

세포막손상 유발로 인한 황련의 캔디다 바이오필름 형성 억제

김연희

세명대학교 한의학과

Inhibition of *Candida albicans* Biofilm Formation by *Coptidis chinensis* through Damaging the Integrity of Cell Membrane

Younhee Kim

Department of Oriental Medicine, Semyung University, Chungbuk 390-711, Republic of Korea

(Received January 21, 2013 / Accepted February 6, 2013)

Candida biofilms are organized microbial communities growing on the surfaces of host tissues or indwelling medical devices, and the biofilms show enhanced resistance against the conventional antifungal agents. The roots of *Coptidis chinensis* have been widely used for medicinal purposes in East Asia. The present study was aimed to assess the effect of *C. chinensis* aqueous extract upon preformed biofilms of 10 clinical *Candida albicans* isolates and the antifungal activities which contribute to inhibit the *C. albicans* biofilm formation. Its effect on preformed biofilms was judged using XTT [2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide] reduction assay, and metabolic activity of all tested strains was reduced significantly ($57.3 \pm 14.7\%$) at $98 \mu\text{g/ml}$ of the *C. chinensis* extract. The extract damaged the cell membrane of *C. albicans* which was analyzed by fluorescein diacetate and propidium iodide staining. The anticandidal activity was fungicidal, and the extract obstructed the adhesion of *C. albicans* biofilms to polystyrene surfaces, arrested *C. albicans* cells at G_0/G_1 as well, and reduced the growth of biofilms or budding yeasts finally. The data suggest that *C. chinensis* has multiple antifungal effects on target fungi resulting in preventing the formation of biofilms. Therefore, *C. chinensis* holds great promise for exploring antifungal agents from natural products in treating and eliminating biofilm-associated *Candida* infection.

Keywords: *Candida albicans*, *Coptidis chinensis*, antifungal activity, biofilm, cell membrane

*Candida albicans*는 건강한 사람의 점막 상재균으로서, 심각한 질환에 걸렸거나 면역력이 약화된 환자에게 표재성 감염을 유발하며 점막상피를 통해 전신성 혈류감염을 유발하는 기회감염균이다(Odds *et al.*, 2001). *Candida* sp.는 병원내 감염의 주요 원인균으로서, 침습적 캔디다 감염의 90% 이상이 *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*에 기인하고 있고 전신적 캔디다증에 의한 사망률은 40% 이상에 이르고 있다(Pfaller and Diekema, 2007).

*C. albicans*는 숙주 조직에 침입하거나 숙주의 방어기작을 회피하게 하는 독성인자를 가지고 있는 다재다능한 병원성 미생물로서 이들이 가지는 독성인자로는 숙주 상피세포로의 부착을 매개하는 다양한 표면구조의 표현, 단세포성 효모형과 필라멘트성 균사형으로의 상호 형태변화 능력, 바이오필름 형성능력, 아스파르트산 단백질 분해효소나 phospholipase와 같은 가수분해효소의 분비, 환경변화에 대한 반응성 등을 들 수 있다(Calderone

and Fonzi, 2001; Haynes, 2001).

*C. albicans*의 주요한 독성인자로 여겨지는 바이오필름 형성 능력은 생물학적 표면이나 비생물학적 표면에 소군락을 형성하여 숙주를 감염시킬 수 있다(Douglas, 2003; Ramage *et al.*, 2006). 캔디다증은 주로 치과 임플란트, 카테타, 인공판막, 우회 혈관, 인공관절과 같은 체내에 삽입된 의료기구와 관련이 있으며, 이들 기구는 캔디다 바이오필름 성장에 대한 기질로 작용할 수 있다(Chandra *et al.*, 2001). 바이오필름은 캔디다의 은신처로 작용하여 숙주의 면역체계를 회피하고 다른 병원체로부터의 경쟁적 압박에서도 생존하게 하며 항진균제의 치료에도 내성을 나타내도록 하기 때문에(Chandra *et al.*, 2001) 전통적인 항진균제의 지속적인 사용을 어렵게 하고 있다. 또한 *C. albicans*에 의해 형성된 대부분의 질환이 바이오필름의 성장과 관련이 있는 것으로 보고되어 있다(Blankenship and Mitchell, 2006).

현재 심부 진균증의 치료에 사용되는 항진균제는 작용 메커니즘에 따라 세포막 기능의 변화(amphotericin B), DNA나 RNA 합성의 저해(flucytosine), ergosterol 생합성의 저해(azole [fluconazole]), glucan 합성을 저해(echinocandin [caspofungin])

*For correspondence. E-mail: ykim@semyung.ac.kr; Tel.: +82-43-649-1346; Fax: +82-43-649-1702

하는 네 가지 부류로 나눌 수 있다(Perea and Patterson, 2002). 지난 수십 년간 진균의 치료에는 진균 세포막의 ergosterol에 결합하는 암포테리신 B와 같은 살진균성 polyene이 사용되었고, 최근에는 비교적 사용이 용이한 azoles 계열의 정진균제가 항진균 치료제로 널리 사용되고 있다(Oliver *et al.*, 2008). 그러나 진균의 진핵세포적 특성과 더불어 제한된 약제의 반복적인 사용으로 인한 내성 균주의 출현, *Candida*의 환경변화에 대한 뛰어난 적응능력, 일부 환자에서의 심각한 부작용 등으로 인해 *Candida* 감염에 대한 치료는 결코 쉽지 않은 실정이다. 따라서 독성이 낮고 치료 효과가 좋은 새로운 항진균제의 개발이 절실하게 요구되고 있다. 최근 보편적인 미생물 통제 전략에 대한 대체요법으로 다양한 천연물에서 기반한 화합물이 사람들의 주목을 끌고 있는데, 그 이유는 이들 화합물들이 질병과 감염에 대한 치료 및 예방을 위해 오랜 역사 동안 민간 요법으로 널리 사용되어 안전하다고 여겨지기 때문이다(Guarrera, 2005). 황련(*Coptidis chinensis* Franch)은 미나리아재비과(Ranunculaceae)에 속하는 다년생 초본으로서 이 식물의 주성분은 isoquinoline 계열 alkaloid인 berberine과 palmatine, coptisine, berberastine 등(Ikuta *et al.*, 1984)이며, 이들 중 berberine은 항균작용(Ghosh *et al.*, 1985), 항염증 작용(Kuo *et al.*, 2004; Talhouk *et al.*, 2007), 국소 마취 및 항응고작용(Sabir and Bhide, 1971)을, palmatine은 심장 뇌 허혈-재관류 손상에 대한 보호 기능을 가지는 것으로 보고되어 있다(Kim *et al.*, 2009).

본 연구는 *C. chinensis*의 수용성 추출물이 칸디다증 환자들로부터 분리된 바이오필름 형성 임상 *Candida* 균주에 대해 우수한 항바이오필름 능력을 나타내며, 이러한 능력이 *C. albicans*의 세포막 기능억제, 살진균 활성 그리고 G_0/G_1 에서 S로의 세포주기의 진행억제와 관련된 복합적 효과와 관련이 있음을 XTT 환원분석법, fluorescein diacetate와 propidium iodide 이중 염색법, time-kill assay, 세포주기 분석을 통해 연구하였다.

재료 및 방법

식물추출물

건조된 황련(*C. chinensis*)의 뿌리를 jchanbang.com에서 구매하였다. 30 g의 황련을 600 ml의 증류수에 넣어 1시간 동안 불린 후 2시간 동안 끓였다. 2,000×g로 20분간 원심분리한 후 상등액을 진공농축기로 농축시키고 동결건조하여 황련의 수용성 추출물 6.1 g을 얻었다. 황련의 수용성 추출물(이하 *C. chinensis* 수용성 추출물)은 50 mg/ml의 농도로 증류수에 녹인 후 0.45 µm filter로 여과하여 사용 전까지 -20°C에 보관하였다.

균주 및 배양

Candida albicans (KCCM 50235, ATCC 18804), *C. glabrata* (KCCM 50044, ATCC 2001), *C. tropicalis* (KCCM 50075, ATCC 750), *C. krusei* (KCCM 11426, ATCC 32196)는 한국미생물 보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms, KCCM)에서 분양 받아 사용하였다. *C. albicans* (KCCM 50235)는 바이오필름 실험을 제외한 모든 실험에 사용되었으며, 칸디다증 환자로부터

분리된 10 *C. albicans* 균주는 바이오필름 실험에 사용되었다(Park *et al.*, 2009). 모든 균주는 -70°C에 보관하였고 필요시 YM agar 또는 YM 액체배지에서 계대배양 후 사용하였다.

최소 억제농도(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)

항진균 감수성 검사는 CLSI M27-A3 미량희석법(CLSI, 2008a)에 따라 수행하였으며 MIC는 성장이 현저히 감소되는 가장 낮은 농도로 결정하였다. MIC는 3회의 분석 중 최소한 2회 일치하거나 3회 중 가장 높은 값을 채택하였다. 양성 대조군으로 amphotericin B (Sigma, USA)를 포함시켰다.

바이오필름 형성과 *C. chinensis*의 항바이오필름 활성 측정

칸디다증 환자에서 분리한 10 *C. albicans* 균주에 대한 대수기의 배양액을 5% glucose가 첨가된 Yeast Nitrogen Base (YNB/Glucose)에 최종 1×10^7 cells/ml로 희석하였다. Flat-bottomed 96 well plate에 희석액을 각각 0.1 ml씩 넣고 37°C에서 3시간 배양하여 *C. albicans*가 바이오필름을 형성하게 하였다. 부유상태의 효모를 제거하고 YNB/Glucose로 행군 후 음성 대조군을 포함하여 *C. chinensis*가 포함된 0.2 ml의 YNB/Glucose를 각 well에 넣어 초기단계 바이오필름에 대한 *C. chinensis* 추출물의 저해효과를 조사하였다. 습도가 유지되는 조건에서 24시간 동안 37°C에서 반응시킨 후 바이오필름의 생존력을 XTT 환원분석법(Ramage *et al.*, 2001)에 따라 측정하였다. 모든 실험은 4개씩 3회 분석하였다. 데이터는 3회 실험 중의 하나를 나타낸다.

*C. albicans*의 폴리스티렌 표면 부착에 대한 *C. chinensis*의 영향

대수기의 *C. albicans* ATCC 18804 배양액을 YNB/Glucose에 최종 1×10^7 CFU/ml로 희석하였다. Flat-bottomed 96 well plate에 배양액을 0.1 ml 넣고 37°C에서 3시간 배양하여 *C. albicans*가 바이오필름을 형성하게 하였다. 부유상태의 효모를 조심스럽게 제거하고 YNB/Glucose로 행군 후 음성 대조군을 포함하여 *C. chinensis*가 포함된 0.2 ml의 YNB/Glucose를 각 well에 넣어 3시간과 24시간 후에 부유세포를 조심스럽게 제거한 후 폴리스티렌 바닥에 부착된 *C. albicans*를 위상차 현미경(Olympus, Japan)을 통해 분석하였다.

Time-kill curves

Time-kill assay는 Klepser 등(1998)의 방법을 변형하여 실행하였다. 대수기의 *C. albicans* ATCC 18804 배양액을 YM 배지에 2×10^4 CFU/ml로 희석한 후 음성 대조군을 포함하여 MIC의 *C. chinensis*를 넣은 후 37°C, 200 rpm으로 진탕 배양하였다. 정해진 시간마다 100 µl의 배양액을 새로운 튜브에 옮긴 후 20 초 이상 교반하여 출아 직후의 결합된 효모를 분리하였다. 증류수로 적당히 희석한 후 희석액 100 µl를 YM agar plate에 도말하여 37°C에서 24시간 배양한 후 집락의 갯수를 기록하였다. 결과에 나타난 집락의 수는 quadruplicate로 관찰된 실험 중 하나를 나타낸다.

Table 1. Inhibitory activity of the *C. chinensis* extract against *Candida* spp.

<i>Candida</i> species	Concentration of <i>C. chinensis</i> (µg/ml)	
	<i>C. chinensis</i>	Amphotericin B
<i>C. albicans</i> ATCC 18804	98	0.25
<i>C. glabrata</i> ATCC 2001	25	0.13
<i>C. krusei</i> ATCC 750	49	0.25
<i>C. tropicalis</i> ATCC 32196	12	0.13
<i>C. albicans</i> (clinical, n=10)	98	ND*

The MIC endpoint is based on visual determination using turbidity levels according to CLSI M27-A3 protocol. ND, not determined.

FUN-1/Calcofluor white 염색

대수기의 *C. albicans* ATCC 18804를 YNB/Glucose에 최종 2×10^6 CFU/ml로 희석하였다. 음성 대조군을 포함하여 MIC의 *C. chinensis*를 처리한 후 37°C, 200 rpm에서 3시간 동안 진탕 배양하였다. 1 ml의 배양액을 5,000×g로 1분간 원심분리하여 회수하고 PBS로 행군 후 50 µl PBS로 균질하게 녹였다. 제조사 (Molecular Probes, USA)에서 제공하는 방법에 따라 FUN-1 (20 µM)과 Calcofluor white (25 µM)를 넣어 상온의 암소에서 30분간 염색한 후 triple pass filter가 장착된 형광현미경(Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

Fluorescein diacetate/prodidium iodide 염색

대수기의 *C. albicans*를 2×10^6 CFU/ml로 희석한 후 음성 대조군을 포함하여 MIC의 *C. chinensis* 수용성 추출물을 처리하여 37°C, 200 rpm에서 각각 3시간과 6시간 동안 진탕 배양하였다. 1 ml의 배양액을 5,000×g로 1분간 원심분리하여 상등액을 제거한 후 100 µl의 working solution으로 침전물을 녹였다. Working solution은 PBS에 2 µg의 fluorescein diacetate (Sigma)와 1 µg의 propidium iodide (Sigma)를 넣어 준비하였다 (Jones and Senft, 1985). 상온에서 3분간 염색한 후 triple pass filter가 장착된 형광현미경을 통해 관찰하였다.

***C. chinensis*에 의한 세포주기 변화**

대수기의 *C. albicans* ATCC 18804 배양액(1×10^8 CFU/ml)에 *C. chinensis* 수용성 추출물을 처리한 후 37°C에서 200 rpm으로 진탕 배양하였다. 1시간과 3시간 후 각각 1 ml의 배양액을 5,000×g로 1분간 원심분리하여 세포를 회수한 후 PBS로 행군하였다. 1 ml의 4°C ethanol/PBS (7:3)를 넣고 -20°C에서 15분 이상 고정하여 세포막을 permeabilization시켰다. 0.5 ml의 PBS로 행군 후 다시 0.5 ml의 PBS를 넣고 최종 농도 200 µg/ml RNase A (Sigma)를 넣었다. 50°C에서 1시간 반응시킨 후, DNA 염색을 위해 50 µg의 propidium iodide를 넣고 30분간 어두운 곳에 놓아둔 후 Muse™ Cell Analyzer로 분석하였다.

Germ tube 형성

C. albicans (1×10^6 CFU/ml)가 포함된 0.1 ml의 fetal bovine serum에 10 µl의 *C. chinensis* 수용성 추출물을 넣은 후 37°C에서 3시간(Mackenzie, 1962)과 18시간 동안 배양하였다. 위상차

Table 2. The effect of the *C. chinensis* extract on the metabolic activity of preformed *C. albicans* biofilms, expressed as percentage inhibition

<i>C. albicans</i> clinical isolates	Concentration of <i>C. chinensis</i> (µg/ml)	
	196	98
	Inhibition (%)	
1	84.8 ± 1.8*	80.9 ± 4.3**
2	81.5 ± 1.7**	75.2 ± 7.2**
3	58.7 ± 1.3**	52.7 ± 7.1**
4	71.5 ± 2.3**	57.4 ± 4.4**
5	60.3 ± 5.7	31.3 ± 4.1**
6	69.5 ± 1.2**	64.9 ± 5.9**
7	60.8 ± 1.6*	59.7 ± 2.3**
8	65.0 ± 5.4**	40.7 ± 3.8**
9	61.6 ± 6.2**	51.4 ± 6.4**
10	59.5 ± 0.7*	58.7 ± 1.6**
Mean	67.3 ± 0.7	57.3 ± 14.7

Metabolic activity was assessed using the XTT reduction assay measuring the absorbance at 492 nm. Inhibition percentages were calculated as $100 \times (1 - A_{492} \text{ with } C. chinensis / A_{492} \text{ without } C. chinensis)$. The differences in the optical density (mean ± standard deviation) of individual biofilms incubated with *C. chinensis* extract and control values were calculated using Paired Student's t-test, and were considered statistically significant when p -value was ≤ 0.05 . The experiments were performed three times with four replicates. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

현미경을 통해 germ tube 형성에 대한 *C. chinensis* 수용성 추출물의 효과를 관찰하였다.

통계분석

모든 실험은 2 또는 3회 반복하였으며 통계분석은 t-test로, 두 그룹간의 차이는 Paired t-test로 SigmaPlot 10.0을 이용하여 분석하였다. p 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 것으로 보았다.

결과 및 고찰

캔디다혈증의 주요 원인균인 *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*에 대한 *C. chinensis* 수용성 추출물의 항진균 활성을 CLSI M27-A3 미량희석법에 의해 분석하였다(Table 1). *C. chinensis*의 *C. albicans* ATCC 18804에 대한 MIC는 98 µg/ml이었고, 분석에 이용한 표준균주 *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*에 대한 MIC 값도 25 µg/ml, 49 µg/ml, 12 µg/ml를 나타냈다. 정제된 amphotericin B의 MIC와 비교한다면 *C. chinensis* 수용성 추출물의 *Candida* sp.에 대한 MIC 값은 약 90-400배 높은 수치를 나타냈으나, 6가지 *Candida* sp.인 *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*에 대한 23가지 약초의 MIC값이 0.1-0.5 mg/ml (Rukayadi et al., 2008)이고, 8가지 식물추출물의 *C. albicans*와 *Aspergillus niger*에 대한 MIC가 0.5-0.9 mg/ml (Mathur et al., 2011)인 것과 비교한다면, *C. chinensis* 수용성 추출물의 항진균 활성은 비교적 우수한 것으로 판단된다. 캔디다증 환자에서 분리한 10 *C. albicans* 균주에 대한 *C. chinensis* 수용성 추출물의 MIC값 또한 표준 *C. albicans*로 사용된 *C. albicans* ATCC18804와 모두 동일한 98 µg/ml을 나타냈다(Table 1).

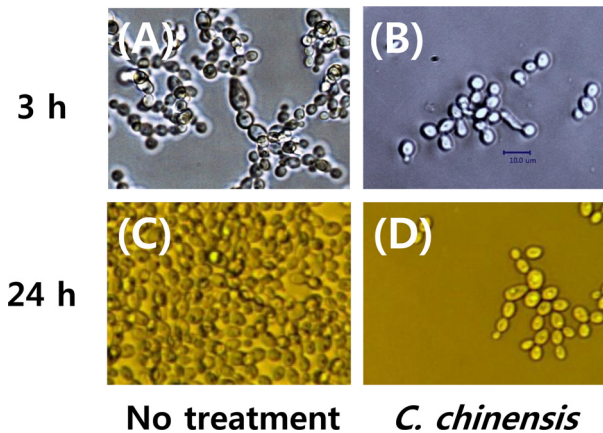


Fig. 1. Effect of the *C. chinensis* extract on cell adhesion. (A) *C. albicans* biofilm formed on polystyrene surface was incubated without (A and C) and with 98 μg/ml (B and D) of the plant extract for 3 and 24 h, respectively, and washed with PBS. Microscopic images of the adhered cells are shown. Bar, 10 μm.

다음의 실험에서 10 *C. albicans* 임상분리 균주들이 3시간 동안 형성한 바이오필름에 대해 *C. chinensis* 수용성 추출물의 바이오필름 제거효과를 XTT 환원법을 이용한 대사활성도로 조사하였다. 24시간 동안 *C. chinensis* 추출물에 노출된 바이오필름은 MIC (98 μg/ml)에서 $57.3 \pm 14.7\%$, 2MIC에서 $67.3 \pm 0.7\%$ 의 대사활성도가 감소되었고, Paired t-test로 분석한 대조군과의 차이는 대부분의 균주에서 95% 또는 99% 수준에서 유의성을 나타냈다(Table 2).

*C. albicans*의 폴리스티렌 표면 부착에 대한 *C. chinensis*의 영향을 알아보기 위해 3시간 동안 형성된 *C. albicans* 바이오필름에 *C. chinensis* 수용성 추출물을 처리한 후의 바이오필름 제거효과를 각각 3시간과 24시간 후에 위상차 현미경을 통해 분석하였다(Fig. 1). Fig. 1B에 보여지는 바와 같이 3시간의 *C. chinensis* 처리만으로도 바이오필름이 상당히 제거된 것을 관찰할 수 있었고, 24시간 동안 *C. chinensis*에 노출된 바이오필름의 경우 부착된 세포들의 상대적 비율이 훨씬 낮은 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1D). 세포가 부착된 모습도 대조군의 세포들은 건강한 세포들로서 바닥에 잘 부착되어 크고 어둡게 관찰되었지만 *C. chinensis* 추출물에 노출된 세포들은 부착상태가 좋지 않아 약간 밝고 작게 관찰이 되는 것을 확인할 수 있었다. 특히 Fig. 1의 사진으로 구분하기는 어렵지만, 위상차 현미경으로 관찰했을 때 대조군에서는 활발하게 움직이는 세포내 소포(vacuole)를 관찰할 수 있었으나, 실험군에서는 소포가 잘 보이지 않거나 움직임이 잘 관찰되지 않았다. 이들 소포의 존재는 많은 논문에 언급되어 있으며 가수분해효소를 함유하고 있어 동물세포의 리소솜(lysosome)에 해당되는 것으로 알려져 있다(Wienmken *et al.*, 1979; Gow and Gooday, 1982; Baba *et al.*, 1997; Isola *et al.*, 2009).

C. chinensis 수용성 추출물을 넣고 배양한 *C. albicans*의 시간대별 생존한 개체에 대한 colony count 분석법을 시행하였다. 9시간 동안 *C. chinensis*에 노출된 *C. albicans*의 생존률은 3.07

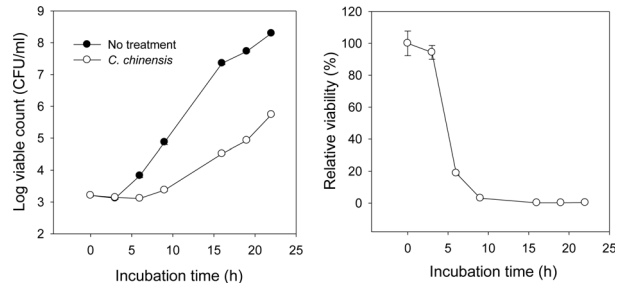


Fig. 2. Time-kill curves for the *C. chinensis* extract and relative viability of *C. albicans*. *C. albicans* cells (2×10^4 CFU/ml) were incubated with shaking in the absence and presence of *C. chinensis* (98 μg/ml) at 37°C, and a colony count assay was used to determine the candidacidal activity of the *C. chinensis* extract against *C. albicans*. Error bars represent standard deviations (n=4).

$\pm 0.49\%$ 이었고, 22시간 후의 생존률은 $2.80 \pm 0.02\%$ 로 98 μg/ml의 *C. chinensis* 수용성 추출물은 *C. albicans*에 대해 약 97%의 살진균 활성을 나타냈다(Fig. 2).

C. chinensis 수용성 추출물이 *C. albicans* 세포에 미치는 효과를 관찰하기 위해 3시간 동안 수용성 추출물에 노출된 *C. albicans*를 FUN-1과 Calcofluor white로 동시에 염색시켜 triple pass filter가 장착된 형광현미경을 통해 관찰하였다. Calcofluor white는 셀룰로오스와 키틴에 결합하는 염료로서 식물이나 진균류의 세포벽을 밝은 파란색의 형광으로 염색시킨다. FUN-1은 세포막을 통과할 수 있는 형광 probe로서 대사적으로 활발한 효모는 세포질에 붉은 CIVS (cylindrical intravacuolar structure)를 나타내지만(Millard *et al.*, 1997) 죽은 세포의 세포질은 옅은 담황색의 형광으로 염색시키므로 효모의 대사와 생존여부를 관찰하기에 적합하다. 특히 CIVS는 세포막이 온전하고 대사활성이 유지되는 살아있는 세포에서만 형성되며(Henry-Stanley *et al.*, 2004), 앞에서 언급한 라이소솜으로 여겨진다. Fig. 3A에 보여지는 바와 같이 대조군의 현미경적 이미지는 정상적인 출아 형태를 나타내고 있으며 붉은 색의 세포내 CIVS를 보여줌으로써 이들 세포가 대사적으로 활발한 살아있는 세포임을 시사한다. *C. chinensis* 추출물을 처리한 실험군(Fig. 3B)은 담황색의

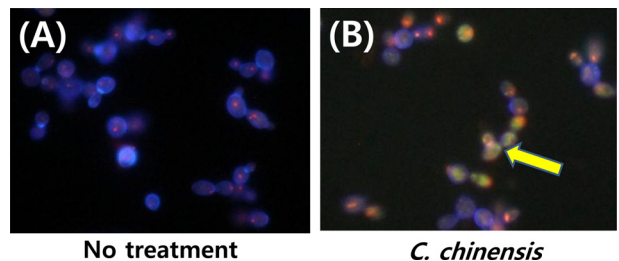


Fig. 3. FUN-1 and Calcofluor white double staining. Microscopic images of *C. albicans* cells stained with FUN-1 and Calcofluor white viewed by fluorescence microscope. (A) Viable *C. albicans* cells with characteristic orange-red CIVS inclusions; (B) *C. chinensis*-treated cells. Both live and dead yeast cell walls were stained with Calcofluor white. An arrow indicates yellow-green dead cells. Bar, 10 μm.

세포질을 나타내는 세포가 많았고 붉은 색의 CIVS를 함유하는 세포는 상대적으로 적게 발견되었다. 이 실험의 결과로 3시간의 *C. chinensis* 노출에 의해 많은 *C. albicans*가 죽어감을 확인할 수 있다.

Fluorescein diacetate는 형광을 발하지 않는 비극성의 ester로서 세포막을 통과하여 살아 있는 세포내의 esterase에 의해 가수분해되어 fluorescein을 형성한다. Fluorescein은 녹색의 형광을 발하는 극성의 화합물로서 세포막을 잘 통과하지 못하고 세포내에 축적된다. 그러나 세포막이 손상되었을 때 fluorescein은 세포막을 통과하므로 녹색의 형광을 발하지 않게 된다(Rotman and Papermaster, 1966; Jones and Senft, 1985). Propidium iodide는 손상된 세포막을 통과하여 DNA나 RNA에 삽입되므로 죽은 세포의 핵이 붉은 색의 형광을 띤다(Edidin, 1970; Krishan, 1975). 그러나 기능적인 세포막을 가지는 경우 세포는 propidium iodide를 배출하므로 형광을 발하지 않는다. 그러므로 fluorescein과 propidium iodide의 이중염색법은 살아있는 세포와 세포막이 손상되어 있거나 죽은 세포를 구분하는 방법으로 이용되고 있다. Fig. 4A에 보여지는 바와 같이 대조군은 세포질 전체에서 밝은 녹색의 형광이 방출되어 이들이 살아있는 세포들임을 시사한다. 그러나 *C. chinensis* 수용성 추출물을 처리한 실험군(Fig. 4B)은 propidium iodide에 의해 염색되어 붉은 형광을 발하였으며, 크기는 Fig. 4A보다 상대적으로 작아 이들의 핵이 염색되었음을 나타냈다. 이는 *C. chinensis* 수용성 추출물에 의해 *C. albicans*의 세포막이 손상되어 세포가 죽은 것을 암시한다. *C. chinensis* 추출물을 6시간 처리한 실험군의 경우 *C. albicans*의 세포막 손상 등으로 인한 죽은 세포의 수가 증가하여 붉은 색의 형광을 나타내는 세포의 수는 급격히 감소하였으며 세포파열 등에 의한 cell debris가 많이 관찰되었다(자료 미제시). Amphotericin B는 세포막의 주성분인 ergosterol에 소수성 상호작용으로 결합한 후 세포막의 구조적 재배열을 유도해 막채널 또는 구멍을 형성한다. Beggs는 막의 구멍을 통한 K⁺의 누출이 *C. albicans*의 죽음과 관계가 있음을 보고하였다(Beggs, 1994). 또한 amphotericin B의 살진균 효과는 H⁺, OH⁻를 포함한 작은 양이온과 음이온을 통과시킬 수 있는 막의 구멍을 형성하여 염의 통과로 인한 세포내 pH의 증가와 이에 따른 삼투를 증가시킨다. 세포내 pH의 증

가는 세포막을 손상시켜 세포를 죽음에 이르게 한다(Cohen, 1998). 정확한 메커니즘을 밝혀려면 좀더 심도있는 연구가 필요하지만 amphotericin B에서 보여지는 바와 같이 *C. chinensis*에 의한 세포막의 손상은 *C. albicans*의 죽음을 유발시키는 원인으로 작용하는 것 같다. 또한 이러한 살진균 효과가 캔디다의 바이오필름 형성을 억제하는 데 기여하는 주요인으로 생각된다.

C. chinensis 수용성 추출물이 *C. albicans*의 세포주기에 변화를 주는지 알아보기 위해 *C. chinensis* 수용성 추출물을 처리한 후 각각 1시간과 3시간 후의 세포주기의 변화를 MuseTM Cell Analyzer로 분석하였다. 대조군은 시간이 지남에 따라 G₀/G₁과 S기에 있는 세포들의 상대적 비율이 감소하면서 G₂기에 있는 세포들이 많아져 활발한 세포분열이 일어남을 나타냈다(Fig. 5A). 그러나 *C. chinensis* 수용성 추출물을 처리한 실험군에서는 1시간 후 대조군에 비해 오히려 G₀/G₁의 비율이 다소 감소하고 S기 세포들의 비율이 증가하여 *C. chinensis* 수용성 추출물이 다소 세포분열을 촉진하는 효과를 보여주었으나, 3시간 후에는 1시간 후와 비슷한 패턴이 그대로 유지되면서 *C. chinensis* 수용성 추출물이 캔디다 세포들을 G₀/G₁에서 머무르게 하여(G₀/G₁ arrest), S기로의 세포주기 진행을 억제함을 알 수 있었다(Fig. 5B). Berberine은 전립선암세포(Mantena *et al.*, 2006)와 교모세포종 T98G 세포(Eom *et al.*, 2008)에서 G₁ arrest와 세포사멸을 유도하는 것으로 보고되어 있는데, *C. chinensis*의 주성분 berberine의 *C. albicans*에 대한 G₀/G₁ arrest 효과가 바이오필름 형성억제에 기여하는 것으로 보인다.

병원성 진균 *C. albicans*는 효모, 가균사(pseudohyphae), 균사(hyphae)의 세 가지 형태로 자랄 수 있다. 효모형은 단세포로서 난원형이며 출아법으로 번식하지만 가균사와 균사는 사상균(filamentous fungi)으로 알려져 있으며(Thompson *et al.*, 2011) 균사는 일정한 두께의 관모양에 구멍이 있는 격막을 가지고 있지만 가균사는 길쭉한 타원형으로 수축부위에 의해 세포들이 나뉘어져 있어 효모형이 연결된 것 같은 형태를 취한다. *C. albicans*의 균사는 진균이 숙주세포의 상피를 통과하는 것을 돕는 것으로 생각되는 독성요인(Lo *et al.*, 1997)으로 균사의 성장은 영양소의 결핍, 특히 낮은 질소원에 반응하여 영양소를 찾아 균사로 자라는 반응으로 나타난다. 발아관(germ tube)은 균사형으로 형태변화가 일어날 때 처음 나타나는 원통형 구조이다. 다음의 실험에서 *C. albicans*의 발아관 형성에 대한 *C. chinensis* 수용성

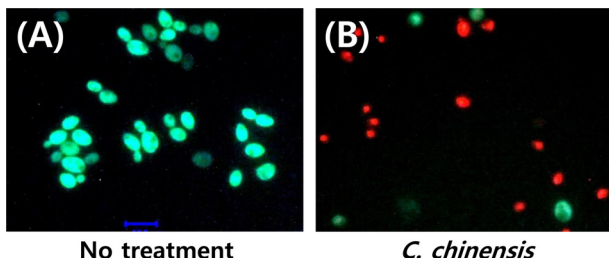


Fig. 4. Fluorescein diacetate and propidium iodide double staining. Microscopic images of *C. albicans* cells stained with fluorescein diacetate and propidium iodide viewed by fluorescence microscope. (A) Viable *C. albicans* with bright green fluorescence; (B) Membrane-damaged *C. albicans* with bright red fluorescence, mainly in the nucleus, treated with the *C. chinensis* extract. Bar, 10 μ m.

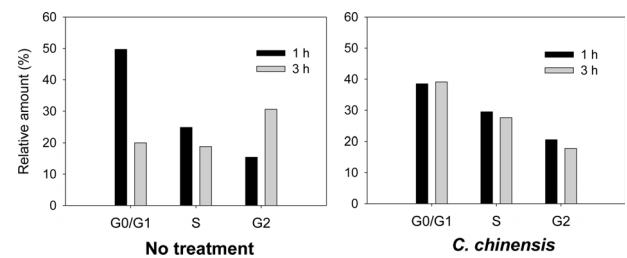


Fig. 5. Effect of the *C. chinensis* extract on cell cycle of *C. albicans*. *C. albicans* ATCC 18804 were stained with MuseTM Cell Cycle Kit, and acquired on the MuseTM Cell Analyzer. Population percentages were analyzed with the MuseTM cell cycle software module.

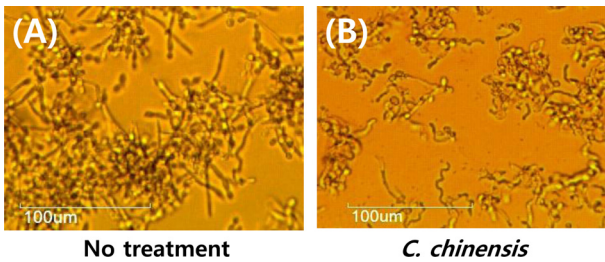


Fig. 6. Effect of the *C. chinensis* extract on germ-tube formation of *C. albicans*. Fetal bovine serum (0.1 ml) containing *C. albicans* cells (2×10^6 CFU/ml) was incubated in the absence (A) and presence (B) of the *C. chinensis* extract (98 µg/ml) at 37°C for 18 h and microscopic images are shown.

추출물의 효과를 분석하였다. 3시간 후 관찰된 *C. chinensis* 수용성 추출물의 *C. albicans* 발아관 형성에 대한 효과는 거의 없었다(자료 미제시). 그러나 18시간 후 관찰된 *C. albicans*의 형태는 상당한 형태적 차이를 나타냈다(Fig. 6). 통통하고 건강한 모습을 나타내는 대조군에 비해 *C. chinensis* 추출물을 처리한 실험군은 균사가 마르고 주글주글하며 비틀려 수축된 모습이였다. 또한 입체감이 사라져 바닥에 납작하게 부착된 모습을 보였고, 효모형도 작고 수축되어 검게 보이는 형태로 군데 군데 바닥에 분산된 모습을 보였다(Fig. 6B). 이 실험에서 *C. albicans*가 발아관을 형성하는 데 대한 *C. chinensis* 추출물의 억제효과는 거의 없었지만 *C. chinensis* 추출물의 존재하에서 형성된 균사가 대부분 병적인 형태를 띠며 죽어있는 세포들이 많은 것으로 보아 세포막 기능의 손상이나 다른 필수적 기능의 저해에 의해 정상적인 삶의 유지를 어렵게 하는 것으로 생각된다.

위의 결과들을 종합해보면, *C. chinensis* 수용성 추출물이 *C. albicans* 세포의 바이오필름 형성을 저해하는 것은 *C. albicans*의 세포막 손상유발로 인한 살진균 활성화, *C. albicans*의 폴리스티렌 표면으로의 부착 억제효과, G₀/G₁ arrest에 의한 출아 및 바이오필름 증식의 억제효과, 병적인 효모의 형성 등과 관련된 복합적인 항진균 활성화에 의해 기인한 것으로 보인다. 따라서 본 연구의 결과는 *C. chinensis* 추출물이 바이오필름과 관련된 칸디다의 감염을 치료하고 제거하기 위한 천연물 기반 항진균제 개발에 대한 가능성을 가짐을 시사한다.

적요

Candida 바이오필름은 숙주조직이나 인체에 삽입된 의료기구의 표면에 자라는 진균의 군락으로 전통적인 항진균제에 대한 내성을 유발한다. 황련(*Coptidis chinensis*)의 뿌리는 극동지방에서 의료용 목적으로 널리 사용되어 왔다. 본 연구의 목적은 임상에서 분리한 *C. albicans* 바이오필름 형성 균주가 형성한 바이오필름에 대한 *C. chinensis* 수용성 추출물의 효과와 *C. albicans* 바이오필름 형성을 저해하는 데 기여하는 항진균활성을 평가하는 데 있다. 바이오필름에 대한 효과는 XTT [2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide)] 환원 분석법을 사용하였으며, 조사된 모든 균주에 대한 대사활성은 98 µg/ml의 *C. chinensis* 수용성 추출물에 의해 현저하게 감소

($57.3 \pm 14.7\%$)되어 유의성 있는 항바이오필름 활성을 나타내었다. Fluorescein diacetate와 propidium iodide로 이중 염색한 결과 *C. chinensis* 추출물은 *C. albicans*의 세포막을 손상시켰다. *C. chinensis* 수용성 추출물은 살진균 활성을 나타냈고, *C. albicans* 바이오필름의 폴리스티렌 표면으로의 부착을 억제하였으며 *C. albicans*를 G₀/G₁기에 머무르게 하여 바이오필름이나 출아법에 의한 증식을 억제시켰다. 본 연구의 결과는 *C. chinensis* 추출물이 목표가 되는 *C. albicans*에 복합적으로 유해한 효과를 내어 궁극적으로는 *C. albicans* 바이오필름 형성을 억제함을 나타낸다. 따라서 *C. chinensis* 추출물은 바이오필름과 관련된 칸디다의 감염을 치료하고 제거하기 위한 천연물 기반 항진균제 개발에 대한 높은 가능성을 가진다.

참고문헌

- Baba, M., Osumi, M., Scott, S.V., Kliensky, D.J., and Ohsumi, Y. 1997. Two distinct pathways for targeting proteins from the cytoplasm to the vacuole/lysosome. *J. Cell Biol.* **139**, 1687-1695.
- Beggs, W.H. 1994. Physicochemical cell damage in relation to lethal amphotericin B action. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 363-364.
- Blankenship, J.R. and Mitchell, A.P. 2006. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**, 588-594.
- Calderone, R.A. and Fonzi, W.A. 2001. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* **9**, 327-335.
- Chandra, J., Kuhn, D.M., Mukherjee, P.K., Hoyer, L.L., McCormick, T., and Ghannoum, M.A. 2001. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J. Bacteriol.* **183**, 5385-5394.
- CLSI. 2008a. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard-third edition; CLSI document M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.
- Cohen, B.E. 1998. Amphotericin B toxicity and lethality: a tale of two channels. *Int. J. Pharmaceutics* **162**, 95-106.
- Douglas, L.J. 2003. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol.* **11**, 30-36.
- Edidin, M. 1970. A rapid, quantitative fluorescence assay for cell damage by cytotoxic antibodies. *J. Immunol.* **104**, 1303-1306.
- Eom, K.S., Hong, J.M., Youn, M.J., So, H.S., Park, R., Kim, J.M., and Kim, T.Y. 2008. Berberine induces G1 arrest and apoptosis in human glioblastoma T98G cells through mitochondrial/caspases pathway. *Biol. Pharm. Bull.* **31**, 558-562.
- Ghosh, A.K., Bhattacharyya, F.K., and Ghosh, D.K. 1985. Amastigote inhibition and mode of action of berberine. *Exp. Parasitol.* **60**, 404-413.
- Gow, N.A.R. and Gooday, G.W. 1982. Vacuolation, branch production and linear growth of germ tubes form *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* **128**, 2195-2198.
- Guarnera, P.M. 2005. Traditional phytotherapy in central Italy. *Fitothérapie* **76**, 1-25.
- Haynes, K. 2001. Virulence in *Candida* species. *Trends Microbiol.* **9**, 591-596.
- Henry-Stanley, M.J., Gami, R.M., and Wells, C.L. 2004. Adaptation of FUN-1 and Calcofluor white stains to assess the ability of viable and nonviable yeast to adhere to and be internalized by cultured mammalian cells. *J. Microbiol. Methods* **59**, 289-292.
- Ikuta, A., Kobayashi, A., and Itokawa, H. 1984. Studies on the

- quantitative analysis of protoberberine alkaloids in Japanese, Chinese and other countries *Coptis* rhizomes by thin-layer chromatography-densitometry. *Shoyakugaku zasshi* **38**, 279-282.
- Isola, M., Isola, R., Lantini, M.S., and Riva, A.** 2009. The three-dimensional morphology of *Candida albicans* as seen by high-resolution scanning electron microscopy. *J. Microbiol.* **47**, 260-264.
- Jones, K.H. and Senft, J.A.** 1985. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *J. Histochem. Cytochem.* **33**, 77-79.
- Kim, Y.M., Ha, Y.M., Jin, Y.C., Shi, L.Y., Lee, Y.S., Kim, H.J., Seo, H.G., Choi, J.S., Kim, Y.S., Kang, S.S., and et al.** 2009. Palmatine from *Coptidis* rhizoma reduces ischemia-reperfusion-mediated acute myocardial injury in the rat. *Food Chem. Toxicol.* **47**, 2097-2102.
- Klepser, M.E., Ernst, E.J., Lewis, R.E., Ernst, M.E., and Pfaller, M.A.** 1998. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: proposal for standardized methods. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 1207-1212.
- Krishan, A.** 1975. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J. Cell Biol.* **66**, 188-193.
- Kuo, C.L., Chi, C.W., and Liu, T.Y.** 2004. The anti-inflammatory potential of berberine *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Lett.* **203**, 127-137.
- Lo, H.J., Kohler, J.R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A., and Fink, G.R.** 1997. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* **90**, 939-949.
- Mackenzie, D.W.R.** 1962. Serum tube identification of *Candida albicans*. *J. Clin. Pathol.* **15**, 563-565.
- Mantena, S.K., Sharma, S.D., and Katiyar, S.K.** 2006. Berberine, a natural product, induces G1-phase cell cycle arrest and caspase-3-dependent apoptosis in human prostate carcinoma cells. *Mol. Cancer Ther.* **5**, 296-308.
- Mathur, A., Singh, R., Yousuf, S., Bhardwaj, A., Verma, S.K., Babu, P., Gupta, V., Prasad, G.B.K.S., and Dua, V.K.** 2011. Antifungal activity of some plant extracts against clinical pathogens. *Adv. Appl. Sci. Res.* **2**, 260-264.
- Millard, P.J., Roth, B.L., Thi, H-P., Yue, S.T., and Haugland, R.P.** 1997. Development of the FUN-1 family of fluorescent probes for vacuole labeling and viability testing of yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2897-2905.
- Odds, F.C., Gow, N.A., and Brown, A.J.** 2001. Fungal virulence studies come of age. *Genome Biol.* **2**, reviews 1009.1-1009.4.
- Oliver, B.G., Silver, P.M., Marie, C., Hoot, S.J., Leyde, S.E., and White, T.C.** 2008. Tetracycline alters drug susceptibility in *Candida albicans* and other pathogenic fungi. *Microbiology* **154**, 960-970.
- Park, S.J., Choi, S.J., Shin, W.S., Lee, H.M., Lee, K.S., and Lee, K.H.** 2009. Relationship between biofilm formation ability and virulence of *Candida albicans*. *J. Bacteriol. Virol.* **39**, 119-124.
- Perea, S. and Patterson, T.F.** 2002. Antifungal resistance in pathogenic fungi. *Clin. Infect. Dis.* **35**, 1073-1080.
- Pfaller, M.A. and Diekema, D.J.** 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**, 133-163.
- Ramage, G., Martinez, J.P., and Lopez-Ribot, J.L.** 2006. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res.* **6**, 979-986.
- Ramage, G., Vande-Walle, K., Wickes, B.L., and Lopez-Ribot, J.L.** 2001. Standardized method for *in vitro* antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 2475-2479.
- Rotman, B. and Papermaster, B.W.** 1966. Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **55**, 134-141.
- Rukayadi, Y., Shim, J.-S., and Hwang, J.-K.** 2008. Screening of Thai medicinal plants for anticandidal activity. *Mycoses* **51**, 308-312.
- Sabir, M. and Bhide, N.** 1971. Study of some pharmacologic actions of berberine. *Ind. J. Phys. Pharm.* **15**, 111-132.
- Talhok, R.S., Karam, C., Fostok, S., El-Jouni, W., and Barbour, E.K.** 2007. Anti-inflammatory bioactivities in plant extracts. *J. Med. Food.* **10**, 1-10.
- Thompson, D.S., Carlisle, P.L., and Kadosh, D.** 2011. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. *Eukaryot. Cell* **10**, 1173-1182.
- Wiemken, A., Schellenberg, M., and Urech, K.** 1979. Vacuoles: The sole compartment of digestive enzymes in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)? *Arch. Microbiol.* **123**, 23-25.