

## Effect of *Stewartia koreana* Nakai Branch Extracts on the Biofilm Formation of *Porphyromonas gingivalis*

Min Jeong Park<sup>1</sup>, Hye Soo Kim<sup>1</sup>, Han Bi Kim<sup>1</sup>, JunHo Park<sup>2</sup>, Chan Yeol Yu<sup>2</sup> and Soo Jeong Cho<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmaceutical Engineering, Gyeongsang National University, 33 Dongjin-ro, Jinju 52725, Korea

<sup>2</sup>Forest Research Department, Gyeongsangnam-do Forest Environment Research Institute, 386 Sumokwon-ro, Jinju 52615, Korea

Received November 2, 2021 / Revised December 3, 2021 / Accepted December 10, 2021

This study was investigated to evaluate the potential of *Stewartia koreana* Nakai as an oral healthcare material. The inhibitory effects of extracts on the biofilm formation and fimbriae genes expression of *Porphyromonas gingivalis* were determined by minimal inhibitory concentrations (MIC), biofilm biomass staining, SEM, and qRT-PCR analysis. The *S. koreana* Nakai branch was extracted into 70% ethanol, and bacteriostatic MIC of extracts against *P. gingivalis* were 0.6 mg/ml. In *P. gingivalis* cultures treated with 0.2-2.0 mg/ml of extract, biofilm production rate was significantly decreased in a concentration-dependent manner. The morphology of treated and untreated samples was observed by SEM, and cell aggregation and biofilm were only observed in those treated with extract. Subsequently, qRT-PCR analysis showed that the mRNA expression on fimbriae genes *fimA* and *fimB* was suppressed in a concentration-dependent manner. Based on these results, it can be suggested that *S. koreana* branch extract has the potential to be used as naturally derived oral healthcare material because of its bacteriostatic action and inhibition of *P. gingivalis* biofilm formation.

**Key words** : Bacteriostatic action, biofilm formation, fimbriae, *P. gingivalis* KCTC5352, *Stewartia koreana*

### 서 론

우리나라는 경제수준이 높아지면서 생활환경이 개선되고 의료기술이 발전하여 노인 인구(65세 이상 인구)의 비중이 매년 증가하고 있으며 이로 인해 우리 사회는 고령사회를 넘어 초고령사회로 빠르게 변하고 있다[23]. 또한 노인 인구 비중이 증가됨에 따라 건강한 고령화(healthy aging)와 노인 인구의 삶의 질 향상에 대한 관심도 높아지고 있다. 건강한 고령화는 나이가 들더라도 성별과 연령에 관계없이 자립적이고 행복한 삶을 영위하면서 활발한 사회활동을 수행할 수 있도록 신체적, 사회적, 정신적 건강을 적절히 유지할 기회를 보장하는 과정을 의미한다. 즉, 건강한 노령화는 단순한 평균수명 연장을 의미하는 것이 아니라 생활환경이나 영양상태의 질적 개선을 통해 건강한 상태로 살아가는 건강수명이 함께 연장되는 것을 의미한다[25]. 노인 인구의 삶의 질을 결정하는 여러가지 요인 중 가장 중요한 요인은 건강문제이며, 우리나라 노인 인구의 89.25%가 평균 2.7개 정도의 만성질환을 가지고 있다. 2019년 국민건강영양조사에 의하면 노인인구의 39.8%는 구강

문제로 불편함을 호소하고 있고[20], 2020년 외래 다빈도 질병 통계 결과에서도 구강질환인 치은염 및 치주질환으로 진료를 받은 환자 수가 가장 많았으며[21] 선진국에서도 성인의 과반수 이상과 아동의 90% 이상이 구강질환인 치아우식증(dental caries)과 치주질환(Periodontal disease)을 겪고 있다고 보고되고 있다[2].

대표적인 구강질환에는 치아우식증과 치주질환이 있고, 중장년층과 노년층에서는 만성 치주염 발병률이 높은 편이다. 치주염은 구강에 상주하고 있는 구강 세균에 의해 발병되는 세균성 염증질환으로 증상의 진행 정도에 따라 치은염(gingivitis)과 치주염(periodontitis)으로 구분된다[24]. 치은염은 염증이 잇몸인 연조직에만 국한되어 나타나지만, 치주염은 염증이 치아를 둘러싸고 있는 치주조직까지 진행되어 나타난다. 또한, 치주염이 지속되면 치주인대와 치조골이 파괴되고 심한 경우에는 치아를 상실하게 되기 때문에 치주염은 삶의 질과도 밀접한 연관이 있다. 치주질환을 유발하는 주요 세균에는 red complex species라고 불리는 *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* 등이 있는데[11] 이 중에서도 대표적인 치주질환 원인균은 *P. gingivalis*이다. *P. gingivalis*는 만성 치아주위조직염에서 주로 발견되는 그람 음성의 혐기성 간균으로 *bacteroides gingivalis*라고 불리며[24], 구강 내에 상주하고 있는 다른 세균들과 치아 표면에 구강 바이오필름(oral biofilm)인 치면세균막(dental biofilm)을 형성한다[16]. 치면세균막은 치태(dental plaque)로 알려져 있는 점착성 세균막으로 약 700여 종 이상의 세균들이 치아 표면의 당단백질(glycoprotein)에 부착되어 물리적으로 두꺼운 층을 형성하고 있어

#### \*Corresponding author

Tel : +82-55-772-3397, Fax : +82-55-772-3399

E-mail : sjcho@gnu.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.

서 외부 물질은 치면세균막 내부로 침투되기 어렵고 치면세균막 내에서는 세포와 세포의 상호작용을 통해 유전적 변이가 일어나기 때문에 치면세균막을 형성한 세균들은 부유 세균(planktonic bacteria)에 비해 항생제에 대한 저항성이 높다는 특징이 있다[18, 19]. 또한, 치아 표면에 침착된 치면세균막은 시간이 지나면서 치석으로 변하게 되고 치석이 방지되면 치은 출혈, 부종, 치조골 흡수로 인한 치아 흔들림, 치아우식증, 치주질환 등을 유발할 수 있기 때문에 치주질환 예방 및 치료에서 가장 중요한 것은 치면세균막을 제거하는 것이다[4, 9]. 치면세균막을 제거하는 가장 효과적인 방법은 칫솔이나 치간 칫솔, 치실 등을 이용하여 치아 표면에 침착된 치면세균막을 물리적으로 제거하는 것이지만 물리적인 방법만으로 치면세균막을 정확하고 효과적으로 제거하기는 어렵기 때문에 항균제가 첨가된 구강케어제품이 사용되고 있다. 현재 치과 구강용 항균제로는 benzydamine hydrochloride, benzethonium chloride, cetylpyridium chloride, chlorhexidine, triclosan 등이 많이 사용되고 있으나 최근 들어 이와 같은 항균제를 장기간 사용할 경우 치아나 연조직의 착색과 미각 변화의 가능성 등이 있다고 보고되면서 이를 대체할 수 있는 천연물유래 구강건강 개선소재에 대한 관심이 증가하고 있다[6, 8, 11].

노각나무는 차나무과(Theaceae)의 노각나무속(*Stewartia*)에 속하는 낙엽교목으로 한국, 중국, 일본, 미국을 중심으로 전세계에 30여 종이 분포하고 있으며, 한국에 자생하고 있는 노각나무는 *Stewartia koreana* Nakai로 지리산 지역을 중심으로 전라남북도와 경상남북도에 분포하고 있다[5, 13, 14]. 노각나무는 공해에 강하고 관상적 가치가 높아서 가로수, 정원수, 공원수 등으로 많이 이용되어 왔으며, 예로부터 모란이라 불리는 노각나무 껍질과 뿌리 껍질은 타박상으로 인한 어혈을 풀어주고 풍습성으로 인한 사지마비와 동통에 효능이 있는 것으로 기록되어 있고, 노각나무 가지를 달여 먹으면 간염이나 간경화증, 지방간과 같은 간질환에 뛰어난 치료 효과가 있다고 알려져 있다[6]. 노각나무의 생리활성에 관한 최근 연구에 의하면 노각나무의 가지와 잎에는 dihydrochalcone [1], flavonoid, phenolic compound, spinasterol glycoside, hyperin 등[17]의 화합물이 존재하고 있고 이 화합물들은 항산화 활성[5], HIV-protease 억제 및 NO (Nitric oxide) 생성 억제[5], 신생혈관 촉진[13], 항균활성[8] 등의 약리작용이 있다. 특히, Kim 등[8]의 연구에 의하면 노각나무 잎 추출물은 구강 미생물에 대해 낮은 농도에서 항균활성이 있고 구강 미생물의 병원성 인자인 바이오필름의 형성을 억제할 수 있기 때문에 노각나무 잎은 구강건강 개선소재로서 이용 가능성이 높은 것으로 보고되었다. 그러나, 노각나무 잎은 계절적 요인에 의해 소재 확보가 제한적이라는 단점이 있어서 노각나무의 식의약품소재화를 위해서는 소재 확보가 용이한 노각나무 가지 및 줄기의 이용 가능성에 관한 연구가 필요한 실정이다.

본 연구에서는 천연물유래 구강건강 소재로써 노각나무 가지의 이용 가능성을 검토하기 위해 노각나무 가지 추출물이 치주염 원인균인 *P. gingivalis*의 바이오필름 형성에 미치는 영향을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주 및 추출물

치주염원인균인 *Porphyromonas gingivalis* KCTC5352는 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)에서 분양받아 사용하였으며 분양받은 균주는 tryptic soy agar hemin menadione (TSAHM) 배지에 계대한 다음 37°C에서 혐기배양하였다.

건조된 노각나무 가지는 (주)농업회사법인 모리(경상남도 거창군 소재)에서 구매하여 사용하였다. 건조된 노각나무 가지는 70% 에탄올에 침지한 다음 80°C에서 2시간 동안 3회 반복 추출하였고 추출물은 Whatman filter paper (No. 2)로 여과한 후 회전감압농축기(Eyela, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)로 농축하였다. 노각나무 가지 조추출물은 dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma Aldrich, St. Louis, USA)에 용해한 다음 4°C에 보관하면서 사용하였다.

### 최소성장억제 농도(MIC) 및 최소살균농도(MBC)

노각나무 가지 추출물의 최소성장억제 농도(minimal inhibitory concentration, MIC)는 액체배지 희석법을 이용하여 조사하였다[15]. *P. gingivalis*는 37°C에서 48시간 동안 혐기배양한 다음  $4.0 \times 10^{4.5}$  cfu/ml이 되도록 TSAHM 액체배지에 희석하였다. 최소성장억제 농도는  $4.0 \times 10^{4.5}$  cfu/ml 밀도로 희석된 *P. gingivalis* 배양액에 0.2-2.0 mg/ml 농도의 추출물을 처리한 다음 37°C에서 48시간 동안 혐기배양한 후 600 nm에서 흡광도를 측정하여 *P. gingivalis*가 증식되지 않은 최소 농도로 확인하였다. 추출물의 최소살균농도(minimal bactericidal concentration, MBC)는 추출물에 대한 *P. gingivalis*의 최소성장억제 농도를 확인한 후 최소성장억제 농도 및 그 이상의 농도에 해당하는 배양액을 추출물 무첨가 TSAHM 고체배지에 도말하여 37°C에서 혐기배양한 다음 colony가 나타나지 않은 추출물의 최소 농도로 정하였다.

### *P. gingivalis*의 colony morphology 변화

노각나무 가지 추출물이 *P. gingivalis*의 colony morphology에 미치는 영향은 Ueda 등[26]의 방법을 이용하여 조사하였다. 0.02% congo red와 0.04% coomassie brilliant blue가 첨가된 TSAHM 고체배지에 추출물을 1 mg/ml의 농도로 도말한 후 *P. gingivalis*를 접종하여 48시간 동안 혐기배양하면서 추출물 첨가 배지와 무첨가 배지의 colony morphology를 관찰하였다.

***P. gingivalis*의 바이오필름 바이오매스(biofilm biomass) 형성 억제**

노각나무 가지 추출물 처리에 의한 *P. gingivalis*의 바이오필름 형성 억제능은 Zhou 등[30]의 방법을 이용하여 조사하였다. TSHM 고체배지에서 48시간 동안 혐기배양한 *P. gingivalis*는 TSAHM 액체배지에 현탁한( $4.0 \times 10^{4.5}$  cfu/ml) 다음 96-well plate에 분주하였다. 추출물은 *P. gingivalis*가 분주된 96-well plate에 0.2-2.0 mg/ml 농도가 되도록 처리하였고, 추출물이 처리된 96-well plate는 바이오필름 바이오매스가 형성되도록 37°C에서 혐기배양하였다. 96-well plate에 형성된 바이오필름 바이오매스는 멸균 증류수로 세척한 다음 건조한 후 0.5% crystal violet으로 20분 동안 염색하였고, crystal violet에 염색된 바이오필름 바이오매스는 70% 에탄올에 용해하였다. 바이오필름 바이오매스 형성 억제능은 spectrophotometer (Softmax M5, Molecular Devices, USA)를 이용하여 측정한 70% 에탄올에 용해된 crystal violet의 흡광도 값으로 확인하였다.

***P. gingivalis*의 morphology 변화**

노각나무 가지 추출물에 의한 *P. gingivalis*의 morphology 변화는 주사전자현미경(Scanning electron microscope, SEM; JEOL LTD., JSM-6701F, Japan)을 이용하여 확인하였다. Coverslip (12 mm, SPL Ltd, Korea)이 들어있는 48 well-plate에  $4.0 \times 10^{4.5}$  cfu/ml 밀도의 *P. gingivalis*를 분주한 다음 0.6 mg/ml의 추출물을 처리하였고, 추출물이 처리된 48 well-plate는 37°C에서 48시간 동안 혐기배양하면서 바이오필름 형성을 유도하였다. 배양이 완료된 coverslip은 PBS (Phosphate buffer saline, Bioneer, Daejeon, Korea)로 세척한 후 0.5% glutaraldehyde (Sigma Aldrich Co., USA)를 처리하여 coverslip에서 배양된 *P. gingivalis*와 바이오필름을 고정하였고, 30, 50, 60, 70, 80 및 99%의 에탄올을 순차적으로 처리하여 *P. gingivalis*와 바이오필름의 수분을 제거한 다음 실온에서 건조하였다. 건조된 시료는 *P. gingivalis*의 바이오필름 형성 여부를 확인하기 위해 platinum으로 코팅한 후 주사전자현미경으로 관찰하였다.

**섬모유전자 *fimA*와 *fimB*에 대한 mRNA 발현**

노각나무 가지 추출물이 *P. gingivalis*의 섬모 형성에 미치는 영향은 섬모관련 유전자인 *fimA*와 *fimB*를 primer로 사용한 qRT-PCR로 확인하였다. Total RNA는 RNeasy Kit (Qiagen, Hillden, Germany)를 이용하여 0.2-2.0 mg/ml의 추출물이 처

리된 *P. gingivalis* 배양액으로부터 분리하였다. cDNA는 iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad, USA)를 이용하여 합성하였다. qRT-PCR은 Table 1의 primer를 사용하여 CFX96 touch™ qRT-PCR detection system (Bio-Rad, USA)으로 확인하였다. PCR 반응은 ssoadvanced™ universal SYBR® green supermix (Bio-Rad, USA)를 사용하여 95°C에서 5분 동안 denaturation 시킨 후 95°C에서 1분, 52°C에서 1분, 72°C에서 30 초씩 30 cycle을 반복하여 수행하였다[10, 26]. 유전자 증폭의 정확성은 PCR 반응이 종결된 후 melt-curve analysis를 수행하여 확인하였으며, 유전자의 상대적 발현량은 endogenous control로 사용한 *P. gingivalis*의 housekeeping gene (16S rRNA)에 대한 *fimA*와 *fimB* 유전자의 상대적 mRNA 발현 값으로 나타내었다.

**통계처리**

모든 실험은 3회 이상 반복실험을 수행하였으며, 실험결과 의 평균값과 표준오차는 SAS (Statistical analysis system, USA) program을 사용하여 구하였고, 실험결과 의 통계적 유의성은  $p < 0.05$  수준에서 Duncan's 다중검정법으로 검증하였다.

**결과 및 고찰**

***P. gingivalis*에 대한 노각나무 가지 추출물의 최소성장억제 농도(MIC) 및 최소살균농도(MBC)**

노각나무 가지 추출물은 구강미생물인 *P. gingivalis*에 대해 항균활성을 나타내었으며, *P. gingivalis*에 대한 노각나무 가지 추출물의 최소성장억제농도(MIC)는 0.6 mg/ml였고, 0.6-2 mg/ml의 추출물 처리농도에서 *P. gingivalis*에 대한 노각나무 가지 추출물의 항균활성은 농도의존적으로 증가하였다. *P. gingivalis*에 대한 노각나무 가지 추출물의 최소살균농도(MBC)는 최소성장억제농도를 확인한 후 최소성장억제농도인 0.6 mg/ml 이상의 농도에 해당하는 *P. gingivalis* 배양액을 추출물 무점가 고체배지에 배양하여 확인하였으며, 최소성장억제농도인 0.6 mg/ml 이상의 농도에서 colony가 관찰되었기 때문에 노각나무 추출물은 *P. gingivalis*에 대해 정균작용을 하는 것으로 판단된다(Table 2).

노각나무 잎 추출물의 항균활성과 항바이오필름 활성화에 관한 이전연구에서도 노각나무 잎 추출물은 정균작용을 나타내었으며 0.4 mg/ml의 농도에서 *P. gingivalis*의 생육이 억제되었다[8]. *P. gingivalis*에 대한 황기 추출물의 항균효과에 관한

Table 1. Oligonucleotides used for qRT-PCR in this study

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
16S rRNA	5'-ATC ACG AGG AAC TCC GAT TG -3'	5'-CGT TTA CTG CGT GGA CTA CC -3'
<i>fimA</i>	5'-GCG CAG CCT ACG ATA ACA TT-3'	5'- AAT GTT ATC GTA GGC TGC GC -3'
<i>fimB</i>	5'-CGG ATA TCA GAT GGG TTG TTG-3'	5'- GTT TCG TTC CTA CCA GCA GC-3'

Table 2. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of branch extracts of *S. koreana* against *P. gingivalis*

	Concentration (mg/ml)						
	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	2.0
Minimum inhibitory concentration	G <sup>a</sup>	G	G	S <sup>c</sup>	NG <sup>b</sup>	NG	NG
Minimum bactericidal concentration	G	G	G	G	G	G	G

G<sup>a</sup>, growth on test medium; NG<sup>b</sup>, no growth on test medium; S<sup>c</sup>, slow growth on test medium.

Choi 등[3]의 연구에 의하면 황기추출물은 5 mg/ml 이상의 농도에서 *P. gingivalis*의 생육을 억제하였고, 10 mg/ml의 농도에서는 살균작용을 나타내었다. 따라서 노각나무 가지 추출물은 낮은 농도에서 *P. gingivalis*에 대해 정균작용을 나타내기 때문에 천연물유래 구강건강 소재로써 사용할 경우 경제성이 있을 것으로 판단된다.

**노각나무 가지 추출물이 *P. gingivalis*의 colony morphology에 미치는 영향**

노각나무 가지 추출물이 *P. gingivalis*의 colony morphology에 미치는 영향은 Ueda 등[26]의 방법에 따라 congo red와 coomassie brilliant blue가 첨가된 TSAHM 고체배지에서 확인하였다. 추출물 무첨가 배지에서 배양된 *P. gingivalis*의 colony에서는 주름이 관찰되었지만, 추출물 첨가 배지에서 성장한 colony에서는 주름이 관찰되지 않았다(Fig. 1). Colony의 주름은 exopolysaccharide (EPS)의 overexpression과 관련된 것으로 알려져 있으며, exopolysaccharide는 주로 다당류와 단백질, 지질, extracellular DNA (eDNA) 등으로 구성되어 있는 생체 고분자 혼합물이다. 미생물은 자외선, 온도변화, pH, 높은 염도, 고압, 영양분 고갈과 같은 외부환경 변화로부터 자신을 보호하기 위해 바이오필름을 형성하고 유지하는 것으로 알려져 있으며, EPS는 균집을 이루고 있는 그람 음성 세균의 세포 사이에서 공간을 만들고 바이오필름 매트릭스 구조를 형성하는데 관여한다[27, 28]. 노각나무 가지 추출물 첨가 배지에서 배양된 *P. gingivalis*의 colony에서 주름이 관찰되지 않았

다는 것은 EPS의 생성이 억제되었다는 것이고, EPS의 생성 억제는 바이오필름 형성이 억제됨을 의미하기 때문에 노각나무 가지 추출물은 *P. gingivalis*의 바이오필름 형성을 억제할 수 있을 것으로 판단된다.

**노각나무 가지 추출물이 *P. gingivalis*의 바이오필름 바이오매스 형성에 미치는 영향**

노각나무 가지 추출물이 *P. gingivalis*의 바이오필름 바이오매스 형성에 미치는 영향은 Zhou 등[30]의 방법에 따라 양적 분석방법으로 조사하였다. 추출물 무처리구의 바이오필름 형성률을 100%로 하였을 때, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 및 2.0 mg/ml 농도의 추출물이 처리된 배양액에서 *P. gingivalis*의 바이오필름 형성률은 각각 78.9±1.99%, 64.5±1.83%, 46.3±1.8%, 34.1±1.24%, 32.8±1.8%, 29.3±1.5%로서 추출물의 농도가 높아질수록 바이오필름 바이오매스 형성이 농도의존적으로 억제되는 것을 확인할 수 있었으며, *P. gingivalis*의 생육도 추출물의 농도(0.2-0.6 mg/ml)가 높아질수록 농도의존적으로 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 이 결과는 노각나무 잎 추출물의 항균활성과 항바이오필름 활성화에 관한 이전의 연구[8]와도 일치하는 결과이며, 강황에서 분리된 curcumin의 *P. gingivalis* 바이오필름 생성을 및 병원성 인자(virulence factor) 발현에 관한 Kumbar 등[12]의 보고와도 일치하는 결과이다. 따라서 노각나무 가지 추출물은 *P. gingivalis*의 생육을 억제할 수 있을 뿐만 아니라 바이오필름 바이오매스 형성도 억제할 수 있기 때문에 천연물유래 구강건강 소재로써 개발 가능성이 있다고 판단된다.

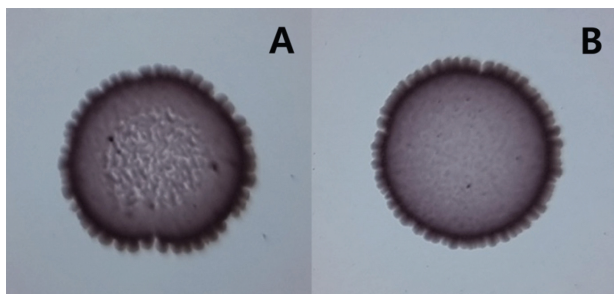


Fig. 1. Comparison of colony morphology on tryptic soy hemin menadione agar plates with congo red and coomassie brilliant blue. Colony of *P. gingivalis* KCTC5352 grown without branch extracts of *S. koreana* (A) and with 1 mg/ml branch extracts of *S. koreana* (B).

**노각나무 가지 추출물이 *P. gingivalis*의 morphology에 미치는 영향**

노각나무 가지 추출물이 *P. gingivalis*의 morphology에 미치는 영향을 확인하기 위해 추출물 처리구(1 mg/ml)와 무처리구에서 배양한 *P. gingivalis*를 주사전자현미경으로 관찰하였다(Fig. 3). 추출물 무처리구의 세포들은 응집(aggregation)을 이루면서 모여 있고 세포 주변에서 바이오필름이 관찰되었지만, 추출물 처리구에서는 세포들이 흩어져 있고 세포 주변에서도 바이오필름이 관찰되지 않았다. 이와 같은 결과는 노각나무 잎 추출물의 항균활성과 항바이오필름 활성화에 관한 이전의 연구 [8]와도 일치하는 결과이며, 정향(*Syzygium ar-*

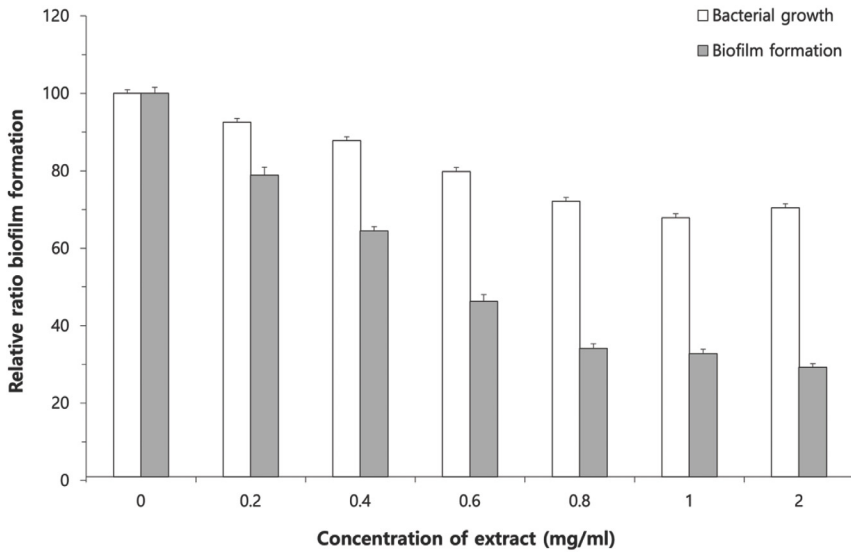


Fig. 2. Bacterial growth and biofilm formation of *P. gingivalis* KCTC5352 in tryptic soy hemin menadione broth treated with branch extracts of *S. koreana* (0.2-2.0 mg/ml). Growth and biofilm formation were measured under anaerobic condition. All assays were performed in triplicate, and mean values and standard deviations are shown.

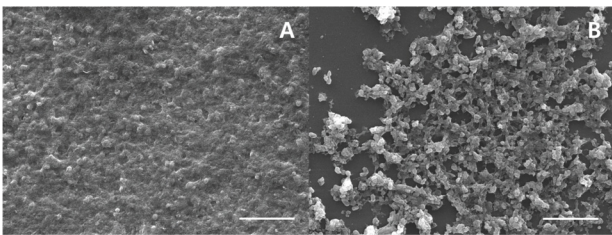


Fig. 3. Scanning electron microscopy (SEM) micrographs, at 10,000X magnification, of *P. gingivalis* KCTC5352 in the absence (A) and presence (B) of branch extracts of *S. koreana* (0.6 mg/ml). Scale bar, 5 μm.

*omaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry) 오일(oil)에서 분리된 eugenol의 *P. gingivalis*에 대한 항균활성과 바이오필름 억제에 관한 Zhang 등[29]의 연구와도 일치하는 결과이다. Zhang 등 [29]의 연구에 의하면 eugenol 무처리구의 *P. gingivalis*는 군집을 이루면서 바이오필름을 형성하지만 eugenol 처리구의 *P. gingivalis*는 세포가 흩어져 있고 바이오필름의 부피와 두께가 감소하였다. 이상의 결과를 종합하면, 노각나무 가지 추출물은 바이오필름 형성 초기 단계에 관여하여 세포의 응집(auto-aggregation)을 억제함으로써 바이오필름 형성을 억제하는 것으로 판단된다.

**노각나무 가지 추출물 처리가 *P. gingivalis*의 섬모(fimbriae) 유전자에 대한 mRNA 발현에 미치는 영향**

노각나무 가지 추출물 처리가 *P. gingivalis*의 섬모관련 유전자에 대한 mRNA 발현에 미치는 영향은 섬모 유전자를 primer로 이용한 qRT-PCR로 확인하였다. 추출물(0.2-2.0 mg/ml) 처리가 섬모 유전자 *fimA*와 *fimB*에 대한 mRNA 발현에 미치는 영향을 확인한 결과는 Fig. 4와 같으며, *P. gingivalis*의 *fimA*와 *fimB* 유전자에 대한 mRNA 발현은 추출물의 농도가 높아질수

록 농도의존적으로 억제되는 경향을 나타내었다.

섬모는 세균의 세포 표면에 돌출된 단백질성 부속기(proteinaceous appendages) 중 하나로서 세균의 응집(aggregation), 세균과 숙주세포의 접착(adhesion), 숙주세포로의 침입(invasion), 바이오필름 형성 등에 관여한다. *P. gingivalis*의 섬모는 바이오필름 형성과정 중 초기 부착단계에서 *P. gingivalis*가 치아 표면에 부착하는데 중요한 역할을 하며, *P. gingivalis*의 긴 섬모는 긴 섬모와 짧은 섬모로 이루어져 있고 *P. gingivalis*의 긴 섬모는 FimA subunit으로 구성되어 있으며 짧은 섬모는 Mfa1 subunit으로 구성되어 있다. *P. gingivalis*의 긴 섬모는 *P. gingivalis* 이 치아의 치은 섬모세포에 부착하는데 필수적이며 *P. gingivalis*와 *S. gordonii*의 응집에도 관여한다[3, 7]. *P. gingivalis*의 긴 섬모를 암호화하는 *fim* 유전자는 *fimABCDE*로 이루어진 *fim* 클러스터(cluster)이며, Nagano 등[22]의 보고에 의하면 *fim* 클러스터를 이루고 있는 유전자 중 *fimA* 유전자가 결손되면 *P. gingivalis*와 치은 섬모세포 및 상피 세포의 부착이 감소되어 *P. gingivalis*는 치은연하(subgingival)에서 바이오필름을 형성할 수 없다. 따라서 노각나무 가지 추출물 처리구에서 *fimA*와 *fimB* 유전자에 대한 mRNA 발현이 감소되었다는 것은 *P. gingivalis*와 치은 섬모세포 및 상피 세포의 부착이 감소됨을 나타내기 때문에 노각나무 가지 추출물은 바이오필름 형성 초기 단계에서 바이오필름 형성을 저해하는 것으로 판단된다.

이상의 결과를 종합하면 노각나무 가지 추출물은 *P. gingivalis*에 대해 정균 작용을 나타내며, 바이오필름 형성 초기 단계에서 바이오필름 형성을 억제할 수 있기 때문에 노각나무 가지 추출물의 바이오필름 형성 억제에 관한 추가적인 연구들이 진행된다면 노각나무 가지 추출물은 *P. gingivalis*의 병원성 인자(virulence factor)를 조절하여 치주염을 예방하거나 치료할 수 있는 구강건강 소재로서 개발 가능성이 높다고 판단된다.

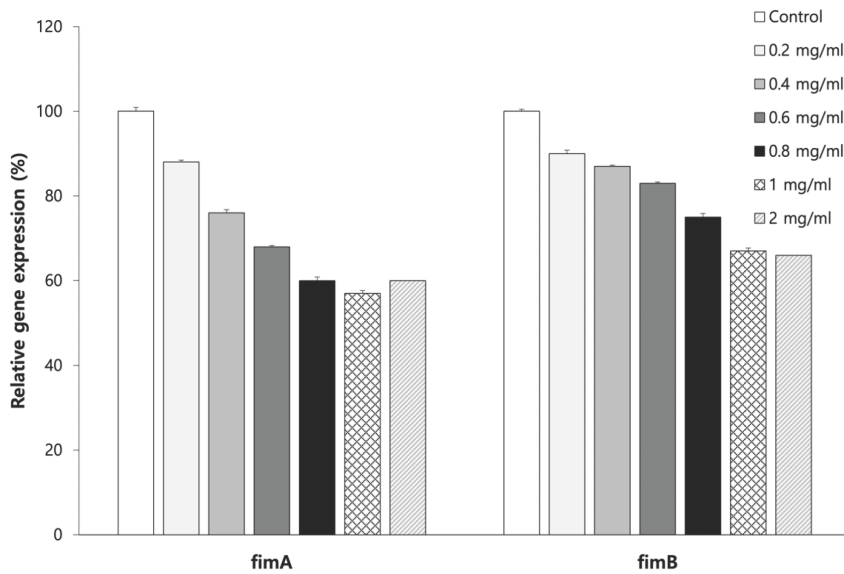


Fig. 4. Effects of branch extracts of *S. koreana* on mRNA expression of *fimA* and *fimB* genes in *P. gingivalis* KCTC 5352 by qRT-PCR analysis. The mRNA expression was normalized to 16S rRNA gene used as a reference gene. Results are shown as the  $\pm$  SD of five replicates. \* $p < 0.05$ , as compared with the control.

## 감사의 글

본 연구는 2021년 노각나무 유래 식의약품 소재개발 및 산업화 연구 용역 지원에 의하여 수행된 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

## The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

## References

- Ahn, D. R., Lee, S. I., Yang, J. H., Kim, H. Y., Lee, J. H., Park, J. S. and Kim, D. K. 2011. Dihydrochalcone components from the twigs of *Stewartia koreana*. *Kor. J. Pharmacogn.* **42**, 229-232.
- 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.
- Choi, Y. R., Choi, M. S., Kwun, H. S. and Nam, E. H. 2019. The inhibitory effect of *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) on *Astragali radis* extract. *J. Kor. Soc. Oral Health Sci.* **7**, 46-50.
- 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.
- Im, S. B., Kim, J. K., Choi, Y. I., Choi, S. H. and Kwon, H. J. 2011. Construction of a full-length cDNA library from Korean *Stewartia* (*Stewartia koreana* Nakai) and characterization of EST dataset. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* **29**, 116-122.
- Jang, J. H. 2011. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of phenolic compounds from stems of *Stewartia koreana* Nakai, M. S. dissertation, Chung-ang University, Seoul, Korea.
- Kang, C. K. 2014. Investigation of genomic variation of *Porphyromonas gingivalis* gingipain isolated from chronic periodontitis, M. S. dissertation, Seoul National University, Seoul, Korea.
- Kim, H. S., Park, M. J., Kim, S. J., Kim, B. K., Park, J. H., Kim, D. H. and Cho, S. J. 2021. Antibacterial and antibiofilm activities of leaf extracts of *Stewartia koreana* against *Porphyromonas gingivalis*. *J. Life Sci.* **31**, 330-337.
- 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.
- Kim, S. I., Jeong, M. J., Ahn, Y. S., Kim, A. R., Kim, M. N. and Lim, D. S. 2015. Antimicrobial effect of commercially available mouth rinsing solutions and natural herbal extracts on *Streptococcus mutans*. *J. Dent. Hyg. Sci.* **15**, 308-317.
- 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.
- Kumbar, V. M., Peram, M. R., Kugaji, M. S., Shah, T., Patil, S. P., Muddapur, U. M. and Bhat, K. G. 2020. Effect of curcumin on growth, biofilm formation and virulence factor gene expression of *Porphyromonas gingivalis*. *Odontology* doi: 10.1007/s10266-020-00514-y.
- Kwon, H. J., Kwon, J. H., Jeong, H. R., Lee, J. H. and Song, H. K. 2011. Vegetation structures of *Stewartia koreana* forest in Mt. Jirisan. *J. Eco. Env.* **25**, 725-735.
- Kwon, H. J. and Song, H. K. 2008. Vegetation structures and ecological properties of *Stewartia koreana* community. *J. Kor. Soc. For. Sci.* **97**, 296-304.
- Lee, S. H. and Baek, D. H. 2013. Antibacterial activity of hydrogen-rich water against oral bacteria. *Int. J. Oral Biol.* **38**, 81-85.
- Lee, S. H. and Kim, M. J. 2018. Antimicrobial effect of natural plant extracts against periodontopathic bacteria. *J. of Korea Contents Association* **19**, 243-255

17. Lee, S. S., Bang, M. H., Park, S. H., Chung, D. K. and Yang, S. A. 2018. Inhibitory effects of flavonoids isolated from the leaves of *Stewartia koreana* on nitric-oxide production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *J. Life Sci.* **28**, 509-516.
18. Marsh, P. D. 2004. Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res.* **38**, 204-211.
19. Marsh, P. D. 2006. Dental plaque as a biofilm and a microbial community-implications for health and disease. *BMC Oral Health* **6**, S14.
20. Ministry of health & welfare, Korea centers for disease control & prevention. 2019. The eighth Korea national health and nutrition examination survey. Cheongju, Korea.
21. Moon, S. H., Son, J. L., Shin, S. J., Oh, S. H., Kim, S. H. and Bae, J. M. 2020. Efficacy of the extract of *Brachypodium sylvaticum* as a preventive and an improving agent of periodontal disease. *Kor. J. Dent. Mater.* **47**, 235-244.
22. 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.
23. Oh, J. Y. 2018. The effect of systemic health and salivary massage on saliva flow, M. S. dissertation, Dong-Eui University, Busan, Korea.
24. Shin, A. R. 2021. A study on the aptamer specific detection on *P. gingivalis*. *J. of Korea Contents Association* **21**, 825-832.
25. SNIPH (Swedish National Institute of Public Health). 2006. Healthy ageing: A challenge for Europe. pp. 1-227, Sweden.
26. Ueda, A. and Wood, T. K. 2009. Connecting quorum sensing, c-di-GMP, Pel polysaccharide, and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* through tyrosine phosphatase TpbA (PA3885). *PLoS Pathog.* **5**, 1-15.
27. Vu, B., Chen, M., Crawford, R. J. and Ivanova, E. P. 2009. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecule* **14**, 2535-2554.
28. Yin, W., Wang, Y., Liu, L. and He, J. 2019. Biofilms: The microbial "protective clothing" in extreme environments. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, doi:10.3390/ijms20143423.
29. 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.
30. 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 : 노각나무 가지 추출물이 *Porphyromonas gingivalis*의 바이오필름 형성에 미치는 영향

박민정<sup>1</sup> · 김혜수<sup>1</sup> · 김한비<sup>1</sup> · 박준호<sup>2</sup> · 유찬열<sup>2</sup> · 조수정<sup>1\*</sup>  
 (<sup>1</sup>경상국립대학교 제약공학과, <sup>2</sup>경남산림환경연구원)

본 연구에서는 천연물유래 구강건강 개선소재로써 노각나무 가지의 이용 가능성을 검토하기 위해 노각나무 가지 추출물이 치주염 원인균인 *P. gingivalis* KCTC5352의 병원성인자(virulence factor)에 미치는 영향을 조사하였다. 추출물은 *P. gingivalis*에 대해 정균작용을 나타내었고 *P. gingivalis*에 대한 추출물의 MIC는 0.6 mg/ml였다. 추출물 처리구(0.2-2.0 mg/ml)에서 *P. gingivalis*의 병원성 인자인 바이오필름은 추출물의 농도가 증가할수록 농도의존적으로 억제되는 경향을 나타내었고, 주사전자현미경으로 추출물 처리구의 *P. gingivalis*를 관찰한 결과에 의하면 추출물 무처리구에서는 세포들의 응집(autoaggregation)과 바이오필름이 관찰되었지만 추출물 처리구에서는 세포들의 응집과 바이오필름이 관찰되지 않았다. qRT-PCR을 이용하여 *P. gingivalis*의 바이오필름 형성에 필수적인 섬모(fimbriae) 유전자에 대한 mRNA 발현을 조사한 결과에서도 섬모관련 유전자인 *fimA*와 *fimB*에 대한 mRNA 발현은 추출물의 농도가 높아질수록 농도의존적으로 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 이상의 결과를 종합하면 노각나무 가지 추출물은 치주염 원인균인 *P. gingivalis*에 대해 정균작용을 나타낼 뿐만 아니라 *P. gingivalis*의 병원성 인자인 바이오필름의 형성을 효과적으로 억제할 수 있기 때문에 천연물유래 구강건강 개선소재로써 이용 가능성이 높을 것으로 판단된다.