

Effect of the Ag_3PO_4 on *Staphylococcus aureus* Growth and Human Immunity

Mi Kyung Kim^{1,†} and Dae-Sik Kim²

¹Department of Systems Biology, College of Life Science, Yonsei University, Seoul 03722, Korea

²Department of Clinical Laboratory Science, Dongnam Health University, Suwon 16328, Korea

Silver (Ag) has been widely used in commercial products and medical fields since ancient times because of its antibacterial effect. It is harmless and non-toxic to the human body. For this reason, recent research has actively evaluated antimicrobial activity using silver (Ag). In this study, we investigated the inhibitory effect of a silver-based compound, silver phosphate (Ag_3PO_4) on the growth of *Staphylococcus aureus* and the activation of human immunity. First, the inhibitory effect of Ag_3PO_4 on the growth of *Staphylococcus aureus* was confirmed by a growth curve and a colony-counting method. As a result, the growth inhibitory effect increased as the concentration of Ag_3PO_4 increased. Specifically, treatment with 5 $\mu g/mL$ of Ag_3PO_4 resulted in no bacteria growth, and the colony-counting method showed a remarkable inhibition. In addition, the expression of cytokine IL-8 by Ag_3PO_4 was examined to investigate the cellular immune system activation by Ag_3PO_4 . After pretreatment of *Staphylococcus aureus* for 1 hour with 50 $\mu g/mL$ Ag_3PO_4 , an increased IL-8 mRNA expression resulted. In cells treated with Ag_3PO_4 , we found that the expression of IL-8 was enhanced in a time-dependent fashion compared to non-treated cells. These results indicate that Ag_3PO_4 induces antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and activates human immunity. These results are expected to contribute to the future study of the mechanism of silver (Ag) and silver-based compounds in relation to antibacterial activity.

Key Words: Silver, *Staphylococcus aureus*, Antibacterial, Immunity

서 론

은(Ag, silver)은 항균 효과 때문에 고대부터 상업 제품 및 의료 분야에서 다양하게 사용되고 있다(Klaine et al., 2008). 최근에는 은 이온(Ag^+)이 박테리아의 대사경로를 억제하여 ROS 생산을 유도하고 이 변화가 디설파이드 결합 형성을 억제함으로써 막 투과성을 증가시켜 박테리아 세포사멸을 유도한다는 것이 밝혀졌다(Morones-Ramirez et al., 2013). 또한 Ag_3PO_4 가 식물 줄기 마름병의 원인균인 *Pseudomonas syringae*의 성장을 억제하고 식물면역체계를

유도함이 밝혀져 효과적인 식물 질병 조절제로서의 사용가능성이 제시되었다(Kim et al., 2016). *Staphylococcus aureus*는 그람양성균인 포도상구균의 한 종으로 식중독뿐만 아니라 피부의 화농·중이염·방광염 등 화농성 질환을 일으키는 원인균이다(Masalha et al., 2001). 페니실린(메티실린, 디클록사실린, 납실린, 옥사실린 외)과 세팔로스포린을 포함한 β -락탐계 항생물질에 내성을 획득한 황색 포도상구균은 메티실린 내성 황색 포도상구균(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)이라 하는데, 사람에게 감염되어 여러 가지 병을 일으켜 문제가 되고 있다(Gurusamy et al., 2013). 본 논문에서는 *Staphylococcus*

*Received: January 3, 2018 / Revised: March 12, 2018 / Accepted: March 13, 2018

†Corresponding author: Mi Kyung Kim. Department of Systems Biology, College of Life Science, Yonsei University, Seoul 03722, Korea.
Tel: +82-2-2123-2709, Fax: +82-2-312-5657, e-mail: biokyung@gmail.com

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

©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/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

*aureus*에 대한 은의 항균 효과 및 면역반응을 조사하여 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구에 사용된 시약은 Ag_3PO_4 (Sigma-Aldrich, USA)이다. 실험에서 사용된 미생물은 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538로서 생물자원센터에서 분양받아 사용하였다. 배양배지는 Tryptic soy broth (TSB)를 사용하였다. 사용한 세포는 비소세포폐암 세포주인 H1299 (Korean Cell Line Bank, Korea)이다. 배양배지는 DMEM (Hyclone, UK)에 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Hyclone)를 첨가하여 사용하였다. 배양은 37°C, 5% CO_2 인큐베이터에서 진행하였다.

Ag_3PO_4 의 항균 효과

24시간 동안 계대배양한 *Staphylococcus aureus*를 새로운 배양배지에 $A_{600nm}=0.06$ 되도록 희석한 균주에 Ag_3PO_4 를 첨가하지 않거나 첨가하여 37°C에서 배양하였다. 0일째부터 7일째까지 균주를 키우면서 정해진 시간에 A_{600nm} 에서 흡광도를 측정하여 성장곡선을 그렸다. 또한 콜로니 카운팅 방법은 위와 같은 방법으로 키운 *Staphylococcus aureus*를 10배수 계열희석 10^{-1} 에서 10^{-8} 까지 희석하여 각각의 colony 수를 계산하였다.

Ag_3PO_4 에 의한 면역작용 활성화(실시간 정량 PCR를 이용한 IL-8 mRNA의 정량)

H1299 세포를 six-well plates containing $\sim 10^6$ cells/well 되도록 심었다. 16시간 후 *Staphylococcus aureus*를 1시간 선처리 후 50 $\mu g/mL$ 의 Ag_3PO_4 를 24, 48시간 동안 처리하였다. 이때 extracellular bacteria를 제거한 후 gentamicin (50 $\mu g/mL$)이 첨가된 배양액에서 배양하여 남아있는 extracellular bacteria를 완전히 제거하였다(Kim et al., 1998; Eckmann et al., 1993). 이후의 과정은 다음과 같다.

RNA 분리 및 정량: 배양한 H1299 세포로부터 RNA를 분리하기 위하여 TRIzol reagent (Gibco, USA)을 사용하여 제작사의 설명서에 따라 분리하였다. 각 대조군과 실험군으로부터 분리한 RNA를 60°C water bath에서 10분간 가열시켜 single strand로 분리한 후 spectrophotometer (Biophotometer, Germany)를 이용하여 RNA 농도 및 순수도를 측정하였다.

역전사 반응(Reverse transcription): 각각의 대조군과 실험군으로부터 분리하여 정량, 보정한 RNA 1 μg 에 RNA PCR Kit Ver.2.1 (TaKaRa, Japan)를 이용하여 제작사의 설명서에 따라 역전사 반응을 실행하였다.

실시간 정량 PCR (Real time quantitative polymerase chain reaction): cDNA와 IL-8 유전자의 primers (Forward 5'-TGCCAAGGAGTGCTAAAG-3', Reverse 5'-CTTCTCCA-CAACCCTCTG-3')로 디자인한 Light Cycler probes (Sigma-Aldrich) 그리고 Light Cycler reaction protocol에 따라 만든 mixture를 섞어 만든 각각의 반응 혼합액을 tube에, 한 실험 개체당 20 μL 씩 채운 다음, 95°C 1분(1회), 95°C 10초(1회), [60°C 15초, 72°C 15초](40회)의 thermal cycling condition에서 Light Cycler (Roche, Germany)를 이용하여 실시간 정량 PCR (RT-PCR)을 진행시켰다. Beta-actin 유전자를 기준 표지자로 이용하였다.

결 과

Ag_3PO_4 에 의한 *Staphylococcus aureus*의 성장 억제 효과

Ag_3PO_4 에 의한 *Staphylococcus aureus*의 성장 억제 효과를 조사하기 위해 배양액에서의 농도가 각각 0.5, 5 $\mu g/mL$ 되도록 첨가하여 *Staphylococcus aureus*의 성장곡선을 관찰하였다(Fig. 1A). Ag_3PO_4 가 0.5 $\mu g/mL$ 첨가된 경우에는 Ag_3PO_4 를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 성장 억제 효과를 나타내었다. 한편 5 $\mu g/mL$ 에서는 균이 성장하지 못하였다. Ag_3PO_4 에 의한 *Staphylococcus aureus*의 성장 억제 효과를 더 확인하기 위해 콜로니 카운팅 방법을 이용하여 실험하였다. Ag_3PO_4 가 0.5 $\mu g/mL$ 가 첨가된 경우에는 성장 억제 효과를 보이다가 4일 후에는 대조군과 비슷한 수준으로 되돌아 갔다. 그러나 5 $\mu g/mL$ 에서는 시간이 지나도 뚜렷한 성장 억제 효과를 보였다(Fig. 1B).

Ag_3PO_4 에 의한 면역작용 활성화

우리 몸은 병원성균 침입시 이에 대항하기 위한 선천성 면역반응을 통해 NF- κ B가 활성화되고 활성화된 NF- κ B는 후천성 면역반응을 유도하여 여러 질병으로부터 우리 몸을 보호한다(Kim et al., 1998; Elewaut et al., 1999; O'Neill et al., 2013; Yusa et al., 2017). 이러한 NF- κ B 활성화는 사이토카인(cytokine)과 같은 면역반응 물질을 유도하여 세포의 증식/사멸을 증가시키는 것으로 알려져 있다(Kim et al.,

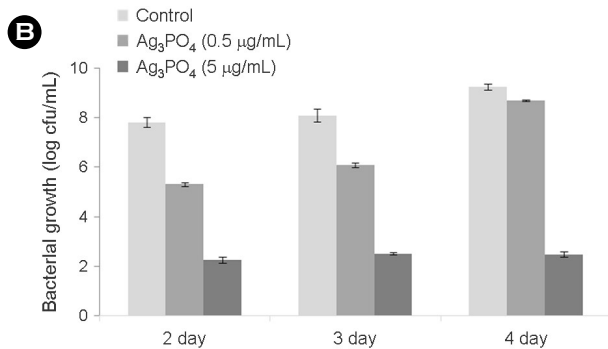
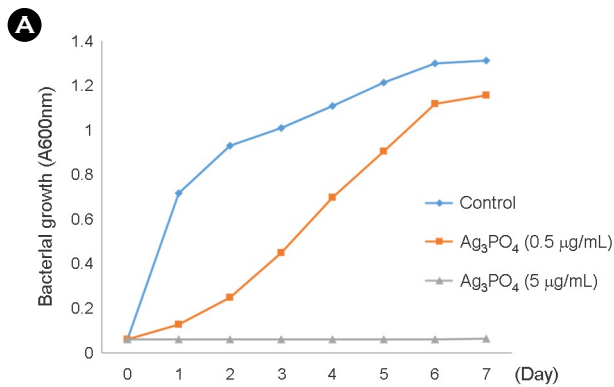


Fig. 1. Inhibition of *Staphylococcus aureus* growth by Ag₃PO₄. Overnight-grown bacteria were diluted and aliquoted into new tubes with A600nm=0.06. They were further grown with or without the indicated amounts of Ag₃PO₄. Bacterial growth was then analyzed at the indicated time points by measuring values of A600nm (A) or by counting bacterial colonies (B). Data represent mean \pm SD from three biological replications.

1998; Elewaut et al., 1999; O'Neill et al., 2013). Ag₃PO₄에 의한 *Staphylococcus aureus*의 성장 억제 효과를 확인하였는데(Fig. 1), 이러한 결과는 면역작용 활성화와 관련 있을 가능성이 크다. 이를 알아보기 위하여 NF- κ B에 의해 발현이 조절되는 유전자 중 대표적인 사이토카인인 interleukin-8 (IL-8)의 전사가 Ag₃PO₄에 의해 영향을 받는지 조사하였다. *Staphylococcus aureus*를 1시간 선처리 후 50 µg/mL의 Ag₃PO₄를 처리한 후 IL-8의 발현양을 정량한 위한 RT-PCR 결과는 다음과 같다(Table 1). *Staphylococcus aureus* 처리 후 50 µg/mL의 Ag₃PO₄를 처리해 주었을 때 IL-8의 mRNA 발현이 증가되는 것을 확인하였다(Fig. 2). IL-8의 mRNA 발현은 Ag₃PO₄를 처리한 시간이 늘어날수록 증가하였다. 한편, Ag₃PO₄를 처리하지 않은 대조군은 IL-8의 mRNA 발현이 증가하지 않았다.

Table 1. RT-PCR data

| Ag ₃ PO ₄ treatment time (h) | IL-8 | Beta-actin | Δ C _T | Ratio |
|--|-------|------------|-------------------------|----------|
| 0 h (no) | 30.72 | 24.74 | 5.98 | 0.015843 |
| 24 h (no) | 30.58 | 24.63 | 5.95 | 0.016176 |
| 48 h (no) | 30.5 | 24.57 | 5.93 | 0.016402 |
| 0 h | 30.44 | 24.59 | 5.85 | 0.017337 |
| 24 h | 30.26 | 25.01 | 5.25 | 0.026278 |
| 48 h | 30.51 | 26.47 | 4.04 | 0.060791 |

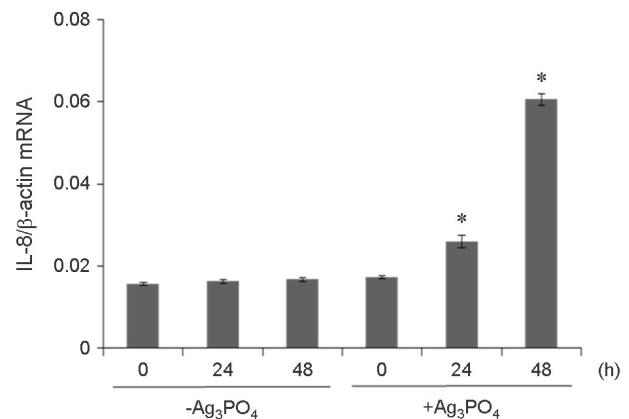


Fig. 2. Induction of human immune responses by Ag₃PO₄. Ag₃PO₄ induces the expression of IL-8. H1299 cells were treated with or without 50 µg/mL Ag₃PO₄ for the indicated time. RNA extracts were then subject to real time RT-PCR analysis with a LightCycler[®] Nano System (Roche). Primers used were; 5'-TGCC-AAGGAGTGCTAAAG-3' and 5'-CTTCTCCACAACCCTCTG for IL-8, and 5'-GTTGCTATCCAGGCTGTG and 5'-TGATCT-TGATCTTCATTGTG for β-actin. Relative transcript amounts of IL-8 were normalized against β-actin. Bar, mean \pm SD from three biological replications. *, P < 0.05 in comparison to non-treated cells.

고찰

본 연구는 *Staphylococcus aureus*에 대한 은의 항균 효과 및 면역반응을 조사하여 그 결과를 알아보기 위하여 진행되었다. 은(Ag, silver)이 *Escherichia coli*, *Pseudomonas syringae* 등의 박테리아의 성장을 억제한다고 보고되었다(Morones-Ramirez et al., 2013; Kim et al., 2016). 본 연구진은 Ag₃PO₄를 이용하여 다른 박테리아의 한 종류인 *Staphylococcus aureus*를 이용하여 Ag₃PO₄의 성장 억제 효과를 관찰하였다. Ag₃PO₄에 의한 *Staphylococcus aureus*의 성장 억제 효과를 성장곡선과 콜로니 카운팅 방법을 이용하여 확인한 결

과 Ag_3PO_4 의 농도가 증가할수록 성장 억제 효과가 증가하는 것을 확인하였다. 특히, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 Ag_3PO_4 를 처리한 경우는 균이 성장하지 못하였고 콜로니 카운팅 방법에서는 뚜렷한 성장 억제 양상을 보였다. 이는 종전에 발표된 은이온 및 은나노 입자에 의한 항균작용과 비슷한 결과를 보였다(Chen et al., 2011; Li et al., 2010).

Ag_3PO_4 가 식물 줄기 마름병의 원인균인 *Pseudomonas syringae*의 성장을 억제하고 식물면역체계를 유도함이 밝혀졌다(Kim et al., 2016). 또한 우리 몸은 병원성균 침입시에 대항하기 위한 선천성 면역반응을 통해 NF- κ B가 활성화되고 활성화된 NF- κ B는 후천성 면역반응을 유도하는데, 사이토카인과 같은 면역반응 물질을 분비하여 여러 질병으로부터 우리 몸을 보호한다(Kim et al., 1998; Elewaut et al., 1999; O'Neill et al., 2013; Yusa et al., 2017). 병원성균 침입시 NF- κ B에 의해 발현이 조절되는 유전자 중 대표적인 사이토카인은 IL-8이다(Kim et al., 1998; Elewaut et al., 1999; O'Neill et al., 2013; Yusa et al., 2017). 이를 바탕으로 Ag_3PO_4 가 우리 몸의 면역체계를 유도하는지 알아보기 위해 *Staphylococcus aureus*를 1시간 선처리 후 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 Ag_3PO_4 를 처리한 세포에서 병원성균 침입시 활성화 되는 면역반응 물질인 IL-8 전사가 Ag_3PO_4 에 의해 영향을 받는지 조사하였다. IL-8 특이 primers를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. 발현된 IL-8의 전사량을 β -actin 유전자의 mRNA량과 상대적 비교를 통해 표준화하여 정량한 결과 Ag_3PO_4 를 처리한 결과 IL-8의 mRNA 발현이 증가되는 것을 확인하였다(Fig. 2). IL-8의 mRNA 발현은 Ag_3PO_4 를 처리한 시간이 늘어날수록 증가하였다. 한편, Ag_3PO_4 를 처리하지 않은 대조군은 IL-8의 mRNA 발현이 증가하지 않았다. 이러한 결과는 Ag_3PO_4 가 *Staphylococcus aureus*에 반응하여 면역반응을 유도한다는 것을 입증해 주는 것이고, 우리 몸에서 은(Ag)의 항균작용 기작이 면역반응 활성화와 관련이 있음을 시사해 준다. 또한 *Staphylococcus aureus*의 다른 박테리아의 경우에도 이러한 항균작용이 해당될 가능성이 크며 이를 입증하기 위해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다. 이와 같은 결과를 통해 Ag_3PO_4 가 *Staphylococcus aureus*에 대한 항균작용과 우리 몸에서의 면역작용 활성화를 유도하는 즉, 항균작용과 면역작용 활성화 2가지 효과가 있음을 확인하였다. 이러한 결과는 앞으로 은(Ag)의 항균작용과 작용기작에 대한 연구에 많은 도움을 줄 것으로 여겨진다.

ACKNOWLEDGEMENTS

None.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have no conflicts of interest to disclose.

REFERENCES

- Chen M, Yang Z, Wu H, Pan X, Xie X, Wu C. Antimicrobial activity and the mechanism of silver nanoparticle thermosensitive gel. *Int J Nanomedicine*. 2011. 6: 2873-2877.
- Eckmann L, Kagnoff MF, Fierer J. Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. *Infect Immun*. 1993. 61: 4569-4574.
- Elewaut D, DiDonato JA, Kim JM, Truong F, Eckmann L, Kagnoff MF. NF- κ B is a central regulator of the intestinal epithelial cell innate immune response induced by infection with enteroinvasive bacteria. *J Immunol*. 1999. 163: 1457-1466.
- Gurusamy KS, Rahul K, Toon CD, Wilson P, Davidson BR. Antibiotic therapy for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections in surgical wounds. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2013. 8: CD009726.
- Kim JM, Eckmann L, Savidge TC, Lowe DC, Witthöft T, Kagnoff MF. Apoptosis of human intestinal epithelial cells after bacterial invasion. *J Clin Invest*. 1998. 102: 1815-1823.
- Kim MK, Yeo B-E, Park H, Huh Y-D, Kwon C, Yun HS. Dual Effect of the cubic Ag_3PO_4 crystal on *Pseudomonas syringae* growth and plant immunity. *Plant Pathol J*. 2016. 32: 168-170.
- Klaine SJ, Alvarez PJ, Batley GE, Fernandes TF, Handy RD, Lyon DY, Mahendra S, McLaughlin MJ, Lead JR. Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environ Toxicol Chem*. 2008. 27: 1825-1851.
- Li W-R, Xie X-B, Shi Q-S, Zeng H-Y, Ou-Yang Y-S, Chen Y-B. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010. 85: 1115-1122.
- Masalha M, Borovok I, Schreiber R, Aharonowitz Y, Cohen G. Analysis of transcription of the aerobic classIb and anaerobic classIII ribonucleotide reductase genes in response to oxygen. *J Bacteriol*. 2001. 183: 7260-7272.
- Morones-Ramirez JR, Winkler JA, Spina CS, Collins JJ. Silver enhances antibiotic activity against gramnegative bacteria. *Sci*

Transl Med. 2013. 5: 190ra81.

O'Neill LA, Golenbock D, Bowie AG. The history of toll-like receptors - redefining innate immunity. Nat Rev Immunol. 2013. 13: 453-460.

Yusa T, Tateda K, Ohara A, Miyazak S. New possible biomarkers for diagnosis of infections and diagnostic distinction between bacterial and viral infections in children. J Infect Chemother.

2017. 23: 96-100.

<https://doi.org/10.15616/BSL.2018.24.1.30>

Cite this article as: Kim MK, Kim DS. Effect of the Ag_3PO_4 on *Staphylococcus aureus* Growth and Human Immunity. Biomedical Science Letters. 2018. 24: 30-34.