

구강미생물에 대한 강향(降香) 추출물의 항균 효과

임남희 선임연구원, 마진열 책임연구원*

한국한의학연구원 한의기술응용센터

Antibacterial activities of Dalbergiae Odoriferae Lignum extracts against oral bacteria

Nam-Hui Yim, Jin Yeul Ma*

Korea Institute of Oriental Medicine, KM Application Center

Abstract

Dalbergiae Odoriferae Lignum has long been used to treat for dissipating blood stasis, regulating blood flow, and relieving pain as traditional herbal medicine. In this study, the extracts of Dalbergiae Odoriferae Lignum and nerolidol, a major volatile oil of *Dalbergia odorifera*, were evaluated for antibacterial activity against four common oral bacteria. Hot-water extract of Dalbergiae Odoriferae Lignum (DOW), 70% ethanol extract of Dalbergiae Odoriferae Lignum (DOE), and nerolidol were tested for the growth inhibition against *Enterococcus faecalis*, *Actinomyces viscosus*, *Streptococcus mutans*, and *Streptococcus sanguis* by broth microdilution assay in brain heart infusion (BHI)-broth and by dot-blot assay in BHI-agar, used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC), respectively. The activity of Glucosyltransferase (GTase) from *S. mutans* was determined with glucan formation. To confirm the safety of Dalbergiae Odoriferae Lignum, DOW was tested the acute toxicity by administering orally to ICR mice. In the present study, DOW, DOE, and nerolidol showed significant antibacterial activities at high concentrations against the four types of pathogenic oral bacteria, especially showed strong antibacterial activities at *S. mutans* in a dose-dependent manner. Additionally, DOW and DOE decreased the synthesis of water-insoluble glucans by inhibiting the GTase activity, while nerolidol did not work. Further, DOW determined the LD₅₀ values over 5,000 mg/kg in mice and proved DOW's safety.

Correspondence: 마진열(Jin Yeul Ma)

Korean Medicine Application Center, Korea Institute of Oriental Medicine,
70 Cheomdan-ro, Dong-gu, Daegu 41062, Rep. of Korea

Tel: +82-53-940-3849, E-mail: jyama@kiom.re.kr

Received 2020-11-12, revised 2020-11-30, accepted 2020-12-01, available online 2020-12-04
doi:10.22674/KHMI-8-2-10

These results suggest that *Dalbergiae Odoriferae Lignum*, including DOW and DOE, and nerolidol proven antibacterial activities may be useful for treating dental diseases.

Keywords: *Dalbergiae Odoriferae Lignum*, nerolidol, antibacterial activity, oral bacteria, *Streptococcus mutans*, glucosyltransferase

서론

구강내 다양한 미생물은 균형적으로 존재하여 구강내 면적이 적절히 조절되나, 특정 구강균은 치아우식증 및 치주염과 같은 구강질환 발생의 원인이 된다. 구강내 염증 완화를 위해 penicillin 과 같은 항생제를 사용하여 구강미생물의 성장을 억제하고자 하지만, 항생제의 장기간 사용에 의해 유발되는 내성과 같은 부작용의 우려가 있다.¹⁾ 또한 치아우식을 예방하고자 구강세척도구 개발 및 불소화합물의 사용 등 물리·화학적 방법이 꾸준히 소개되고 있으나 충분한 효과를 거두지 못하고 있다.²⁾

Streptococcus mutans 와 같은 치아우식균은 치아 표면에 부착하여 당분을 이용해 젖산을 생성함으로써 치아 enamel 층을 탈회화(decalcification)하여 치아우식을 유발한다. 또한 *S. mutans*에 의해 생산되는 glucosyltransferase (GTase)는 sucrose 를 기질로 하여 glucan 이라는 glucose polymer 를 합성하고, glucan 은 치면에 증식하는 세균간의 결합을 증가시켜 구강균 증식에 기여한다.^{3,4)} 이와 같이 구강균의 특성을 타겟으로 하여 인체내 부작용이 없는 안전성이 확보된 한약재 및 약용식물 추출물로부터 항균물질을 탐색하는 연구가 꾸준히 진행되고 있다.

강향(降香, *Dalbergiae Odoriferae Lignum*)은 콩과 식물인 강향황단(降香黄檀, *Dalbergia odorifera* T.C.Chen)의 변재를 제거한 줄기와 뿌리의 심재이다.⁵⁾ 강향의 한의학적 특성은 성미는 신온(辛溫)하며, 화어지혈(化瘀止血), 이기止痛(理氣止痛)하는 효능이 있어 토혈, 코피, 외상으로 인한 출혈, 간울협통(肝鬱脇痛), 흉비자통(胸痹刺痛), 타박상으로 인한 통증, 구토와 복통을 치료하는 데 주로 이용하였다.⁵⁾ 현대 약리학적 연구결과 강향 추출물 및 강향 유래 성분들의 항염증, 항협심증, 항산화, 항혈소판, 항균 및 항당뇨 효능이 보고되어 있으며,^{6,7)} 특히 단삼과 강향 혼합물의 관상동맥 심장질환 또는 허혈성 심장질환에 대한 연구결과가 보고된 바 있다.^{8,9)} Nerolidol 은 sesquiterpene alcohol 로 강향내 휘발성 오일(volatile oil) 성분의 약 57% 이상을 차지하는 주요 성분이다.¹⁰⁾ Nerolidol 의 약리적 특성은 항산화, 항균, 항말라리아, 항궤양, 항염 및 항종양 활성을 보이며, 특히 메티실린 내성 황색포도상구균(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)에서 nerolidol 의 강력한 항균 활성이 보고되었다.¹¹⁾ 산업적 측면에서 nerolidol 은 세정제나 향수 등 코스메틱 산업에도 활용되고 있으며, 미국 FDA 는 nerolidol 을 안전한 식품 첨가제로 허가하여 풍미제로 음식 산업에 활용하고 있다.¹²⁾

이와 같이 nerolidol 을 포함한 중요한 생리적 기능물질을 함유하고 있는 강향은 다양한 효능에 대한 예방 및 치료 효과가 보고되어 있으나 구강세균과 관련된 연구결과는 미비한 상태다. 이에 본 연구에서 강향 추출물이 구강균에 대한 항균효과 및 치아우식을 유발하는 GTase 활성에 미치는 효과를 확인함으로써 항균 및 항우식 천연물질로서의 가능성을 제시하고자 하였다. 또한, 강향 추출물의 급성독성 평가를 통해 구강내 사용 소재로서의 안전성을 검증하고자 하였다.



본론

1. 실험방법

1) 재료 및 시약

(1) 사용균주 및 배지

치아우식 및 구내염을 유발시키는 구강균인 *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*, KCTC3206), *Actinomyces viscosus* (*A. viscosus*, KCTC15382), *Streptococcus mutans* (*S. mutans*, KTCT3065)는 한국생명공학연구원 생물자원센터(Korea Collection for Type Cultures, KCTC)로부터 분양받아 실험에 사용하였으며, *Streptococcus sanguis* (*S. sanguis*)는 서울대학교 치과대학에서 분양받아 실험에 사용하였다. 4 종의 구강균은 Brain Heart Infusion 액체배지(BHI-broth, BD Difco™, USA)와 고체배지(BHI-agar, BD Difco™, USA)에 계대배양하여 실험에 사용하였다.

(2) 한약재 및 화합물

본 실험에 사용된 강향은 한국한의학연구원 한의기술응용센터의 '한약재 및 한약제제 라이브러리'에서 관리 중인 한약소재(#184)를 추출하여 사용하였으며, 충남대학교 약학대학 배기환 교수에 의해 감정되었다. 강향 내 화합물인 nerolidol과 프로폴리스 내 화합물인 farnesol, acacetin, apigenin, chrysin, galangin 및 rutin hydrate는 Sigma-Aldrich 사(St. Louis, MO, USA)와 Chemfaces 사(Wuhan, China)로부터 구입하여 실험에 사용하였다.

2) 추출물 제조

(1) 강향 열수추출물(DOW) 제조

건조된 강향 50 g에 증류수 1 L를 첨가하여 1시간 정치 후 약탕기에서 3시간 가열 추출하였다. 추출 후 여과지로 여과한 뒤 회전감압농축기(N-1000, EYELA, Japan)를 이용하여 농축한 후 동결건조하였다(수득율 1.24%, w/w).

(2) 강향 에탄올 추출물(DOE) 제조

건조된 강향 50 g에 70% 에탄올 0.5 L를 첨가하여 1시간 정치 후 초음파 추출을 수행하였다. 추출 후 여과지로 여과한 뒤 회전감압농축기를 이용하여 농축한 후 동결건조하였다(수득율 10.22%, w/w).

3) 구강균에 대한 성장 억제능 측정

강향에 의한 구강균 성장 억제 활성을 확인하기 위하여 액체희석배지 방법(broth microdilution assay)를 수행하였다. 균주를 BHI-broth에 접종하여 계대배양 후 UV/VIS spectrophotometer (U-2900, Hitachi, Japan)로 550 nm에서 흡광도값이 0.1이 되도록 균액을 희석하고 희석액의 1%를 BHI-broth에 접종 후 96-well microplate에 200 µL씩 분주하였다. 분주 후, DOW와 DOE를 well에 첨가하여 20시간 동안 배양시킨 후 흡광도를 측정하여 생육억제능을 확인하였다. 또한, 강향 추출물을 첨가하여 배양한 배양액을 BHI-agar에 2 µL씩 접종하여 20시간 동안 추가 배양(dot-blot assay) 후 구강균 성장을 확인하였다.

4) GTase 의 Glucan 생성 저해능 측정

S. mutans 균주를 BHI-broth 에 접종하여 37°C 배양기에서 24 시간 배양한 후, 원심분리기 (Combi-51412, Hanil, Korea)를 이용하여 4°C에서 3,900×g 에서 30 분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 0.2 µm 주사기형 필터로 상등액을 여과한 후, Amicon Ultra Centrifugal Filter (MWCO 30kDa, Cat. No. UFC903008, Millipore)를 사용하여 GTase 가 포함된 조효소액을 제조하였다.

유리 시험관에 기질 용액[sucrose 12.5 g, NaN₃ 0.25 g/0.0625 M potassium phosphate buffer (pH 6.5) 1 L] 800 µL, 조효소액 20 µL 및 강향 추출물 180 µL 를 첨가하여 최종 용량이 1 mL 가 되도록 하였다. 음성대조군으로는 증류수 180 µL 를 첨가하였다. 시험관을 30° 정도 경사지게 하여 37°C 배양기에서 30 시간 반응시켰다. 반응 후 원심분리하여 상정액을 버리고 4 mL 의 증류수를 가하여 10 분간 초음파 처리하여 형성되어 있는 글루칸을 분산시켰다. 분산 직후 UV/VIS spectrophotometer 로 550 nm 에서 흡광도를 측정하였고, 각 시료의 GTase 에 대한 저해율을 하기 식에 의해 계산하였다.

$$\text{글루칸 생성 저해율(\%)} = \frac{[(\text{control} - \text{control blank}) - (\text{sample} - \text{sample blank})]}{(\text{control} - \text{control blank})} \times 100$$

5) 급성독성 실험

(1) 실험동물 및 사육환경

강향 추출물의 안정성에 대한 자료를 마련하기 위하여 단회투여 독성실험을 수행하였다. 단회투여 독성 실험은 식품의약품안전청 고시 제 2005-60 호 의약품 등의 독성시험방법의 “비임상시험 관리기준”(2005년 10월 25일)에 따라 암·수 ICR 마우스를 이용하여 수행하였다. 동물구입 후 약 1주일 동안 온도 23±3°C, 상대습도 50±10%, 환기횟수 시간당 12~16 회, 조명 12 시간 명암주기(점등 07:00, 소등 19:00), 조도 150~300 Lx 인 사육 환경하에서 검역 및 순화시키면서 외관을 육안으로 검사한 후 체중범위에 따른 무작위범위에 의하여 암수 각각 군 분리를 실시하였다(5 mice/cage). 사료와 물은 자유섭취 시켰으며, 사료는 실험동물용 고형사료(PMI nutrition, USA)를 공급하였다. 본 실험은 한국한의학연구원 동물실험 윤리위원회의 승인을 받아 진행하였다(승인번호:11-056).

(2) 임상증상 및 부검

강향 열수 추출물의 투여 용량은 5,000 mg/kg을 기준으로 공비 0.5 로 2,500 mg/kg 및 1,250 mg/kg (Mouse, B.W.)의 3 가지 용량으로 설정하였으며, 부형제인 생리식염수로 각각의 투여 용량별로 희석하여 시험에 사용하였다. 투여 경로는 경구투여법을 이용하였으며, 동물을 하룻밤 절식시킨 후 경구투여용 존데와 주사관을 이용하여 경구투여하였다. 임상증상은 투여 후 6 시간 동안 매시간 관찰하였으며, 그 후 14 일 동안 1 일 1 회, 일반 상태의 변화 및 운동성, 외관, 자율신경 등의 일반증상과 사망사례를 관찰하였다. 체중은 입수 시, 군 분리전 및 시험물질 투여 후 1, 3, 7, 14 일에 각각 측정하였다. 실험동물을 희생하기 전날 18 시간 절식시킨 후 Zoletil 50 (Virbac S.A, France)과 자일라진 히드로클로라이드(Xylazine Hydrochloride, 바이엘 코리아 주식회사, 경기도)를 사용하여 마취하였다. 혈액 채취 및 방혈 후 육안으로 주요 장기의 병변을 관찰하고, 간, 폐, 심장, 신장, 비장을 적출하여 생리식염수에 세척 후 무게를 측정하였다.

(3) 혈액학적 분석

복부 대정맥에서 채취한 혈액을 혈구분석기 ADVIA2120i (Siemens, Germany)를 이용하여 백혈구



(white blood cell, WBC), 적혈구(red blood cell, RBC), 헤모글로빈(hemoglobin, HGB), 헤마토크리트(hematocrit, HCT), 평균적혈구혈색소량(mean corpuscular hemoglobin, MCH), 평균적혈구용적(mean corpuscular volume, MCV), 평균적혈구혈색소농도(mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC), 혈소판(platelet, PLT), 호중구(neutrophil, Neut), 림프구(lymphocyte, Lymph) 및 단핵구(Monocyte, Mono)를 측정하였다.

6) 통계 처리

실험결과는 GraphPad PRISM (GraphPad PRISM software Inc., version 5.02, San Diego, CA, USA)와 SPSS version 23 software (IBM SPSS Statistics for Windows, version 23.0, Armonk, NY, USA)을 이용하여 평균과 표준편차를 구하였다. 데이터의 평균값 차이에 대한 유의성은 one-way ANOVA (analysis of variance)에 의하여 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

2. 결과

1) 구강균에 대한 강향 추출물 및 nerolidol 의 항균활성

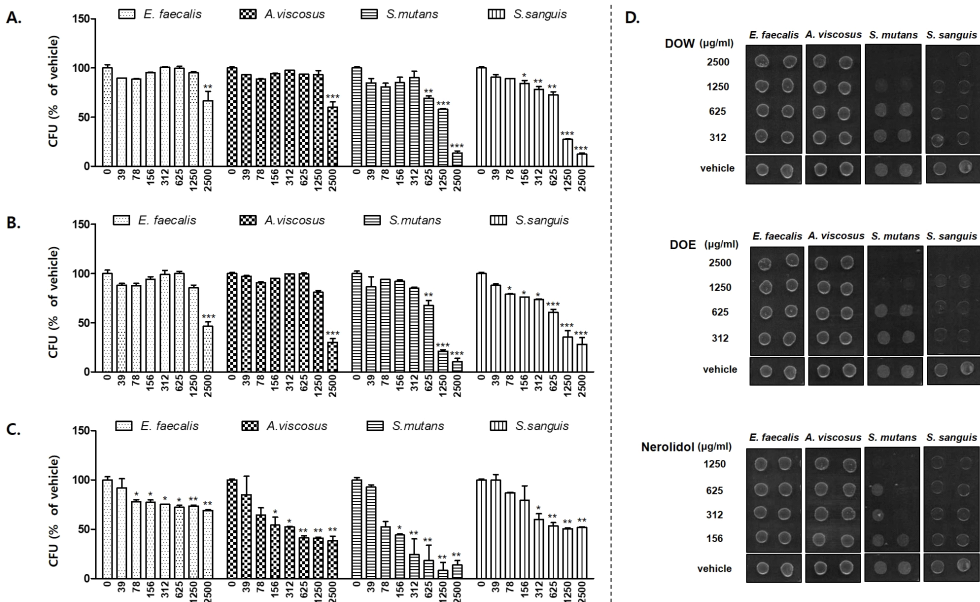


Figure 1. Antibacterial activities of DOW, DOE, and nerolidol against oral bacteria. Investigation of growth inhibition of oral bacteria by broth microdilution assay in BHI-broth (A, DOW; B, DOE; C, nerolidol) and by dot-blot assay in BHI-agar (D). Significant differences from the control (untreated) are indicated by * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

강향 추출물(DOW, DOE) 및 강향 내 화합물인 nerolidol 을 4 종의 구강균에 각각 처리하여 broth microdilution assay 를 수행하여 균성장 억제효능을 확인하였다(Fig. 1A). DOW 와 DOE 의 최고 처리



농도인 2,500 µg/mL 를 처리 시 모든 구강균의 성장이 유의적으로 억제되었다. 특히 *S. mutans* 와 *S. sanguis*에 대해 DOW 와 DOE 의 농도 의존적 균성장 억제 효능을 확인하였다. Nerolidol 은 농도 의존적으로 구강균의 성장을 강하게 억제하였으며, 특히 nerolidol 156 µg/mL 농도에서 치아우식증을 유발하는 대표적인 구강균인 *S. mutans*의 성장이 약 56% 억제되었다. 액체 배양매지에서 DOW, DOE 및 nerolidol 에 의해 성장이 억제된 균들을 dot-blot assay 를 수행하여 정균 및 살균 효능을 확인하였다(Fig. 1B). 그 결과, 각각의 DOW 와 DOE 2,500 µg/mL 농도에서 성장이 억제된 *E. faecalis*와 *A. viscosus*가 BHI-agar 에서 추가배양 시 균성장이 회복됨을 확인하였다. 반면에, *S. mutans*의 경우 DOW 와 DOE 2,500 µg/mL 에서 강한 살균효능을 확인하였으며 1,250 µg/mL 에서도 약한 성장 회복이 나타나 살균 효능이 있음을 확인하였다. *S. sanguis* 또한 DOW 와 DOE 2,500 µg/mL 에 의해 살균되었으며, 2,500 µg/mL 이하의 농도에서는 희미한 균성장 회복이 나타났으나 대체적으로 강한 살균 효능을 보였다. Nerolidol 은 비교적 낮은 농도(312 µg/mL)에서 *S. mutans*을 살균하였으나, *S. sanguis*에 약한 살균 효능을 보였다.

Table 1. MIC and MBC of the extracts and nerolidol from Dalbergiae Odoriferae Lignum against oral bacteria

Samples	<i>E. faecalis</i>		<i>A. viscosus</i>		<i>S. mutans</i>		<i>S. sanguis</i>	
	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)
1 DOW	2500	>2500	2500	>2500	625	1250	625	2500
2 DOE	2500	>2500	2500	>2500	625	1250	625	2500
3 Nerolidol	78	>1250	156	>1250	156	312	312	>1250
P Erythromycin*	<0.78	1.56	<0.78	<0.78	<0.78	<0.78	50	>50

*Antibiotics used as the positive control. MBC, minimum bactericidal concentration; MIC, minimum inhibitory concentration.

이 결과를 토대로 구강균에 대한 최소 성장 저해 농도(minimal inhibitory concentration, MIC)와 최소 살균 농도(minimal bactericidal concentration, MBC)를 정리하였다(Table 1). 유의적인 항균 활성을 고려하여 정리한 결과, DOW 는 *S. mutans*에서 가장 낮은 MIC (625 µg/mL) 와 MBC (1,250 µg/mL) 값을 나타냈다. DOE 또한 *S. mutans*에서 가장 낮은 MIC (625 µg/mL) 와 MBC (1,250 µg/mL) 값을 나타냈다. Nerolidol 은 *E. faecalis*에 가장 낮은 MIC (78 µg/mL) 값을 보였으나 MBC 값은 1,250 µg/mL 이상으로 확인되었다. 반면에 nerolidol 은 *S. mutans*에서 가장 낮은 MBC (312 µg/mL) 값을 보여 nerolidol 을 포함한 강향 추출물은 *S. mutans* 특이적인 강한 항균효능을 갖는 것으로 확인되었다.

2) 강향 추출물 및 nerolidol 의 *S. mutans* 균주 유래 비수용성 glucan 형성억제 효능

강향에 의한 *S. mutans* 유래 GTase 의 활성억제 효능을 확인하기 위하여 GTase 와 당질에 의해 생성되는 glucan 의 함량을 측정하였다. 그 결과, DOW 와 DOE 를 처리시 약 20% 이상 glucan 형성이 억제되었다. 특히, 낮은 농도의 DOW(625 µg/mL)에서 약 40% 정도의 유의적인 glucan 형성 억제 효능이 확인되었다. 반면에 nerolidol 처리시 glucan 함량이 약간 증가되었으며 억제 효과는 확인되지 않았다.



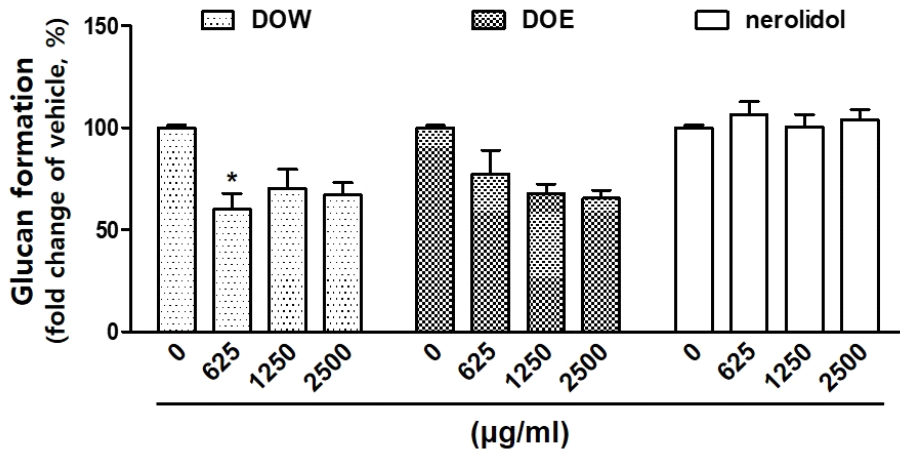
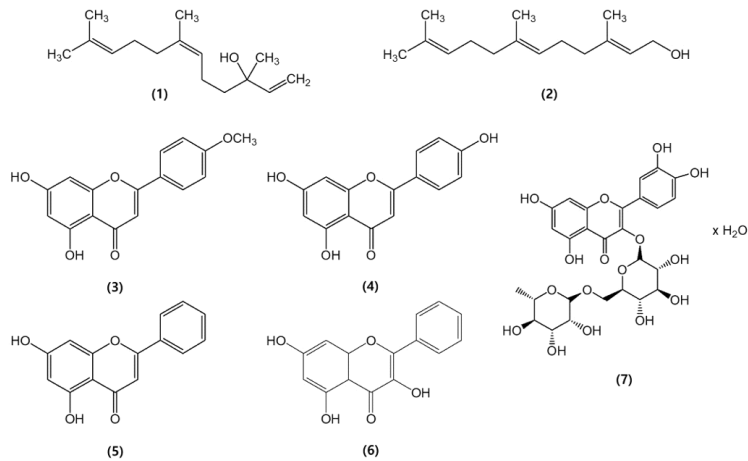


Figure 2. Inhibitory activities of DOW, DOE, and nerolidol against water-insoluble glucan synthesis caused by GTase from *S. mutans*. Significant differences from the control (untreated) are indicated by * $p < 0.05$.

A.



B.

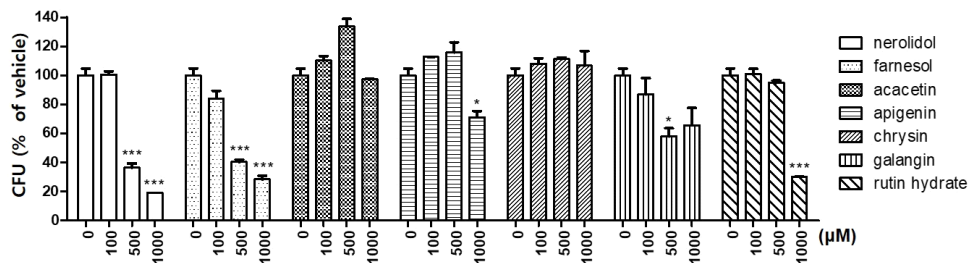


Figure 3. Comparison of antibacterial activities between nerolidol and antibacterial components identified from propolis. Chemical structures of compounds investigated antibacterial activity (A). Comparison of growth inhibitory activities of each compound against *S. mutans* (B). Significant differences from the control (untreated) are indicated by * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$.



3) Nerolidol 과 천연물 유래 항균활성 화합물의 *S. mutans* 균주 성장억제 효능 비교

Nerolidol 의 항치주균 활성 검증을 위해 *S. mutans* 에서 프로폴리스 내 항균 효능이 보고된 개별 화합물 6 종과의 항균 효능을 비교 평가하였다. 그 결과, nerolidol 과 farnesol 에 의해 *S. mutans* 성장이 강하게 억제되었으며, 특히 500 µM 처리 농도에서 nerolidol 과 farnesol 은 각각 63.6%와 59.6%의 항균활성을 나타냈다. 반면에 acacetin, apigenin, chrysin, galangin, rutin hydrate 중 apigenin, galangin 및 rutin hydrate 는 비교적 높은 처리 농도에서 항균 활성을 나타냈다.

4) 강향 열수추출물(DOW) 단회투여에 의한 마우스 급성독성 실험 결과

DOW 를 투여 후 14 일간 실험동물에 대한 임상증상을 확인한 결과, 정상대조군과 비교하여 보행장애, 웅크림, 호흡축박, 몸단장, 튀어오름, 무기력증, 마비, 유연, 유루, 설사, 부종, 구토, 비루 등의 임상증상에 대한 이상 소견은 없었다. 또한 DOW 고용량(5,000 mg/kg)을 투여한 실험군을 포함하여 모든 실험동물에서 사망이 관찰되지 않아 DOW 의 반수치사농도(lethal concentration 50%, LD₅₀)는 5,000 mg/kg 이상일 것으로 예측하였다. 시험기간 동안 DOW 투여군과 대조군의 체중은 암, 수 모든 개체에서 개시체중에 비하여 증가하였다. 투여 후 관찰기간 동안 대조군과 비교시 DOW 투여에 의한 유의적인 체중 변화 차이는 확인되지 않았다(Fig. 4).

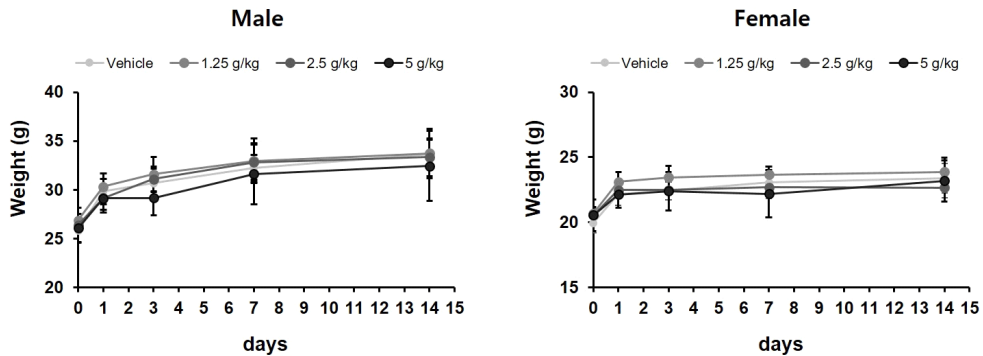


Figure 4. Changes of body weights in male and female ICR mice administered with DOW for the acute toxicity test.

실험 종료 후 모든 실험동물을 부검한 결과, DOW 투여군 및 대조군 모두에서 폐, 심장, 간, 비장 및 신장 등의 장기 무게는 Table 2 와 같다. 주요 내부장기에 대한 외관상의 어떠한 이상 병변도 발견되지 않았으며, DOW 를 투여한 수컷에서 간 및 심장 무게가 약간 증가하였으나 용량 의존적이지 않고 통계적 유의성이 없었다. 암컷에서는 DOW 투여에 의해 폐 무게가 약간 증가하였으나 분석 결과 통계적 유의성이 없었다.

혈액학적 검사를 실시한 결과, 모든 실험군에서 WBC, RBC, HGB, HCT, MCH, MCV, MCHC 및 PLT 등의 혈액학적 검사 결과 수치가 정상대조군과 비교하여 유의한 증가나 감소는 관찰되지 않았다.



Table 2. Organ Weights of male and female ICR Mice Orally administered with DOW.

Sex	Group	number	Organ Weight (g)					
			Lung	Heart	Liver	Spleen	Kidney (L)	Kidney (R)
Male	vehicle	5	0.203 ±0.020	0.145 ±0.007	1.393 ±0.097	0.121 ±0.013	0.245 ±0.035	0.236 ±0.026
	5 g/kg	5	0.206 ±0.008	0.164 ±0.010	1.692 ±0.439	0.148 ±0.041	0.214 ±0.121	0.278 ±0.046
	2.5 g/kg	5	0.200 ±0.020	0.159 ±0.016	1.446 ±0.143	0.111 ±0.016	0.243 ±0.022	0.241 ±0.020
	1.25 g/kg	5	0.205 ±0.205	0.154 ±0.006	1.630 ±0.227	0.116 ±0.014	0.260 ±0.028	0.256 ±0.022
Female	vehicle	5	0.165 ±0.014	0.113 ±0.008	0.981 ±0.137	0.106 ±0.026	0.133 ±0.010	0.141 ±0.010
	5 g/kg	5	0.166 ±0.015	0.119 ±0.005	1.029 ±0.163	0.114 ±0.023	0.141 ±0.008	0.142 ±0.006
	2.5 g/kg	5	0.168 ±0.014	0.106 ±0.006	0.963 ±0.111	0.111 ±0.014	0.139 ±0.009	0.130 ±0.003
	1.25 g/kg	5	0.173 ±0.009	0.117 ±0.007	0.979 ±0.042	0.102 ±0.011	0.133 ±0.009	0.132 ±0.010

Table 3. Levels of Hematological Analysis in male and female ICR Mice Orally administered with DOW.

Group	number	WBC (×1,000)	RBC (×10 ⁶)	HGB (g/dL)	HCT (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	PLT (×1,000)	#NEUT	#LYMPH	#MONO	
Male	vehicle	5	1.11 ±0.204	8.76 ±0.144	13.80 ±0.485	53.62 ±1.809	61.20 ±1.611	15.74 ±0.416	25.70 ±0.579	980.60 ±118.056	0.28 ±0.094	0.69 ±0.159	0.01 ±0.005
	5 g/kg	5	2.04 ±0.855	7.26 ±1.391	11.14 ±2.102	44.72 ±8.899	61.48 ±1.344	15.34 ±0.477	24.94 ±0.688	1182.80 ±441.515	1.23 ±1.350	1.60 ±0.714	0.06 ±0.059
	2.5 g/kg	5	1.39 ±0.403	8.03 ±0.915	12.88 ±1.361	50.42 ±6.680	62.68 ±1.636	16.06 ±0.385	25.68 ±0.876	1259.50 ±98.906	0.26 ±0.132	0.84 ±0.431	0.01 ±0.008
	1.25 g/kg	5	1.56 ±0.611	7.63 ±0.478	12.06 ±0.586	47.62 ±3.241	62.36 ±0.658	15.82 ±0.268	25.36 ±0.680	1257.00 ±173.009	0.37 ±0.220	1.12 ±0.457	0.02 ±0.017
Female	vehicle	5	1.69 ±0.970	8.35 ±0.525	13.10 ±0.735	50.84 ±2.859	60.90 ±1.296	15.72 ±0.356	25.80 ±0.292	1056.40 ±153.819	0.37 ±0.173	1.08 ±0.655	0.02 ±0.013
	5 g/kg	5	1.50 ±0.305	8.37 ±0.404	13.22 ±1.089	49.94 ±4.289	59.54 ±2.708	15.80 ±0.624	26.52 ±0.311	686.60 ±402.479	0.29 ±0.084	1.20 ±0.377	0.02 ±0.005
	2.5 g/kg	5	1.20 ±0.666	6.74 ±3.436	10.58 ±5.489	41.44 ±21.12 4	60.92 ±2.657	15.02 ±1.709	24.64 ±2.194	1136.50 ±155.226	0.22 ±0.094	0.81 ±0.470	0.01 ±0.007
	1.25 g/kg	5	2.11 ±0.453	8.28 ±0.488	13.02 ±0.526	49.08 ±3.051	59.30 ±2.972	15.74 ±0.684	26.56 ±0.913	1066.75 ±169.950	0.53 ±0.080	1.35 ±0.378	0.03 ±0.009

WBC, white blood cell; RBC, red blood cell; HGB, hemoglobin; HCT, hematocrit; MCH, Mean Corpuscular Hemoglobin; MCV, Mean Corpuscular Volume; MCHC, Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration; PLT, platelet; Neut, Neutrophil; Lymph, Lymphocyte; Mono, Monocyte.



3. 고찰

구강내 미생물은 구강염증을 유발하거나 치태를 형성시켜 치아우식을 유발하고 이로 인해 구취를 발생시킨다. 이와 같은 구강질환을 예방 또는 치료하기 위해 한약재를 포함한 다양한 식물 추출물을 대상으로 미생물의 성장을 억제시키는 정균(bacteriostatic) 또는 살균(bactericidal) 효과를 확인한 연구결과가 보고되어 있다.¹³⁻¹⁵⁾ 이 연구에서 사용된 4종의 구강균은 그람 양성세균으로 *E. faecalis*와 *A. viscosus*는 구강내 치아우식이 일어난 치주조직 주변에 염증을 유발하며, *S. mutans*와 *S. sanguis*는 치아표면이나 치태에 집적하여 치아우식에 크게 관여한다.¹⁶⁾ 이 중에서 *E. faecalis*는 주로 위장관에 서식하는 균이나 구강내 치근관에서 분리되기도 하며 치근관 치료시 재감염의 주요 원인균으로 알려져 있다. 특히 *E. faecalis*는 vancomycin 등의 다양한 항생제에 대해 강한 내성을 나타내어 *E. faecalis* 감염시 치료 효율이 낮다.¹⁷⁾ *A. viscosus*는 치태 및 치근에 존재하며 치주조직내 면역세포와 반응하여 염증성 사이토카인을 분비하여 치은염 및 치주염을 유발한다.¹⁸⁾ *S. mutans*는 oral streptococci 중 대표적인 세균으로 치면 세균막(biofilm) 형성에 큰 역할을 하여 치아우식증의 원인균으로 알려져 있다.¹⁹⁾ 특히 *S. mutans*를 타겟으로 하는 연구는 균성장 억제 뿐 아니라 균체의 효소인 GTase 활성 억제를 확인함으로써 타겟소재의 항균 효능 및 항치아우식 효능을 검증한다.

강향은 flavonoid 계, pterocarpan 계, phenol 계 및 sesquiterpene 계열의 휘발성 오일 등 다양한 식물 화합물을 포함하고 있으며,⁸⁾ 이들 화합물들의 생물학적 활성에 기인하여 항염증 및 항균 효능을 나타낸다고 추측된다. 이 연구에서 강향 열수 추출물(DOW)와 70% 에탄올 추출물(DOE)를 4종의 구강균에 처리한 결과, *E. faecalis*와 *A. viscosus*에 대해 강향 추출물의 최고 처리 농도에서 MIC 값이 확인되었으며 MBC 값은 처리 농도에서 확인되지 않았다. 반면에 2종의 강향 추출물은 *S. mutans*와 *S. sanguis*에 대해 비교적 낮은 농도에서 유의적인 항균효능을 나타냈으며, 치태 형성에 중요한 역할을 하는 *S. mutans* 유래 GTases의 활성을 억제하였다. 이와 같은 실험 결과는 강향 추출물의 항균 효능을 나타내며 강향 추출물을 이용한 치아우식의 예방 및 치료 효과를 기대할 수 있다. Nerolidol은 강향 내 대표적인 휘발성 오일로 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)과 대장균(*Escherichia coli*) 등 병원성 세균에 대한 항균 효능이 보고되어 있으며 최근에 신경 퇴행성 질환에 대한 항염증 효능이 보고되었다.^{12,20)} 이 연구에서 구강균에 대한 nerolidol의 항균 활성은 강향 추출물에 비해 강하게 나타났으며, 특히 *S. mutans*에 대해 대부분 처리 농도에서 유의적 활성값을 나타냈다. 반면에 nerolidol은 *S. mutans* 유래 GTases의 활성에는 영향을 주지 않았다. 이 결과로 구강균에 대한 nerolidol의 항균 효능은 검증되었으나 치아우식에는 관여하지 않는 것으로 추측된다. 대표적인 천연 항균물질로 구강질환 및 면역 증강에 많이 활용되는 프로폴리스 내 항균 효능이 알려진 구성 화합물과 nerolidol의 *S. mutans*에 대한 항균 활성을 비교한 결과, sesquiterpenoid 계열의 farnesol이 nerolidol과 유사한 항균 활성을 나타낸 반면, 프로폴리스 유래 flavonoid 계열의 화합물들은 처리한 농도에서 *S. mutans*에 상대적으로 미비한 항균 활성을 보였다. 이와 같은 결과는 nerolidol을 포함한 강향 추출물이 구강 항균제로서 활용될 수 있는 근거라고 생각된다.

강향 열수 추출물의 마우스에 대한 급성독성평가 결과는 5,000 mg/kg 이상의 LD₅₀ 값을 확인하여 구강균에 대한 항균 활성을 나타낸 강향 열수 추출물의 농도 범위는 안전한 것으로 보인다. 비록 이 연구에서 혈액생화학적 분석 결과는 확인하지 않았으나, 기존의 임상연구에서 단삼과 강향의 혼합 추출물을 심장질환 치료 목적으로 적용한 근거가 보고되어 있어,¹⁰⁾ 강향 추출물의 인체 내 적용은 가능하다고 판단된다.



결론

강향 열수 추출물 및 70% 에탄올 추출물은 치주염과 치아우식을 유발하는 구강균의 성장을 강하게 억제하였으며, 특히 치아우식을 유발하는 대표적인 구강균인 *S. mutans*에 대해 유의적인 항균 효과를 나타냈다. 또한 강향 추출물은 *S. mutans* 유래 GTases의 활성화에 의한 glucan의 생성을 억제하여 항치아우식 효과가 있음이 확인되었다. 강향 유래 화합물인 nerolidol은 구강균에 대해 강한 항균 효과를 나타냈으며 프로폴리스 내 항균 활성이 보고된 구성 화합물보다 강한 항균 효과를 나타냈다. 반면에 nerolidol은 치아우식 과정에는 영향을 주지 않았다. 실험동물에서 강향 열수 추출물의 급성독성평가를 통해 안전성을 확인하였다. 이와 같은 강향 추출물의 항균·항치아우식 효과를 근거로 강향 추출물을 천연 항균제로서 구강질환의 예방 및 치료에 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 한국한의학연구원 주요사업인 '생물전환을 이용한 신한약제 개발 (과제번호: K17281)'로 수행되었으며, 한약재 관련 정보는 한국한의학연구원 한약자원연구센터 최교야 박사님께서 제공해주셨습니다. 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 박숙자, 김상찬, 이종록. 구강미생물에 대한 고삼의 항균효과. 대한본초학회지. 2010;25(2):81-8.
2. 이황, 유용욱. 소목 추출물이 *Streptococcus mutans*의 치아우식 유발능 억제에 미치는 효과와 항균물질 brazilin의 분리. 원광치의학지. 2004;13(1):63-83.
3. Hanada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiological Reviews. 1990;35:331-84.
4. Ooshima T, Minami T, Aono W, Tamura Y, Hamada S. Reduction of dental plaque formation in humans by Oolong tea extracts. Caries Research. 1994;28:146-9.
5. Korea Institute of Oriental Medicine. *Defining Dictionary for Medicinal Herbs* [Korean, 'Hanya k Giwon Sajeon'](2020). Published on the Internet; <https://oasis.kiom.re.kr/herbplib/hminfo/hbmcod/hbmcodList.do> (accessed 2020-04-29).
6. Xiangsheng Zhao et al. *Dalbergia odorifera*: A review of its traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and quality control. Journal of Ethnopharmacology. 2020;248:112328.
7. Son Ninh The. A Review on the Medicinal Plant *Dalbergia odorifera* Species: Phytochemistry and Biological Activity. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2017; Article ID 7142370: 27.
8. Fei Li et al. A network pharmacology approach to reveal the protective mechanism of *Salvia miltiorrhiza*-*Dalbergia odorifera* coupled-herbs on coronary heart disease. SCIENTIFIC REPORTS. 2019;9:19343.
9. Atsushi Sugiyama et al. Cardiac Effects of *Salvia Miltiorrhiza*/*Dalbergia Odorifera* Mixture,

- an Intravenously Applicable Chinese Medicine Widely Used for Patients With Ischemic Heart Disease in China. *Circulation Journal*. 2002;66:182-4.
10. Weng-Keong Chan et al. Nerolidol: A Sesquiterpene Alcohol with Multi-Faceted Pharmacological and Biological Activities. *Molecules*. 2016;21:529.
 11. Byron F. Brehm-Stecher and Eric A. Johnson. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to Antibiotics by the Sesquiterpenoids Nerolidol, Farnesol, Bisabolol, and Apritone. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*. 2003;47(10):3357-60.
 12. Lapczynski, A., Bhatia, S.P., Letizia, C.S., Api, A.M. Fragrance material review on nerolidol (isomer unspecified). *Food Chemical Toxicology*. 2008;46:S247-S250.
 13. Nam-Hui Yim et al. Screening of aqueous extracts of medicinal herbs for antimicrobial activity against oral bacteria. *Integrative Medicine Research*. 2013;2:18-24.
 14. 박은진, 이준수, 최원석. 용매 변화에 따른 버섯추출물의 항충치활성. *한국식품과학회지*. 2011;43(6):783-6.
 15. Singh J, Kumar A, Budhiraja S, Hooda A. Ethnomedicine: use in dental caries. *Brazilian Journal of Oral Sciences*. 2007;6(21):1308-12.
 16. 문혁수 외 8인. Triclosan 을 배합한 세치제의 치은염완화효과와 치면세균막형성억제효과 및 구강 질환원인균에 대한 항균효과에 관한 연구. *대한구강보건학회지*. 1998;22(2):171-82.
 17. Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T., Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *International Endodontic Journal*. 1998;31:1-7.
 18. Shimada E, Kataoka H, Miyazawa Y, Yamamoto M, Igarashi T. Lipoproteins of *Actinomyces viscosus* induce inflammatory responses through TLR2 in human gingival epithelial cells and macrophages. *Microbes and Infection*. 2012;14:916-21.
 19. Allaker RP, Douglas CWI. Novel antimicrobial therapies for dental plaque-related disease. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2009;33:8-13.
 20. Rusbene Bruno Fonseca De Carvalho et al. Nerolidol and its Pharmacological Application in Treating Neurodegenerative Diseases: A Review. *Recent Patents on Biotechnology*. 2018;12(3):158-68.

