

Effect of Methylene Blue-mediated Photodynamic Therapy on Wild-type and Ciprofloxacin-resistant *Mycobacterium smegmatis*

Insoo Shim¹, Myungwon Choi¹, Yegee Min¹, Kwang Hyuk Seok², Jiyeun Kate Kim¹,
Jee-Yeong Jeong², Chul-Ho Oak^{3*} and Indal Park^{1*}

¹Department of Microbiology, Kosin University College of Medicine, Busan; ²Department of Biochemistry, Kosin University College of Medicine, Busan; ³Department of Internal Medicine, Kosin University College of Medicine, Busan, Korea

Tuberculosis (TB) patients are normally treated with a combination of antibiotics. However, with improper or incomplete treatment of antibiotics, the disease may progress to multidrug-resistant TB (MDR-TB). The treatment of MDR-TB is very costly and inefficient. Therefore, there is a great demand of new therapeutic approaches for MDR-TB such as photodynamic therapy. In this study, we tried to optimize the conditions for photodynamic inactivation of TB using methylene blue as a photosensitizer. Different combinations of methylene blue concentrations and light doses were tested for their photodynamic effects to A549 cells or *Mycobacterium smegmatis* (*M. smegmatis*). We also tested the effect of photodynamic therapy on ciprofloxacin-resistant *M. smegmatis*. Methylene blue treatment alone did not affect the survival rates of A549 cells or bacteria up to 5 µg/ml. When the A549 and *M. smegmatis* cells treated with methylene blue were irradiated with laser light (wavelength, 630 nm), photodynamic inactivation of cells was increased in methylene blue concentration- and light dose-dependent manners. Interestingly, the ciprofloxacin-resistant *M. smegmatis* exhibited higher level of susceptibility to methylene blue-mediated photodynamic inactivation. This study suggests that photodynamic therapy at 3.6 J/cm² in the presence of 5 µg/ml methylene blue may be an appropriate range for therapy due to the high bactericidal activity against high level of ciprofloxacin-resistant *M. smegmatis* and the low damaging effect to mammalian cells. This study demonstrates that photodynamic therapy could be a potential alternative for MDR-TB treatment.

Key Words: Photodynamic therapy, Methylene blue, *Mycobacterium smegmatis*, Ciprofloxacin, Tuberculosis

INTRODUCTION

광역동치료법(Photodynamic therapy, PDT)은 빛과 그 빛에 반응하는 물질의 상호작용으로 국소 부위에서 화학작용을 일으켜 치료하는 방법으로써 빛 에너지와 빛 감각

제, 산소가 필요하다. 빛이 목적물에 흡수되면 빛 감각제가 radical과 singlet oxygen과 같은 세포독성물질의 생성을 유도하게 되고, 이 물질이 DNA나 단백질에 작용하여 apoptosis나 necrosis를 일으키는 것으로 알려져 있다 (1). 빛 에너지로는 레이저, intense pulsed light, light-emitting diodes (LEDs), blue light, red light, 가시광선 등이 있으며,

Received: January 19, 2016/ Revised: February 6, 2016/ Accepted: February 11, 2016

*Corresponding author: Indal Park. Department of Microbiology, Kosin University College of Medicine, 262 Gamcheon-ro, Suh-gu, Busan 49267, Korea. Phone: +82-51-990-6423, Fax: +82-51-990-3081, e-mail: indalp103@gmail.com

*Corresponding author: Chul-Ho Oak. Department of Internal Medicine, Kosin University College of Medicine, 262 Gamcheon-ro, Suh-gu, Busan, 49267 Korea.

Phone: +82-51-990-6215, Fax: +82-51-990-3081, e-mail: oaks70@daum.net

© 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/>).

빛 감작제로는 haematoporphyrin 유도체를 비롯하여 다양한 물질들이 있는데, 의료용으로 사용되는 감작제들은 porphyrins, chlorophylls, dyes로 분류하고 있으며 여러 종류들이 제품화 되어 있다 (2, 3). 본 실험에 사용한 methylene blue (MB)는 phenothiazinium salts로 알려져 있는 푸른색 계통의 염료로써 620~670 nm에서 빛을 흡수하며 다른 빛 감작제와 마찬가지로 singlet oxygen과 자유 산소기를 발생하여 *Staphylococcus aureus* 등과 같은 그람 양성균 뿐만 아니라, *Pseudomonas aeruginosa* 같은 그람 음성균, 포자, 다양한 종류들의 진균이나 효모, 바이러스 등의 제거에 사용되고 있으며, 암세포, 최근에는 광우병의 원인 물질인 프리온도 불활성화 시켰다는 보고도 있다 (4~12).

결핵(tuberculosis, TB)은 주로 폐에 감염을 일으키지만 전신의 거의 모든 장기에서 질병을 일으킬 수 있고, 기침, 재채기, 콧물, 대화하는 과정에서도 공기를 통해 전파될 수 있는 균이기 때문에 보통 같은 공간에서 생활하는 사람들에서 집단적으로 발생할 가능성이 높다. 2015년 세계 보건기구(World Health Organization, WHO)의 보고(Global Tuberculosis Control WHO Report, 2015)에 의하면 우리나라는 결핵 3대 지표인 결핵 발생률, 유병률, 사망률에 있어서 10만명당 발생률은 2013년 97명에서 2014년 86명으로, 유병률은 143명에서 101명으로, 사망률은 5.2명에서 3.8명으로 감소했다고 발표하였는데, 여전히 결핵 발생률은 경제협력개발기구(Organization for Economic Co-operation and Development, OECD) 국가 중 가장 높다. 결핵의 치료는 기본적으로 6개월의 장기간, 다량의 약을 복용해야 하기 때문에 규칙적이고, 지속적인 복용이 어려워 그로 인한 내성균의 출현도 높은 편이다. 결핵 치료제인 isoniazid (isonicotinyl hydrazine, INH), rifampin (RMP)에 내성을 가진 균을 다약제내성결핵균(multidrug-resistant TB, MDR-TB)이라 하고, 이들 내성균의 치료에는 aminoglycoside, ethionamide, pyrazinamide, fluoroquinolone (FQ)의 4가지 약제가 사용되는데 이런 MDR-TB 중 FQ에 내성이면서 주사용 약제인 capreomycin 또는 kanamycin, amikacin 중 하나에 대해 내성인 균을 광범위약제내성결핵균(extensively drug resistant TB, XDR-TB)이라고 한다. 2014년 한 해 동안 전 세계에서 MDR-TB 환자가 480,000명 발생하였고, 190,000명이 사망하였으며, MDR-TB 환자 중 9.7%가 XDR-TB 환자인 것으로 보고되었다. 결핵의 재치료 실패 시 12~88%의 환자가 MDR-TB로 된다는 WHO의 보고가 있으며, 국가별 MDR-TB 환자 수의 추정치가 1,700여명으로

OECD 회원국 중에서 가장 많은 우리나라로서는 결핵의 예방과 치료에 집중적인 연구가 필요한 상황이다 (13~15). MDR-TB의 치료에 사용되는 FQ는 ofloxacin, ciprofloxacin (CFX), levofloxacin 등이며, 최근에는 4세대 FQ인 moxifloxacin이나 gatifloxacin이 많이 사용되고 있고, 이 약제들은 *M. tuberculosis* DNA의 double-strand를 절단함으로써 사멸시키는 것으로 알려져 있다 (16, 17). FQ에 대한 내성은 주로 DNA gyrase와 Topoisomerase IV의 유전자 변이에 의해 발생하는데, DNA gyrase는 *gyrA*, *gyrB* 유전자에 의해, Topoisomerase IV는 *parC*와 *parE* 유전자에 의해 만들어지는데, *M. tuberculosis*는 DNA gyrase의 돌연변이가 내성에 주로 관여하는 것으로 알려져 있다 (18~20). 이와 같이 결핵은 전 세계뿐만 아니라 국내에서도 심각한 질병으로 문제가 되고 있지만 아직 확실한 치료제나 치료 방법이 개발되어 있지 않다.

따라서 본 실험에서는 결핵균과 유사한 성질을 갖고 있는 *M. smegmatis*를 이용하여 결핵균을 효과적으로 사멸시킬 수 있는 방법을 찾기 위해 가격이 저렴하면서 성능이 우수한 MB를 광감작제로 이용하고, 광원으로는 300 mW/cm² 레이저를 사용하여 균 사멸에 효율이 높은 MB의 농도와 레이저 주사 시간의 조합을 찾고자 하였다. 그리고 CFX에 내성인 *M. smegmatis*를 만들어 내성균에 대한 효과 역시 연구함으로써 결핵 치료의 기초 자료를 마련하고자 하였다.

MATERIALS AND METHODS

시약 및 배지

세포주로는 사람 폐암세포(Human lung adenocarcinoma epithelial cell line)인 A549 (ATCC, CCL-185, USA)를 사용하였으며, 세포 배양에는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, HyClone, USA)에 10% fetal bovine serum (FBS, HyClone), 1% penicillin-streptomycin 혼합액(Hyclone)을 첨가한 배지를 사용하였다. Methylene blue (MB) Seoul Chemical Inc., Korea)는 phosphate buffered saline (PBS)에 1 mg/ml 되게 녹여 보관하며 사용하였고, 항균제는 ciprofloxacin (CFX; Bayer Schering Pharma AG, Germany), lomefloxacin (LMX; Sigma., USA), levofloxacin (LFX; Daiichi Sankyo Co., LTD, Japan), moxifloxacin (MFX; Bayer Vital GmbH, Germany), amikacin (AMK; Boryung Pharm, Korea), clarithromycin (CLA; Abbott France, France), colistin (COL;

Mississauga, Canada), rifampin (RMP; Sigma) 등을 사용하였다.

M. smegmatis 배양에는 Middlebrook 7H9 액체배지(Difco, USA)와 7H10 고형배지(Difco)를 사용하였으며, 0.5% Tween 80 (Sigma)과 10% ADC (albumin, dextrose, catalase) enrichment (BD and BBL, USA)를 첨가하여 균을 37°C 배양기에서 배양하였다. 배양된 균은 OD₆₀₀ = 0.6일 때 14,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 Tween 80이 0.5% 첨가된 PBS에 잘 현탁하였고, 균 수를 1×10^6 CFU/ml로 조정하여 실험에 사용하였다.

MTT assay에는 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (Sigma)를 PBS에 2 mg/ml 되게 녹여 사용하였고, 레이저는 Ceralas PDT Diode Laser System (CeramOptec, Germany)의 제품으로 630 nm의 파장을 갖고 있다.

A549 세포주에 대한 MB의 사멸 효과 측정

사람의 세포에 영향을 주지 않는 MB의 농도를 측정하기 위하여 폐암 세포주인 A549 세포를 DMEM 배지에서 키워 5×10^7 개의 세포를 96 well에 분주하여 24시간 동안 배양하였다. MB의 농도를 0, 1, 5, 10, 30, 80 µg/ml으로, 40분간 반응시키고 PBS (pH 7.0)로 세척하여 세포 생존율을 MTT assay로 측정하였다. MTT assay는 MB에 노출시킨 세포들을 24시간 배양한 후 2 mg/ml 농도의 MTT 용액을 100 µl 넣고 37°C에서 4시간 반응시켰다. MTT 용액을 제거하고 Dimethyl sulfoxide (DMSO, Pierce, USA)를 넣고 formazan 결정이 녹을 때까지 실온에서 10분간 가볍게 흔들어진 후 ELISA reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

A549 세포주에 대한 MB와 레이저의 PDT 효과 측정

MB와 레이저를 함께 처리했을 때 어떠한 효과가 나타나는지 알아보기 위해 5×10^7 개의 세포를 24-well plate에 분주하여 24시간 배양하였다. MB의 농도는 0, 5, 30 µg/ml였으며, 레이저는 300 mW/cm²로, 0, 12, 60, 180, 360초 동안(0, 3.6, 18, 54, 108 J/cm²) 조사하였다. 새로운 배지로 갈아준 후 24시간 배양하고, 2 mg/ml 농도의 MTT 용액 250 µl를 넣고 MTT assay를 하였다.

*M. smegmatis*에 대한 MB의 사멸 효과 측정

M. smegmatis 균액을 MB의 최종 농도가 0, 1, 5, 10, 30,

50, 80, 150 µg/ml 되게 하여 24-well plate에 1 ml씩 분주한 후 암실에서 40분간 shaking하며 반응시켰다. 각 균을 10⁻⁵까지 10배 계단 희석하여 7H10 배지에 100 µl씩 도말하고 암실에서 3일간 배양한 후 집락 수를 세었다.

*M. smegmatis*에 대한 MB와 레이저의 PDT 효과 측정

M. smegmatis 균액을 MB의 최종 농도가 0, 5, 30 µg/ml 되게 하여 24-well plate에 1 ml씩 분주한 후, 암실에서 40분간 shaking하며 반응시킨 후 레이저를 300 mW/cm²로, 0, 12, 60, 360초 동안(0, 3.6, 18, 108 J/cm²) 조사하였다. 각 균을 10⁻⁵까지 10배 계단 희석하여 100 µl씩 7H10 배지에 도말하고 암실에서 3일간 배양한 후 집락 수를 세었다.

*M. smegmatis*의 CFX에 대한 내성균 제작

*M. smegmatis*를 7H10 액체배지에 접종하여 배양하고, 배양된 균은 CFX의 농도를 0.0125 µg/ml부터 단계적으로 높여가면서 인위적으로 내성균을 유도하는 stepwise selection 방법을 사용하였다 (21). 만들어진 내성균들은 5 ml씩 배양하여 초저온 냉동고에 보관하였다.

항균제 감수성 검사

내성균들에 대한 CFX, LMF, LFX, MFX, AMK, CLA, COL, RMP 등의 항균제들의 최저발육저지농도(minimal inhibitory concentration, MIC)를 측정하기 위해 액체계단 희석법을 사용하였으며, 각 항균제들의 최고 농도는 128 µg/ml, 최저 농도는 0.06 µg/ml 되도록 2배 계단 희석법으로 희석하였다. 암실에서 3일 동안 배양한 후 OD₆₀₀ = 0.6 되면 1 ml 취해서 14,000 rpm에서 10분간 원심한 후 Tween 80이 첨가된 PBS에서 잘 현탁하여 20 µl씩 접종하였다. 72시간 배양한 후 관찰하여 균이 자라지 않은 가장 낮은 농도를 MIC로 하였다.

DNA 분리와 Polymerase chain reaction(PCR, 중합효소 연쇄반응)

내성균주를 각 5 ml 배양하여 14,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 균을 PBS로 2번 세척하였다. 증류수 50 µl를 넣어 잘 섞은 후 100°C에서 5분간 가열하고 14,000 rpm에서 20분간 원심하여 그 상층액을 중합효소 연쇄반응 원액으로 사용하였다.

*M. smegmatis*의 FQ 내성 관련 유전자인 *gyrA*와 *gyrB* 유전자 부위에 대한 돌연변이를 관찰하기 위해 primer

M-gyrAF 5'-CAGCGCAGCTACACGACTA-3', M-gyrAR 5'-AGTCGAAGTCGGTCAGCTTG-3', M-gyrBF 5'-GGCATG-TACATTGGCTCGAC-3', M-gyrBR 5'-ACCGGAACAACA-ACGTCAAC-3'를 사용하여 PCR을 시행하였다(Genbank accession numbers X94224 and L27512). 반응에는 Smart Taq Pre-mix (SolGent, Korea)를 사용하였으며, PCR Thermal cycler (TaKaRa, Japan)로 94℃에서 10분간 전 처리하고, 94℃에서 1분, 55℃에서 1분, 72℃에서 1분간 35회 반응시킨 후 72℃에서 10분간 더 반응시켰다. 반응 결과물은 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 ethidium bromide 용액으로 염색한 후 관찰하였다. PCR 결과 산물은 자동염기 분석기인 ABI PRISM 3730X Analyzer (Applied Biosystems, USA)로 염기서열을 분석하였다.

CFX 내성 *M. smegmatis*에 대한 MB와 레이저의 PDT 효과 측정

CFX 고도 내성 *M. smegmatis*를 배양하여 OD₆₀₀ = 0.6일 때 14,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 Tween 80이 0.5% 첨가된 PBS에 잘 현탁하였다. 균 수를 1×10^6 CFU/ml로 조정하여 MB의 최종 농도가 0, 5, 30 µg/ml 되게 한 후 24-well plate에 1 ml씩 분주하였고, 암실에서 40분간 shaking하며 반응시킨 후 레이저를 300 mW/cm²로, 0, 12, 60, 360초 동안(0, 3.6, 18, 54 J/cm²) 조사하였다. 각 균을 10⁻⁵까지 10배 계단 희석하여 100 µl씩 7H10 배지에 도말하고 암실에서 3일간 배양한 후 집락 수를 세었다.

RESULTS

A549 세포주에 대한 MB의 사멸 효과

MB의 농도에 따른 세포의 생존율은 0.5 µg/ml에서는 98.7%이었고, 1 µg/ml에서는 98.1%, MB 농도 5, 10, 30, 80 µg/ml에서는 각각 95.9, 78.1, 53.2, 39.1%로 나타나 MB 5 µg/ml까지는 세포의 생존율에 거의 영향을 미치지 않았으며 그 이상의 농도에서는 세포의 생존율이 떨어지는 것이 관찰되었다(data not shown).

A549 세포주에 대한 MB와 레이저의 PDT 효과

MB의 농도를 0, 5, 30 µg/ml 되게 한 후 레이저를 0, 12, 60, 180, 360초 동안(0, 3.6, 18, 54, 108 J/cm²) 조사하여 생존율을 확인하였다. MB가 없는 경우 레이저만으로는 세포의 사멸에 거의 영향을 주지 않았으며, MB의 농도가

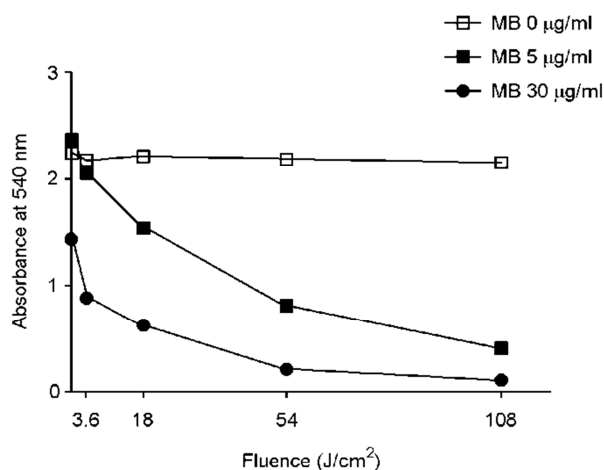


Figure 1. Effects of photodynamic therapy with methylene blue on A549 human lung cell. Different concentrations of methylene blue (MB) were incubated with A549 cells and irradiated with different light doses. Means are shown as points.

5 µg/ml일 경우는 MB를 넣지 않은 군과 3.6 J/cm²까지는 비슷하게 감소하다가 그 이상의 에너지를 가하면 급속히 사멸되는 경향을 보였고, MB의 농도가 30 µg/ml인 경우에는 초기부터 급격히 사멸하기 시작하였다(Fig. 1).

*M. smegmatis*에 대한 MB의 사멸 효과

*M. smegmatis*에 대해 MB의 농도가 0, 1, 5, 10, 30, 50, 80, 150 µg/ml 되게 처리한 결과, 10 µg/ml까지는 생존율이 95.9, 94.0, 91.4%로 거의 변화가 없었으며, 30 µg/ml에서는 79.0%, 50 µg/ml에서 55.9%, 80 µg/ml에서 9.2%로 50 µg/ml 이후에 급격하게 감소되는 것으로 관찰되었다(data not shown).

*M. smegmatis*에 대한 MB와 레이저의 PDT 효과

MB 농도 0, 5, 30 µg/ml에서 레이저를 0, 3.6, 18, 54 J/cm²(0, 12, 60, 180초) 되게 조사하였더니 MB 농도 5 µg/ml에서는 생존율이 각각 95.2, 82.1, 36.1%로 18 J/cm²까지는 큰 변화가 없었으며, 그 이상에서는 생존율이 떨어짐을 관찰할 수 있었다. MB 30 µg/ml에서는 83.1, 27.1, 1.1%로 다소 급격하게 사멸이 이루어져 54 J/cm²에서는 균이 현저하게 감소된 것으로 관찰되었다(Fig. 2).

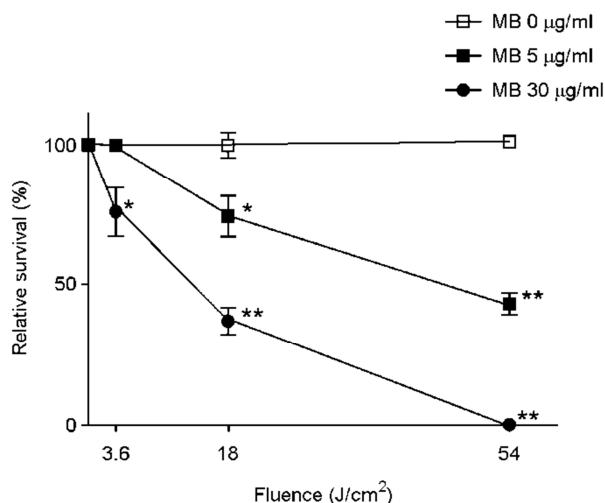


Figure 2. Effects of photodynamic therapy with methylene blue on *Mycobacterium smegmatis*. Different concentrations of methylene blue (MB) were incubated with *Mycobacterium smegmatis* and irradiated with different light doses. Data were presented as Mean \pm SD of three independent experiments. Asterisks indicate statistically significant differences with respect to the corresponding controls (student *t*-test: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$).

*M. smegmatis*의 CFX에 대한 내성균 제작과 항균제 감수성 검사

CFX의 최종 농도가 256 µg/ml인 내성균이 만들어졌으며, 염기서열 분석결과 94번째 위치의 aspartic acid (D)가 glycine (G)으로 치환된 것이 관찰되었다. 이 균의 항균제 감수성 검사 결과는 CFX, LMX에 대한 MIC는 0~256 µg/ml, LFX는 0.5~64 µg/ml, MFX는 0~8 µg/ml로 새로운 세대의 FQ 일수록 효과가 좋은 것으로 나타났다. 그리고 AMK, CLA, COL, RMP에 대한 MIC 농도는 각 0.5, 0.5~1, 32, 8~16 µg/ml으로서 quinolone resistance-determining regions (QRDR)의 유전자 변이와는 연관성이 없는 것으로 관찰되었다(Table 1).

CFX 내성 *M. smegmatis*에 대한 methylene blue와 레이저의 PDT 효과

인위적으로 만든 CFX 내성 *M. smegmatis*에 MB 농도 0, 5, 30 µg/ml에서 레이저를 0, 3.6, 18, 54 J/cm²(0, 12, 60, 180초) 되게 조사하였더니 MB 5 µg/ml에서는 생존율이 각각 61.8, 31.0, 4.3%, 30 µg/ml에서는 58.8, 18.7, 2.2%로 MB 농도와 관계없이 두 조건 모두에서 비슷한 생존율을

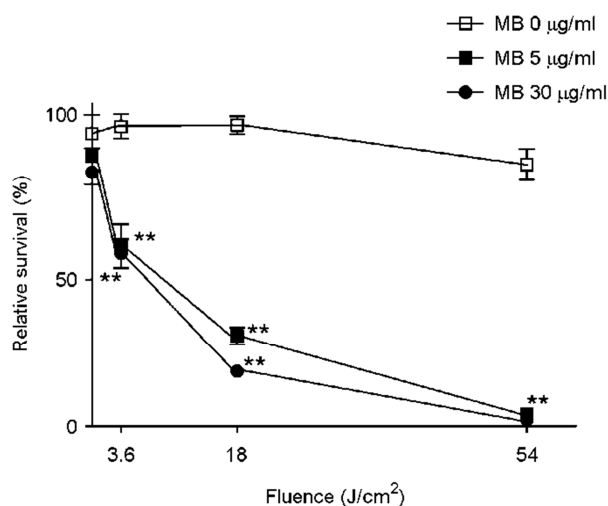


Figure 3. Effects of photodynamic therapy with methylene blue on ciprofloxacin resistant *Mycobacterium smegmatis*. Different concentrations of methylene blue (MB) were incubated with *Mycobacterium smegmatis* and irradiated with different light doses. Data were presented as Mean \pm SD of three independent experiments. Asterisks indicate statistically significant differences with respect to the corresponding controls (student *t*-test: **, $p < 0.01$).

나타내었고, 54 J/cm²에서는 생존율이 급격하게 떨어지는 것이 관찰되었다(Fig. 3).

DISCUSSION

MB는 핵산과 같이 음전하를 띠는 세포 구조물에 염색이 잘되기 때문에 세포나 세균의 염색에 많이 사용되어 왔지만 최근에는 PDT의 광감각제로 이용되어 일반 세균 뿐만 아니라 진균, 칸디다, 아메바, 바이러스 등과 같은 다양한 종류의 병원체를 사멸시키는데 사용되고 있다. 그리고 암세포나 프리온과 같은 단백질도 불활성화 시키는 데 관여하고 있으며, 그 외 뇌, 피부, 위, 간암 등의 치료에도 PDT를 도입하기 위한 연구가 한창 진행 중이다 (4~12). 결핵의 경우는 좋은 약제들이 있어 완치가 될 수 있는 질병이지만, 많은 양의 약을 복용해야 하고, 6개월 이상의 복약 기간이 필요하므로 치료가 실패하는 경우가 많으며, 그로 인해 내성균이 생길 수 있다. 일단 내성균이 생기게 되면 약제의 선택이 어려워지며, 최근에는 FQ를 사용하기도 하지만 그 역시 내성균이 생기게 되어 치료의 어려움이 있고 심지어는 치료를 포기해야 하는 상황이 오

Table 1. Characteristics of CFX resistant *Mycobacterium smegmatis*.

Strains	AA change		Minimal inhibitory concentration of:							
	<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>	CFX	LMX	LFX	MFX	AMK	CLA	COL	RMP
WT	None	None	0	0.5	0	0	0.5	0.5	32	8
Msl	None	None	0.5	1	0.5	0	0.5	1	32	8
Ms5	None	None	2	4	0.5	0	0.5	1	32	16
M1	None	None	4	4	0.5	0	0.5	1	32	16
M2	None	None	32	16	2	1	0.5	1	32	16
M4	None	None	32	32	4	2	0.5	1	32	16
M8	None	None	128	128	32	4	0.5	1	32	16
M16	D94G	None	256	256	32	4	0.5	1	32	16
M32	D94G	None	256	256	32	4	0.5	1	32	16
M64	D94G	None	256	256	64	8	0.5	1	32	16
M128	D94G	None	256	256	64	8	0.5	1	32	16

Abbreviations: CFX, ciprofloxacin; LFX, levofloxacin; LMX, lomefloxacin; MFX, moxifloxacin; AMK, amikacin; CLA, clarithromycin; COL, colistin; RMP, rifampin; AA, amino acid

기도 한다. 본 실험에서는 이러한 약물 치료의 어려움을 극복하기 위하여 내시경을 통한 국소적인 광역동치료법을 개발함으로써 통상의 항균제로는 치료가 어려운 결핵의 새로운 치료 방법을 찾고자 하였다. 먼저 MB 자체가 사람의 세포에 어떠한 영향을 주는지 알아보기 위하여 사람의 폐세포주인 A549 세포를 사용하여, MB 농도 0, 0.01, 0.05, 0.1, 1, 5, 10 µg/ml로, 30분, 4시간, 18시간, 24시간 반응시켜 세포 생존율을 보았더니 5 µg/ml까지는 생존율에 거의 영향을 미치지 않았지만 그 보다 높은 농도에서는 생존율이 급격하게 떨어졌다(data not shown). 그리고 세포에 MB를 작용시키고 난 뒤 레이저를 조사하였더니 5 µg/ml에서는 조사 시간에 비례해서 생존율이 감소하였으며, 30 µg/ml에서는 레이저를 조사한 초기부터 급격히 생존율이 떨어지는 것이 관찰되었다(Fig. 1). Sturme이 등 (22)은 adenocarcinoma cell line OE33을 사용하여 15 mM MB(약 5 mg/ml)에 빛을 5분 동안 조사한 경우가 조사하지 않은 경우보다 30% 이상 높은 DNA 손상이 있었다고 하였으며, 0.015 mM (5 µg/ml)인 경우는 대조군과 거의 비슷한 수준이었고, 0.15 mM (50 µg/ml), 1.5 mM (500 µg/ml)의 경우에는 각각 비례해서 DNA 손상 정도가 높았다. 이는 본 실험에서 MB 5 µg/ml까지는 세포의 생존율에 큰 영향을 미치지 않았고, 그 이상의 농도에서는 생존율이 급격히

떨어진다는 결과와 유사하였다. 그리고 Davies 등 (23)은 CaCo-2 adenocarcinoma cells에 0.1% (1 mg/ml) indigo carmine 또는 0.1% (1 mg/ml) MB를 적용하고, 백열등을 조사하지 않거나, 2분 동안 백열등을 조사하여 DNA 손상 정도를 비교하였더니 0.1% MB를 적용하고 백열등을 조사한 경우에만 다른 그룹에 비해 DNA의 손상이 현저하게 증가된 것이 관찰되었다고 하였다. 이 실험은 1 mg/ml의 고농도의 MB를 작용시켰지만 다양한 파장을 가진 단순 백열등을 사용한 점과 세포의 생존율보다 DNA 손상을 관찰한 점이 본 실험의 방법과는 다르지만 MB와 빛 에너지가 같이 작용할 때는 세포의 DNA에 심각한 손상을 가져오며 그로 인해 세포의 사멸 가능성이 있다는 점에서는 유사한 결과라고 할 수 있다.

*M. smegmatis*에 대한 MB의 효과는 세포주와는 달리 50 µg/ml까지는 균의 감소가 거의 없었으며, 그 이상의 농도에서는 급격히 생존율이 떨어지는 것이 관찰되었다. MB와 레이저를 같이 작용시켰을 때는 MB 5 µg/ml에서는 대조군과 비슷한 사멸률을 보였고, 30 µg/ml일 때 18 J(60초)까지는 급격한 사멸이 이루어졌으며, 그 뒤 완만하게 사멸이 이루어지다 54 J 이상에서는 생존율이 거의 최저점에 이르렀다. Feese 등 (6)은 *M. smegmatis*를 대상으로 MB를 비롯한 다양한 광감각제를 시험하였는데 광원은 백열

등(400~700 nm)으로 에너지는 3.6, 18, 54, 108 J/cm²였고, MB의 농도는 100 nM, 150 nM, 750 nM, 7.5 μ M, 75 μ M이었다. 실험 결과 MB 7.5 μ M(약 2.5 μ g/ml)의 경우는 54 J에서 급격한 사멸 곡선을 나타냈으며, 75 μ M(약 25 μ g/ml)인 경우는 초기부터 급격한 사멸률을 보이다가 54 J에 이르러서는 거의 다 사멸한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 본 실험과 사용한 MB의 농도는 비슷하지만(2.5, 25와 5, 30 μ g/ml) 에너지의 세기에 있어서 Feese 등 (6)은 60 mW/cm²로 긴 시간을 사용한 반면 본 실험에서는 300 mW/cm²로 짧은 시간 조사하여 순간적인 에너지 양의 차이에 의해 사멸 곡선의 기울기의 차이는 있었으나 두 실험 모두 54 J에서는 거의 최저점으로 떨어져 유의성이 있는 결과라고 할 수 있다. 그리고 Shih 등 (24)은 *M. fortuitum*을 이용하여 실험하였는데 빛이 없는 경우에는 MB의 농도 (1~100 μ g/ml)와 관계없이 아무런 영향이 없었으며, MB 1 μ g/ml에 100 J/cm²도 효과가 없었고, 10 μ g/ml, 100 J/cm²에서는 2 또는 그 이상의 log CFU의 감소가 있었으며, 100 μ g/ml, 100 J/cm²에서는 모두 사멸한 것으로 관찰되었다고 하였다. 따라서 본 실험과, Feese 등 (6), Shih 등 (24)의 결과를 종합해보면 mycobacteria의 경우 MB 25 μ g/ml 이상의 농도에서 100 J/cm² 정도의 에너지를 주게 되면 균 수가 현저히 감소하거나, 거의 모든 균이 사멸되는 것으로 관찰되었다.

결핵의 경우에는 치료약이 한정되어 있기 때문에 내성이 생기면 다른 대체 항균제를 선택하기가 어렵다. 따라서 본 실험에서는 이러한 항균제 내성결핵균(MDR- 또는 XDR-TB)을 제거하기 위한 방법으로 다른 항균제를 선택하는 대신 PDT의 효능을 알아보기 위해 동일한 방법을 적용시켜 보았다. 그래서 비교적 최근에 개발되어 결핵 치료제로 사용하고 있는 FQs 약제 중 하나인 CFX에 대한 내성균을 만들었고, 만들어진 내성균의 염기서열 분석과 다른 항균제에 대한 감수성을 조사하였더니 Table 1과 같았다. CFX 256 μ g/ml 이상의 높은 내성을 나타내는 균들은 GyrA 단백질 94번 위치의 aspartic acid가 glycine으로의 아미노산 치환이 있었고, GyrB 단백질에서는 아미노산 치환이 관찰되지 않았다. 이는 Sirgel 등 (25)은 *M. tuberculosis*에서, Yokoyama 등 (26)은 *Mycobacterium leprae*의 내성균을 분석한 결과 GyrA 단백질 94번(또는 95번) 위치의 아미노산 치환이 아주 높은 빈도로 일어나며, FQ에 대한 높은 내성에도 관여하는 것으로 보고한 것과 같은 결과라고 생각한다. 그리고 MIC 2~128 μ g/ml까지의

균들에서는 유전자 변이가 관찰되지 않았는데 이는 본 실험에서 사용한 primer들이 일반적으로 *M. tuberculosis*의 QRDR로 알려져 있는 *gyrA*의 codon 74-113, *gyrB*의 codon 500-538를 포함하는 *gyrA*의 codon 37-142, *gyrB*의 codon 488-562 부분이었지만 Devasia 등 (16)이 보고한 것처럼 일반적으로 알려져 있는 QRDR 부위 이 외에도 돌연변이가 발생하고 내성을 가질 수 있다 하여 앞으로 본 실험에서 검색했던 부위보다 더 넓은 부위에서 유전자 변이를 찾아봐야 할 것으로 생각한다. 인위적으로 만든 CFX 내성 *M. smegmatis* 중 내성도가 높은 균을 사용하여 PDT를 적용하였더니 MB 5, 30 μ g/ml에서 모두 18 J까지는 생존율이 각각 31, 17%로 급격한 사멸률을 나타내었고, 그 뒤 완만한 사멸률을 나타내다가 54 J 이상에서는 생존율이 거의 최저점에 이르렀다. 비내성 *M. smegmatis*와 CFX 고도 내성 *M. smegmatis*의 생존율을 비교해보면 MB 5 μ g/ml, 3.6 J일 때 95, 61%, 30 μ g/ml일 때 83, 59%였고, 18 J일 때 MB 5 μ g/ml이면 82, 31%, 30 μ g/ml이면 27, 17%로 내성균이 비내성균보다 더 민감하게 반응하는 것이 관찰되었고, 이러한 결과는 Sung 등 (27)이 *M. tuberculosis*에 광감각제로 radachlorin을 사용해서 레이저를 조사했을 때 비활성화 비율이 비내성균은 $10^{3.7-4.3}$ CFU인 반면 MDR-TB인 경우 $10^{3.1}$ CFU로 관찰된 것과 같이 유전자상의 돌연변이가 PDT에 더 민감하게 반응하는 것을 알 수 있었다. 따라서 MB 매개 광역동치료법은 비내성균보다는 MDR-TB 균들에 대해서 더 사멸 효과가 있을 것으로 생각하며, 본 교실에서 제작한 moxifloxacin 내성 *M. smegmatis*를 이용하여 동일한 현상이 나타나는지 다시 한번 확인해 볼 예정이다. 그리고 Shih 등 (24)은 MB 50 μ g/ml와 CFX 또는 MFX, AMK 등의 항균제를 함께 섞어 100 J/cm²의 에너지를 쬔 때에 항균제 단독으로 사용했을 때 보다 2배 이상의 상승 효과가 나타난다고 하였고, Daniela 등 (4)은 potassium iodide (KI)를 MB와 함께 사용하면 상승 효과가 나타난다고 하여, 세포에 대해 손상이 적으면서 비내성균과 내성균 모두에서 좀 더 효과를 높일 수 있는 방법으로 적용될 수 있는지 연구해 볼 가치가 있다고 생각한다.

REFERENCES

- 1) Dougherty TJ. Photodynamic therapy. Photochem Photobiol 1993;58:895-900.

- 2) Allison RR, Downie GH, Cuenca R, Hu X, Childs CJH, Sibata CH. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiag Photodynamic* 2004;1:27-42.
- 3) Brancalion L, Moseley H. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. *Lasers Med Sci* 2002;17:173-86.
- 4) Daniela V, Asheesh G, Liyi H, Giacomo L, Pinar A, Andrea R, *et al.* Bacterial photodynamic inactivation mediated by methylene blue and red light is enhanced by synergistic effect of potassium iodide. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:5203-12.
- 5) Dolmans DE, Fukumura D, Jain RK. Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3:380-7.
- 6) Feese E, Ghiladi RA. Highly efficient *in vitro* photodynamic inactivation of *Mycobacterium smegmatis*. *J Antimicrob Chemother* 2009;64:782-785.
- 7) Gudgin DEF, Goyan RL, Pottier RH. New directions in photodynamic therapy. *Cell Mol Bio* 2002;48:939-54.
- 8) Janouskova O, Rakusan J, Karaskova M, Holada K. Photodynamic inactivation of prions by disulfonated hydroxy-aluminium phthalocyanine. *J Gen Virol* 2012;93:2512-7.
- 9) Song D, Lindoso JA, Oyafuso LK, Kanashiro EH, Cardoso JL, Uchoa AF, *et al.* Photodynamic therapy using methylene blue to treat cutaneous leishmaniasis. *Photomed Laser Surg* 2011;29:711-5.
- 10) Sperandio FF, Huang Y, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy to kill Gram-negative bacteria. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 2013;8:108-20.
- 11) Usuda J, Kato H, Okunaka T, Furukawa K, Tsutsui H, Yamada K, *et al.* Photodynamic therapy (PDT) for lung cancers. *J Thorac Oncol* 2006;1:489-93.
- 12) Wong TW, Huang HJ, Wang YF, Lee YP, Huang CC, Yu CK. Methylene blue - mediated photodynamic inactivation as a novel disinfectant of enterovirus 71. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:2176-82.
- 13) Kim DH, Kim HJ, Park SK, Kong SJ, Kim YS, Kim TH, *et al.* Treatment outcomes and survival based on drug resistance patterns in multidrug-resistant tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;182:113-9.
- 14) Kim HJ. Current status of tuberculosis in Korea. *Korean J Med* 2012;82:257-62.
- 15) Park MM, Davis AL, Schluger NW, Cohen H, Rom WN. Outcome of MDR-TB patients, 1983-1993. Prolonged survival with appropriate therapy. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:317-24.
- 16) Devasia R, Blackman A, Eden S, Li H, Maruri F, Shintani A, *et al.* High proportion of fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates with novel gyrase polymorphisms and a *gyrA* region associated with fluoroquinolone susceptibility. *J Clin Microbiol* 2012;50:1390-6.
- 17) Ji B, Lounis N, Maslo C, Truffot-Pernot C, Bonnafous P, Grosset J. *In vitro* and *in vivo* activities of moxifloxacin and cinafloxacin against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:2066-9.
- 18) Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, *et al.* Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 1998;393:537-44.
- 19) Groll AV, Martin A, Jureen P, Hoffner S, Vandamme P, Portaels F, *et al.* Fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and mutations in *gyrA* and *gyrB*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:4498-500.
- 20) Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, Nakamura S. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:1271-2.
- 21) Ferrero L, Cameron B, Crouzet J. Analysis of *gyrA* and *grrA* mutations in stepwise-selected ciprofloxacin-resistant mutants of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1554-8.
- 22) Sturmey RG, Wild CP, Hardie LJ. Removal of red light minimizes methylene blue-stimulated DNA damage in oesophageal cells: implications for chromoendoscopy. *Mutagenesis* 2009;24:253-8.
- 23) Davies J, Burke D, Olliver JR, Hardie LJ, Wild CP, Routledge MN. Methylene blue but not indigo carmine causes DNA damage to colonocytes *in vitro* and *in vivo* at concentrations used in clinical chromoendoscopy. *Gut* 2007;56:155-6.
- 24) Shih MH, Huang FC. Effects of photodynamic therapy on rapidly growing nontuberculous mycobacteria keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:223-9.
- 25) Sirgel FA, Warren RM, Streicher EM, Victor TC, Helden PD, Bööttger EC. *gyrA* mutations and phenotypic susceptibility levels to ofloxacin and moxifloxacin in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:1088-93.
- 26) Yokoyama K, Kim H, Mukai T, Matsuoka M, Nakajima C, Suzuki Y. Amino acid substitutions at position 95 in GyrA

can add fluoroquinolone resistance to *Mycobacterium leprae*.
Antimicrob Agents Chemother 2012;56:697-702.

- 27) Sung N, Back S, Jung J, Kim K, Kim J, Lee JH, *et al*.
Inactivation of multidrug resistant (MDR)-and extensively

drug resistant (XDR)-*Mycobacterium tuberculosis* by photo-
dynamic therapy. Photodiagn Photodyn Ther 2013;10:694
-702.
