

## 단삼에 의한 *Candida albicans* 바이오필름 발달의 억제

이흥식<sup>1</sup>, 김연희<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>고려대학교 생명정보공학과

<sup>2</sup>세명대학교 한의학과

Received: January 18, 2019 / Revised: February 16, 2019 / Accepted: February 26, 2019

### Growth of *Candida albicans* Biofilm is Inhibited by *Salvia miltiorrhiza*

Heung-Shick Lee<sup>1</sup> and Younhee Kim<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biotechnology and Bioinformatics, Korea University, Sejongsi 30019, Republic of Korea

<sup>2</sup>Department of Korean Medicine, Semyung University, Jecheon 27136, Republic of Korea

*Candida albicans* is an opportunistic human pathogen that causes infections. *Candidiasis* is often related to antifungal resistance because the pathogen has the ability to form biofilms. In a previous study, we found that the *Salvia miltiorrhiza* ethanol extract demonstrated anticandidal activity by altering membrane permeability and inhibiting the cell wall synthesis in *C. albicans*. Our results here demonstrate that 78 µg/ml of the *S. miltiorrhiza* extract significantly diminished the early stage biofilms formed by 10 clinical *C. albicans* isolates by 51.3%; this was analyzed by 2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide salt (XTT) reduction assay. The effect of the *S. miltiorrhiza* extract on the adhesion of *C. albicans* cells to polystyrene plates and germ tube formation was examined via microscopic investigation. Although the density of the adhered cells was remarkably reduced up on incubation with 39 µg/ml *S. miltiorrhiza* extract, germ tube formation by *C. albicans* was rarely affected. Quantitative real-time PCR analysis showed that the *S. miltiorrhiza* extract downregulated the expression of *C. albicans* hypha-specific genes, *EAP1* by 34.7% ( $p < 0.001$ ), *ALS1* by 45.0% ( $p < 0.001$ ), *ALS3* by 48.1% ( $p < 0.001$ ), and *ECE1* by 21.3% ( $p = 0.006$ ), respectively. Our data suggest that the *S. miltiorrhiza* ethanol extract significantly inhibited the early stage of biofilm formation by *C. albicans* by interfering with cell adhesion, by downregulating *EAP1*, *ALS1* and *ALS3*, and presumably by modifying the cell wall and membrane structure.

**Keywords:** Antifungal, biofilm, *Candida albicans*, hypha-specific gene, *Salvia miltiorrhiza*

## 서론

*Candida* species는 건강한 사람의 점막이나 위장관에 상주하는 상재균이다. 그러나 면역 기능이 손상되었거나 심각한 질병을 앓고 있는 환자들에게 표재성 또는 전신성 감염을 유발하는 기회감염균이다[1]. 그 중에서도 *C. albicans*는 캔디다증(candidiasis)을 유발하는 대표적인 원인균으로 알려져 있으며, 최근에는 *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*에 의한 감염이 점차 확산하고 있는 실정이다[2].

*C. albicans*는 환경적인 조건에 따라 효모형(yeast), 가균사(pseudohyphae) 또는 균사(true hyphae)로 자랄 수 있다. 효모형 또는 출아포자(blastospore)는 둥근 세포형이거나 이에 출아(budding)에 의해 형성된 포자가 부착된 형태이다. 가균사(pseudohyphae)는 다양한 길이의 긴 세포가 사슬처럼 연결되어 있는 형태를 띠며, 인접한 세포와 세포 사이에서는 잘룩한 협착이 관찰된다. 균사(hyphae)는 기다란 관의 형태이며, 관의 폭은 일정하고 협착은 관찰되지 않는다. 이와 같이 세포 형태를 자유롭게 바꿀 수 있는 *C. albicans*의 능력은 인간 조직으로의 침투나 포식작용으로부터의 회피 또는 혈류내에서의 전파를 용이하게 하는 독성요인으로 작용한다[3]. 바이오필름(biofilm)은 미생물이 어떤 표면에 부착한 후 조직적인 구조를 형성하고 세포외기질(ECM, extracellular matrix)로 보호된 미생물 집단이다[4]. 최근의

### \*Corresponding author

Tel: +82-43-649-1346, Fax: +82-43-649-1341

E-mail: ykim@semyung.ac.kr

© 2019, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

연구에 의하면 사람의 미생물감염의 약 65%는 플랑크톤성 감염보다는 표면에 부착되어 구조화된 바이오필름성 감염과 관련이 있는 것으로 추정된다[5].

*C. albicans*는 사람의 조직이나 혈류 또는 카테타와 같이 인공적으로 삽입된 의료기구에 바이오필름을 형성하는 능력을 가지고 있다[6]. *C. albicans* 감염과 관련된 대부분의 질병은 바이오필름과 관련이 있으며, 바이오필름은 숙주의 면역 시스템을 회피하는 은신처로 작용할 뿐만 아니라 플랑크톤성 세포들보다 항진균 치료제에 대해 높은 내성을 나타내는 것으로 보고되어 있다[7]. *Candida* 바이오필름은 플랑크톤성 세포에 비해 대사 활성의 50%를 감소시키는 데 필요한 약의 농도와 최소저해농도(MIC, Minimum inhibitory concentration)가 각각 5-8배와 30-2,000배 더 높았다[8]. 이와 같이 *Candida* 바이오필름이 항진균제에 대해 내성을 나타내는 이유는 바이오필름 매트릭스로 항진균제의 침투가 용이하지 않거나 영양소 공급이 제한되어 성장속도가 감소되고, efflux pump를 코딩하는 내성 유전자가 발현되거나 persister 세포가 존재하기 때문이다[6]. 따라서 바이오필름과 관련된 *C. albicans* 감염은 다양한 항진균제에 대한 내성으로 인해 통상적으로 사용하는 항진균제를 지속적으로 사용하기 어려운 경우가 많다[9]. 이 밖에도 대부분의 미생물감염의 원인체인 세균이 원핵생물인 반면 *C. albicans*는 진핵생물로서 인간의 세포와 많은 특징을 공유하여 진균류에 특이적인 약제의 폭이 좁고, 일부 환자에서 나타나는 항진균제의 심각한 부작용[10]으로 인해 독성이 낮고 치료효과가 좋은 새로운 항진균제의 개발이 절실하게 필요한 실정이다. 최근 미생물과 관련된 질병의 치료제를 보완할 대체물로서 천연물에 기반한 화합물에 대한 관심이 집중되고 있는데, 그 이유는 오랜 역사를 통해 이들이 민간요법으로 질병의 예방과 치료에 사용되었으므로 안전하다고 생각되기 때문이다[10, 11].

지난 연구에서 우리는 단삼(*Salvia miltiorrhiza*)의 에탄올 추출물이 *C. albicans*의 막투과성을 변화시켜 세포막의 기능을 교란시키고 세포벽의 성분 중 (1,3)- $\beta$ -D-glucan polymer의 형성에 관여하는 (1,3)- $\beta$ -D-glucan synthase의 활성을 억제하여 세포벽의 기능을 약화시킴을 밝혔다[12]. 본 연구에서는 단삼의 에탄올추출물이 캔디다증 환자에서 분리한 10개 *C. albicans* 균주의 바이오필름 발달에 미치는 영향과 *C. albicans* SC5314의 바이오필름에 특이적인 유전자 *EAP1*, *HWP1*, *ALS1*, *ALS3*, *ECE1*의 발현에 미치는 효과를 연구하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배양조건

바이오필름 연구에 사용된 10개 *C. albicans* 균주는 캔디

다증 환자로부터 분리한 것을 연세대학교 원주의과대학에서 기증받았다[13]. *C. albicans* SC5314 (ATCC MYA-2876<sup>TM</sup>)는 미국 American Type Culture Collection에서 구입하였다. *C. albicans*는 통상적으로 YM 배지(yeast extract 0.3%, malt extract 0.3%, peptone 0.5% and dextrose 1%)를 이용하여 37°C에서 배양하였다.

### 식물 추출물

단삼의 마른 뿌리를 70% 에탄올로 침출한 후 동결건조한 추출물을 최종 농도 100 mg/ml로 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹인 후 -20°C의 압소에 보관하였고, 이를 단삼 에탄올추출물이라고 표현하였다[12]. Positive control인 amphotericin B (250  $\mu$ g/ml)는 Sigma (USA)에서 구입하였으며, 실험 직전에 배지로 희석하여 사용하였다. 모든 실험의 대조군에는 실험군에 사용된 단삼 에탄올추출물의 양과 동일한 양의 DMSO를 넣었다. 반응에 사용된 DMSO의 양은 최대 1% (v/v)로 1%까지는 DMSO가 *C. albicans*의 생존에 영향을 미치지 않았다.

### 항진균 감수성 검사

항진균 감수성 검사는 기본적으로 CLSI M27-A3 미량희석법[14]에 따라 배지의 혼탁도를 기준으로 MIC를 결정하였고, 동시에 배지에 살아있는 세포 활동의 지표인 resazurin (Sigma)을 포함시켜 24시간 후 resazurin의 청색이 붉은 색으로 변하지 않는 최저농도를 MIC로 판단하여 데이터의 결과를 이중으로 검증하였다[15].

### 바이오필름의 정량

10개 *C. albicans* 임상균주가 형성한 바이오필름의 양은 XTT (Sigma) 환원분석법으로 측정하였고[16], 바이오필름은 3시간 동안 형성된 초기 단계의 바이오필름(early stage of preformed biofilms)을 대상으로 실험을 진행하였다[17]. YNB/glucose (yeast nitrogen base with 50 mM glucose) 배지를 사용하여 각 *C. albicans* 임상균주를  $1 \times 10^7$  cells/ml로 희석한 후, 0.2 ml의 cell suspension을 flat-bottom 96-well polystyrene plate에 넣어 3시간 동안 37°C에서 배양하였다. 부유세포를 포함한 배지를 제거한 후 PBS (phosphate buffered saline, Invitrogen)로 2회 헹구어 초기 단계 바이오필름을 준비하였다. 여기에 단삼 에탄올추출물 (0, 39  $\mu$ g/ml and 78  $\mu$ g/ml)이 들어 있는 YNB/glucose (0.2 ml)를 넣고 37°C에서 16시간 동안 추가로 배양하여 단삼이 바이오필름 성장에 미치는 영향을 보고자 하였다. 부유세포를 제거하고 PBS로 헹구 후 발달된 바이오필름의 양을 XTT 환원분석법을 시행하여 정량하였다. 실험은 각 샘플당 5배수로 진행하였고 각 실험당 단삼 에탄올추출물을 넣지 않

은 대조군을 100으로 하여 바이오필름 활성의 억제율을 %로 표현하였다.

### 단삼이 *C. albicans*의 폴리스티렌 표면부착(adhesion)에 미치는 영향

*C. albicans* SC5314 배양액을 YNB/glucose 액체배지를 사용하여  $5 \times 10^6$  cells/ml로 희석한 cell suspension을 flat-bottom 96-well polystyrene plate에 넣고, 최종 농도 0, 39  $\mu\text{g/ml}$  또는 78  $\mu\text{g/ml}$ 의 단삼 에탄올추출물을 첨가한 후 37°C에서 3시간 배양하여 캔디다 바이오필름이 발달하도록 하였다. 바닥에 부착되지 않은 부유세포와 배지를 제거하고 PBS로 헹군 후 40  $\mu\text{l}$  PBS를 넣어 inverted microscope로 관찰하였다. 폴리스티렌 표면에 부착된 *C. albicans*의 입체적인 형태를 관찰하기 위해 5  $\mu\text{l}$ 의 0.05% Calcofluor-White 용액(Sigma)을 추가적으로 well에 넣은 후 inverted epifluorescence microscope를 이용하여 자외선하에서 400배로 관찰하였다.

### 단삼이 *C. albicans*의 germ tube 형성에 미치는 효과

*C. albicans* SC5314 배양액을 10% FBS (fetal bovine serum)를 포함하는 RPMI 1640 배지를 이용하여  $5 \times 10^6$  cells/ml로 희석한 cell suspension을 flat-bottom 96-well polystyrene plate에 넣었다. 각 well에 최종 농도 0, 39  $\mu\text{g/ml}$  또는 195  $\mu\text{g/ml}$  단삼 에탄올추출물을 넣은 후 3시간 동안 37°C에서 배양하여, *C. albicans*가 germ tube를 형성하는 데 단삼 에탄올추출물이 어떤 영향을 미치는지 inverted microscope를 이용하여 200배로 관찰하였다.

### *C. albicans*의 바이오필름 관련 유전자에 대한 qPCR (Quantitative real-time PCR) 분석

단삼이 바이오필름 형성에 관여하는 유전자들의 mRNA 발현에 미치는 영향을 분석하기 위해 qPCR 분석을 하였고, Lee and Kim의 논문에 기술한 것과 동일한 PCR primer와 방법을 사용하였다[17]. 간단하게 기술하면, 6 well plate에서 RPMI 1640 배지내의 *C. albicans* SC5314가 37°C에서 4시간 동안 바이오필름을 형성하게 한 후, 부유세포를 제거하고 PBS wash를 통해 초기단계 바이오필름을 준비하였다. 그 후 바이오필름에 0 또는 39  $\mu\text{g/ml}$  단삼 에탄올추출물을 처리하여 37°C에서 90분간 배양하였다. 다음으로 각 바이오필름에서 total RNA를 분리한 후 cDNA를 합성하였고, 바이오필름과 관련된 *EAP1*, *HWP1*, *ALS1*, *ALS3*, *ECE1* 유전자에 대한 forward and reverse primers를 넣어 DNA를 증폭시켰다. 각 유전자의 fold regulation은 *ACT1* Ct를 기준으로 comparative Ct method를 사용하여 계산하였고, DMSO를 처리한 solvent control을 Ct 값을 결정하는

reference 값으로 데이터를 분석하였다. 각 유전자 발현에 대한 표준편차(standard deviation, SD)와 그룹간의 차이는 Sigma plot 13.0의 Student's *t*-test를 사용하였고, 결과는  $p < 0.05$ 일 때 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

## 결과 및 고찰

### 항진균 감수성 검사

지난 연구에서 우리는 단삼 에탄올추출물이 *C. albicans* 세포막의 지질성분 변화와 함께 막투과성을 증가시켰으며, 동시에 세포벽 성분을 합성하는 (1,3)- $\beta$ -D-glucan synthase 활성을 저해하여 *C. albicans*의 세포막 기능과 세포벽 integrity에 영향을 끼침을 밝혔다[12]. 본 연구에서는 단삼 에탄올추출물이 캔디다증 환자로부터 분리한 10개의 *C. albicans* 임상균주가 형성하는 바이오필름에 미치는 영향을 관찰하고, 유전자 서열이 알려진 *C. albicans* SC5314를 이용하여 바이오필름에 특이적인 유전자의 발현에 미치는 영향을 분석하고자 하였다. CLSI M27-A3의 기준에 따라 MIC를 분석해보니, *C. albicans* SC5314에 대한 단삼 에탄올추출물의 MIC는 39  $\mu\text{g/ml}$ , 10개 *C. albicans* 임상균주에 대한 MIC는 19.5  $\mu\text{g/ml}$ 에서 39  $\mu\text{g/ml}$ 의 범위로 이들 모두 단삼 추출물에 대해 비슷한 감수성을 나타냈다(Table 1). Reference antifungal로 사용된 amphotericin B의 *C. albicans* SC5314에 대한 MIC는 0.5  $\mu\text{g/ml}$ 이었고, 10개 *C. albicans* 임상균주에 대한 MIC는 0.25  $\mu\text{g/ml}$ 에서

**Table 1. Minimum inhibitory concentrations (MICs) of the *S. miltiorrhiza* ethanol extract against different *C. albicans* strains.**

	<i>S. miltiorrhiza</i> ( $\mu\text{g/ml}$ )	Amphotericin B ( $\mu\text{g/ml}$ )
<i>C. albicans</i> SC5314	39	0.5
Clinical isolates of <i>C. albicans</i>		
1	19.5	0.5
2	39	0.5
3	39	0.5
4	39	0.5
5	39	0.5
6	39	0.5
7	39	0.5
8	19.5	0.25
9	19.5	0.5
10	19.5	0.25

The *in vitro* MICs of *S. miltiorrhiza* against *Candida* spp. were determined by the modified CLSI M27-A3 protocol of the colorimetric broth microdilution method using resazurin [14, 15].

0.5 µg/ml의 범위내로 실험에 사용된 *C. albicans* 균주들의 amphotericin B에 대한 감수성 또한 비슷하였다. 더불어 이들 균주는 모두 단삼 에탄올추출물보다 amphotericin B에 대해 39배 또는 78배 더 민감하였다(Table 1). 따라서 다음에 이어지는 모든 실험에서는 *C. albicans* SC5314를 이용하여 단삼 에탄올추출물에 대한 MIC인 39 µg/ml 또는 이의 배수 농도로 처리하여 단삼 에탄올추출물의 효과에 대한 결과를 분석하였다.

**초기 단계 *C. albicans* 바이오필름에 대한 단삼의 효과**

*C. albicans* 바이오필름의 발달은 세 단계로 이루어지는데, 초기 단계(early stage)에서는 주로 효모형과 약간의 균사가 표면에 부착하여 microcolony를 형성한다. 중기 단계(intermediate stage)에서는 비세포성 물질이 증가하여 microcolony 주변에 안개같은 필름을 형성한다. 성숙 단계(maturation stage)에서는 세포외기질의 양이 계속 증가하여 *C. albicans* 집단의 주변을 완벽하게 감싸는 바이오필름을 형성한다[7]. 본 연구에 사용된 단삼 에탄올추출물은 초기 단계의 바이오필름 억제에 대한 효과가 좋았기 때문에 10개의 *C. albicans* 임상균주가 형성한 초기 단계의 바이오필름을 이용하여 단삼 추출물이 바이오필름 발달에 미치는 영향을 정량하였다. 바이오필름의 정량은 XTT 환원분석법에 의하며, 이는 살아있는 세포의 미토콘드리아 효소가 tetrazolium salt XTT를 환원시켜 생성한 formazan derivatives의 양을 흡광도(A<sub>492</sub>)로 측정하는 방법으로서, 바이오필름의 대사 활성(metabolic activity)양을 바이오필름의

양으로 간주하였다[18]. 39 µg/ml의 단삼 에탄올추출물에 노출된 바이오필름은 대사율의 감소를 나타내기는 하였으나 일부 데이터는 통계적으로 유의하지 않았다(Table 2). 그러나 78 µg/ml 단삼 에탄올추출물에 노출된 10개 *C. albicans* 임상균주의 바이오필름은 평균 51.3%의 대사율의 감소를 나타냈고 모두 통계적으로 유의하여, 단삼 에탄올추출물이 초기 단계의 바이오필름의 양을 줄이는 데 효과적이라는 것을 알 수 있었다.

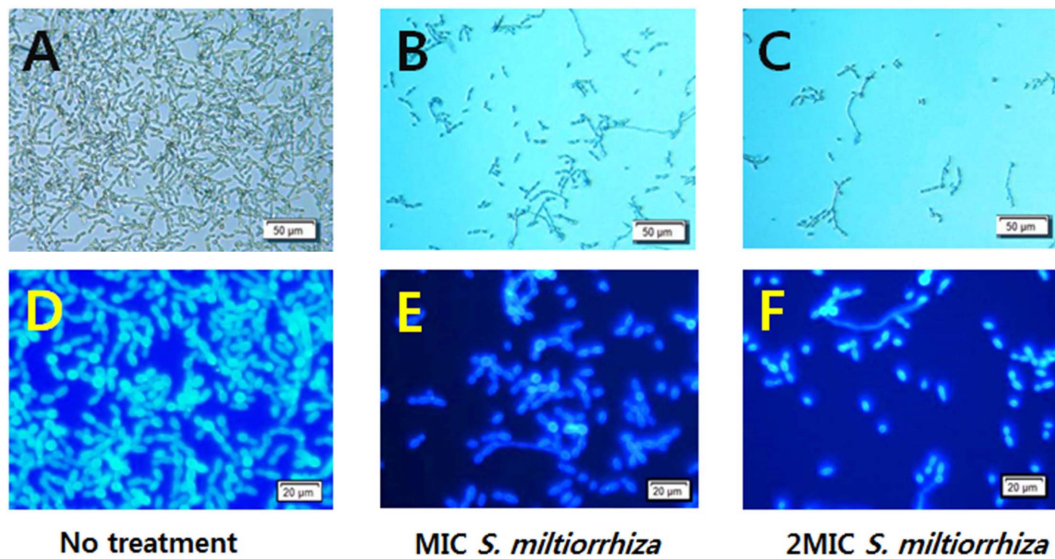
**단삼이 *C. albicans*의 표면부착에 미치는 영향**

*C. albicans*의 생물학적 또는 비활성 표면으로의 부착은 바이오필름 형성에서 필수적인 단계이다. 단삼 에탄올추출물이 *C. albicans*의 폴리스티렌 표면부착 단계에 대한 영향을 adhesion assay로 분석하였다. *C. albicans*는 배지의 종류나 pH에 따라 효모형, 균사형 또는 바이오필름의 형태를 적절하게 선택하는 개체인데, YNB/glucose 배지에서 *C. albicans*는 두꺼운 바이오필름 구조를 형성하기 보다는 adhesion을 선호한다[19]. *C. albicans* SC5314 세포를 단삼 에탄올추출물이 포함된 YNB/glucose 배지에 3시간 노출시킨 후, 폴리스티렌 표면에 부착된 세포를 위상차 현미경으로 관찰하였다. 대조군에 비해 39 µg/ml (Figs. 1B and 1E) 또는 78 µg/ml (Figs. 1C and 1F)의 단삼 에탄올추출물을 처리한 실험군에서는 바닥에 부착된 *C. albicans* 세포의 양이 현저하게 감소하였다. YNB/glucose 배지에서 *C. albicans*는 주로 효모형을 나타내는데[7], 홍미롭게도 단삼 에탄올추출물을 처리한 실험군에서는 오히려 균사 형성이 촉진되는 것을

**Table 2. Quantified metabolic activity of *C. albicans* biofilms after treatment of the *S. miltiorrhiza* ethanol extract.**

<i>C. albicans</i> strains	<i>S. miltiorrhiza</i> (µg/ml)				
	0		39		78
	A <sub>492</sub>	A <sub>492</sub>	Relative inhibition rate (%)	A <sub>492</sub>	Relative inhibition rate (%)
1	0.190 ± 0.009	0.168 ± 0.017*	11.6	0.148 ± 0.020**	22.1
2	0.310 ± 0.057	0.196 ± 0.014**	36.8	0.146 ± 0.006**	52.9
3	0.369 ± 0.029	0.323 ± 0.032*	12.5	0.155 ± 0.007**	58.0
4	0.492 ± 0.064	0.319 ± 0.067**	35.2	0.136 ± 0.016**	72.4
5	0.755 ± 0.021	0.725 ± 0.026	3.9	0.129 ± 0.022**	82.9
6	0.185 ± 0.008	0.168 ± 0.019	9.1	0.127 ± 0.002**	31.4
7	0.382 ± 0.035	0.337 ± 0.015	11.8	0.173 ± 0.020**	54.7
8	0.348 ± 0.158	0.230 ± 0.072	33.9	0.156 ± 0.013*	55.2
9	0.195 ± 0.101	0.150 ± 0.051*	23.0	0.126 ± 0.026*	35.4
10	0.299 ± 0.192	0.227 ± 0.128	24.0	0.155 ± 0.030*	48.2
Mean ± SD			20.1 ± 12.0		51.3 ± 18.3

Three hour-aged early stage of *C. albicans* biofilms from 10 clinical isolates were incubated with the indicated concentrations of the *S. miltiorrhiza* ethanol extract for 16 h at 37 °C. Metabolic activity was assessed using the XTT reduction assay measuring the absorbance at 492 nm. Values reported are the means of quintuplicate determinations ± standard deviations (SD). \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01.



**Fig. 1. Effect of the *S. miltiorrhiza* ethanol extract on *C. albicans* adhesion to polystyrene.** *C. albicans* SC5314 cells were incubated without (A and D) or with 39  $\mu\text{g/ml}$  (B and E) and 78  $\mu\text{g/ml}$  (C and F) *S. miltiorrhiza* ethanol extract, respectively, at 37  $^{\circ}\text{C}$  for 3 h in a flat-bottomed polystyrene plate. Adherent cells were investigated using an inverted microscopy (A, B and C) at x200 magnification. Bars; 50  $\mu\text{m}$ . Adherent cells stained with Calcofluor-White were observed under UV light using an inverted epifluorescence microscope at x400 magnification (D, E and F). Bars; 20  $\mu\text{m}$ .

관찰할 수 있었다.

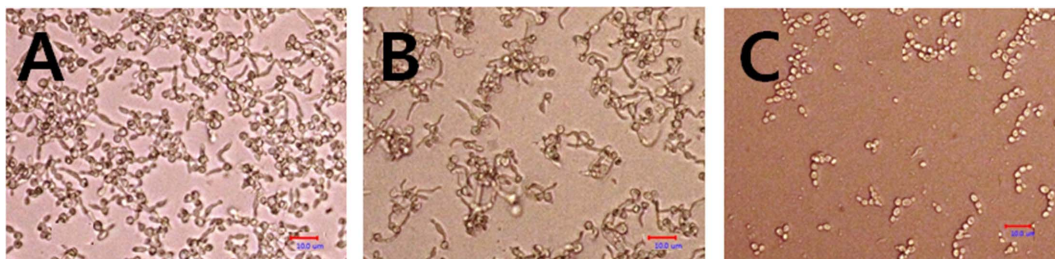
#### 단삼추출액의 *C. albicans* germ tube 형성 억제에 대한 효과

*C. albicans*가 바이오필름을 형성하기 위해서는 표면부착 후 germ tube라는 짧은 관을 출아포자에 내어 가균사를 형성하는데, germ tube의 형성은 균사로 진입하기 위한 필수적인 과정이다. 단삼 에탄올추출물이 germ tube 형성을 얼마나 효과적으로 억제하는지 알아보기 위해 *C. albicans* SC5314 세포를 germ tube 형성을 유도하는 FBS와 RPMI 1640 배지에 노출시켜 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 배양하였다. 1x MIC에 해당하는 39  $\mu\text{g/ml}$  단삼 추출물을 넣은 경우 germ tube 형성은 억제되지 않았다(Fig. 2B). 단삼의 양을 증가시켜 5x MIC에 해당하는 195  $\mu\text{g/ml}$  단삼 추출물을 처리했을 때

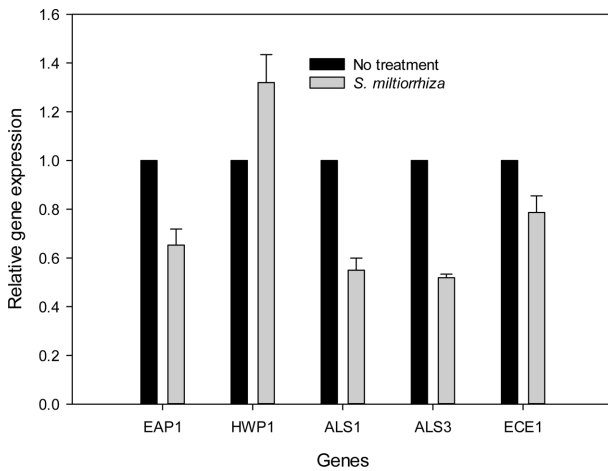
germ tube 형성이 억제되어 효모형만이 관찰되었으며 반복된 실험에서도 고용량의 단삼 에탄올추출물의 존재하에서만 germ tube 형성에 대한 억제효과가 있었다. 따라서 단삼 에탄올추출물의 *C. albicans*의 germ tube 형성 억제능은 그다지 크지는 않을 것으로 생각된다.

#### 균사와 관련된 유전자들의 발현분석

단삼 에탄올추출물의 바이오필름에 대한 영향을 분석하기 위해 본 연구에서는 qRT-PCR의 방법을 사용하여 바이오필름 또는 균사에 특이적인 유전자발현의 변화를 분석하였다. 바이오필름 발달에서 표면부착은 필수적인 단계이므로 *Candida* Genome Database (CGD, <http://www.candidagenome.org/>)의 정보에 기초하여 효모의 표면부착과



**Fig. 2. Germ tube formation of *C. albicans* cells.** *C. albicans* SC5314 cells were grown in RPMI 1640 containing 10% FBS in the absence (A) or presence of 39  $\mu\text{g/ml}$  and 195  $\mu\text{g/ml}$  *S. miltiorrhiza* ethanol extract (B and C), respectively, at 37  $^{\circ}\text{C}$  for 4 h. Inverted microscopic images are shown at x400 magnification. Bars; 10  $\mu\text{m}$



**Fig. 3. Effect of the *S. miltiorrhiza* ethanol extract on the expression of *C. albicans* hypha-specific genes.** Four hour-aged biofilms of *C. albicans* SC5314 were treated without or with 39  $\mu\text{g/ml}$  *S. miltiorrhiza* ethanol extract for 90 min at 37  $^{\circ}\text{C}$ , and the expression of the indicated genes was analyzed by qRT-PCR. Expression level of each gene is represented after normalization with housekeeping *ACT1* gene. The data displays relative expression fold change of genes by *S. miltiorrhiza*-treatment with respect to the DMSO control. Data represent the mean of triplicates  $\pm$  SD.

바이오필름 형성에서 중요한 역할을 하는 유전자인 *EAP1*, *HWP1*, *ALS1*, *ALS3*, *ECE1*의 발현량 변화를 분석하였다. housekeeping gene인 actin 유전자 *ACT1*의 발현량으로 normalization을 하여 단삼처리 실험군의 유전자 발현을 비교하였다(Fig. 3).

Eap1 (Enhanced adherence to polystyrene protein 1)은 세포벽 adhesion 단백질로서 세포와 세포 또는 세포와 기질 간 부착을 매개하는 바이오필름 형성에 필수적인 단백질이다[20]. *C. albicans* Eap1은 adhesin 당단백질 중의 하나로서 불용성 아밀로이드를 형성하고 아밀로이드 형성은 이들 단백질간에 세포간 aggregation을 형성할 수 있게 하는 중요한 인자이다[21]. 단삼 에탄올추출물을 처리한 바이오필름의 *EAP1* 발현량은 0.653배로 감소하였다( $p < 0.001$ ) (Fig. 3). Lee and Kim [17]의 연구에서 백작약(*Paeonia lactiflora*) 추출물은 *EAP1*의 발현량을 증가시켰는데, 형광현미경 관찰에서 많은 *C. albicans* cell aggregates가 바닥에 부착되어 있지 않고 둥둥 떠 있는 현상을 관찰할 수 있었다. 반면에 Fig. 1에 보여지는 바와 같이 단삼 에탄올추출물을 처리한 실험에서는 *C. albicans* cell aggregates 없이 날개로 분리된 효모형의 세포들이 소량 바닥에 붙어 있는 형태가 많았다(Figs. 1E and 1F). 따라서 이 결과는 단삼에 의한 *EAP1* 발현의 감소와 일치하는 현상으로 보인다.

*ALS* gene family는 세포표면의 당단백질을 코딩하는 유

전자군으로서 숙주표면 부착에 관여한다[22]. Als1 (agglutinin-like sequence 1)과 Als3 (agglutinin-like sequence 3) 단백질은 균사발달을 시작하게 하고 바이오필름의 표면 부착과 세포벽의 integrity 유지에 관여한다[23]. 단삼 에탄올추출물을 처리한 바이오필름에서 *ALS1*과 *ALS3* 유전자의 mRNA 양은 각각 0.55배와 0.519배로 감소하였다(Fig. 3). 이 결과는 Fig. 1의 단삼을 처리한 실험군의 *C. albicans* 세포들의 표면 부착량이 현저하게 감소되는 현상과 일치하는 결과이다.

*ECE1* (Extent of cell elongation protein 1)은 균사가 형성되는 동안 분비되어 세포의 신장(elongation)을 통해 바이오필름 형성에 관여한다[24]. Ece1은 숙주 상피세포의 세포막을 직접적으로 손상시키는 candidalysin이라는 세포용해성 펩타이드 독소의 전구체로서 이 독소를 분비하지 않는 *C. albicans*는 동물모델에서 점막감염을 유발하지 않는 것으로 관찰되었다[25]. 단삼은 *C. albicans* 바이오필름의 *ECE1*의 발현량을 0.787배로 낮추었는데( $p = 0.006$ ) (Fig. 3), 이 결과는 단삼이 *C. albicans* 초기 단계 바이오필름에서의 신장을 억제하며 숙주 감염시 독성을 낮추는 효과를 나타낼 것으로 생각된다.

Hwp1 (hyphal wall protein 1)은 세포벽 단백질을 코딩하는 단백질로 숙주세포로의 부착에서 중요한 역할을 한다. 이 단백질은 효모형의 캔디다에서는 발현이 되지 않으나 균사형에서 매우 높게 발현이 된다[26]. 단삼 에탄올추출물에 노출된 바이오필름의 *HWP1* 발현량은 1.32배( $p = 0.008$ )로 증가했다(Fig. 3). Fig. 2에서 단삼을 처리하였을 때 germ tube 형성을 억제하지 못했고, YNB/glucose 배지에서 오히려 일부 균사의 형성이 촉진되는 현상은 *HWP1*의 발현량이 증가하는 현상과 일치하는 결과이다.

*C. albicans*의 독성을 나타내는 인자는 다양한 요인에 의해 결정이 되는데 그 중 생물학적 또는 비활성 표면에 부착하는 능력과 균사로의 진입과 숙주세포 부착을 용이하게 하는 germ tube 형성은 독성 인자로 작용한다[27]. *C. albicans* germ tube 형성 단계에서 단삼 에탄올추출물의 영향은 그다지 크지 않았다. 오히려 효모형을 촉진하는 YNB/glucose 배지에서 일부 *C. albicans*는 단삼 처리 후 균사를 형성했다. 이는 *C. albicans*가 단삼에 노출되어 세포막의 기능과 세포벽 integrity의 손상에 대한 적응을 위해 바이오필름 단계로 진입하려고 시도하는 것으로 보인다. 바이오필름에 단삼 추출물을 처리한 후 *HWP1* 발현이 증가했는데 이는 균사형성이 촉진된다는 것을 암시한다. 그러므로 단삼 에탄올추출물은 *C. albicans* 바이오필름의 성장을 매우 효율적으로 저해하지는 않는 것 같다. 그럼에도 불구하고 단삼 에탄올추출물은 다음과 같은 기전을 통해 *C. albicans*의 표면부착에 영향을 주어 초기단계 바이오필름의 성장억제에 기여하는 것으로 보인다. 첫째, *ALS1*과 *ALS3*의 발현 감소

를 통해 *C. albicans*의 표면 부착을 저해한다. 둘째, *EAP1* 발현을 억제하여 세포와 세포간 또는 세포와 표면 부착을 억제한다. 이 밖에도 세포막 지질성분 변화로 인한 삼투변화와 (1,3)-D-glucan synthase 활성 감소로 인한 부실한 세포벽 구조 또한 세포부착능 감소에 기여할 것으로 추정된다.

## 요 약

*Candida albicans*는 기회감염을 유발하는 주요한 병원성 진균 중의 하나이다. 칸디다증 치료과정에서 항진균제에 대한 내성이 흔히 발견되는데, 그 이유는 *Candida*가 바이오필름을 형성할 수 있기 때문이다. 이전의 연구에서 우리는 단삼(*Salvia miltiorrhiza*)의 에탄올추출물이 세포막의 투과성을 변화시키고 세포벽 합성을 저해하여 항칸디다 활성을 나타냄을 밝혔다. 본 연구에서는 10개 *C. albicans* 임상균주가 형성한 초기단계의 바이오필름을 대상으로 XTT 환원분석법으로 대사활성을 측정하니, 78 µg/ml 단삼 에탄올추출물에 의해 바이오필름의 대사활성이 평균 51.3% 감소되었다. *C. albicans* 세포들이 폴리스티렌 표면에 부착하거나 germ tube를 형성하는 과정에서의 단삼 에탄올추출물의 영향을 현미경으로 분석하니, 39 µg/ml 단삼 에탄올추출물에 의해 부착된 세포의 밀도는 현저하게 감소하였으나 germ tube 형성은 거의 억제하지 못했다. 단삼 에탄올추출물이 *C. albicans* SC5314 세포의 균사에 특이적인 유전자 발현에 미치는 영향을 qPCR로 분석한 결과, *EAP1*은 34.7% ( $p < 0.001$ ), *ALS1*은 45.0% ( $p < 0.001$ ), *ALS3*는 48.1% ( $p < 0.001$ ), *ECE1*은 21.3% ( $p = 0.006$ ) 억제하였다. 결론적으로 단삼의 에탄올추출물은 초기단계의 *C. albicans* 바이오필름 발달을 효율적으로 저해하며, 이는 *EAP1*, *ALS1*, *ALS3* 유전자의 발현억제에 따른 세포부착 억제와 관련이 있다. 더불어 단삼 에탄올추출물의 *C. albicans* 세포막 기능저해와 세포벽 합성억제에 의한 구조변화 또한 세포부착단계에서의 바이오필름 발달억제에 기여할 것으로 추정된다.

## Acknowledgments

This paper was supported by the Semyung University Research Grant of 2017.

## Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

## References

- Pfaller MA, Diekema DJ. 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**: 133-163.
- Pfaller M, Neofytos D, Diekema D, Azie N, Meier-Kriesche HU, Quan SP, et al. 2012. Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance<sup>®</sup>) registry, 2004–2008. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **74**: 323-331.
- Mukaremera L, Lee KK, Mora-Montes HM, Gow NAR. 2017. *Candida albicans* yeast, pseudohyphal, and hyphal morphogenesis differentially affects immune recognition. *Front. Immunol.* **8**: 629.
- Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, et al. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* **41**: 435-464.
- Donlan RM. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* **8**: 881-890.
- Ramage G, Martínez JP, López-Ribot JL. 2006. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res.* **6**: 979-986.
- Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. 2001. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J. Bacteriol.* **183**: 5385-5394.
- Douglas LJ. 2003. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol.* **11**: 30-36.
- Ramage G, Saville SP, Thomas DP, Lopez-Ribot JL. 2005. *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot. Cell* **4**: 633-638.
- Lee HS, Kim Y. 2014. Antifungal activity of *Rheum undulatum* on *Candida albicans* by the changes in membrane permeability. *Korean J. Microbiol.* **50**: 360-367.
- Guarrera PM. 2005. Traditional phytotherapy in central Italy (Marche, Abruzzo, and Latium). *Fitoterapia* **76**: 1-25.
- Lee HS, Kim Y. 2016. Antifungal activity of *Salvia miltiorrhiza* against *Candida albicans* is associated with the alteration of membrane permeability and (1, 3)-β-D-glucan synthase activity. *J. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 610-617.
- Park SJ, Choi SJ, Shin WS, Lee HM, Lee KS, Lee KH. 2009. Relationship between biofilm formation ability and virulence of *Candida albicans*. *J. Bacteriol. Virol.* **39**: 119-124.
- Clinical Laboratory Standards Institute. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard M27-A3, 3rd ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Liu M, Seidel V, Katerere DR, Gray AI. 2007. Colorimetric broth microdilution method for the antifungal screening of plant extracts against yeast. *Methods* **42**: 325-329.
- Ramage G, Vande Walle K, Wickes BL, López-Ribot JL. 2001. Standardized method for *in vitro* antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**: 2475-2479.
- Lee HS, Kim Y. 2018. Development of *Candida albicans* biofilms is diminished by *Paeonia lactiflora* via obstruction of cell adhesion and cell lysis. *J. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 482-490.
- Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S,

- Nofziger TH, *et al.* 1988. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* **48**: 4827-4833.
19. Kucharíková S, Tournu H, Lagrou K, Van Dijck P, Bujdakova H. 2011. Detailed comparison of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms under different conditions and their susceptibility to caspofungin and anidulafungin. *J. Med. Microbiol.* **60**: 1261-1269.
  20. Li F, Palecek SP. 2003. EAP1, A *Candida albicans* gene involved in binding human epithelial cells. *Eukaryot. Cell* **2**: 1266-1273.
  21. Ramsook CB, Tan C, Garcia MC, Fung R, Soybelman G, Henry R, *et al.* 2010. Yeast cell adhesion molecules have functional amyloid-forming sequences. *Eukaryot. Cell* **9**: 393-404.
  22. Hoyer LL, Payne TL, Bell M, Myers AM, Scherer S. 1998. *Candida albicans* ALS3 and insights into the nature of the ALS gene family. *Curr. Genet.* **33**: 451-459.
  23. Liu Y, Filler SG. 2011. *Candida albicans* Als3, a multifunctional adhesin and invasin. *Eukaryot. Cell* **10**: 168-173.
  24. Birse CE, Irwin MY, Fonzi WA, Sypherd PS. 1993. Cloning and characterization of ECE1, a gene expressed in association with cell elongation of the dimorphic pathogen *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **61**: 3648-3655.
  25. Moyes DL, Wilson D, Richardson JP, Mogavero S, Tang SX, Wernecke J, *et al.* 2016. Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. *Nature* **532**: 64.
  26. Staab JF, Sundstrom P. 1998. Genetic organization and sequence analysis of the hypha-specific cell wall protein gene HWP1 of *Candida albicans*. *Yeast* **14**: 681-686.
  27. Richardson MD, Smith H. 1981. Production of germ tubes by virulent and attenuated strains of *Candida albicans*. *J. Infect. Dis.* **144**: 565-569.