에서 언급한 것처럼 피톤치드는 *P. gingivalis*의 형태를 변화시키고 생존력을 감소시켰기 때문에 틀림없이 superoxide dismutase 이외에도 발현에 변화가 있는 유전자, 단백질이 있을 것으로 사료된다. 따라서 앞으로 microarray나 더 많은 유전자를 대상으로 RT-PCR 관찰을 계속하는 것이 필요하고 그 결과는 피톤치드의 항균기전을 이해하는 데 도움을 줄 것으로 생각된다.

본 연구결과로 미루어 볼 때, 편백 피톤치드의 *P. gingivalis*에 대한 항균력은 매우 강력하며 이를 이용한 구강위생제품은 치주질환과 구취의 예방 및 치료 후의 예후 관리에 매우 유용하게 사용할 수 있을 것이라고 생각된다.

V. 결 론

피톤치드란 '산림향'이라고 부르는, 나무가 갖는 특유의 향을 발산하는 휘발성 화학물질로서, 우리 몸을 쾌적하게 해 줄 뿐만 아니라 항균, 방충, 소취 등 다양한 기능을 가지고 있다. 치주질환과 구취를 유발시키는 중요한 원인균인 *P. gingivalis*에 대한 피톤치드의 항균효과와 항균작용을 연구하기 위하여, 편백 피톤치드와 함께 *P. gingivalis* 2561을 배양한 후 *P. gingivalis* 2561의 성장정도, 생존력 및 형태적, 분자생물학적 변화를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 피톤치드는 *P. gingivalis*에 매우 강한 항균력을 보였고, 이 항균력은 살균작용에 의한 것으로 나타났다. *P. gingivalis*에 대한 피톤치드의 최소억제농도는 0.008%, 최소살균농도는 0.01%로 결정되었다.
2. 피톤치드와 함께 배양된 *P. gingivalis*는 ampicillin, cefatoxime, penicillin, tetracycline에 대한 감수성이 변하지 않았으나 amoxicillin에 대한 감수성은 증가하였다.
3. 피톤치드와 같이 배양된 *P. gingivalis*를 투과전자현미경으로 관찰한 결과, 핵이 뚜렷해지고 전자밀도가 높은 과립이 증가하였고 리보솜이 세포질 가장자리로 분포하였으며, 피톤치드 양이 증가할수록 유령세포, 특히 소포가 특징적으로 크게 증가하였다.
4. RT-PCR 분석 결과, 피톤치드는 *P. gingivalis*의 superoxide dismutase의 발현을 억제하는 것으로 나타났다.
5. SDS-PAGE와 immunoblot 분석 결과, 피톤치드는 *P. gingivalis*의 단백질 발현에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

이상의 결과로 미루어 피톤치드는 *P. gingivalis*에 대해 강한 항균효과를 갖고 있으며 이것은 살균작용에 의한 것으로 판단된다. 즉, 피톤치드는 외막단백질 발현에는 영향을 미치지 못하지만 *P. gingivalis*의 항산화물질 생산능력을 감소시키거나 아직 밝혀지지 않은 기전을 통해 스트레스 상황을 유도하여 생존능력을 억제하여 결과적으로 세균세포의 구조적 형태 변화와 함께 사멸을 유도하는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Gharbia SE, Shah HN. Interactions between black-pigmented Gram-negative anaerobes and other species which may be important in disease development. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1993;6:173-178.
2. Ximenez-Fyvie LA, Haffajee, AD, Socransky SS. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol* 2000;27:648-657.
3. Lamont RJ, Jenkinson HF. Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62:1244-1263.
4. Tanner AA, Socransky SS, Goodson JM. Microbiota of periodontal pockets losing crestal alveolar bone. *J Periodontal Res* 1984;11:279-291.
5. Tamai R, Asai Y, Ogawa T. Requirement for intercellular adhesion molecule 1 and caveolae in invasion of human oral epithelial cells by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 2005;73:6290-6298.
6. Christersson LA, Rosling BG, Dunford RG *et al*. monitoring of subgingival *Bacteroides gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the management of advanced periodontitis. *Adv Dent Res* 1988;2:382-388.
7. Ding Y, Haapasalo M, Kerosuo E *et al*. Release and activation of human neutrophil matrix metallo- and serine proteinases during phagocytosis of *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola*. *J Clin Periodontol* 1997;24:237-248.
8. DeCarlo AA Jr, Windsor LJ, Bodden MK *et al*. Activation and novel processing of matrix metalloproteinases by a thiol-proteinase from the oral anaerobe *Porphyromonas gingivalis*. *J Dent Res*, 1997;76:1260-1270.
9. Tonzetich J. Production and origin of oral malodor. A review of mechanisms and methods of analysis. *J Periodontol* 1997;48:13-20.
10. Bosy A. Oral Malodor: philosophical and practical aspects. *J Can Dent Assoc* 1997;63:196-201.
11. Nakano Y, Yoshimura M, Koga T. Correlation between oral malodor and periodontal bacteria. *Microbes Infect* 2002;4:679-683.
12. Welsh C. Complementary therapies in hospice care: touch with oils- a pertinent part of holistic care. *Am J hospice Palliat Care* 1997;14:42-44.
13. Lis-Balchin M. Essential oils and aromatherapy: their modern role in healing. *J R Soc Health* 1977;117:324-329.
14. 강하영, 오중환. 침엽수 침엽 정유의 방향성 이용적성. *임업연보* 1994;49:177-179.
15. 강하영, 이성숙, 최인규. 침엽수 수엽 정유의 항균성에 관한 연구. *한국임산에너지학회지* 1993;13:71-79.
16. Whittaker RH, Feeny PP. Alleochemicals: chemical interactions between species. *Science* 1971;171:757-770.
17. Muller CH. Allelopathy as a factor in ecological processes. *Vegetation* 1969;18:348-357.
18. 이현욱, 백승화, 한동민. 편백정유의 항균효과. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 2001;29:253-257.
19. Takarada K, Kimizuka R, Takahashi N *et al*. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:61-64.

20. Shapiro S, Meier A, Guggenheim B. The antimicrobial activity of essential oils and essential oil components towards oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 1994;9:202-208.
21. Schoenknecht FD, Sabath LD, Thornsberry C. *Manual of Clinical Microbiology*. 4th ed. Washington DC, 1985, American Society for Microbiology, pp. 1000-1008.
22. Dickinson DP, Kubiniec MA, Yoshimura F, Genco RJ. Molecular cloning and sequencing of the gene encoding the fimbrial subunit protein of *Bacteroides gingivalis*. *J Bacteriol* 1988;170:1658-1665.
23. Nakayama K. The superoxide dismutase-encoding gene of the obligately anaerobic bacterium *Bacteroides gingivalis*. *Gene* 1990;96:149-150.
24. Nelson KE, Fleischmann RD, DeBoy RT *et al*. Complete genome sequence of the oral pathogenic Bacterium *Porphyromonas gingivalis* strain W83. *J Bacteriol* 2003;185:5591-5601.
25. Schnaubelt K. *Advanced aromatherapy*. Vermont, 1995, Healing Arts Press, pp. 255-286.
26. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:564-582.
27. Ayres H, Furr JR, Russell AD. A rapid method of evaluating permeabilizing activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *Lett Appl Microbiol* 1993;17:149-151.
28. Xajigeorgiou C, Sakellari D, Slini T *et al*. Clinical and microbiological effects of different antimicrobials on generalized aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol* 2006;33:254-264.
29. Vaara M, Jaakkola J. Sodium hexametaphosphate sensitizes *Pseudomonas aeruginosa*, several other species of *Pseudomonas*, and *Escherichia coli* to hydrophobic drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33:1741-1747.
30. Nguefack J, Budde BB, Jakobsen M. Five essential oils from aromatic plants of Cameroon: their antibacterial activity and ability to permeabilize the cytoplasmic membrane of *Listeria innocua* examined by flow cytometry. *Lett Appl Microbiol* 2004;39: 395-400.
31. Cox SD, Mann CM, Markham JL *et al*. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J Appl Microbiol* 2000;88: 170-175.
32. Carson CF, Mee BJ, Riley TV. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assay and electron microscopy. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:1914-1920.
33. Oussalah M, Caillet S, Lacroix M. Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot* 2006;69:1046-1055.
34. 최인식, 박병래, 김홍렬 등. *Porphyromonas gingivalis*에 대한 polyphosphate의 항균효과. *대한미생물학회지* 1999;34:285-301.
35. Rao NN, Kornberg A. Inorganic polyphosphate supports resistance and survival of stationary-phase *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1996;178:1394-1400.
36. Mayrand D, Holt SC. Biology of asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides* species. *Microbiol Rev* 1988;52:134-152.
37. Fine DH, Furgang D, Lieb R *et al*. Effects of sublethal exposure to an antiseptic mouthrinse on representative plaque bacteria. *J Clin Periodontol* 1996;23:444-451.
38. Nakayama KJ. Rapid viability loss on exposure to air in a superoxide dismutase-deficient mutant of *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol* 1994;176: 1939-1943.
39. Murakami Y, Masuda T, Imai M *et al*. Analysis of major virulence factors in *Porphyromonas gingivalis* under various culture temperatures using specific antibodies. *Microbiol Immunol* 2004;48:561-569.
40. Masuda T, Murakami Y, Noguchi T, Yoshimura F. Effects of various growth conditions in a chemostat on expression of virulence factors in *Porphyromonas gingivalis*. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:3458-3467.

- ABSTRACT -

Effect of Phytoncide on *Porphyromonas gingivalis*

Sun-Q Kim, D.M.D.,M.S.D.¹, Mi-Kyoung Shin², Q-Schick Auh, D.M.D.,M.S.D.,Ph.D.¹,
Jin-Yong Lee, D.M.D.,M.S.D.,Ph.D.^{2,3}, Jung-Pyo Hong, D.M.D.,M.S.D.,Ph.D.^{1,2},
Yang-Hyun Chun, D.M.D.,M.S.D.,Ph.D.¹

*Department of Oral Medicine, School of Dentistry¹,
Institute of Oral biology, School of Dentistry²,
and Department of Oral Microbiology, School of Dentistry³, Kyung Hee University*

Trees emit phytoncide into atmosphere to protect them from predation. Phytoncide from different trees has its own unique fragrance that is referred to as forest bath. Phytoncide, which is essential oil of trees, has microbicidal, insecticidal, acaricidal, and deodorizing effect. The present study was performed to examine the effect of phytoncide on *Porphyromonas gingivalis*, which is one of the most important causative agents of periodontitis and halitosis. *P. gingivalis* 2561 was incubated with or without phytoncide extracted from Hinoki (*Chamaecyparis obtusa* Sieb. et Zucc.; Japanese cypress) and then changes were observed in its cell viability, antibiotic sensitivity, morphology, and biochemical/molecular biological pattern. The results were as follows:

1. The phytoncide appeared to have a strong antibacterial effect on *P. gingivalis*. MIC of phytoncide for the bacterium was determined to be 0.008%. The antibacterial effect was attributed to bactericidal activity against *P. gingivalis*. It almost completely suppressed the bacterial cell viability (>99.9%) at the concentration of 0.01%, which is the MBC for the bacterium.
2. The phytoncide failed to enhance the bacterial susceptibility to ampicillin, cefotaxime, penicillin, and tetracycline but did increase the susceptibility to amoxicillin.
3. Numbers of electron dense granules, ghost cell, and vesicles increased with increasing concentration of the phytoncide.
4. RT-PCR analysis revealed that expression of superoxide dismutase was increased in the bacterium incubated with the phytoncide.
5. No distinct difference in protein profile between the bacterium incubated with or without the phytoncide was observed as determined by SDS-PAGE and immunoblot.

Overall results suggest that the phytoncide is a strong antibacterial agent that has a bactericidal action against *P. gingivalis*. The phytoncide does not seem to affect much the profile of the major outer membrane proteins but interferes with antioxidant activity of the bacterium. Along with this, yet unknown mechanism may cause changes in cell morphology and eventually cell death.

Key words : Phytoncide, Antibacterial effect, Malodor, *P. gingivalis*, Oral pathogenic bacteria
