

# *Streptococcus mutans* 군에 의해 형성된 바이오필름에 대한 Glycyrrhetic acid의 불안정화 효과

유정현, 이다미, 이상화

LG 생활건강 기술연구원

## Destabilizing effect of glycyrrhetic acid on pre-formed biofilms of *Streptococcus mutans*

Jungheon Yu, Dami Lee, Sanghwa Lee

LG Household &amp; Health Care Ltd., Daejeon, Korea

**Received:** January 8, 2016  
**Revised:** February 15, 2016  
**Accepted:** February 26, 2016

**Corresponding Author:** Sanghwa Lee  
LG Household & Health Care Ltd., 175,  
Gajeong-ro, Yuseong-gu, Daejeon 34114,  
Korea  
Tel: +82-42-860-8723  
Fax: +82-42-862-2474  
E-mail: shleek@lgcare.com

**Objectives:** In this study, the destabilizing effect of glycyrrhetic acid on pre-formed biofilms of *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) was observed.

**Methods:** Alamar blue assay was used to determine the toxicity of glycyrrhetic acid on pre-formed biofilms of *S. mutans*. Four different concentrations (0, 3.75, 7.5, 15  $\mu$ g/ml) of glycyrrhetic acid were tested. Changes in the biofilm architecture after exposure to glycyrrhetic acid were analyzed by scanning electron microscopy (SEM). Moreover, the role of glycyrrhetic acid in enhancing the antimicrobial activity of cetylpyridinium chloride (CPC), an antimicrobial agent commonly used in oral health care products, was evaluated.

**Results:** Glycyrrhetic acid concentration of up to 15  $\mu$ g/ml had little cytotoxic effect but significantly changed the biofilm architecture. SEM analysis revealed destabilized biofilm structure after the pre-formed biofilms were exposed to glycyrrhetic acid. Supplementing 2.5  $\mu$ g/ml CPC with 15  $\mu$ g/ml glycyrrhetic acid significantly enhanced the bactericidal effect of CPC on the pre-formed biofilms than that in the non-supplemented CPC treated control. This indicates that glycyrrhetic acid enhanced the antimicrobial activity of CPC by modifying the structure, thus facilitating the penetration of CPC into the biofilm.

**Conclusions:** Glycyrrhetic acid could be a potential agent to effectively control *S. mutans* biofilms responsible for dental caries.

**Key Words:** Biofilm destabilizing effect, Dental caries, Glycyrrhetic acid, *Streptococcus mutans*

## 서론

미생물은 고체 표면 위에 부착하여 다층의 세균막을 형성하는데 이것을 바이오필름이라고 한다. 미생물이 바이오필름을 형성하면, 부유할 때와는 다른 성질을 가지게 된다<sup>1,2</sup>. 바이오필름 형태로 존재할 경우에는 미생물이 부유생활을 할 때 보다 가혹한 환경, 항생제, 면역세포의 공격 등에 대해 훨씬 강한 저항성을 가지기 때문

에 멸균, 소독, 치료가 어렵다<sup>2</sup>.

치아우식증은 감염성 세균에 의해 발생하는 감염성 질환 중의 하나로서, *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) 군이 치아우식증을 일으키는 주요 병원균이다. *S. mutans* 군은 구강내 생존을 위해 치아에 부착하여 바이오필름을 형성한다<sup>3,4</sup>. 이러한 구강내 바이오필름이 치아우식증을 발생시키는데 중요한 역할을 한다.

효과적으로 치아우식증을 예방하기 위해서는 *S. mutans* 군과

그 세균이 형성하는 바이오필름을 제어해야 한다. 일반적으로 치아우식증 예방을 위한 구강케어 제품들은 다양한 항균제를 함유하고 있다<sup>5,6)</sup>. 그러나 항균제는 바이오필름 내부에 침투하여 바이오필름 안에 있는 균까지 항균작용을 하는데 한계가 있다<sup>7)</sup>. 그러므로 치아우식증을 예방하기 위하여 치아에 형성되는 바이오필름을 제어할 수 있는 다양한 항균제 보완 물질들이 개발되고 있다.

*Glycyrrhiza* 종은 전통의약에 종종 사용되어 왔다. 연구자들은 이들의 효능성분과 생물학적 활성을 연구해 왔다<sup>8)</sup>. *Glycyrrhiza glabra*의 뿌리에서 분리한 *Glycyrrhetic acid*는 류마티스성 통증이나 위궤양 치료와 같은 약학적 효능이 증명되었다<sup>9,10)</sup>. 또한 본 연구자들은 *Glycyrrhetic acid*가 *S. mutans* 균의 바이오필름 형성을 억제한다는 사실을 발견하였다(발표전 데이터). 그러나 아직까지 이미 형성된 바이오필름에 대한 *Glycyrrhetic acid*의 작용 효능은 구체적으로 연구되어 있지 않다.

이번 연구에서 우리는 *Glycyrrhetic acid*가 *S. mutans* 균에 의해 형성된 바이오필름의 구조를 불안정하게 변화시켜 항균제가 효과적으로 침투하여 세균을 제어할 수 있는 방법을 보여주는데 목적이 있다. 구체적으로는 형성된 바이오필름에 대한 *Glycyrrhetic acid*의 농도별 독성을 평가하고, 전자주사현미경(Scanning electron microscopy, SEM) 이미지 분석을 통한 형태학적 변화를 관찰하려 한다. 그리고 이러한 영향이 항균제인 Cetylpyridinium chloride (CPC)의 효능을 강화시키는지 실험적으로 확인해 보고자 한다. 이를 통해 *Glycyrrhetic acid*가 형성된 바이오필름을 제어하는 보완제의 역할을 함으로써 구강내 치아우식증 예방 제제로서의 가능성을 제시하고자 한다.

## 연구대상 및 방법

### 1. 실험균주 및 배양

ATCC에서 구입한 *S. mutans* UA159를 사용하였다. *S. mutans* UA159는 Brain Heart Infusion (BHI) 액체배지(BD, Franklin Lakes, NJ, USA)에 접종하여 37°C 배양기에 배양하였다.

### 2. 독성 평가

*S. mutans* 균에 의해 형성된 바이오필름에 대한 *Glycyrrhetic acid* (Shaanx Fujie Pharmaceutical Co., Ltd., Xianyang, China)의 독성을 alamar blue 실험법으로 측정하였다<sup>11,12)</sup>. BHI 액체배지에 *S. mutans* 균을 접종하여 600 nm에서 흡광도가 0.5가 될 때까지 배양하였다. 그리고 96-well microtitre plate에  $1 \times 10^6$  CFU/ml 농도가 되도록 1% sucrose가 들어있는 BHI 액체배지로 희석하여 접종하였다. 이를 37°C 배양기에서 6시간 동안 배양한 후 PBS로 수세하여 부유균을 제거하였다. 이렇게 형성된 바이오필름에 *Glycyrrhetic acid*를 농도별로(0, 3.75, 7.5, 15 µg/ml) 처리하여 37°C 배양기에서 18시간 배양하였다. 그리고 10% alamar blue solution (Invitrogen, Waltham, MA, USA)을 넣고 같은 배양조건에서 2시간 동안 배양한 후, plate reader (VICTOR; PerkinElmer, Waltham, MA, USA)를 사용하여 형광을 측정하였다. 이

때 *Glycyrrhetic acid*를 처리하지 않은 대조군을 기준으로 독성 정도를 나타냈으며, 실험은 3회 반복 실시하였다.

### 3. 주사전자현미경을 이용한 형성된 바이오필름에 대한 변화 관찰

대수증식기의 *S. mutans* 균을 1% sucrose가 들어있는 BHI 액체배지에 1:100으로 희석하여 37°C 배양기에서 6시간 동안 배양함으로써 cover glass 위에 바이오필름을 형성하였다. 여기에 15 µg/ml *Glycyrrhetic acid*를 처리하였다. *Glycyrrhetic acid*를 처리하지 않은 것을 대조군으로 사용하였다. 37°C 배양기에서 18시간 배양한 후, cover glass에 존재하는 바이오필름을 2% formaldehyde와 2.5% glutaraldehyde가 포함된 buffer로 실온에서 18시간 동안 고정하였다. 고정된 바이오필름을 에탄올에 순차적으로 탈수시킨 후 완전히 건조하였다. 건조된 시료는 백금 코팅 후, 주사전자현미경(S-4800; Hitachi, Tokyo, Japan)을 사용하여 1,000배의 배율로 관찰하였다.

### 4. 항균제 작용에 대한 *Glycyrrhetic acid*의 효능 평가

대수증식기의 *S. mutans* 균을 1% sucrose가 들어있는 BHI 액체배지에 1:100으로 희석하여 96-well microtitre plate에 접종한 후, 37°C 배양기에서 6시간 동안 배양하였다. 그런 다음 부유균을 제거하기 위하여 PBS로 수세하였다. 이렇게 형성된 바이오필름에 항균제인 CPC/*Glycyrrhetic acid* 혼합물을 처리하여 37°C 배양기에서 18시간 동안 배양하였다. 처리농도는 2.5 µg/ml CPC, 2.5 µg/ml CPC+15 µg/ml *Glycyrrhetic acid*, 15 µg/ml *Glycyrrhetic acid*, 대조군인 무처리군을 포함한다. 여기에 alamar blue를 처리하여 형광을 측정하여 평가하였다.

### 5. 통계 분석

모든 실험은 3회 반복으로 수행하였고, 각각의 결과는 평균과 표준편차로 표현하였다. 통계적 분석은 SPSS 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계프로그램을 사용하여 ANOVA 방법으로 수행했으며, 유의수준은 0.05로 하였다.

## 연구 성적

### 1. 형성된 바이오필름에 대한 *Glycyrrhetic acid*의 독성

형성된 바이오필름에 대한 *Glycyrrhetic acid*의 독성평가를 하였다. 형성된 바이오필름에 0, 3.75, 7.5, 15 µg/ml *Glycyrrhetic acid*를 처리하여 alamar blue로 평가해 보았다. 그 결과, 무처리군과 비교해 보았을 때 15 µg/ml *Glycyrrhetic acid* 농도까지는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 1).

### 2. *Glycyrrhetic acid*에 의한 형성된 바이오필름의 형태학적 변화

형성된 바이오필름에 15 µg/ml *Glycyrrhetic acid*를 처리하였을 때의 영향을 주사전자현미경을 사용하여 1,000배의 배율로

관찰해 보았다(Fig. 2). Glycyrrhetic acid를 처리하지 않은 대조군 (a)의 경우 큰 균 덩어리들로 구성되어 있는 반면, Glycyrrhetic acid를 처리한 실험군 (b)의 경우 대조군보다 균 덩어리들이 작게 조각화되어 있으며, 바이오필름 부피와 두께가 감소한 것을 확인할 수 있었다. 반면, 형성된 바이오필름에 CPC를 단독으로 처리하였을 경우 바이오필름의 형태학적 변화가 없음을 확인하였다. 즉 대조군 (a)와 유사한 이미지로 관찰되었으며, CPC와 Glycyrrhetic acid를 함께 처리하였을 경우는 Glycyrrhetic acid를 처리한 실험군 (b)와 유사한 이미지로 관찰되었다(data not shown).

### 3. Glycyrrhetic acid의 형성된 바이오필름에 대한 항균제 작용 강화 효과

Glycyrrhetic acid가 형성된 바이오필름 구조를 불안정하게 만드는 효과를 확인하여, Glycyrrhetic acid가 항균제의 침투 및 항균작용을 강화시키는지 실험적으로 확인해 보았다. 형성된 바이오필름에 CPC/Glycyrrhetic acid 혼합물을 처리하여 alamar

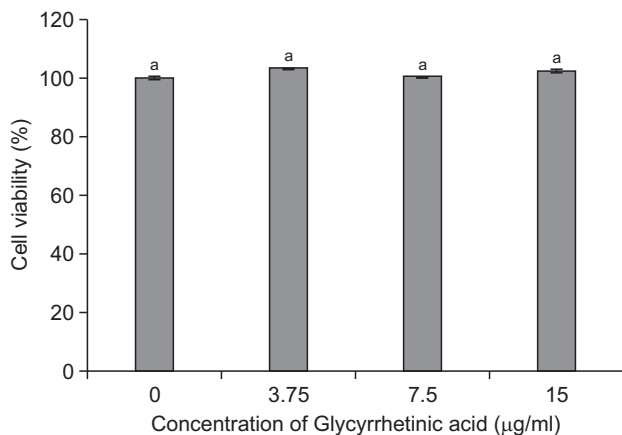


Fig. 1. Cytotoxicity of Glycyrrhetic acid on pre-formed biofilms of *S. mutans*.

blue로 평가해 보았다(Fig. 3). 그 결과 혼합물을 처리하였을 경우, CPC 단독으로 처리하였을 때보다 항균작용이 통계적으로 유의하게 증가하였다( $P < 0.05$ ). 2.5 μg/ml CPC에 15 μg/ml Glycyrrhetic acid를 함께 처리한 경우, 2.5 μg/ml CPC 단독으로 처리하였을 경우와 비교하였을 때 형성된 바이오필름 균들에 대한 항균작용이 약 2배 정도 증가하였다. 15 μg/ml Glycyrrhetic acid를 단독으로 처리하였을 경우에는 항균효과가 거의 없었다.

## 고 안

바이오필름은 고체 표면 위에 형성되는 미생물의 3차원적 구조물로서 세균에 의해 발생하는 감염성 질환의 중요한 요인이다.

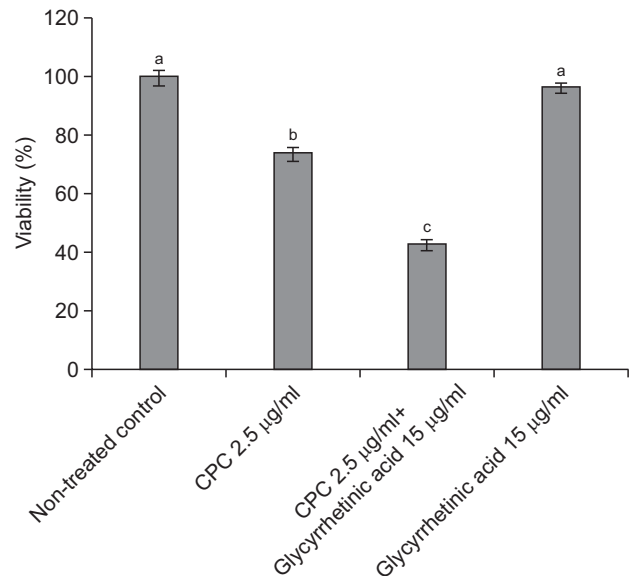


Fig. 3. Effect of Glycyrrhetic acid on the antimicrobial activity in the pre-formed biofilms of *S. mutans*.

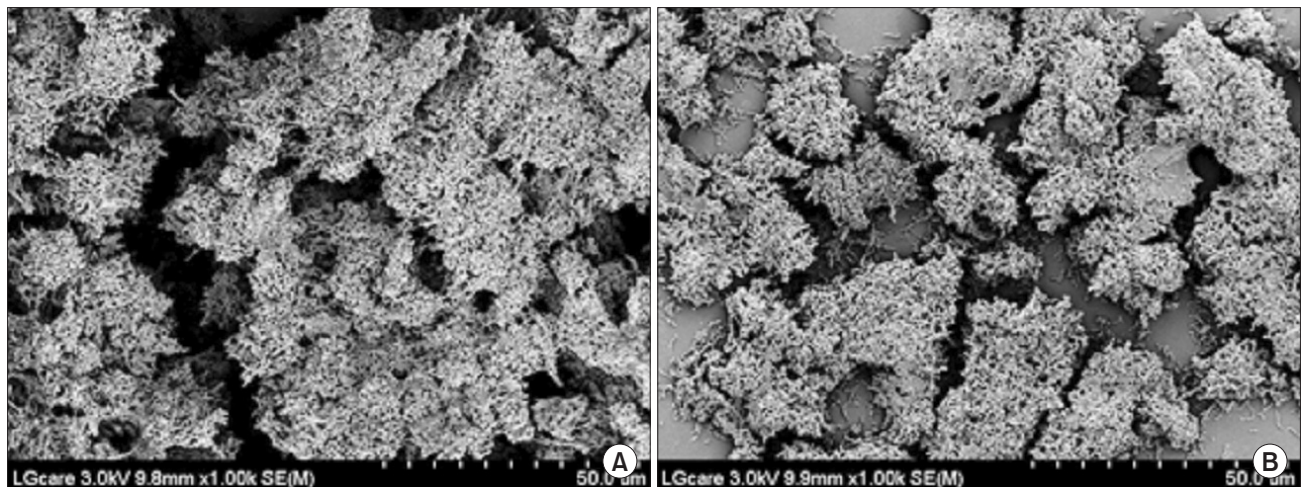


Fig. 2. SEM images of formed biofilms of *S. mutans*. (A) non-treated control; (B) biofilms treated with 15 μg/ml Glycyrrhetic acid.



치아우식증은 *S. mutans* 균에 기인한 가장 잘 알려진 바이오필름 관련 질병 중 하나이다<sup>13,14</sup>. 이러한 치아우식증을 효과적으로 예방하기 위해서는 *S. mutans* 균의 바이오필름 제어 방법에 주목해야 한다.

현재 구강내 바이오필름을 제어하기 위해 신규 또는 천연 항균제 개발, 나아가 퀴럼센싱(Quorum sensing)과 같은 미생물 간의 소통 경로를 차단하는 물질을 개발하는 방향으로 연구가 진행되고 있다<sup>4,15-17</sup>. 미생물은 단독으로 살아남을 수 없고 서로를 필요로 하기 때문에, 퀴럼센싱 경로를 차단하면 미생물의 생장 및 바이오필름 형성을 억제할 수 있을 것이라 생각하고 있다. 이를 통해 항생제를 비롯한 항균물질에 대한 내성을 나타내는 슈퍼박테리아를 키우기보다는 공생을 통해 저항성을 최소화하면서 감염확률을 낮출 수 있다<sup>13</sup>.

이와 같이 구강내 바이오필름을 효과적으로 제어할 수 있는 신규 물질을 개발할 필요성도 있지만, 현재 사용하고 있는 항균제를 통해 형성된 바이오필름에 보다 효과적으로 침투하여 균을 제어할 수 있는 방법을 찾는 연구가 우선적으로 이루어져야 한다고 생각한다.

이에 본 연구에서는 천연식물인 *Glycyrrhiza glabra*에서 분리한 Glycyrrhetic acid가 형성된 바이오필름의 구조를 불안정화하여 항균제의 침투를 용이하게 함으로써 형성된 바이오필름 내부의 균까지 제어할 수 있는 방법을 보여주고자 하였다. 이를 통해 Glycyrrhetic acid가 형성된 바이오필름에 대한 항균제의 한계를 극복할 수 있는 보완제로서의 가능성을 제시하고자 한다.

형성된 바이오필름에 대해 Glycyrrhetic acid를 농도별로 처리하여 독성평가를 했을 때, 15 µg/ml Glycyrrhetic acid 농도까지는 독성이 없었다(Fig. 1). 그러므로 형성된 바이오필름에 대한 Glycyrrhetic acid의 영향은 직접적인 항균효과 때문이 아님을 알 수 있었다.

그리고 형성된 바이오필름에 대한 Glycyrrhetic acid의 영향을 전자주사현미경을 통해서 관찰해 보았다. 그 결과 바이오필름 구조의 변화를 볼 수 있었다(Fig. 2). 15 µg/ml Glycyrrhetic acid를 처리한 실험군의 경우 Glycyrrhetic acid를 처리하지 않은 대조군에 비해 바이오필름 두께와 부피가 감소하였으며 균 덩어리들이 작게 조각화되어 있었다. 이를 통해 Glycyrrhetic acid는 형성된 바이오필름의 형태학적 구조를 변화시켜 바이오필름을 불안정하게 만든다는 사실을 알 수 있었다. 이는 본 연구자들이 선행 연구하여 밝혀낸 Glycyrrhetic acid가 바이오필름 관련 유전자들의 발현을 억제한다는 사실과 연관성이 있는 것으로 보인다(발표전 데이터). Glycyrrhetic acid의 이러한 작용이 cell-cell interaction을 변화시켜 바이오필름의 구조를 불안정하게 변화시키는 것으로 사료된다.

Glycyrrhetic acid의 이러한 효능이 항균제인 CPC가 형성된 바이오필름 내부에 침투해서 작용하는 것의 한계를 극복하는데 도움을 준다는 사실을 CPC와 Glycyrrhetic acid 혼합물을 처리하여 실험해 봄으로써 확인할 수 있었다(Fig. 3). 2.5 µg/ml CPC에 15 µg/ml Glycyrrhetic acid를 함께 처리한 경우, 2.5 µg/ml

CPC를 단독으로 처리하였을 경우에 비해 형성된 바이오필름 군들에 대한 항균작용이 약 2배 정도 증가하였다. 이는 Glycyrrhetic acid의 형성된 바이오필름의 구조에 대한 영향이 CPC의 침투를 용이하게 함으로써 항균제의 작용을 강화한 것으로 여겨진다.

바이오필름은 항균제에 대한 저항성이 높기 때문에 바이오필름이 형성되면 제어를 위해 더 많은 항균제를 사용해야 한다. 본 연구를 통해서 구강내 형성된 바이오필름에 항균제인 CPC와 함께 Glycyrrhetic acid를 복합 처방함으로써 구강제품에 사용하는 CPC의 사용량을 줄이면서 바이오필름 내부의 균까지 효율적으로 제어할 수 있을 것이라 사료된다.

본 연구에서는 Glycyrrhetic acid가 독성이 없으면서 형성된 바이오필름의 구조를 불안정하게 만든다는 것을 보여주었다. 이러한 불안정화는 바이오필름 구조의 형태학적 변화를 통해서 추론할 수 있다. 그리고 Glycyrrhetic acid의 이러한 효능이 구강케어 제품에 많이 사용되고 있는 항균제인 CPC의 침투를 용이하게 하여 항균효과가 증진되는 것을 확인하였다. 그러나 본 연구는 *S. mutans* 균에 한하여 실험을 진행한 것에 제한점이 있다. 구강내 바이오필름은 실제 환경에서 다양한 균 복합체에 의해 형성되므로 균 복합체를 이용한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다. 또한 향후 구강제품에 Glycyrrhetic acid와 항균제를 복합 처방하여 임상적 효과를 확인하는 단계가 필요할 것으로 여겨진다.

## 결론

본 연구는 Glycyrrhetic acid가 구강내 *S. mutans* 균에 의해 형성된 바이오필름의 구조를 불안정화하여 항균제의 침투를 용이하게 하는지를 알아보고자 시행하였다. *S. mutans* 균에 의해 형성된 바이오필름에 Glycyrrhetic acid를 처리하여 alamar blue assay를 통한 독성평가와 SEM을 통한 형태학적 변화를 관찰함으로써 확인하였다. 그리고 이러한 효능이 항균제의 작용을 강화시키는 지 평가하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 형성된 바이오필름에 Glycyrrhetic acid를 농도(0, 3.75, 7.5, 15 µg/ml) 별로 처리하여 독성평가를 실시한 결과, 15 µg/ml 농도까지 통계적으로 유의한 차이가 없었다.
2. Glycyrrhetic acid를 처리하여 SEM을 통해 형성된 바이오필름의 형태학적 구조를 관찰한 결과 바이오필름을 구성하는 균 덩어리가 조각화되고, 바이오필름의 부피와 두께가 감소한 것을 확인할 수 있었다.
3. 항균제인 CPC에 Glycyrrhetic acid를 혼합처리하여 CPC 단독의 경우와 항균력을 비교해 본 결과 혼합처리한 경우 항균력이 2배 이상 증가한 것으로 나타났다( $P < 0.05$ ).

이상의 결과, Glycyrrhetic acid의 바이오필름 불안정화 효능은 이미 형성된 바이오필름에 대한 기존 항균제의 활성 저하라는 일반적인 한계를 해결할 수 있는 보완제로서 사용될 수 있는 가능성을 보여준다. 그러므로 Glycyrrhetic acid와 항균제를 복합 처방하여 구강제품에 적용함으로써 구강내 효과적인 치아우식증 예방제로서의 역할이 기대된다.

## References

1. Liu Y, Wang L, Zhou X, Hu S, Wu H. Effect of the antimicrobial decapeptide KSL on the growth of oral pathogens and *Streptococcus mutans* biofilm. *Int J Antimicrob Agents* 2011;37:33-38.
2. Yoshida A, Ansai T, Takehara T, Kuramitsu HK. LuxS-based signaling affects *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:2372-2380.
3. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* 1999;60:756-762.
4. Zhiyan H, Qian W, Yuejian H, Jingping L, Yuntao J, Rui M, et al. Use of the quorum sensing inhibitor furanone C-30 to interfere with biofilm formation by *Streptococcus mutans* and its *luxS* mutant strain. *Int J Antimicrob Agents* 2012;40:30-35.
5. Eley BM. Antibacterial agents in the control of supragingival plaque—a review. *Br Dent J* 1999;186:286-296.
6. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev* 1986;50:353-380.
7. Marsh PD. Plaque as a biofilm: pharmacological principles of drug delivery and action in the sub- and supragingival environment. *Oral Dis* 2003;9 Suppl 1:S16-22.
8. Pellati D, Fiore C, Armanini D, Rassu M, Bertoloni G. *In vitro* effects of glycyrrhetic acid on the growth of clinical isolates of *Candida albicans*. *Phytother Res* 2009;23:572-574.
9. Tsukiyama R, Katsura H, Tokuriki N, Kobayashi M. Antibacterial activity of licochalcone A against spore-forming bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:1226-1230.
10. Asl MN, Hosseinzadeh H. Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza* sp. and its bioactive compounds. *Phytother Res* 2008;22:709-724.
11. Hamid R, Rotshteyn Y, Rabadi L, Parikh R, Bullock P. Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicol In Vitro* 2004;18:703-710.
12. Robin K. Pettit, Christine A. Weber, Melissa J. Kean, Holger Hoffmann, Gero R. Pettit, Rui Tan, et al. Microplate alamar blue assay for *Staphylococcus epidermidis* biofilm susceptibility testing. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:2612-2617.
13. Senadheera D, Cvitkovitch DG. Quorum sensing and biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Adv Exp Med Biol* 2008;631:178-188.
14. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol* 2000 2002;28:12-55.
15. Park SN, Lim YK, Freire MO, Cho E, Jin D, Kook JK. Antimicrobial effect of linalool and  $\alpha$ -terpineol against periodontopathic and cariogenic bacteria. *Anaerobe* 2012;18:369-372.
16. Paula Va, Modesto A, Santos KR, Gleiser R. Antimicrobial effects of the combination of chlorhexidine and xylitol. *Br Dent J* 2010 Oct 1 [Epub]. DOI:10.1038/sj.bdj.2010.887.
17. Hassan S, Danishuddin M, Adil M, Singh K, Verma PK, Khan AU. Efficacy of *E. officinalis* on the cariogenic properties of *Streptococcus mutans*: a novel and alternative approach to suppress quorum-sensing mechanism. *PLoS One* 2012 Jul 5 [Epub]. DOI:10.1371/journal.pone.0040319.