



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

치의과학 석사학위논문

Lactophorin-3 펩타이드가 *Streptococcus mutans*  
와 *Candida albicans* 활성에 주는 영향

The effect of lactophorin-3 on the viability of  
*Streptococcus mutans* and *Candida albicans*

2017년 8월

서울대학교 대학원  
치의과학과 치과생체재료과학 전공  
박 홍 주

Lactophorin-3 펩타이드가 *Streptococcus mutans*  
와 *Candida albicans* 활성에 주는 영향

The effect of lactophorin-3 on the viability of  
*Streptococcus mutans* and *Candida albicans*

지도교수 양 형 철

이 논문을 치의과학 석사학위논문으로 제출함

2017년 4월

서울대학교 대학원

치의과학과 치과생체재료과학 전공

박 홍 주

박홍주의 석사학위논문을 인준함

2017년 6월

위 원 장 \_\_\_\_\_ (인)

부 위 원 장 \_\_\_\_\_ (인)

위 원 \_\_\_\_\_ (인)

## 요 약 (국문초록)

### 1. 연구목적

*Streptococcus mutans*는 치아 우식증의 원인이 되는 균으로 이를 감소시키고 바이오필름 형성을 억제하는 것이 치아 우식증을 예방하는데 중요하다. 의치상에 번식하여 구강점막을 자극하는 *Candida albicans*는 인구의 약 30~40%에서 정상 구강 상주균 중에서 발견된다. 이는 전신 쇠약, 면역 억제, 턱 안면부의 방사선 조사, 장기간의 항생제 치료, 당뇨, 구강 피임약 복용, 내분비장애, 흡연, 의치 구내염, 구강 건조증 등의 질환을 가진 환자에게 기회감염을 일으켜 구강점막을 자극한다. 소 우유에서 발견되는 항균성 phosphoglycoprotein인 proteose peptone component-3 (PP3)는 lactophorin이라 하며, PP3를 구성하는 C 말단의 23개 아미노산으로 이루어진 펩타이드를 lactophoricin (LPcin)이라 한다. LPcin은 그람 음성균과 그람 양성균을 억제하는 효과가 있다고 알려져 있으며, 본 연구에서는 LPcin의 C 말단을 변형시킨 lactophorin-3 (LP-3, 15 residues)의 항미생물 효과를 *S. mutans*와 *C. albicans*를 이용하여 평가하였다.

## 2. 재료 및 방법

*S. mutans* (OMZ-65)에 대한 LP-3의 항균효과를 조사하기 위해 최소저해농도 [minimum inhibitory concentration (MIC)] 결정, time kill assay, 바이오필름 감수성 시험을 시행하였으며, 바이오필름 억제 효과는 형광 염색법을 이용하여 관찰하였다. *C. albicans* (ATCC10231)의 활성에 대한 LP-3의 효과는 WST-1을 이용하여 평가하였으며, polymethyl methacrylate (PMMA) 상에서 바이오필름 감수성 시험을 수행하였다. 그리고 scanning electron microscope (SEM)을 이용하여 LP-3에 의한 *C. albicans*의 형태변화를 관찰하고자 하였다. 측정결과는 one way ANOVA 및 t-test로 분석하였고 p-value가 0.05 이하일 때 통계적으로 의미가 있는 것으로 판단하였다.

## 3. 결과

MIC 시험 결과, 6.25  $\mu\text{g/ml}$ 에서부터 LP-3가 *S. mutans*를 억제하는 효과를 나타냈고, time kill assay에서 LP-3를 12.5  $\mu\text{g/ml}$  농도로 *S. mutans*에 적용한 결과, 10분 후에 완전히 사멸되었다. 바이오필름 감수성 시험에서는 6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 바이오필름에 적용한 결과, 100  $\mu\text{g/ml}$  (16  $\times$  MIC)에서 15분간 처리했을 때 바이오필름의 세포활성이 완전히 사라졌다. 2분간 처리시 이미 세포활성이 거의 감소하였고, *C. albicans*의 활성에 대한 LP-3의 저해 효과는 25  $\mu\text{g/ml}$ 부터 나타나기 시작하였으며 200  $\mu\text{g/ml}$ 까지 농도

의존적으로 저해 효과가 나타났다. PMMA 상에서 1, 3, 6시간 동안 *C. albicans*를 LP-3로 처리한 결과, 음성 대조군에 비해서 *C. albicans*의 활성이 1시간 후 60%, 3시간 후 33%, 6시간 후 12%로 감소하였다. 50  $\mu\text{g/ml}$  농도의 LP-3로 *C. albicans*를 8시간 동안 처리한 후, SEM을 통해 관찰한 결과 다수의 세포가 PMMA 표면에서 제거되고, 평평하게 짓눌린 모양의 세포를 볼 수 있었다.

결과적으로 LP-3는 농도와 처리 시간에 비례하여, *S. mutans*와 *C. albicans*에 항미생물 효과를 나타내었다.

---

**주요어 :** 락토포린-3, 항균 펩타이드, 스트렙토코쿠스 뮤탄스, 캔디다 알비칸스, 바이오필름, PMMA

**학 번 :** 2015 - 23261

# 목 차

## 1. 서론

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 균주 및 펩타이드

### 2.2 *S. mutans* 감수성 시험

#### 2.2.1 최소저해농도 시험

#### 2.2.2 Time kill assay

#### 2.2.3 *S. mutans* 바이오필름 감수성 시험

### 2.3 *C. albicans* 감수성 시험

#### 2.3.1 최소치사농도 시험

#### 2.3.2 *C. albicans* 바이오필름 감수성 시험

#### 2.3.3 Scanning electron microscope (SEM) 관찰

### 2.4 통계분석

## 3. 결과

### 3.1 *S. mutans* 감수성 시험

#### 3.1.1 최소저해농도 결정

#### 3.1.2 Time kill assay

#### 3.1.3 *S. mutans* 바이오필름 감수성 시험

### 3.2 *C. albicans* 감수성 시험

#### 3.2.1 최소치사농도 결정

#### 3.2.2 *C. albicans* 바이오필름 감수성 시험

#### 3.2.3 Scanning electron microscope (SEM) 관찰

## 4. 고찰 및 결론

## 5. 참고문헌

# 1. 서론

Antimicrobial peptides (AMPs)는 식물, 양서류, 곤충, 조류, 어류, 포유류, 사람에 이르기까지 다양한 곳에서 발견되며 숙주의 방어 기전에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 [1][2]. AMPs가 갖는 항미생물 효과는 기존 항생제와 다른 기전으로 항균작용을 나타낸다 [3]. 정확한 AMPs의 항균 메커니즘에 대해서는 알려져 있지 않지만 일반적으로 세균 세포막의 삼투압을 변화시켜 세포를 파괴하거나, apoptosis를 유발하여 항균작용을 일으키기도 하는 것으로 알려져 있다 [4-6]. 항균작용 뿐만 아니라 식물에서 발견되는 RsAFP2 peptide, human lactoferrin, 벌독에서 추출한 멜리틴과 같은 성분은 항진균 작용을 하여 *C. albicans*와 같은 곰팡이 균에도 효과가 있는 것으로 밝혀졌다 [7-10].

AMPs는 항생제와 달리 숙주 세포의 용혈현상이 일어나지 않고 박테리아에 선택적으로 적용이 가능하기 때문에 부작용을 최소화 할 수 있다는 장점이 있다 [11]. 그러므로 내성을 가질 수 있는 일반적인 항생제에 비해 효과적인 대안으로 생각된다 [1]. AMPs는 4가지 그룹으로 분류할 수 있는데  $\alpha$ -helical peptides,  $\beta$ -sheet peptides, extended peptides, 그리고 loop peptides이다. 그 중  $\alpha$ -helical peptides는 숙주 방어 기전에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져있다 [12].

동물의 우유에서 발견되는 AMPs는 소, 낙타, 라마, 염소, 쥐 등 여러 곳에서 발견되고 있으며 항미생물 효과가 실험을 통해 입증되었다 [13-16]. 우리가 흔히 접할 수 있는 소 우유에서 발견되는 AMPs로는  $\kappa$ -casein 의 c-terminal인 caseinomacropeptide [17], 그리고 lactoferrin



등이 있다. Casecidin, casocidin-I(as2-Casein)이나 kappacin, lactoferricin B, lactoferricin 같은 소 우유에서 추출된 펩타이드의 일부 시퀀스가 항균성이 있음이 실험을 통해 밝혀졌다 [17-21]. 또한, 소 우유에서 추출된 펩타이드 Bac8a를 변형시킨 Bac8c (RIWVIWRR-NH<sub>2</sub>)와 같은 인공 펩타이드는 항진균 효과도 있는 것으로 밝혀졌다 [22].

소 우유에서 발견되는 항균성 phosphoglycoprotein인 proteose peptone component-3 (PP3)는 lactophorin이라고도 하며, PP3를 구성하는 C 말단의 23개 아미노산을 lactophoricin (LPcin)이라 한다. LPcin은 그람 음성균과 그람 양성균 둘 다에 항균효과를 보이고 있으며, 항균효과와 더불어 항진균 효과도 있음이 보고되고 있다 [23][24]. 본 연구에서는 LPcin의 C 말단을 변형시킨 lactophorin-3 (LP-3, 15 residues)의 항미생물 효과를 *S. mutans*와 *C. albicans*를 이용하여 평가하였다.

구강 내 상주하는 약 700여종의 세균 중에는 인체에 유용한 균뿐 아니라, 치아의 우식을 발생시키는 *S. mutans* 등과 같은 유해한 균도 존재한다 [25][26]. *S. mutans*는 치아의 표면에 바이오필름을 형성하여 법랑질의 탈회를 초래하고 *Actinomyces spp.*와 함께 치근면 치아 우식증에도 관여한다 [27-29]. 그러므로 *S. mutans*의 존재는 치아 우식이환율을 나타내는 지표로 사용되기도 한다 [30][31]. 또한, 구내 점막이나 혀 등의 연조직에 문제를 일으키는 *C. albicans*는 인구의 약 30~40%에서 정상 구강 상주균 중에서 발견된다. 이는 전신 쇠약, 면역 억제, 당뇨, 내분비장애, 흡연, 구강 건조증 등의 질환을 가진 환자에게

기회감염을 일으켜 구강점막을 자극할 수 있으며, 의치상에 번식하여 구강점막에 자극을 준다. 이러한 구내 질환을 예방하고 치료함에 있어서 구강 내 유해 세균의 감소와 세균이 생성하는 바이오필름을 억제하는 것은 매우 중요하다 [32]. 현재, *S. mutans*를 억제하는 항미생물 약제로는 chlorhexidine, hexetidine, delmopinol, amine fluoride/stannous fluoride, triclosan, phenolic compounds 등이 있다 [33]. 이러한 약제들은 nystatin과 함께 *C. albicans*의 활성 억제에도 효과가 있다 [34]. 하지만 일부는 구토, 설사, 치아 착색 등을 유발하는 부작용도 가지고 있다 [33]. 특히, chlorhexidine (CHX)은 임상에서 가장 많이 사용되는 대표적인 약제로서 쓴 맛 때문에 환자들이 거부감을 갖기도 하고, 빈번한 사용 시에는 치아를 착색시키는 부작용이 있다 [35][36].

이에 본 연구에서는 LP-3가 기존 약제들에 대한 대체제가 될 수 있는지 알아보려고 하였으며, 구강 내 질환을 유발할 수 있는 *S. mutans*와 *C. albicans*의 활성에 대해서 어떠한 영향을 미치는 지 분석하고, LP-3의 처리시간과 농도에 따른 항미생물 효과를 평가하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 균주 및 펩타이드

*S. mutans* (OMZ-65)는 서울대학교 치과대학 균주은행에서 제공받았으며, 배지는 BHI (Conda pronadisa lab, Madrid, Spain)에서 37°C, 150 rpm의 조건으로 배양하였다. *C. albicans* (ATCC10231)는 TSB (BD™ Tryptic Soy Broth, Heidelberg, Germany)를 배지로 사용하여 30°C, 50 rpm의 조건에서 배양하였다.

LP-3의 아미노산 서열은 'NKVKEWIKYLKSLFS'이며, 펩타이드는 (주)셀인바이오 (Suwon, Korea)로부터 제공받았다.

### 2.2. *S. mutans* 감수성 시험 (Susceptibility test)

#### 2.2.1 최소저해농도 [minimum inhibitory concentration (MIC)] 시험

*S. mutans* (10000 CFU/ml)를 LP-3가 1.57, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 µg/ml의 농도로 포함되어 있는 배지에 접종한 후 37°C에서 배양하였다. 24시간 후 균액을 ELISA reader (Sunrise, TECAN, Salzburg, Austria)로 540 nm에서 OD를 측정하였다.

### 2.2.2 Time kill assay

LP-3를 12.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 포함하고 있는 BHI 배지에 약 10000 CFU/ml의 *S. mutans*를 접종하였다. 일정 시간 동안 배양 후 배양액을 1/10, 1/100, 1/1000 비율로 희석하여 반응을 정지시켰다. 반응이 정지된 샘플 250  $\mu\text{l}$ 는 미리 준비된 agar plate에 도말하고 37°C에서 24시간 배양 후 colony counting 하였다.

### 2.2.3 바이오필름 감수성 시험

바이오필름을 형성하기 위해 0.4 OD (540 nm)의 *S. mutans* 배양액을 1/40로 희석하여 culture slide (Falcon<sup>®</sup> Culture Slides, NY, USA)의 각 well에 200  $\mu\text{l}$ 씩 분주하고, 1% sucrose (Sigma-aldrich company, St. Louis, MO, USA)를 첨가하였다. 그 후, anaerobic 상태에서 24시간 배양하여 바이오필름을 형성시켰다. 24시간 후 증류수에 세척하고 바이오필름이 형성된 것을 육안으로 확인 후 LP-3로 1시간 동안 처리한 후 증류수에 2번 세척하였다. 음성 대조군으로 BHI, 양성 대조군으로 0.12% 클로르헥시딘을 사용하였으며, LP-3의 농도는 MIC의 2, 8, 16 배로 하였다. 처리시간은 16  $\times$  MIC에서 2, 5, 10, 15 분간 수행하였다. LIVE/DEAD<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup> Bacterial Viability Kit (Invitrogen Inc, CA, USA)를 이용하여 제조사의 지시에 따라 15분간 형광 염색하여 형광현미경 (Digital Imaging Microscope, Nikon, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

## 2.3. *C. albicans* 감수성 시험 (Susceptibility test)

### 2.3.1 최소치사농도 (minimum cidal concentration) 시험

0.25 OD (595 nm)의 *C. albicans*를 1/10로 희석하여 500  $\mu$ l씩 준비하고 LP-3의 농도를 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu$ g/ml가 되도록 하여 6시간동안 반응시켰다. 그 후, WST-1 (EZ-Cytox, Daeil lab service Co. Ltd, Seoul, Korea)을 이용하여 1시간 동안 염색 후 ELISA reader로 595 nm에서 OD를 측정하였다.

### 2.3.2 바이오필름 감수성 시험

*C. albicans* 바이오필름은 지름 5 mm, 높이 2 mm의 polymethyl methacrylate (PMMA) (Ortho jet<sup>TM</sup> Lang dental Mfg. Co. Inc, IL, USA) disc에서 형성시켰다. Disc는 70% 에탄올에 15분간 소독하고, 자외선에 12시간 동안 노출시켜 멸균, 건조하였다. OD 0.25의 *C. albicans* 200  $\mu$ l를 PMMA disc 위에 분주하고 30°C에서 24시간 배양하였다. 바이오필름이 형성된 PMMA는 증류수로 두 번 세척하고, 50  $\mu$ g/ml 농도의 LP-3로 처리하였다. 양성 대조군은 0.12% 클로르헥시딘을 사용하였다. LP-3는 0, 1, 3, 6 시간 동안 처리한 후에 증류수로 세척하고, WST-1 염색법으로 *C. albicans* viability를 측정하였다.

### 2.3.3 Scanning electron microscope (SEM) 관찰

바이오필름 감수성 시험에서와 같이 PMMA에 바이오필름을

형성하고 8시간 동안 LP-3를 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 후, 4% 파라포름알데하이드 200  $\mu\text{l}$ 로 4°C에서 4시간동안 고정시켰다. 그 후 1%  $\text{OSO}_4$  으로 4°C에서 한 시간 동안 후고정시켰다. 50%부터 70, 80, 90, 95, 100% 에탄올 series로 20분씩 탈수시키고 Hexamethyldisilazane (HMDS) (Emsdiasum, PA, USA) 시약으로 20분간 처리했다. Quorum Q150T S (Quorum Technologies, Laughton, East Sussex, England)를 이용하여 백금으로 코팅하고 15 kVp에서 SEM (S-4700 Hitachi, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

## 2.4 통계분석

측정한 수치는 비교대상이 3개 이상인 경우 일원배치분산분석 (oneway Analysis Of Variance : ANOVA)을 사용하였고 2개인 경우 t-test로 분석하였으며  $p=0.05$  수준에서 시행하였다.

### 3. 결과

#### 3.1. *S. mutans* 감수성 시험

##### 3.1.1 최소저해농도 결정

LP-3 의 농도 1.57 - 200  $\mu\text{g/ml}$ 를 *S. mutans* (10000 CFU/ml) 배지에 접종하고 37°C에서 24시간 배양 후 균액의 OD를 측정한 결과, LP-3 6.25  $\mu\text{g/ml}$ 에서 균의 성장이 나타나지 않았다. 따라서 *S. mutans*에 대한 LP-3의 MIC는 6.25  $\mu\text{g/ml}$  이다.

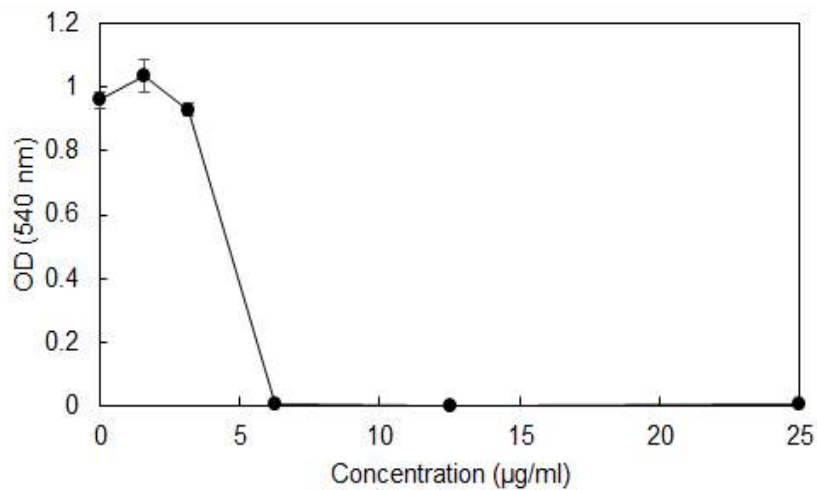


Figure 1. *S. mutans* MIC assay.

##### 3.1.2 Time kill assay

*S. mutans*를 12.5  $\mu\text{g/ml}$  LP-3로 처리한 결과, 30초 후에 대조군의

66%로 세균이 사멸되었으며, 5분에 4%로, 10분에 완전하게 사멸되었다.

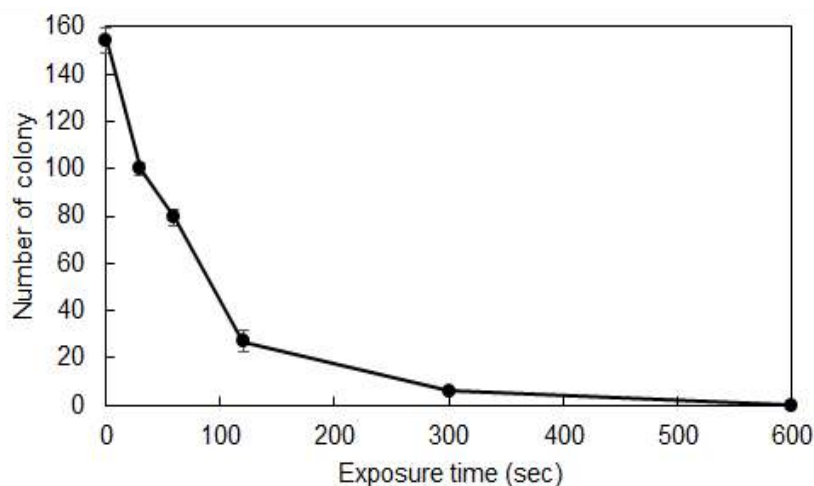


Figure 2. *S. mutans* time kill assay. *S. mutans* was treated with 12.5  $\mu\text{g/ml}$  LP-3 at 37°C.

### 3.1.3 *S. mutans* 바이오필름 감수성 시험

Figure 3과 같이 LP-3의 농도가 MIC의 1, 2, 8, 16 배로 증가함에 따라 바이오필름의 세포활성이 감소되었다. 특히, 활성 감소는 100  $\mu\text{g/ml}$  (16  $\times$  MIC)에서 급격하게 나타났다. Figure 4에서는 100  $\mu\text{g/ml}$  (16  $\times$  MIC)에서 2, 5, 10, 15 분간 반응시켰을 때의 변화를 본 것으로 반응초기 (2분)부터 세포활성이 감소되었다. 즉 LP-3는 2분 안에 바이오필름 활성에 영향을 주었다고 할 수 있다.



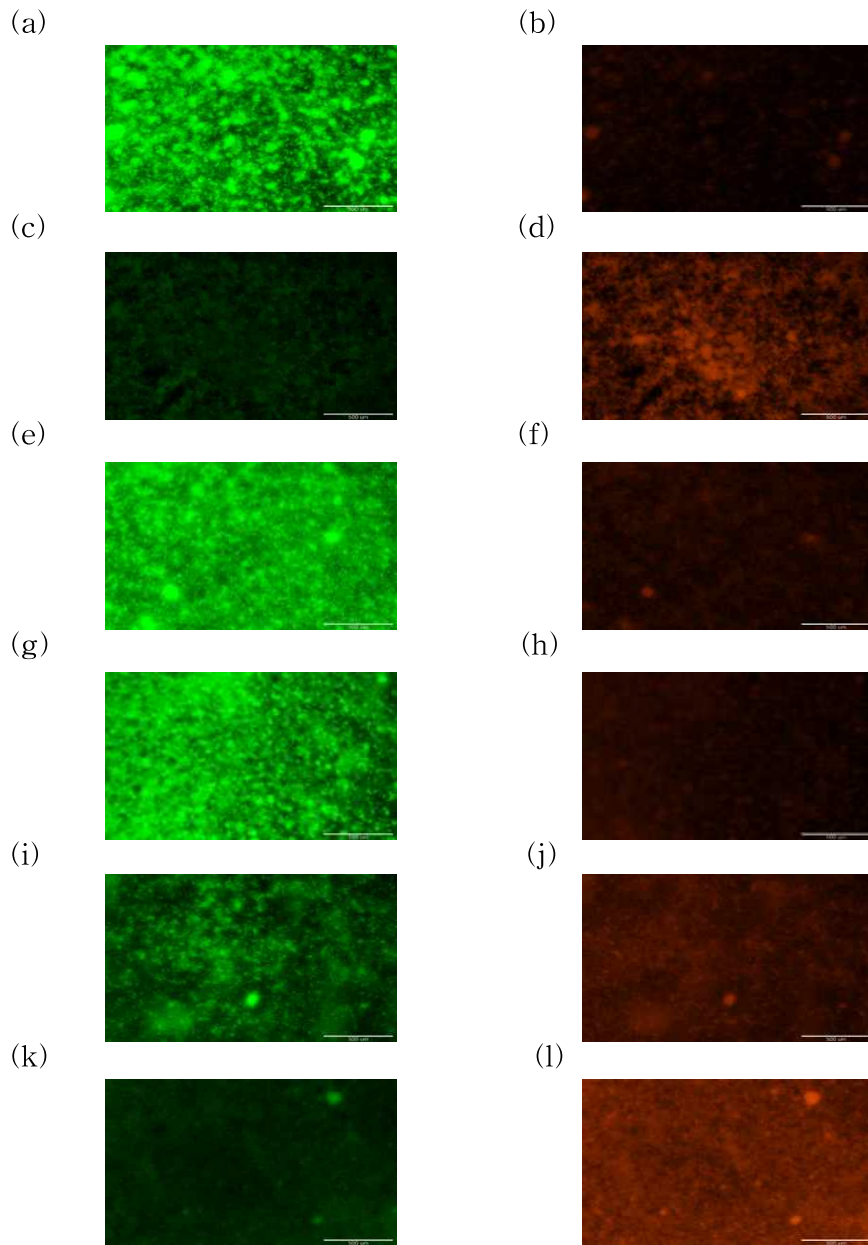


Figure 3. *S. mutans* biofilm susceptibility test. Live and dead cells were stained with green (a, c, e, g, i, k) and red (b, d, f, h, j, l) fluorescent probe, respectively. Cells were treated with LP-3 at 0 (a, b), 6.25 (MIC) (e, f), 12.5 (2× MIC) (g, h), 25 (8× MIC) (i, j), 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (16× MIC) (k, l) and 0.12% CHX (c, d). Scale bar is 0.5 mm.

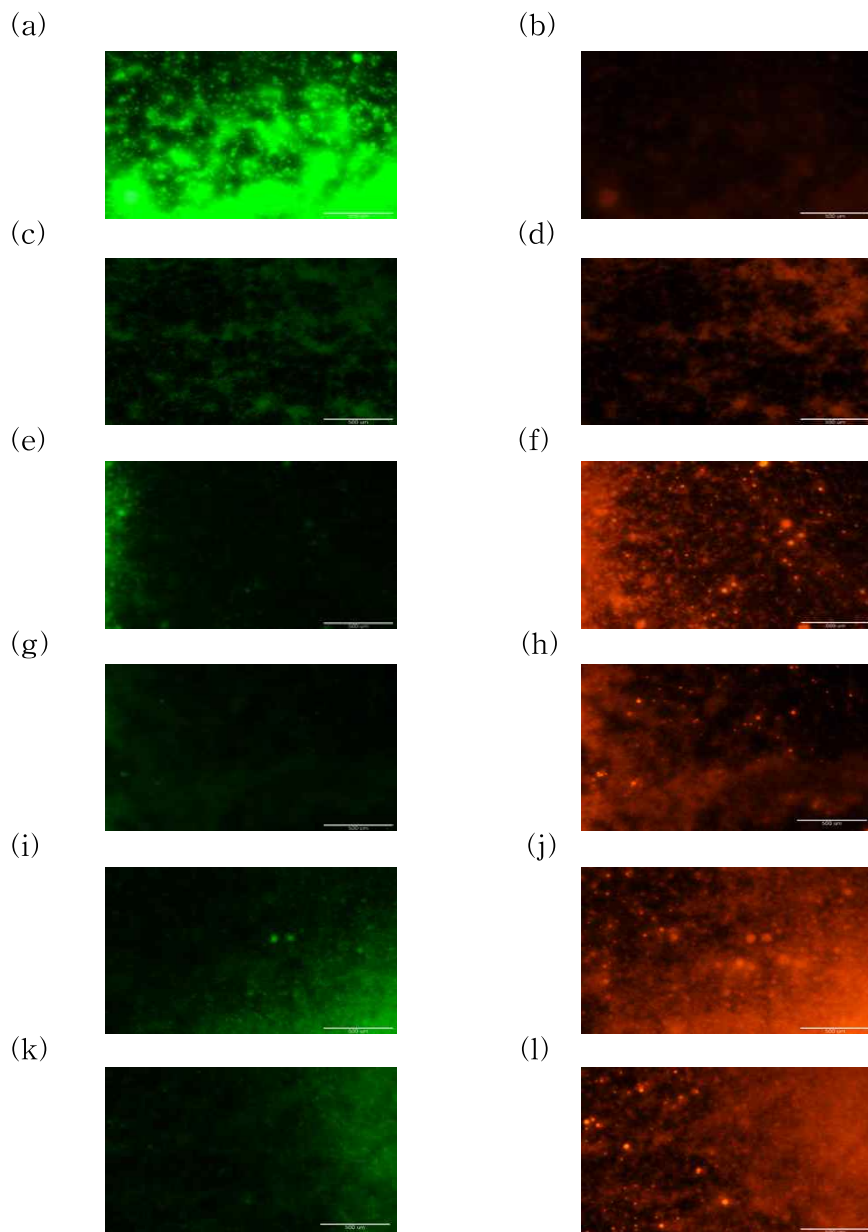


Figure 4. *S. mutans* biofilm susceptibility test (time kill assay). Cells were treated with LP-3 at 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ( $16\times$  MIC) for 0 (a, b), 2 (e, f), 5 (g, h), 10 (i, j), 15 (k, l) min. and 0.12% CHX (c, d). Live and dead cells were stained with green (a, c, e, g, i, k) and red (b, d, f, h, j, l) fluorescent probes, respectively. Scale bar is 0.5 mm.

## 3.2. *C. albicans* 감수성 시험

### 3.2.1 최소치사농도 결정

*C. albicans*의 활성에 대한 LP-3의 효과를 평가하기에 앞서, 진균 활성 측정에 대한 WST-1의 유용성을 조사하였다. 0.12% CHX를 처리한 *C. albicans*는 세포가 없는 대조군과 유사한 결과를 보였으며, 처리하지 않은 세포는 높은 OD를 나타내었다. 즉, WST-1으로 세포활성 측정이 가능한 것으로 판단되었다 (Figure 5). Figure 6에서 보는 바와 같이 LP-3의 농도를 다르게 하여 6시간 동안 반응시킨 후 세포활성을 WST-1으로 측정한 결과 *C. albicans*의 활성에 대한 저해 효과는 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 부터 나타나기 시작하였다. 50, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 각각 36%, 35%의 세포활성을 보였으며, 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 활성이 완전히 사라질 때까지 농도 의존적으로 저해 효과를 나타내었다.

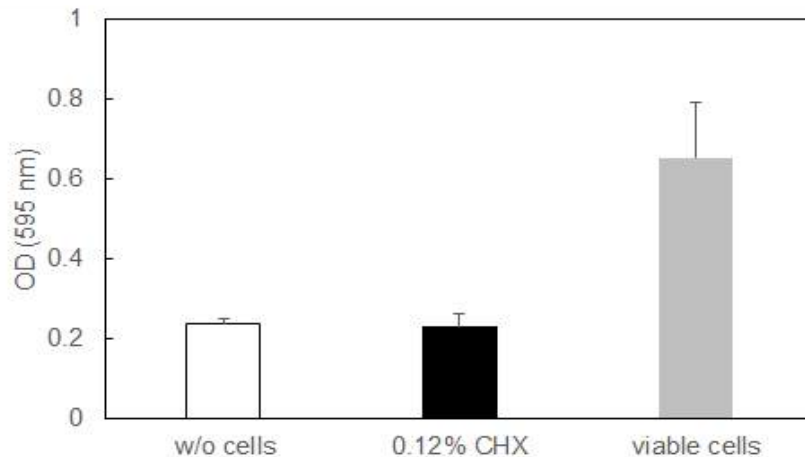


Figure 5. *C. albicans* WST-1 assay. Viability of live and dead (0.12% CHX-treated) *C. albicans* were measured with WST-1.

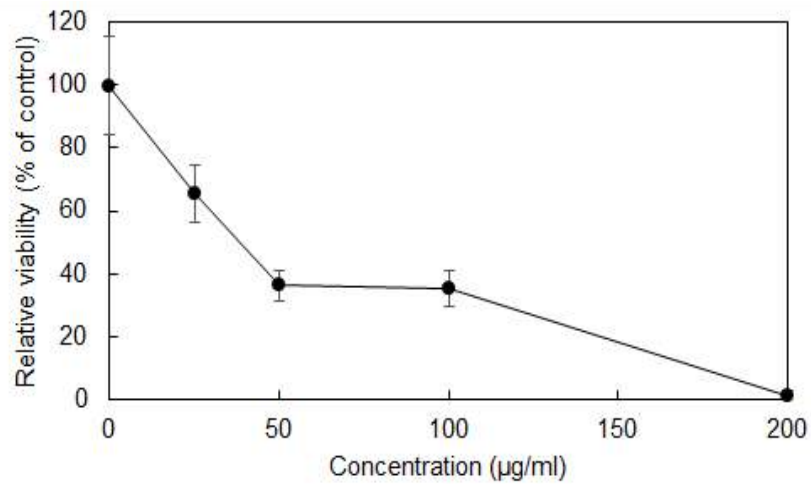


Figure 6. *C. albicans* cidal effect test. After treatment with LP-3 for 6 h, viability of *C. albicans* was measured with WST-1.

### 3.2.2 *C. albicans* 바이오필름 감수성 시험

PMMA disc에서 *C. albicans* 바이오필름을 형성하고 50 µg/ml 농도의 LP-3로 처리 후, WST-1 염색법으로 *C. albicans* viability를 측정된 결과, Figure 7과 같이 시간이 지날수록 *C. albicans* viability가 감소하는 결과를 보인 반면, 음성대조군은 세포활성이 증가하였다.

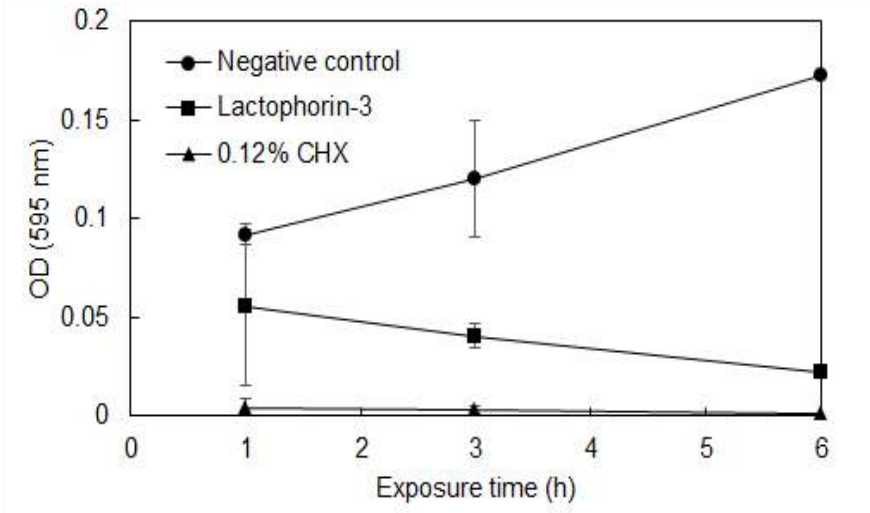


Figure 7. *C. albicans* viability test on PMMA. *C. albicans* on PMMA was treated with 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  LP-3 for 1, 3, 6 h. Viability of *C. albicans* was measured with WST-1.

### 3.2.3 Scanning electron microscope (SEM) 관찰

바이오필름 감수성 시험에서와 같이 PMMA에 바이오필름을 형성하고 8시간 동안 LP-3를 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 후 SEM으로 관찰한 결과, 다수의 세포가 PMMA 표면에서 제거되고, 평평하게 짓눌린 모양의 세포가 보였다. 즉, LP-3의 *C. albicans* 바이오필름에 대한 저해 효과를 SEM으로 확인할 수 있었다.

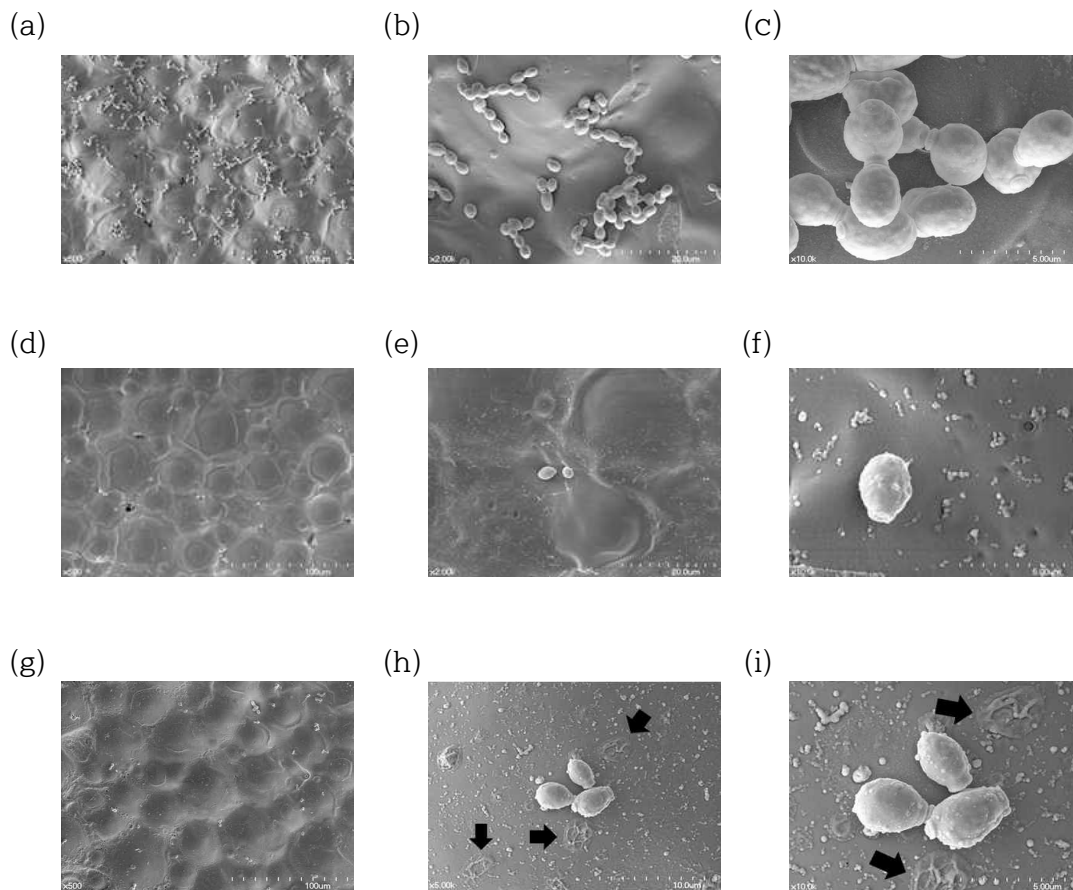


Figure 8. SEM observation of *C. albicans* on PMMA. Cells were treated with 50  $\mu\text{g/ml}$  LP-3 (g, h, i) and 0.12% CHX (d, e, f). Untreated control are shown in panel (a, b, c). Arrows indicate crushed and shrank *C. albicans*.

## 4. 고찰 및 결론

치아 우식증과 치주질환을 일으키는 미생물은 *Actinomyces* spp., *S. mutans*, *Lactobacillus* spp. 등이 대표적이다. *S. mutans*는 바이오필름을 형성하여 치아표면의 탈회를 초래하는데, AMPs는 항미생물 효과를 통해 치아우식증과 치주질환을 예방할 수 있을 것으로 기대된다. 현재, AMPs의 항미생물 효과에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 개구리 피부 유래의 AMPs인 L-K6는 MIC 3.13  $\mu\text{M}$ 에서 *S. mutans*의 바이오필름 억제 효과를 나타냈으며, 6.25  $\mu\text{M}$ 에서 *C. albicans*의 바이오필름 억제 효과를 나타내었다 [37]. 소 우유로부터 분리된 kappacin은 59  $\mu\text{g/ml}$  (26  $\mu\text{M}$ )에서 *S. mutans*의 바이오필름 억제 효과를 나타내었다 [17]. Lactoferricin B는 균주와 사용된 배지에 따라서 0.3-150  $\mu\text{g/ml}$ 의 넓은 범위의 MIC를 나타냈으며, lacticin 3147는 1.3-3.8  $\mu\text{M}$ 을 나타내었다 [1][38]. Cathelicidin-related antimicrobial peptide는 0.15  $\mu\text{M}$ 에서 *C. albicans*의 활성에 대한 저해 효과를 나타내었다 [39].

본 연구에서 사용된 LP-3는 6.25  $\mu\text{g/ml}$ 에서 *S. mutans*에 대한 억제 효과를 나타냈으며 *C. albicans*의 활성에 대한 저해 효과는 25  $\mu\text{g/ml}$ 부터 나타나기 시작했다. 이는 다른 AMPs와 유사한 정도의 항미생물 활성을 보이는 것이라고 할 수 있다. LP-3의 전구물질인 LPcin은 미생물 활성 억제 효과가 신속히 나타나는 것으로 알려져 있다 [27]. *S. mutans*는 LP-3에 노출 시작 후 30초에 66%의 세균이 사멸되었다 (Figure 2). 따라서, LP-3도 LPcin과 같이 항미생물 효과가

빠르게 나타나는 것으로 보인다. *S. mutans*의 MIC는 6.25  $\mu\text{g/ml}$ 로 나타나는 반면, *S. mutans*의 바이오필름 활성을 억제하기 위해서는 MIC 농도에서는 15분간 처리하여도 바이오필름 활성이 억제되지 않았다. 바이오필름 상에서 세포의 사멸을 유도하기 위해서는 MIC의 16배인 100  $\mu\text{g/ml}$ 이 필요한 것으로 나타났다 (Figure 3). 이와 같이 높은 농도의 펩타이드가 필요한 이유는 두 가지로 생각된다. 첫 번째 이유로서 바이오필름의 특성상 세포내로 펩타이드가 도달하기 쉽지 않기 때문이다. 두 번째 이유는 바이오필름 내의 세포 농도가 높아서 세포 활성을 억제하기 위해서는 더 높은 농도의 펩타이드가 필요하기 때문이다. 그러나 펩타이드의 농도가 충분하면 바이오필름 상태라도 세포 사멸 속도가 2분 이내로서 신속한 항미생물 효과를 보였다 (Figure 4). 따라서, 바이오필름이 LP-3의 침투를 적극적으로 방해하지는 않는 것으로 생각된다. 본 연구에서는 *C. albicans*의 MIC를 측정하지 않고 치사농도를 측정하였으므로 *S. mutans*의 농도보다 높은 농도의 펩타이드를 필요로 하였다 (Figure 6). *C. albicans*의 최소치사농도는 200  $\mu\text{g/ml}$ 로 6시간 이내에 *C. albicans*는 완전히 사멸되었다. 50  $\mu\text{g/ml}$ 에서는 36% 정도로 세포활성이 낮아졌으며, 이 농도에서 PMMA 상에 있는 *C. albicans*를 처리한 결과, 1시간 후 60%, 3시간 후 33%, 6시간 후 12%의 비율로 세포활성이 낮아졌다 (Figure 7). PMMA상에서 펩타이드가 더욱 효과적인 이유는 치사농도 결정시험과 PMMA 상에서의 항진균시험의 배양조건이 상이하기 때문으로 생각된다. *C. albicans*는 치사농도 결정시험에서 진탕배양한 것보다 PMMA 상에서 정지배양 되었을 경우 활성이 높지 않기 때문에 이러한 결과를 보인



것으로 사료된다.

마지막으로, LP-3로 처리한 *C. albicans*를 SEM으로 관찰한 결과, 납작하게 변형된 모양의 *C. albicans*를 관찰할 수 있었다 (Figure 8). 이는 LP-3가 *C. albicans*의 세포막 혹은 세포벽에 영향을 주어 나타난 것으로 생각되며, 향후 LP-3의 항미생물 작용 메커니즘에 대한 연구가 더 필요할 것으로 생각된다. 또한, 본 연구 결과를 바탕으로 LP-3는 틀니 세정제 등과 같은 다양한 분야에 적용이 가능 할 것으로 예상되며, 임상에 적용하기 위해서는 동물세포에 대한 LP-3의 세포독성 연구가 수행되어야 한다.

## 5. 참고문헌

- [1] Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*. 2002;415:389-95.
- [2] Fulmer PA, Lundin JG, Wynne JH. Development of antimicrobial peptides (AMPs) for use in self-decontaminating coatings. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2010;2:1266-70.
- [3] Zhao H. Mode of action of antimicrobial peptides (doctoral dissertation 2003). University of Helsinki, Helsinki. Finland.
- [4] Jiang Z, Vasil AI, Hale JD, Hancock RE, Vasil ML, Hodges RS. Effect of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic alpha-helical cationic antimicrobial peptides. *Biopolymers*. 2008;90:369-83.
- [5] Yokoyama S, Iida Y, Kawasaki Y, Minami Y, Watanabe K, Yagi F. The chitin-binding capability of Cy-AMP1 from cycad is essential to antifungal activity. *J Pept Sci*. 2009;15:492-7.
- [6] Hwang B, Hwang JS, Lee J, Kim JK, Kim SR, Kim Y, Lee DG. Induction of yeast apoptosis by an antimicrobial peptide, Papiliocin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;408:89-93.

- [7] Aerts AM, Carmona-Gutierrez D, Lefevre S, Govaert G, François IE, Madeo F, Santos R, Cammue BP, Thevissen K. The antifungal plant defensin RsAFP2 from radish induces apoptosis in a metacaspase independent way in *Candida albicans*. FEBS Lett. 2009;583:2513-16.
- [8] Andrés MT, Viejo-Díaz M, Fierro JF. Human lactoferrin induces apoptosis-like cell death in *Candida albicans*: critical role of K<sup>+</sup>-channel-mediated K<sup>+</sup> efflux. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52:4081-88.
- [9] Park C, Lee DG. Melittin induces apoptotic features in *Candida albicans*. Biochem Biophys Res Commun. 2010;394:170-2.
- [10] Shirtliff ME, Krom BP, Meijering RA, Peters BM, Zhu J, Scheper MA, Harris ML, Jabra-Rizk MA. Farnesol-induced apoptosis in *Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53:2392-2401.
- [11] Matsuzaki K. Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. Biochim Biophys Acta. 2009;1788:1687-92.
- [12] Jeong JH, Kim JS, Choi SS, Kim Y. NMR structural studies of antimicrobial peptides: LPCin analogs. Biophys J. 2016;110:423-30.
- [13] Sørensen ES, Petersen TE. Phosphorylation, glycosylation and

amino acid sequences of component PP3 from the proteose-peptone fraction of bovine milk. *J Dairy Res.* 1993;60:535-42.

[14] Lasky LA, Singer MS, Dowbenko D, Imai Y, Henzel WJ, Grimley C, Fennie C, Gillett N, Watson SR, Rosen SD. An endothelial ligand for L-selectin is a novel mucin-like molecule. *Cell.* 1992;69:927-38.

[15] Beg OU, Bahr-Lindstrøm H, Zaidi ZH, Jornvall H. Characterization of a heterogeneous camel milk whey non-casein protein. *FEBS Lett.* 1987;216:270-4.

[16] Cantisani A, Napolitano L, Giuffrida MG, Conti A. Direct identification and characterization of llama (*Lama glama* L.) whey proteins by microsequencing after western blotting. *J Biochem Biophys Methods.* 1990;21:227-36.

[17] Malkoski M, Dashper SG, O'Brien-Simpson NM, Talbo GH, Macris M, Cross KJ, Reynolds EC. Kappacin, a novel antibacterial peptide from bovine milk. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:2309-15.

[18] Jones EM, Smart A, Bloomberg G, Burgess L, Millar MR. Lactoferricin, a new antimicrobial peptide. *J Appl Bacteriol.* 1994;77:208-14.

- [19] Bellamy W, Takase M, Wakabayashi H, Kawase K, Tomita M. Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *J Appl Bacteriol.* 1992;73:472-9.
- [20] Lahov E, Regelson W. Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: casecidin, isracidin peptides. *Food Chem Toxicol.* 1996;34:131-45.
- [21] Zucht HD, Raida M, Adermann K, Mägert HJ, Forssmann W G. Casocidin-I: a casein- $\alpha$  s<sub>2</sub> derived peptide exhibits antibacterial activity. *FEBS lett.* 1995;372:185-8.
- [22] Lee W, Lee DG. Fungicidal mechanisms of the antimicrobial peptide Bac8c. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1848:673-9.
- [23] Campagna S, Mathot AG, Girardet JM, Gaillard JL. Antibacterial activity of lactophoricin, a synthetic 23-residues peptide derived from the sequence of bovine milk component-3 of proteose peptone. *J Dairy Sci.* 2004;87:1621-26.
- [24] Pedersen LR, Nielsen SB, Hansted JG, Petersen TE, Otzen DE, Sørensen ES. PP3 forms stable tetrameric structures through hydrophobic interactions via the C-terminal amphipathic helix and

undergoes reversible thermal dissociation and denaturation. FEBS J. 2012;279:336-47.

[25] Kolenbrander PE, Palmer RJ Jr, Rickard AH, Jakubovics NS, Chalmers NI, Diaz PI. Bacterial interactions and successions during plaque development. Periodontology. 2000. 2006;42:47-79.

[26] Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. J Clin Microbiol. 2005;43:5721-32.

[27] Marsh PD. Dental plaque as a biofilm and a microbial community – implications for health and disease. BMC Oral Health. 2006;6:14.

[28] Ruby JD, Li Y, Luo Y, Caufield PW. Genetic characterization of the oral Actinomyces. Arch Oral Biol. 2002;47:457-63.

[29] Ahn SJ, Wen ZT, Brady LJ, Burne RA. Characteristics of biofilm formation by *Streptococcus mutans* in the presence of saliva. Infect Immun. 2008;76:4259-68.

[30] Banas JA. Virulence properties of *Streptococcus mutans*. Front Biosci. 2004;9:1267-77.

[31] Loesche WJ, Rowan J, Straffon LH, Loos PJ. Association of

*Streptococcus mutans* with human dental decay. Infect Immun. 1975;11:1252-60.

[32] Wang W, Tao R, Tonga Z, Dinga Y, Kuang R, Zhai S, Liu J, Ni L. Effect of a novel antimicrobial peptide chrysopsin-1 on oral pathogens and *Streptococcus mutans* biofilms. Peptides. 2012;33:212-19.

[33] Baehni PC, Takeuchi Y. Anti-plaque agents in the prevention of biofilm associated oral diseases. Oral Diseases. 2003;9:23-9.

[34] Aoun G, Saadeh M, Berberi A. Effectiveness of hexetidine 0.1% compared to chlorhexidine digluconate 0.12% in eliminating *Candida albicans* colonizing dentures: A randomized clinical in vivo study. J Int Oral Health. 2015;7:5-8.

[35] Wei GX, Campagna AN, Bobek LA. Effect of MUC7 peptides on the growth of bacteria and on *Streptococcus mutans* biofilm. J Antimicrob Chemother. 2006;57:1100-9.

[36] Tomas I, Cousido MC, Tomas M, Limeres J, Garcia-Caballero L, Diz P. In vivo bactericidal effect of 0.2% chlorhexidine but not 0.12% on salivary obligate anaerobes. Arch Oral Biol. 2008;53:1186-91.

[37] Shang D, Liang H, Wei S, Yan X, Yang Q, Sun Y. Effects of

antimicrobial peptide L-K6, a temporin-1CEb analog on oral pathogen growth, *Streptococcus mutans* biofilm formation, and anti-inflammatory activity. Appl Microbiol Biotechnol. 2014;98:8685-95.

[38] Dobson A, O'connor PM, Cotter PD, Ross RP, Hill C. Impact of the broad spectrum antimicrobial peptide, lacticin 3147, on *Streptococcus mutans* growing in a biofilm and in human saliva. J Appl Microbiol. 2011;111:1515-23.

[39] De Brucker K, Delattin N, Robijns S, Steenackers H, Verstraeten N, Landuyt B, Luyten W, Schoofs L, Dovgan B, Fröhlich M, Michiels J, Vanderleyden J, Cammue BP, Thevissen K. Derivatives of the mouse cathelicidin-related antimicrobial peptide (CRAMP) inhibit fungal and bacterial biofilm formation. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58:5395-404.



## Abstract

### The effect of lactophorin-3 on the viability of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*

Hong Joo Park, D.D.S

Dept. of Dental Biomaterials Science

Graduate School, Seoul National University

#### 1. Purpose

*Streptococcus mutans* is known to cause dental caries, and the suppression of their growth and biofilm formation is important to prevent dental caries. *Candida albicans* which can irritate oral mucosa under a denture is found in normal oral flora among 30 ~40% of the total population. *C. albicans* can also irritate oral mucose via opportunistic infection in patients experiencing general prostration, immunosuppression, post-irradiation damage of mandible, diabetics, long-term treatment of antibiotics, denture stomatitis, dyscrinism, xerostomia, smoking and oral contraceptives. Proteose peptone component-3, an antibacterial phosphoglycoprotein found in bovine milk, which is also called lactophorin, contains lactophoricin (LPcin) composed of 23 amino

acid at C-terminus. LPcin is known to suppress gram-negative and gram-positive bacteria. In this study, anti-microbial effects of lactophorin-3 (LP-3, 15 amino acid residues), C-terminal modified LPcin, were investigated with *S. mutans* and *C. albicans*.

## 2. Materials and Methods

To observe antibacterial activity of LP-3 against *S. mutans* (OMZ-65), minimum inhibitory concentration (MIC) test, time kill assay, and biofilm susceptibility test were performed. Fluorescence staining method was used for biofilm susceptibility test. The effect of LP-3 on the viability of *C. albicans* (ATCC10231) was investigated by using WST-1, and biofilm susceptibility test was performed on polymethyl methacrylate (PMMA). Morphological changes of LP-3-treated *C. albicans* were observed by scanning electron microscopy (SEM). Statistical analysis of test results was performed with one way ANOVA and t-test. A p-value  $\leq 0.05$  was defined as statistically significant.

## 3. Results

MIC of LP-3 for *S. mutans* was determined to be 6.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . *S. mutans* was completely killed during 10 min by treatment with 12.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  LP-3. In biofilm susceptibility test, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ( $16 \times$  MIC) LP-3 reduced bacterial viability of biofilm during 15 min. At

the first 2 min of treatment, *S. mutans* mostly lost its viability. Inhibitory effects of LP-3 on the viability of *C. albicans* appeared from 25 µg/ml, and was augmented dose-dependently until 200 µg/ml. On the surface of PMMA, the viability of *C. albicans* was reduced to 60, 33, and 12% by LP-3 treatment for 1, 3 and 6 h, respectively, in compared to negative control. When *C. albicans* on PMMA was treated with 50 µg/ml LP-3 for 8 h, a large number of cells was removed, and several cells were squashed flat.

In conclusion, LP-3 exhibited antimicrobial effects on *S. mutans* and *C. albicans* dose- and time- dependently.

---

**Keywords :** Lactophorin-3, antimicrobial peptide, *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, biofilm, PMMA

**Student number :** 2015 - 23261