

황기 추출물에 의한 *Porphyromonas gingivalis*의 억제효과

최유리¹ · 최미숙² · 권현숙³ · 남설희^{4*}

¹한림성심대학교 치위생과 조교수, ²안동과학대학 치위생과 부교수

³마산대학교 치위생과 교수, ⁴강원대학교 치위생학과 조교수

The inhibitory effect of porphyromonas gingivalis (*P. gingivalis*) on Astragali radis extract

Yu-Ri Choi¹, Mi-Sook Choi², Hyeon-Sook Kwun³, Seoul-Hee Nam^{4*}

¹Assistant professor, Dept. of Dental Hygiene, Hallym polytechnic University, ²Associate professor, Dept. of Dental Hygiene, Andong Science College

³Professor, Dept. of Dental Hygiene, Masan University, ⁴Assistant professor, Dept. of Dental Hygiene, Kangwon National University

ABSTRACT The purpose of this study was to evaluate the inhibitory effect of Astragali radis extract in *porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*). This study used Astragali radis leaves cultivated in Kangwon-do after adding 70% ethanol fivefold. The Astragali radis were then concentrated (Gotary vacuum evaporator; N-Nseries, EYELA Co., Japan) and placed under an aspirator (A-3S, EYELA Co., Japan) and a freeze dryer (Ilshin Lab Co., South Korea). The freeze-dried sample was dissolved into dimethylsulfoxide (DMSO). The inhibitory effect of Astragali radis extract was investigated using measurement of the clear zone and the growth inhibitory effect. The measurement of the clear paper disc circle using a growth inhibitory section showed *P. gingivalis* inhibition with 11 mm at 20 mg/mL. The survival rate of *P. gingivalis* calculated from the colony-forming units (CFUs) showed growth inhibition as the concentration increased. However, the inhibitory effect of 5 mg/mL, 10 mg/mL and 20 mg/mL did not show a significant antimicrobial effect, although an inhibition of bacterial growth was observed at 20 mg/mL. Based on the results of this study, Astragali radis extract inhibited the growth of *P. gingivalis* from a 5 mg/mL concentration.

Keywords Periodontal disease, *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), Astragali radis extract, Inhibitory effect

Received on Mar 14, 2019. Revised on Mar 20, 2019. Accepted on Mar 27, 2019.

* Corresponding Author (E-mail: miss4228@naver.com)

이 논문은 2017년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No. 2017R1C1B5074410)

I. 서론

구강 내에서는 일반적으로 500종 이상의 세균이 발견되며, 구강 내 상주세균 수의 변화에 따라 구강질환으로 변하게 된다. 특히 구강 내 질환은 세균에 의해 유발되며 성인의 치아 상실의 주된 원인이 된다[1].

구강 내 균주의 변화는 구강 내 질환뿐만 아니라 전신질환에도 영향을 준다고 알려져 있다. 구강 내에 바이오필름이 축적되면 만성적인 구강 내 염증반응이 유발되어 조직 파괴를 동반하는 치주염에 일으키게 된다[2]. 치주질환 관련된 세균의 독소와 대사산물이 치주낭을 통한 혈류 유입으로 당뇨병, 심혈관계질환, 류마티스 관절염, 폐렴 등의 전신질환과 밀접한 영향을 주고 있다[3].

구강 내 다양한 상주균 중 치주질환의 대표적인 균으로 알려진 균은 *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 균이 있다 [4]. 이중 *P. gingivalis*는 그람 음성 막대균이며, 혐기성의 특성을 가지며, 구취, 치주질환을 유발하는 것으로 알려져 있다. 만성치주염과 급성치주염, 난치성 치주염과 재발성 치주염에서도 많이 검출되는 치주염 원인균으로 독성인자를 가지고 이어, 특히 콜라겐을 분해로 인해 구취를 유발하기도 하며, 내독소로 치조골 파괴를 일으켜 치아의 상실을 유발하기도 한다. 일반적으로 이러한 구강질환을 유발하는 원인균을 억제하기 위해 항생제를 사용하고 있다. 항생제는 인체에 균교대현상과 내성균 형성 등 부작용을 일으킬 수 있어 최근에는 부작용이 적다고 알려진 천연추출물의 활용이 적극적으로 이루어지고 있다[5].

전통적으로 사용되는 한약제등과 많은 생약이 우리나라에서 사용되고 있으며 이러한 물질은 대한약전과 생약 규격집 등에서 규정하고 있으나 아직까지 많은 추출물들이 약리 작용 등에 대해 밝혀져 있지 않다[6].

그 중 황기(*Astragalus membranaceus* Bunge ;AMB)는 다년생 초본식물이며, *Astragalus* 속 식물의 주피를 벗긴 뿌리를 건조한 것으로 예부터 민간에서는 황기는 기운을 보충해주며, 혈압강하, 혈당강하, 면역증강, 항바이러스 항종양등의 특성을 가지고 있다고 알려져 있고[7] 주요성분인 triterpenoids, isoflavonoids, polysaccharides 등의 성분으로 인해 효과를 나타낸다[8,9].

선행연구에 의하면 *P. gingivalis*의 항균력을 확인하기 위하여 천연추출물인 죽엽(솜대)의 항산화성분 및 구강세균에 대한 항균효과를 보았으며[5], 자몽종자추출물, 법제유황수를 함유한 치약의 시제품의 *Streptococcus mutans*, *Prevotella intermedia*, *P. gingivalis*, *Candida albicans*의 항균력을 확인하였다[10]. 또한 연잎 추출물의 구강 내 미생물에 대한 항균력을 확인하기 위하여 *P. gingivalis*와 *Prevotella intermedia*의 항균력을 확인한 연구도 수행되었으나[11] 황기 추출물을 적용한 *P. gingivalis*에 대한 항균력에 대한 연구는 전무한 실정이다.

따라서 본 연구는 항바이러스, 항종양 등의 성질을 가지고 있는 황기추출물의 치주염을 유발하는 대표하는 균인 *P. gingivalis*에 적용한 항균력을 평가하여 치주염 치료의 가능성을 확인하고자 수행하였다.

II. 연구방법

1. 황기 추출물 획득

본 연구를 위해 강원도 정선에서 재배된 3년근 황기의 뿌리는 5배 정도에 해당되는 70% 에탄올 용매를 더하여 65°C에서 12시간 침지하여 상층액만 획득하였다. 여과지로 여과한 뒤 회전식 진공증발 농축기(N-1300E.V.S EYELA Co., Japan)에서 농축하였다. 농축된 황기 추출물은 동결건조기(FD5508, Ilshin Lab, Yangju-kun, Kyunggi-do, Korea)로 건조하여 dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)에 0.2 g/mL의 농도로 용해 시켜 희석하여 사용하였다.

2. *P. gingivalis*균주의 배양

본 연구는 한국생명공학연구원 생물자원센터 (Korean Collection

for Type Cultures, KCTC, Daejeon, Korea)에서 분양받은 *P. gingivalis* (KCTC 5352)를 사용하였다. 실험균주를 yeast extract (5 mg/mL), L-cystein hydrochloride (5 µg/mL), hemin (1 µg/mL) 및 vitamin K1 (0.2 µg/mL) 및 이 첨가된 tryptic soy broth (BD Difco, USA) 액체배지와 면역적혈구가 5% 첨가된 tryptic soy 혈액한천배지에서 24시간 37 ° C에서 혐기적으로 배양하였다.

3. 황기 추출물의 디스크 확산법

본 연구를 위해 tryptic soy 혈액한천배지에 5×10^5 *P. gingivalis*를 분주하였다. 24시간 뒤, 멸균된 8 mm 직경의 5개의 디스크에 20 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL, 2.5 mg/mL, 1.25 mg/mL의 황기 추출물을 적용하였다. 37 ° C에서 혐기적으로 24시간 배양한 후 디스크 주변에 형성된 억제환의 직경을 측정하였다.

4. *P. gingivalis*에 황기 추출물의 억제효과

집락형성단위 (colony-forming units ;CFUs)을 평가하기 위해 20 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL, 2.5 mg/mL, 1.25 mg/mL의 황기 추출물을 1 mL tryptic soy broth에 희석하여 5×10^5 *P. gingivalis* 100 µL를 분주하였다. 24시간 혐기배양 후 tryptic soy 혈액한천배지에 도말하여 혐기배양 하여 CFUs를 확인하였다.

5. 자료분석

본 연구의 항균효과에 대한 통계학적 분석은 SPSS (ver 19.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 프로그램을 사용하여 95% 유의수준에서 One-way ANOVA test로 분석하였으며 Tukey HSD test로 사후검정 하였다.

III. 연구결과

1. 억제환의 직경 측정

P. gingivalis 24시간 혐기 배양한 후 디스크 확산법으로 나타난 성장억제구간을 확인되었다. 20 mg/mL 에서 10 mm 억제구간으로 증식이 억제됨을 확인하였다<Fig. 1>.

2. CFUs 측정을 통한 증식억제효과

P. gingivalis 균에 대하여 20 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL,

2.5 mg/mL, 1.25 mg/mL로 추출물의 농도가 증가함에 따라 항균 효과를 보이는 것을 확인 하였다<Fig. 2>. 또한, CFUs를 계산한 survival rate은 농도가 증가 할수록 균의 성장억제효과를 보였다. 통계적으로 통제군에 비하여 5 mg/mL부터 유의한 차이($p < 0.05$)를 보였으나<Table 1>, 5 mg/mL과 비교 시 10 mg/mL, 20 mg/mL

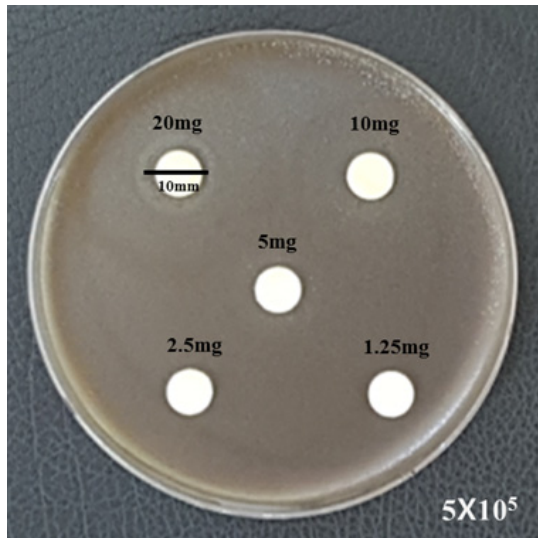
에서 사멸효과를 보였으나 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다($p > 0.05$).

IV. 결론 및 고찰

<Table 1> Comparison of the amount of the *P. gingivalis* at different concentrations of AMB extraction

Concentration	Number of CFUs	p
Control (<i>P. gingivalis</i>)	2.80×1010a	
20 mg/mL	3.80×106c	0.001*
10 mg/mL	3.54×107c	
5 mg/mL	2.65×108c	
2.5 mg/mL	1.95×109b,c	
1.25 mg/mL	2.78×1010a,b	

* The significant difference among the five concentrations one-way ANOVA. Different letters (a, b, c) by presented statistically significant result by Tukey HSD test (*: $p < 0.05$).



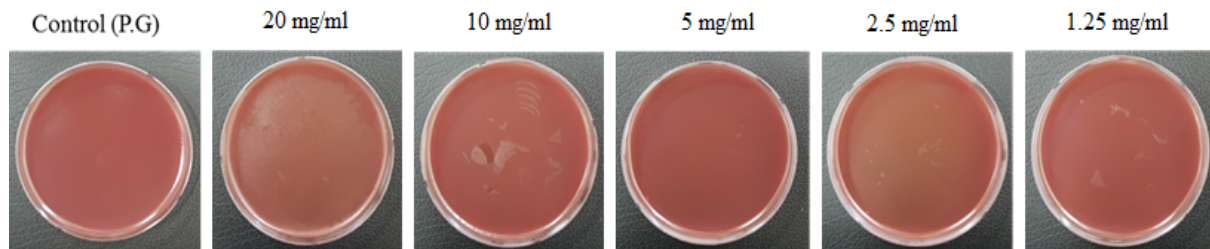
<Fig. 1> Growth inhibition zone of *P. gingivalis* according to the concentration of AMB extract

치주질환의 원인이 되는 치면세균막 관리는 치주질환의 예방과 치료를 위해 필수적이며 외과적 또는 기계적인 제거 방법의 단점을 보완할 수 있는 약물 또는 천연추출물을 이용하는 연구들이 최근 들어 많은 수행되고 있다[12]. 본 연구에서 치주염 원인균인 *P. gingivalis*의 항균효과를 확인하기 위하여 황기 추출물을 적용 하였다.

*P. gingivalis*는 구강 내 감염을 일으켜 치주에 염증을 일으키며 치조골상실을 통해 치아의 부착상실을 일으켜 치아를 직접적으로 상실하게 만드는 직접적인 원인이 된다[13].

추출물 등의 한약제의 효과는 현재 여러 가지 연구가 진행되고 있으며 본 연구에 적용된 황기는 원기회복에 도움을 주는 한약제로 isoflavone 배당체와 saponin을 함유하고 있어 약리실험에 의해 면역증강, 항바이러스, 항종양, 혈압강하, 혈당강하, 이노 등의 효과가 있는 것으로 보고되고 있다[14]. 또한 황기는 독성이 덜하며 항산화, 항세균등의 효과를 나타내기도 한다고 알려져 있다. 이러한 항산화효소는 우리 인체 내 방어능력이 증가하면서 면역력이 증가하게 된다[15]. Min의 연구에 의하면[7] 생 황기에서 폴리페놀은 14.12±0.35 mg/g, 플라보노이드는 2.10±0.01 mg/g을 포함한 것으로 확인되었다. 천연추출물의 항균효과에 관한 연구에 의하면 폴리페놀과 플라보노이드를 함유할수록 항 세균, 항산화 등의 효과를 나타낸다고 알려져 있다[5].

특히 치주질환과 관련된 항균효과에 관한 선행연구에서는 녹차 속에 있는 catechin, epicatechin, epigallocatechin 및 epigallocatechin gallate (EGCG)와 같은 다양한 종류의 polyphenol화합물이 있는데 이러한 물질 역시 다양한 구강 미생물에 대한 효과가 있는



<Fig. 2> Comparison of CFU counts of *P. gingivalis* according to the concentration of AMB extract

것으로 알려져 있다[16]. 뿐만 아니라, 계피나 클로버 오일과 같은 식품의 원료로 이용될 수 있는 물질을 가지고 효과를 보려는 시도가 진행되고 있다[17]. *S. aureus*에 대해 천연 추출물인 복분자, 자유 등이 항균활성을 나타냈으며 오미자 등도 항균활성이 우수하다고 확인되었다[18, 19]. 하지만, 황기에 대한 치주염을 직접 유발한다고 알려진 *P. gingivalis*에 대한 연구는 전무한 실정이다.

본 연구결과, 20 mg/mL 에서 10 mm 억제구간이 나타나 균의 증식이 억제됨을 볼 수 있으면 억제환 주변으로 균의 덜 성장하는 것을 확인 할 수 있다. 또한, 24시간 후 각 농도에 의한 균의 성장률은 농도가 증가 할수록 균의 성장억제효과를 보였고 통제군에 비하여 5 mg/mL부터 유의한 차이를 보였으나 5 mg/mL과 10 mg/mL 20 mg/mL 의 농도에 의한 유의한 차이를 보이지 않았다. 이상의 결과를 바탕으로 볼 때, 20 mg/mL 에서 균의 성장억제를 보이기는 하나 5 mg/mL과 10 mg/mL, 20 mg/mL 의 농도에 의한 뚜렷한 항균효과를 나타내지는 않는다. 그러므로 이는 *P. gingivalis*에 황기는 균의 성장을 억제하는 5 mg/mL에서부터 효과를 가지나 치주염의 치료를 위해서는 20 mg/mL 농도를 증가하여 항균효과를 검증하는 필요성을 가진다. 추후 연구에서는 농도를 증가하여 항균효과를 검증하고 농도증가에 대한 구강 내 조직에 유해한 영향을 미치는 지를 수행할 것이다.

REFERENCES

1. Marsh PD, Zaura E: Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. *Journal of Clinical Periodontology* 44(18):12-22, 2017.
2. Samaranayake L, Matsubara VH: Normal oral flora and the oral ecosystem. *Dental Clinics of North America* 61(2): 199-215, 2017.
3. Krishnan K, Chen T, Paster BJ: A practical guide to the oral microbiome and its relation to health and disease. *Oral Diseases* 23(3):276-286, 2017.
4. Torrungruang K, Jitpakdeebordin S, Charatkulangkun O, Gleebua Y: porphyromonas gingivalis, aggregatibacter actinomycetemcomitans, and treponema denticola / prevotella intermedia co-infection are associated with Severe periodontitis in a thai population. *Plos One* Aug 10(8):e0136646, 2015.
5. Park KL, Kang ST, Kim MJ, Oh HK: Antioxidative components and anti-oralmicrobial effect of bamboo (*Phyllostachys nigra* var. henonis Stapf) Leaves. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition* 45(9): 1265-1272, 2016.
6. Tran HNK, Nguyen VT, Han KH, Moon KS, Kim JA, Min BS: Analysis and stability test of the extracts from astragalus radix, paeoniae radix, and corni fructus for toxicity study. *Korean Journal of Pharmacognosy* 48(3):248-254, 2017.
7. Min SH: Quality characteristics of raw and dried astragalus membranaceus extracts. *The Korean Journal of Food and Cookery Science* 33(1):65-71, 2017.
8. Park CS, Kim DH, Kim ML: Biological activities of extracts from corni fructus, astragalus membranaceus and glycyrrhiza uralensis. *The Korea Journal of Herbology* 23(1):93-101, 2008.
9. Kim MJ, Lim KR, Jung TK, Yoon KS: Anti-aging effect of astragalus membranaceus root extract. *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea* 33(1):33-40, 2007.
10. Huh MK, Kim HJ: Antibacterial effect on leaf-extract from nelumbo nucifera against oral microorganism. *Journal of Korean Society of Dental Hygiene* 14(1):117-22, 2014.
11. Lee BB, Ha YM, Shin SH, et al.: Antimicrobial activity of test dentifrice product containing grapefruit seed extract and processed sulfur solution against oral pathogens. *Journal of Life Science* 19(7):956-962, 2009.
12. Choi SM. The effect of topical application with chlorhexidine and anti-inflammatory drug containing gel on dental plaque and gingival inflammation. *Journal of Periodontal & Implant Science* 18(1):118, 1988.
13. Nakayama M, Ohara N: Molecular mechanisms of porphyromonas gingivalis-host cell interaction on periodontal diseases. *Japanese Dental Science Review* 53(4):134-140, 2017.
14. Lin LZ, He XG, Lindenmaier M, et al.: Liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry study of the flavonoids of the roots of *Astragalus mongholicus* and *A. membranaceus*. *Journal of Chromatography A* 876(1-2): 87-95, 2000.
15. Lee YE, Hong SH: *Oriental medical food materials science*. Kyomunsa Pub, 203-204, 2003.
16. Sakanaka S, Kim M, Taniguchi M, Yamamoto T: Antibacterial substances in japanese green tea extract against streptococcus mutans, a cariogenic bacterium. *Agricultural and Biological Chemistry* 53(9):2307-2311, 1989.
17. Paul DM, Gerhard JH: Antimicrobial activity of some

- edible plants:lotus(nelumbo nucifera), coffee and others.
Journal of food protection 56(1):66-68, 1993.
18. Park CG, Bang KH, Lee SE, et al.: Antibacterial activity from medicinal plant extracts on the staphylococcus aureus. The Korean Society of Medical Crop Science 9(4):251-258, 2001.
19. Chang HS, Choi I: Antimicrobial activities of medicinal herb extracts. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition 41(2):261-269, 2012.