

## Relationship between Biofilm Formation Ability and Virulence of *Candida albicans*

Su Jung Park<sup>1</sup>, Sun Ju Choi<sup>1</sup>, Woon-Seob Shin<sup>2</sup>, Hyuk Min Lee<sup>3</sup>,  
Kkot Sil Lee<sup>4</sup> and Kyoung-Ho Lee<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Yonsei University Wonju College of Medicine and Institute of Basic Medicine, Yonsei University, Wonju, <sup>2</sup>Department of Microbiology, Kwandong University College of Medicine, Kangnung,

<sup>3</sup>Department of Laboratory medicine, <sup>4</sup>Department of Infectious Disease, Kwandong University College of Medicine, Myongji Hospital, Goyang, Korea

Biofilms are microbial communities that form on a surface and are surrounded by extracellular polymeric substances. *Candida* biofilms are a cause of infections associated with medical devices. In the present study, an attempt was made to evaluate a significance of biofilm formation ability (BF) in virulence of *C. albicans*. *C. albicans* of 98 isolates, 24 commensal strains obtained from the oral cavities of healthy volunteers, 29 from blood culture, 25 from urine culture, and 20 from vaginal candidiasis, were assayed for BF, an ability to adhere to epithelial cells (ADH), cell surface hydrophobicity (CSH), and germ tube forming rate (GT). The relationships of BF with CSH, ADH, and GT were statistically examined. A positive correlation between BF and ADH was obtained, but the correlation ( $r=0.326$ ) was relatively low. To assess BF as a factor contributing for candidiasis, mice lethality test was performed. The 10 isolates with the highest BF (mean survival rate, 24%) allow to kill mice more than those with the 10 lowest BF (mean survival rate, 47%). In addition, clinical strains isolated from blood culture, urine culture, and vaginal candidiasis showed higher BF than oral commensal strains. These results suggest BF may represent a virulent characteristic of *C. albicans*.

**Key Words:** *Candida albicans*, Biofilm, Virulence

### 서 론

*Candida albicans*는 건강한 사람의 구강이나 질강, 위 장관에서 정상 균총을 이루고 있으나 면역력이 떨어진 사람에게는 기회감염을 일으키며 혈행성 전신 과중으로 발전될 수 있다. 현재 *C. albicans*는 병원에서 획득되는 감염의 매우 주요한 원인균으로 자리하고 있다. 면역억제제나 세포독성 약제의 사용, 정상 세균을 억제하는 강력한 항생제 처치, 그리고 여러 가지 인체 삽입 기구

또는 보조물 이식 등 많은 의학적 처치들이 칸디다증 발생을 유발하는 위험 요인으로 작용하고 있다 (1, 2).

숙주 방어체계의 이상에서와 마찬가지로 *C. albicans*의 생물학적 특성도 감염증 성립에 영향을 주는 요인으로 작용한다. 일반적으로 *C. albicans*가 정상 상주균으로 자리하고 있으면서 주로 숙주의 면역력 약화로 감염증이 성립되기 때문에 병원성 균주와 정상 상주균 간의 차이를 절대적 병원성 인자만으로 설명하기는 어렵다. 그러나 지금까지 많은 연구를 통하여 숙주상피세포 부착능력과 부착소들 (3~5), 조직의 단백질이나 인지질을 가수분해하는 세포의 분비 효소들 (6, 7), 군사 형성과 형태 변환 능력 (8~11) 등이 *C. albicans* 병원성을 나타내는 특성으로 알려져 있다.

한편, 대부분의 *C. albicans*는 자연환경에서 자유롭게 떠있는 상태보다는 세포외 물질들의 표면에 고착하여 biofilm 형태로 존재한다. 생체에 생기는 biofilm은 칸디

Received: May 7, 2009/ Revised: June 2, 2009

Accepted: June 4, 2009

\*Corresponding author: Kyoung-Ho Lee. Department of Microbiology, Yonsei University Wonju College of Medicine and Institute of Basic Medicine, Yonsei University, 162 Il san-dong, Wonju 220-701, Korea.

Phone: +82-33-741-0324, e-mail: leekh@yonsei.ac.kr

\*\*This work was supported by the Yonsei University Research Fund of 2007.

다중 성립과 그 발전과정에서 결정적인 역할을 하며 생체뿐만 아니라, 카테터, 삽입 보철물 등의 의학적 처치 기구에 형성되는 biofilm도 칸디다증 감염원으로서 중요한 의미를 가진다 (12, 13).

Biofilm 생성과정의 첫 단계는 기질 기저층에 *C. albicans*가 부착하는 것으로 여기에는 *C. albicans*의 소수성, 표면 거칠기, 특이한 adhesin 등이 작용한다. 다음으로 균이 증식하여 미세집락을 형성하고 다양한 외부 물질들도 함께 침착된다. 이렇게 일단의 지지물이 형성된 후 효모형 세포는 균사체로 전환되어 삼차원적 구조를 만들며 수많은 미세집락과 수분이 통할 수 있는 공간이 서로 얽혀 보통 수백  $\mu\text{m}$ 까지 biofilm을 형성한다 (14). 따라서 잘 발달된 biofilm은 *C. albicans* 효모형과 여러 가지 모양의 균사체가 함께 공존하며 비 세포성 물질인 단백질이나 다당체가 침착된 혼합 구조물이다 (15~17).

본 연구는 *C. albicans*의 상피세포 부착능, 조직 혹은 의료기구 부착에 영향을 주는 세포표면 소수성, 혈청에 의한 균사 형성능들과 biofilm과의 상관관계를 조사하였고 마우스 치사율을 측정하여 biofilm 생성능의 의의를 판단하였다. 또한 임상 가검물에 따라 분리된 *C. albicans* 사이에 biofilm 생성능력이 차이가 있는지를 조사하여 실제 병원성과 biofilm과의 연관성을 판단해 보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험 균주 및 동물

*C. albicans*는 연세대학교 원주의과대학 원주기독병원에 내원한 환자의 혈액배양에서 29주, 질염에서 20주를 분리하였고 관동대학교 의과대학 명지병원의 환자의 소변배양에서 25주를 분리하여 동정된 균을 사용하였다. 정상 분리균은 원주기독병원 치과외래에 방문한 건강한 사람의 구강에서 24주를 분리하여 사용하였다. 분리균들은 Sabouraud's dextrose (SD) 배지에 배양한 후  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 보관하여 사용하였다. 실험동물은 생후 8~10주된 암컷 BALB/c 마우스 (Orient Bio, Seongnam, Korea)를 사용하였다.

### 세포 및 세포배양

*C. albicans*의 상피세포 부착능을 확인하기 위해 사용된 HeLa 세포는 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone, Logan, UT, USA), 100 U/ml penicillin 및 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  strep-

tomyacin (Life Technologies, Grand Island, NY, USA)이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Life Technologies)으로 단층배양하였다. 세포는 5%  $\text{CO}_2$ ,  $37^{\circ}\text{C}$  상태의 습윤 항온 배양기에서 배양하였다.

### 상피세포 부착능

SD 한천 배지에서 자란 *C. albicans*를 1% glucose가 포함된 yeast nitrogen base (YNB, Difco<sup>TM</sup>, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) 배지에 접종하여  $24^{\circ}\text{C}$ 에서 16시간 동안 배양하였다. 배양된 균을 차가운 phosphate buffered saline (PBS)로 두 번 세척하였다. 상피세포주인 HeLa 세포 ( $1.5 \times 10^4$  cells/well)를 10% FBS가 포함된 DMEM 배지로 96-well microplate (Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA)에 단세포층이 될 때까지 배양한 후, FBS가 없는 DMEM 배지로 3회 세척하였다. 이 후 각 well에  $1 \times 10^6$ 개의 *C. albicans*를 넣고 3시간 배양하고 부착되지 않은 *C. albicans*를 PBS로 3번 씻어내었다. 상피세포에 부착된 *C. albicans*는 각 well에 2.5% glutaraldehyde (Sigma, St. Louis, MO, USA) 100  $\mu\text{l}$ 를 넣어 고정하였다. 현미경 (Olympus Co., Tokyo, Japan) 하에서 세포층 상피세포 1  $\text{mm}^2$  내에 부착된 *C. albicans*를 세었고 3회 반복하여 평균 측정값을 산정하였다.

### 세포표면 소수성 (cell surface hydrophobicity, CSH)

Rosenberg (18)의 phase partition 방법을 이용하였다. 먼저 SD 한천 배지에 자란 *C. albicans*를 증류수 1리터에 yeast extract 10 g, peptone 20 g, glucose 20 g을 넣어 만든 yeast peptone dextrose 배지 (YPD)에 접종하여  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 배양하였다. 배양 18시간 후 *C. albicans*를 원심 분리하여 회수하고 PBS로 3회 세척하였다. PBS로 3 ml의 yeast 부유액을 만들고 0.8 ml의 n-hexane (Sigma)을 넣어 vortex mixer로 약 90초 동안 진탕하여 혼합하였다. 상층의 hydrocarbon phase로 이동된 세포를 제거하고, 아래층의 *C. albicans* 부유액의 흡광도 (600 nm, spectrophotometer, Biochrom, Cambridge, UK)를 n-hexane을 처치하지 않은 대조군의 흡광도와 비교함으로써 아래의 공식에 따라 relative CSH를 산출, 측정하였다.

$$\text{Relative CSH} = \frac{(\text{A600 of Controls}) - (\text{A600 of Treated Cells})}{\text{A600 of Controls}} \times 100$$

### 균사 형성능

SD 한천 배지에서 자란 한 집락의 *C. albicans*를 YPD 배지에 접종하여 37°C에서 18시간 배양한 후 실험에 사용하였다. 균액을 원심 분리하여 PBS로 두 번 세척하였다. *C. albicans*를  $5 \times 10^7$  cells/ml 농도로 PBS에 부유하고 동량의 토끼 혈청을 첨가하여 37°C에서 2시간 배양하였다. 균액의 일부를 취하여 균사 형성을 확인한 후 5% glutaraldehyde 200  $\mu$ l를 첨가하여 고정시켰다. 균액 100  $\mu$ l를 채취하여 광학 현미경 (Olympus, 배울, 400배)하에서 *C. albicans* 100개 중 균사를 형성한 세포수를 측정하였다.

### Biofilm 생성

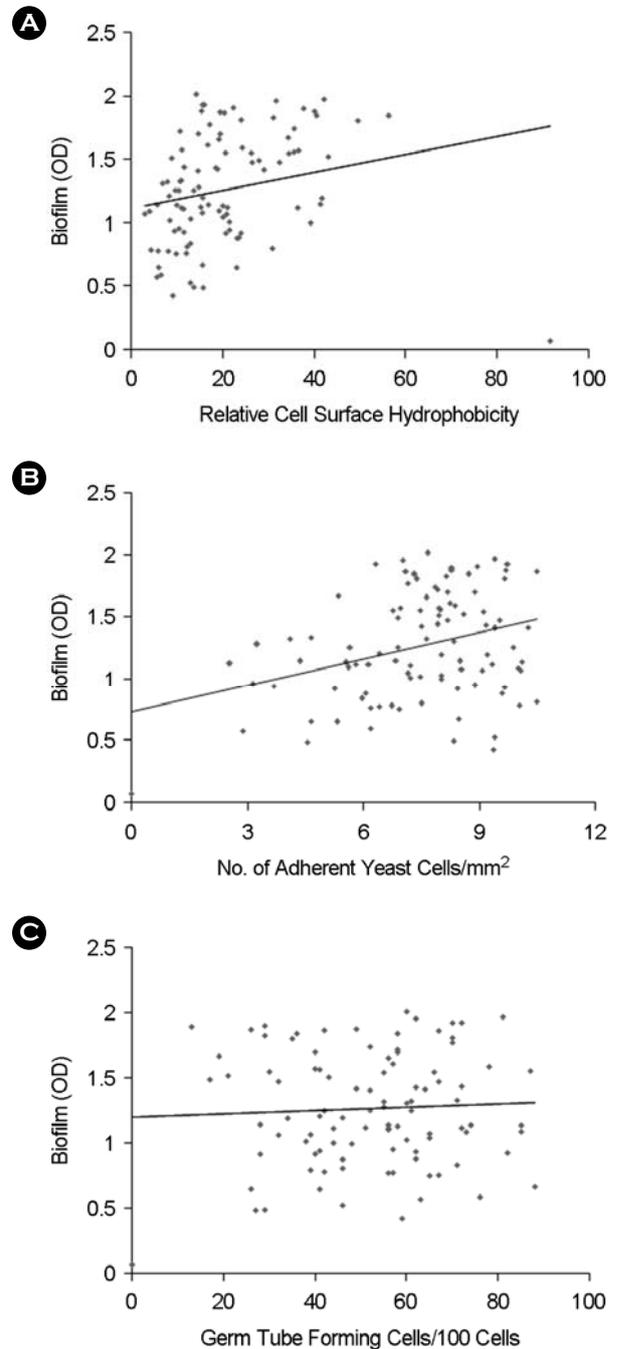
Ramage 등 (15)의 방법을 변형하여 이용하였다. *C. albicans*를 SD 한천 배지에 접종하여 37°C에서 18시간 동안 배양하였다. 배양된 균을 50 mM glucose가 포함된 yeast nitrogen base (YNB, Difco) 배지에 접종하여 30°C에서 18시간 진탕배양한 후, 100 mM glucose가 포함된 YNB 배지로 3번 세척하였다. *C. albicans* ( $1 \times 10^7$  cells/ml)를 100 mM glucose가 포함된 YNB 배지로 희석하여 96-well microplate (Costar, Cambridge, MA, UAS)에 100  $\mu$ l 접종하여 37°C에서 1시간 30분 배양한 후 plate에 약하게 붙은 균을 PBS 세척으로 제거하였다. 각 well에 100 mM glucose가 포함된 YNB 배지 200  $\mu$ l를 첨가하여 75 rpm으로 3일간 배양하였다. 미부착균을 PBS 세척으로 제거한 후 각 well마다 XTT (1 mg/ml, Sigma), Menadione (0.4 mM, Sigma) 5:1 혼합액을 200  $\mu$ l씩 처리하여 빛이 차단된 곳에서 3시간 반응시키고 microplate reader (Emax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 마우스 치사능

Biofilm 생성능이 제일 높은 것부터 10주, 낮은 것부터 10주씩 총 20주의 *C. albicans*를 선정하여 SD 배지에 접종, 37°C에서 18시간 배양한 후 원심 분리하였다. 생리 식염수로 *C. albicans* 농도를 조절하여 각각의 마우스마다  $1 \times 10^5$ 개의 *C. albicans*를 꼬리 정맥에 주사하였다. 매일 일정한 시간에 관찰하면서 마우스의 생존율을 측정하였다.

### 통계처리

통계처리는 t-test와 one-way ANOVA에 의하여 *p* 값을



**Figure 1.** Correlation between the ability of biofilm formation (BF) and putative virulence factors of *C. albicans*. A. Correlation between BF and relative cell surface hydrophobicity:  $r = 0.219$ ,  $p = 0.07$ ; B. Correlation between BF and the ability of adherence to HeLa cells:  $r = 0.326$ ,  $p < 0.01$ ; C. Correlation between BF and germ tube forming rate:  $r = 0.045$ ,  $p = 0.61$ .



질염 분리균주 1.32, 소변배양 분리균주 1.53으로 측정되었으며 모두 구강 분리균주보다 biofilm 생성능이 높게 나타났다 ( $p < 0.01$ ).

## 고 찰

*C. albicans* biofilm 생성의 첫 단계는 표면 부착과정이며 이 후 균 증식과정과 함께 여러 가지 세포외부의 중합체들과 섞이어 견고한 구조의 집락을 형성한다. *C. albicans*가 어떤 표면에 부착하려면 균이 지닌 세포표면 소수성, 정전기적 힘 등의 비특이적 요인들과 부착소와 수용체 같은 특이적 요인이 필요하며 (19, 20), 특별히 *C. albicans* biofilm은 구형과 균사 모양의 *C. albicans*가 서로 얽히어 세포과는 다른 독특하고 보다 견고한 구조를 형성하고 있다 (14~17).

본 연구에서는 부착과 관련된 *C. albicans*의 세포표면 소수성과 상피세포에 부착능과 *C. albicans* biofilm 구성에 필요한 균사를 형성하는 활성을 측정하여 *C. albicans*이 지닌 biofilm 생성능력과 비교하였다 (Fig. 1). *C. albicans*의 biofilm 생성능과 세포표면 소수성, 그리고 상피세포 부착능과는 서로 통계학적으로 유의하게 연관성을 보여주었으나 ( $p < 0.01$ ), 그 상관계수가 세포표면 소수성 0.219, 상피세포 부착능 0.326으로 특성들 사이에 실제 상관성은 크지 않았다. 더욱이 균사 형성능과는 연관성이 없어 효모형과 균사체가 얽혀 보다 더 견고해지는 biofilm 구조물 그 자체와 *C. albicans*의 균사 형성능과는 독립된 특성일 것으로 생각된다. 즉 다양한 형태의 *C. albicans*가 biofilm에 구성되어 보다 견고한 구조물을 이루고 있으나 균사형태로의 전환되는 능력이 높은 *C. albicans*가 biofilm을 보다 더 잘 형성한다는 것과는 서로 다른 특성으로 생각된다. 다만 그 biofilm 구조물의 견고성에는 차이가 있을 것으로 추측되며 앞으로 전자현미경을 통한 구조분석 등이 필요할 것으로 생각된다.

Biofilm이 생성되려면 여러 가지 복합적 특성이 함께 작용하여 만들어지게 된다. 본 연구에서는 biofilm을 생성하는 균의 능력이 *C. albicans*의 병원성을 나타내는 하나의 지표가 될 수 있을 것인지를 판단하기 위하여 biofilm 생성 고능력 균주와 저능력 균주를 선별하여 직접 마우스 치사능을 조사하였다 (Fig. 2). Biofilm 생성 저능력 *C. albicans*를 접종한 마우스 군에서의 생존율 (47%)이 고능력 균주를 접종한 마우스군의 생존율 (24%)보다 약 2배

정도 높게 측정됨으로써 실제로 biofilm 생성능력이 높은 *C. albicans*가 더 높은 병원성을 나타냄을 확인할 수 있었다.

*C. albicans*는 사람에서 상주성 진균으로 주로 기회감염을 일으키는 진균이다. 이런 기회감염의 원인 미생물은 균 자체의 병원성으로 지목되는 생물학적 특성보다는 숙주의 방어체계가 감염증 성립에 절대적으로 중요한 요인이 된다. 즉 숙주 면역계의 저하로 감염증이 성립될 것이며 건강한 사람에게 *C. albicans*이 높은 병원성을 지니므로써 감염증이 성립되는 경우는 매우 적을 것이다. 그럼에도 임상 가검물에서 감염 원인체로 분리된 *C. albicans*가 정상 상주균으로 분리된 구강 분리균주보다 biofilm 생성이 평균 35% 정도 높게 나타나고 혈액배양, 소변배양, 칸디다 질염 분리균주 모두에서 구강 분리균보다 높은 생성능을 가진 결과를 보여준 결과 (Fig. 3)는 biofilm 생성능이 *C. albicans* 병원성의 한 지표가 될 수 있음을 시사한다.

결론적으로 부착, 미세집락, 단단한 구조를 나타내는 것이 *C. albicans*의 biofilm이며 이 구조물을 형성하는 능력이 높은 *C. albicans*가 마우스 치사능이 높아 biofilm 생성능이 고병원성을 나타내는 한 가지 특성으로 생각된다. 그리고 임상 가검물 분리균들이 상주균보다 biofilm 생성능이 높은 것도 위의 결론을 뒷받침하는 연구결과로 해석할 수 있겠다.

## 참 고 문 헌

- 1) Pappas PG, Rex JH, Sobel JD, Filler SG, Dismukes WE, Walsh TJ, Edwards JE; Infectious Diseases Society of America. Guidelines for treatment of candidiasis. Clin Infect Dis 2004; 38:161-89.
- 2) Hurley R, de Louvois J, Mulhall A. Yeasts as human and animal pathogens. In: Rose AH, Harrison JS, editors. The yeasts. 2nd ed. London: Academic Press INC; 1987. p. 212-39.
- 3) Calderone R, Gow NAR. Host recognition by *Candida* species. In: Calderone RA editor, *Candida* and candidiasis. Washington D.C.: ASM Press; 2002. p. 67-86.
- 4) Hostetter MK. Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida spp.* with epithelial and endothelial surfaces. Clin Microbiol Rev 1994;7:29-42.
- 5) Sundstrom P. Adhesion in *Candida spp.* Cell Microbiol 2002;

- 4:461-9.
- 6) Hube B, Naglik J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology* 2001;147:1997-2005.
  - 7) Hube B, Naglik JR. Extracellular hydrolases. In: Calderone RA editor, *Candida and candidiasis*. Washington D.C.: ASM Press; 2002. p. 107-22.
  - 8) Brown AJ, Gow NA. Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. *Trends Microbiol* 1999;7:333-8.
  - 9) Gow NA, Brown AJ, Odds FC. Fungal morphogenesis and host invasion. *Curr Opin Microbiol* 2002;5:366-71.
  - 10) Soll DR. Gene regulation during high-frequency switching in *Candida albicans*. *Microbiology* 1997;143:279-88.
  - 11) Soll DR. Phenotypic switching. In: Calderone RA editor, *Candida and candidiasis*. Washington D.C.: ASM Press; 2002. p. 123-42.
  - 12) Kojic EM, Darouiche RO. *Candida* infections of medical devices. *Clin Microbiol Rev* 2004;17:255-67.
  - 13) Ramage G, Martínez JP, López-Ribot JL. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res* 2006;6:979-86.
  - 14) Seneviratne CJ, Jin L, Samaranayake LP. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. *Oral Dis* 2008;14:582-90.
  - 15) Ramage G, Vandewalle K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol* 2001;18:163-70.
  - 16) Baillie GS, Douglas LJ. Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *J Antimicrob Chemother* 2000;46:397-403.
  - 17) Andes D, Nett J, Oschel P, Albrecht R, Marchillo K, Pitula A. Development and characterization of an *in vivo* central venous catheter *Candida albicans* biofilm model. *Infect Immun* 2004;72:6023-31.
  - 18) Rosenberg M. Microbial adhesion to hydrocarbons: twenty-five years of doing MATH. *FEMS Microbiol Lett* 2006;262:129-34.
  - 19) Chaffin WL, López-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martínez JP. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62:130-80.
  - 20) Li X, Yan Z, Xu J. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiology* 2003;149:353-62.