

Postantibiotic Effects of Photodynamic Therapy Using Erythrosine and Light Emitting Diode on *Streptococcus mutans*

Min Seok Yoo and Si Young Lee*

Department of Microbiology and Immunology, College of Dentistry, Research Institute of Oral Science, Gangneung-Wonju National University

(received January 27, 2016; revised February 25, 2016; accepted February 26, 2016)

Dental caries, the most common oral disease, is a multifactorial disease caused by interactions among bacteria within the dental plaque, food, and saliva, resulting in tooth destruction. *Streptococcus mutans* has been strongly implicated as the causative organism in dental caries and is frequently isolated from human dental plaque. Photodynamic therapy (PDT) is a technique that involves the activation of photosensitizer by light in the presence of tissue oxygen, resulting in the production of reactive radicals capable of inducing cell death. Postantibiotic effect (PAE) is defined as the duration of suppressed bacterial growth following brief exposure to an antibiotic. In this study, the *in vitro* PAE of PDT using erythrosine and light emitting diode on *S. mutans* ATCC 25175 was investigated. The PAE of PDT for 1 s irradiation and 3 s irradiation were 1.65 h and 2.1 h, respectively. The present study thus confirmed PAE of PDT using erythrosine on *S. mutans*.

Key words: postantibiotic, photodynamic therapy, *streptococcus*, erythrosine

*Correspondence to: Si Young Lee, Department of Oral Microbiology, College of Dentistry, Research Institute of Oral Science, Gangneung-Wonju National University, Gangneung, 210-702, Korea.
Tel.: +82-33-640-2455, Fax: +82-33-642-6410
E-mail: siyoung@gwnu.ac.kr
ORCID: 0000-0001-8826-1413

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 론

치아우식은 가장 흔한 구강 질환으로 치태, 음식, 세균 간의 상호작용에 의한 치아파괴의 결과를 나타내는 질환이다. *Streptococcus mutans*는 충치 원인균으로 알려져 있으며, 사람의 치태에서 빈번히 분리된다[1]. 기계적인 잇솔질과 같은 기계적인 방법으로 치면 세균막을 제거하는 것이 치아우식증을 예방하는 가장 효과적인 방법이다. 그러나 이러한 방법을 환자가 제대로 시행하지 않는 경우 치아우식증 예방효과를 기대하기 힘들다는 단점이 있다. 백신을 사용하여 치아우식 원인균을 억제하려는 많은 연구가 진행되고 있다. 하지만 임상적으로 이용 가능한 백신의 개발에는 많은 한계가 있다.

광역학 치료(photodynamic therapy, PDT)는 치아우식증을 예방하기 위해 최근에 연구되고 있는 방법 중 하나이다. 광역학 치료는 암, 피부과 질병 및 여러 질병에 대한 치료 방법 중 한 가지로[2] 세포나 미생물 등을 빛에 의해 불활성화 시키는 방법으로 1904년 의료에 도입되었다[3]. 광역학 치료에 의한 세포 내 작용기전의 시작은 광물리현상에 의한 것으로, 바닥상태의 광감작제를 특정 파장의 빛으로 활성화시키면 단일항 상태나 삼중항 상태로 되고 여기서 바닥상태로 될 때 방출되는 에너지가 산소와 반응하여 활성산소를 생성시키거나 감작제가 전자전달계에 관여하는 경우 자유라디칼이 형성되어 세포파괴를 일으키게 된다[4]. 치과영역의 광역학 치료에 사용되는 광감작제 중 하나인 erythrosine은 분홍색의 합성물로 식용 염료, 치태 착색제 등으로 사용된다[5]. 이전의 연구에서

erythrosine과 4가지 파장의 light emitting diode(LED) 광원을 이용하여, 우식 원인균을 대상으로 광원의 효과를 비교하였는데, 그 결과 erythrosine과 LED 녹색 파장에서 *S. mutans*에 대하여 우수한 살균효과를 관찰하였다[6]. 또한 Park 등의[7] 연구에서는 우식유발 세균인 *S. mutans*에 대해 최소살균농도 이하의 erythrosine 광역학 치료에서 클로르헥시딘이 광역학 치료에 의한 항균 작용을 상승(synergy) 시킨다고 보고하였다.

항생제를 짧은 시간 동안 세균에 처리하고 난 후 세균에서 항생제를 제거하여 항생제 농도가 떨어지더라도 세균이 정상적인 증식속도로 회복되기까지는 많은 시간이 소요되어 항생제 처리 후 세균의 증식이 억제되는 효과를 보이게 된다[8]. 이러한 현상을 postantibiotic effect(PAE)라고 하며[9] 다양한 세균 종에 대하여 여러 종류의 항생제들이 PAE를 나타낸다고 알려져 왔다[10]. 또한 높은 농도의 항생제(supra-inhibitory antibiotic concentration)를 처리한 세균에 다시 sub-minimum inhibitory concentration effect(Sub-MIC)의 항생제를 처리하면 그 항생제에 노출된 적이 없는 세균에 비해 증식에 필요한 시간이 더욱 늘어나는 효과인 postantibiotic sub-MIC effect(PA SME)와 항생제에 노출된 적이 없는 세균을 sub-MIC의 항생제를 처리하였을 때 나타나는 효과인 sub-MIC effect(SME)도 보고되고 있다[11].

현재까지 보고된 바에 따르면 여러 종류의 항생제와 항균물질이 PAE를 유발한다고 알려져 있으나, 세균을 짧은 시간 동안 광역학 치료 방법으로 처리 후에도 항생제의 경우에서와 같이 세균에서 PAE 유사효과가 발생하는지는 알려진 바가 없다. 본 연구에서는 *S. mutans*를 대상으로 erythrosine과 LED를 이용한 광역학 치료 방법으로 처리 후에 PAE 유사효과가 유발되는지를 조사하였다.

재료 및 방법

광감작제와 광원

Erythrosine(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 광감작제로 사용하였다. Erythrosine은 1% phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)으로 녹여 최종 농도 500 μM 으로 제조하여 필터 멸균하여 -20°C 의 어두운 곳에 보관하며 실험에 사용하였다. 광원으로는 LED green(3 W; Photron Co. Ltd., Seoul, Korea)을 사용하였다.

사용 균주 및 배양조건

본 연구에서 사용한 균주는 *Streptococcus mutans* ATCC 25175 이다. *S. mutans*는 Brain Heart Infusion(BHI,

Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) 액체 배지에 접종하여 37°C , 5% CO_2 배양기에서 18시간 배양하였다

Erythrosine 광역학 치료에서 최소살균농도의 측정

Erythrosine 광역학 치료에서 세균 치사에 필요한 최소 처리 시간을 조사하기 위하여, 0.5 μM erythrosine 농도에서 시간을 달리하여 항균효과를 비교하였다. 실험에 사용한 미생물현탁액은 1×10^9 CFU/ml로 희석하여 24-well cell culture plate well(SPL Life Sciences, Pocheon-si, Gyeonggi-do, Korea)에 넣고 erythrosine(최종농도, 0.5 μM)을 첨가한 후 LED green을 사용하여 1초, 3초, 5초 그리고 10초 동안 광 조사를 시행하였다. Cell culture plate well의 최종 액의 양은 2 ml였다. 광 조사 시행 후 BHI plate에 Spiral plate(IUL Instrumunts, Barcelona, Spain)를 사용하여 50 μl 도말하였다. 3일간 배양 후 세균 자동집락계수기(IUL Instrumunts)로 콜로니 수를 측정하였다. 각각의 광 조사 시간에 따른 세균 수를 비교하여 erythrosine 광역학 치료에서 최소살균에 필요한 광 조사 시간을 조사하였다.

Postantibiotic phase의 유발 및 Postantibiotic effect (PAE)의 측정

0.5 μM erythrosine 농도에서 LED green 광 조사 시간 5초를 최소살균에 필요한 광 조사 시간으로 정하고 이보다 짧은 광 조사를 하였다. *S. mutans*를 18시간 배양하여 최대 증식 단계에서 세균 배양 배지로 $\text{OD}_{660}=0.1$ 되게 현탁하고, erythrosine 0.5 μM 농도에서 LED green을 1초와 3초로 각각 처리하였다. 대조군으로는 세균 배양 배지에서 배양하고 erythrosine 및 광 조사 처리 하지 않은 세균을 사용하였다. Erythrosine을 광 조사 처리 후 PBS로 3회 세정하여 완전히 제거하였다. PAE 측정을 위하여 광역학 치료 방법으로 전처리된 세균과 처리되지 않은 세균을 새로운 배양 배지에 접종하고 CO_2 배양기에 배양하며 일정 시간 간격으로 세균 배양액의 현탁도를 660 nm에서 측정하였다. 대조군과 실험군에서 접종된 세균의 수가 유사한지는 매 실험 마다 BHI 고체배지에 세균을 도말하고 3일간 배양 후 세균 집락을 계수하여 확인하였다. 세균의 성장 곡선을 그리고, 세균의 성장이 지연된 정도를 아래의 방법으로 계산하여 PAE를 조사하였다.

$$\text{PAE} = T - C$$

T는 광역학 치료에 전처리된 세균을 새로운 배지에 배양했을 때의 세균 성장곡선에서 최대 흡광도 값의 50%에 도달하는데 걸리는 시간이며, C는 광역학 치료를

하지 않은 세균의 성장곡선에서 최대 흡광도 값의 50%에 도달하는 시간으로 세균의 성장 지연 시간은 이 두 시간의 차이로 계산하였다[12].

연구 결과

Erythrosine 광역학 치료에서 세균 치사에 필요한 최소 처리 시간을 조사한 결과에서 최소살균에 필요한 광 조사

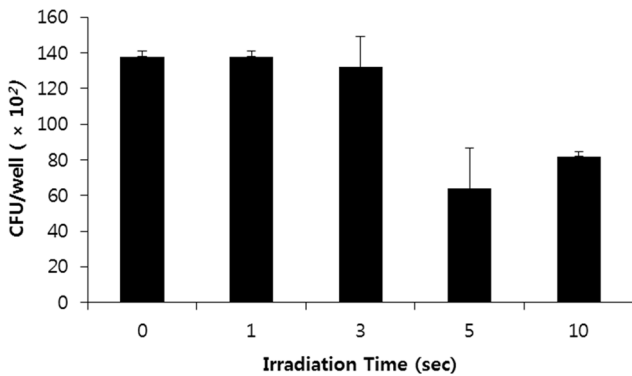


Fig. 1. Colony forming units(CFU) after photodynamic therapy of erythrosine (0.5 μM) and LED green irradiation. The bacterial suspensions were treated with erythrosine (0.5 μM) and LED green irradiation and plated on BHI agar plates. After 3 day incubation, the CFUs were counted. The values are the means of measurements of two experiments and the error bars indicate standard deviations of the mean.

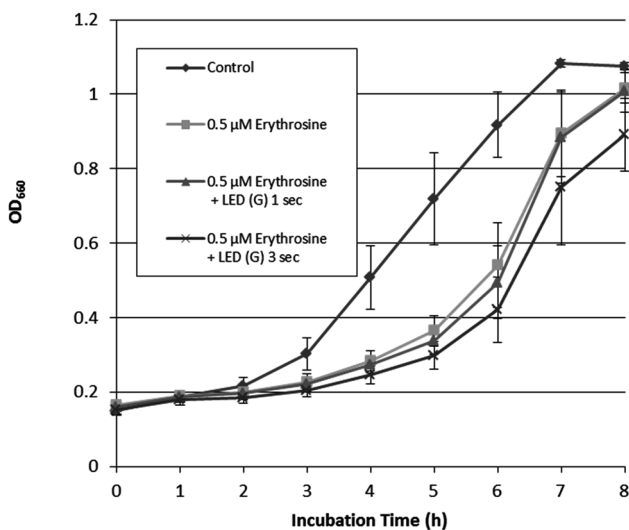


Fig. 2. PAE of photodynamic bactericidal effects of erythrosine with LED against *S. mutans*. The PAE was induced by erythrosine and 1 s or 3 s LED irradiation. PDT effects of erythrosine were eliminated by washing. The values are the means of measurements of three experiments and the error bars indicate standard deviations of the mean.

Table 1. PAE of photodynamic therapy of erythrosine and LED against *S. mutans*

PDT	PAE (h) ^a
Erythrosine only	1.60 ± 0.49
Erythrosine + LED 1 sec	1.73 ± 0.52
Erythrosine + LED 3 sec	2.12 ± 0.65

^a mean ± SD of three experiments

시간은 0.5 μM erythrosine 농도에서 5초로 조사되었으며 1초와 3초에서는 살균작용이 관찰되지 않았다(Fig. 1). 0.5 μM erythrosine 농도에서 LED green 광 조사 시간 5초를 최소살균에 필요한 광 조사 시간으로 정하고 이보다 짧은 광 조사를 하여 PAE 유사효과를 측정된 결과는 Fig. 2에 세 번 실험의 평균값을 성장곡선으로 표시하였으며, 결정된 PAE 유사효과 값은 Table 1에 정리하였다. Erythrosine만 첨가하였을 경우 1.60시간의 PAE 유사효과를 유발하였고 erythrosine 첨가 후 LED green을 오래 처리할수록 처리시간에 따라 각각 1.73시간과 2.12시간으로 더 긴 PAE 유사효과를 유발하였다.

고찰

치아우식을 예방하기 위해서 많은 방법들이 개발되고 있으며, 광감작제를 사용하여 치아우식을 유발하는 세균을 억제할 수 있는 광역학 치료는 1990년대부터 꾸준히 연구되고 있다[13-15]. 광역학 치료에 사용되는 광감작제는 세균의 세포벽에 친화성이 있으며, 광 조사에 의해 활성화된다. 이렇게 활성화된 광감작제 분자는 세균의 세포벽에 손상을 일으켜 인접 세포벽 분자에 에너지를 전이시키고, 세균을 손상시키거나 사멸시킬 수 있는 활성 산소나 자유라디칼을 생성하게 됨으로써 항균효과를 가지게 된다[16-19]. 이전 연구에 따르면 erythrosine과 LED를 사용한 광역학 치료에서 부유상태의 *S. mutans*에 항균효과가 있다고 보고하였다[6]. 광감작제인 erythrosine은 치과영역에서 치태 착색제로 널리 사용되고 있으며, 인체에 독성이 없다고 보고되고 있다[5]. 또한 Wood 등의[20] 연구에 따르면 *S. mutans* 바이오필름에 대한 erythrosine과 methylene blue, photofrin을 사용한 광역학 치료의 효과를 비교한 결과 erythrosine이 광감작제의 특징이 뛰어난 methylene blue와 photofrin보다 더 효과적인 광감작제임을 확인하였다.

항생제 처리 후 세균의 증식이 억제되는 효과인 PAE는 항생제와 세균의 각각의 조합에 따라 특이한 양상으로 나타난다[9]. 하지만 항생제 처리 후 세균 증식 억제를 유발

하는 정확한 기전은 잘 알려져 있지 않다. 그러나 항생제가 결합한 세포 수용기로부터의 확산되는데 걸리는 시간, 항생제에 의해 손상된 세포가 정상적으로 회복되는데 요구되는 시간, 세균 내 성장 억제 물질의 생산, DNA 합성의 영향 등이 가능한 기전으로 제시되고 있다[21]. 본 연구에서 관찰된 PDT 후의 PAE 효과도 항생제에서와 유사한 기전에 의해 유발될 것으로 추정된다.

본 실험에 사용된 erythrosine은 잇솔질 교육을 시행할 때 치아에 바르고, 착색된 치면의 잔류 치태를 제거하기 위해 자주 이용된다. 그리고 LED도 시중에서 널리 이용되고 있다. 본 연구는 치과 진료실에서 쉽게 구할 수 있는 치태 착색제를 광감작제로 이용하고, 광원으로는 LED를 이용한 광역학 치료에 의해서 치아우식 원인세균인 *S. mutans*에서 PAE 유사효과가 유발될 수 있다는 점을 제시하였다는 점에서 본 연구의 의의가 있다고 할 수 있다. 아직까지 광역학 치료에 의해서 세균에 PAE 유사효과가 유발된다는 연구는 발표된 적이 없으며, 본 연구가 처음이다.

PAE를 연구한 대부분의 실험에서 PAE 유발을 위하여 MIC보다 10배 이상 높은 농도의 항균물질로 세균을 짧은 시간 동안 전처리 한 후 PAE를 관찰하였다. 그러나 본 실험에서는 광역학 치료법의 효과가 매우 뛰어나서 세균 치사에 필요한 시간 보다 짧은 시간으로 전처리 시에도 세균의 수가 급격히 감소되어 PAE 유사효과를 측정하기가 힘들었기 때문에, PAE 유사효과 관찰을 위한 세균 전처리에 세균 치사에 필요한 광 조사 시간 보다 짧은 시간을 실험에 사용하였다. 본 실험의 결과에서 광 조사를 하지 않은 군에서도 PAE 유사효과가 유발되는 이유는 실험 환경에서 노출되는 가시광선에 의해서 erythrosine 감작 가능성에 의한 것이라 추정된다.

본 연구를 통하여 광역학 치료 시 치태 내에 일부 부위에서 광감작제의 농도가 충분하지 않은 경우나 혹은 광 조사가 충분히 미치지 못하는 부위에서도, 세균의 치사 효과는 일어나지 않더라도 세균에서 PAE 유사효과가 유발됨으로써 세균 억제 효과를 일부 기대할 수 있는 가능성을 제시하였다. 본 실험에서 치아우식 원인세균 중 한 가지로 알려진 *S. mutans*가 erythrosine과 LED를 이용한 광역학 치료 시 PAE 유사효과가 유발된다는 것을 확인하였다. *S. mutans* 이외의 다른 치태 구성세균에 대한 PDT 처리 후 PAE 유사효과 유발 가능성에 대해서는 추가적인 연구를 통해 밝혀져야 할 것이다.

References

1. Loesche WJ. Role of *streptococcus mutans* in human dental

- decay. *Microbiol Rev.* 1986;50:353-380.
2. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: A new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci.* 2004;3:436-450. doi: 10.1039/b311900a.
3. Malik R, Manocha A, Suresh DK. Photodynamic therapy--a strategic review. *Indian J Dent Res.* 2010;21:285-291. doi: 10.4103/0970-9290.66659.
4. Ochsner M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J Photochem Photobiol B.* 1997;39:1-18.
5. Lin GH, Brusick DJ. Mutagenicity studies on FD&C red no.3. *Mutagenesis.* 1986;1:253-259.
6. Lee SY, Chang BS, Um HS, Ma DS. Comparison of photodynamic bactericidal effects of erythrosine against *streptococcus mutans* and *streptococcus sobrinus* by different wavelength of LED lights. *J Korean Acad Oral Health.* 2012;36:20-25.
7. Park JC, Park HW, Lee SY. Enhancement of erythrosine photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* by chlorhexidine. *J Korean Acad Pediatr Dent.* 2013;40(4):241-246. doi: 10.5933/JKAPD.2013.40.4.241.
8. Bozkurt-Guzel C, Gerceker AA. Post-antibiotic effect of colistin, alone and in combination with amikacin, on *pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cystic fibrosis patients. *J Antibiot (Tokyo).* 2012;65:83-86. doi: 10.1038/ja.2011.101.
9. Zhanel GG, Hoban DJ, Harding GK. The postantibiotic effect: A review of *in vitro* and *in vivo* data. *DICP.* 1991;25:153-163. doi: 10.1177/106002809102500210.
10. Odenholt I. Pharmacodynamic effects of subinhibitory antibiotic concentrations. *Int J Antimicrob Agents.* 2001;17:1-8. doi: 10.1016/S0924-8579(00)00243-0.
11. Odenholt TI, Lowdin E, Cars O. Postantibiotic sub-MIC effects of vancomycin, roxithromycin, sparfloxacin, and amikacin. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992;36:1852-1858. doi: 10.1128/AAC.36.9.1852
12. Lowdin E, Odenholt-Tornqvist I, Bengtsson S, Cars O. A new method to determine postantibiotic effect and effects of subinhibitory antibiotic concentrations. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993;37:2200-2205. doi: 10.1128/AAC.37.10.2200
13. Wilson M. Photolysis of oral bacteria and its potential use in the treatment of caries and periodontal disease. *J Appl Bacteriol.* 1993;75:299-306. doi: 10.1111/j.1365-2672.1993.tb02780.x.
14. Wilson M, Dobson J, Sarkar S. Sensitization of periodontopathogenic bacteria to killing by light from a low-power laser. *Oral Microbiol Immunol.* 1993;8:182-187. doi: 10.1111/j.1399-302X.1993.tb00663.x.
15. Wilson M, Burns T, Pratten J, Pearson GJ. Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low-power laser light in the presence of a photosensitizer. *J Appl Bacteriol.* 1995;78:569-574.
16. Sibata CH, Colussi VC, Oleinick NL, Kinsella TJ. Photodynamic therapy: A new concept in medical treatment. *Braz J Med Biol Res.* 2000;33:869-880. doi: 10.1590/S0100-879X2000000800002.
17. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy

- (PACT). *J Antimicrob Chemother.* 1998;42:13-28. doi: 10.1093/jac/42.1.13.
18. Zvi M, Judith H, Yeshayau N. New trends in photobiology bactericidal effects of photoactivated porphyrins - an alternative approach to antimicrobial drugs. *J Photochem Photobiol B.* 1990;5:281-293. doi: 10.1016/1011-1344(90)85044-W.
19. Tamietti BF, Machado AH, Maftoum-Costa M, Da Silva NS, Tedesco AC, Pacheco-Soares C. Analysis of mitochondrial activity related to cell death after PDT with AIPCS(4). *Photomed Laser Surg.* 2007;25:175-179. doi: 10.1089/pho.2007.2040.
20. Wood S, Metcalf D, Devine D, Robinson C. Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. *J Antimicrob Chemother.* 2006;57:680-684. doi: 10.1093/jac/dkl021.
21. Li RC, Lee SW, Kong CH. Correlation between bactericidal activity and postantibiotic effect for five antibiotics with different mechanisms of action. *J Antimicrob Chemother.* 1997;40:39-45. doi: 10.1093/jac/40.1.39