통현이팔단 에탄올 추출물의 Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*에 대한 항균활성

김인원^{1#}, 강옥화^{1#}, 공룡², 권동렬^{1*}

1 : 원광대학교 약학대학 한약학과, 원광한약연구소, 원광생명공학연구소

2 : 원광대학교 한의학전문대학원 BK21 plus 사업팀

Antibacterial activity of *Tonghyeonipal-dan* against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

In-Won KIM^{1#}, Ok-Hwa KANG^{1#}, Ryong KONG², Dong-Yeul KWON^{1*}

1 : Department of Oriental Pharmacy, College of Pharmacy and Wonkwang-Oriental Medicines Research Institute, Wonkwang University, 344-2 Sinyong-dong, Iksan, Chonbuk 54538, Republic of Korea.

2 : BK21 Plus Team, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University, 344-2 Sinyong-dong, Iksan, Chonbuk 54538, Republic of Korea.

ABSTRACT

Objectives : Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a human pathogen. New antibacterial agents are needed to treat MRSA-related infections. This study investigated the antibacterial activity of EtOH 70% extracts of *Tonghyeonipal-dan* (THD) which prescription is composed of oriental medicine against MRSA.

Methods : The antibacterial activity of THD was evaluated against MRSA strains by using the Disc diffusion method, broth microdilution method, Checkerboard dilution test, and Time-kill test; its mechanism of action was investigated by bacteriolysis, detergent or ATPase inhibitors were used.

Results : The minimum inhibitory concentration (MIC) of THD is 1,000~2,000 µg/mL against MRSA. In the checkerboard dilution test, fractional inhibitory concentration index (FICI) of THD in combination with antibiotics indicated synergy or partial synergism against *S. aureus*. Furthermore, a time-kill assay showed that the growth of the tasted bacteria was considerably inhibited after 24 h of treatment with the combination of THD with selected antibiotics. For measurement of cell membrane permeability, THD 500 µg/mL along with concentration of Triton X-100 (TX) and Tris-(hydroxymethyl) aminomethane (TRIS) were used. In the other hand, N,N-dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) and Sodium azide (NaN₃) were used as an inhibitor of ATPase. TX, TRIS, DCCD and NaN₃ cooperation against *S. aureus* showed synergistic action.

Conclusions : Accordingly, antimicrobial activity of THD was affected by cell membrane and inhibitor of ATPase were assessed. These results suggest that THD has antibacterial activity, and that THD extract offers great potential as a natural antibiotic against MRSA.

Key words : *Tonghyeonipal-dan*, MRSA, Synergy effect, Time-kill assay, Membrane-permeability, ATPase inhibition

*Corresponding author : Dong-Yeul KWON, PhD Department of Oriental Pharmacy College of Pharmacy Wonkwang Oriental Medicines Research Institute Wonkwang University 344-2 Sinyong-dong Iksan, Jeonbuk, 570-749 Korea

· Tel : +82-63-850-6802 · E-mail : dhkim@dju.kr

#First author : In-Won KIM, Department of Oriental Pharmacy College of Pharmacy Wonkwang Oriental Medicines Research Institute Wonkwang University 344-2 Sinyong-dong Iksan, Jeonbuk, 570-749 Korea

· Tel : +82-63-850-6802

Ok-Hwa KANG, Department of Oriental Pharmacy College of Pharmacy Wonkwang Oriental Medicines Research Institute Wonkwang University 344-2 Sinyong-dong Iksan, Jeonbuk, 570-749 Korea

· Tel : +82-63-850-6802 · E-mail : kangokhwa@daum.net

· Received : 27 August 2015 · Revised : 22 September 2015 · Accepted : 22 September 2015

서론

Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)는 대부분의 나라에서 의료관련 질병 감염률과 사망률에 상당한 비중을 차지하고 있다. MRSA는 1961년 영국에서 처음 발견되었고, 그 이후 급격히 발병률이 증가하고 있다¹⁾. MRSA의 감염증상으로는 단순 피부 감염에서, 농가진, 종기 등이 나타나며, 패혈증, 심내막염, 뇌수막염, 폐렴, 골수염의 증상 또한 나타난다²⁻⁵⁾. MRSA는 원내감염의 주요원인균, 특히 병원에서 장기간 있게 되면 MRSA의 감염률이 증가하게 된다⁶⁾.

MRSA 감염 시 가장 큰 문제는 항생제에 대한 내성에 있다. 현재 MRSA의 내성기전은 아직까지 완전하게 규명되지 못하였으나, β -lactam계 항생제와의 친화성이 낮은 PBP2a의 생산, β -lactam ring을 가진 항생제를 분해하는 효소인 β -lactamase의 과잉 분비, 세포막의 항생제 투과성 변화와 Efflux pump를 통한 세포외로의 항생제 유출 등의 기전이 독립적 또는 복합적으로 작용하여 항생제에 대한 내성을 나타내는 것으로 알려져 있다⁷⁻⁸⁾.

MRSA가 급증하는 원인은 항생제의 과다사용에 있으며, 이를 해결하기 위해 여러 연구자들이 항생제가 아닌 천연추출물이나 천연물 유래 화합물, 전통 한의학 처방 등을 이용한 항균활성 연구를 하고 있다⁹⁻¹⁵⁾. 이 실험에 사용된 물질인 통현이팔단(通玄二八丹)은 동의보감(東醫寶鑑)에 수록되어 있는 적취(積聚)를 치료하는 한약처방으로 한의학에서는 상복부가 쥐어짜듯 아프고 아랫배가 그득하고 답답하며, 소변이 잘 나오지 않는 증상 등에 사용한다. 통현이팔단은 黃連, 白芍藥, 當歸, 生地黃, 烏梅로 구성된 처방이며, 위 약재들을 가루 내어 雄豬肚 속에 넣고 실로 꿰맨 다음 하루 동안 쪼린 뒤 환약을 만들어, 한 번에 70환씩 생강 달인 물로 공복에 복용한다고 기록되어 있다¹⁶⁾. 통현이팔단의 구성약재 중 가장 많은 용량을 차지하는 黃連의 주성분 중 하나인 berberine은 이미 MRSA에 대한 항균효과가 있다고 보고 된 바 있다¹⁷⁾.

이에 저자는 통현이팔단의 70% 에탄올 추출물(THD)이 MRSA에 대한 항균효과가 있을 것이라고 보고, 다음의 연구를 진행하였다.

재료 및 방법

1. 재료

사용된 약재는 黃連, 白芍藥, 當歸, 生地黃, 烏梅로 전라북도 익산시 대한한약국(익산, 한국)에서 구입하여 원광대학교 약학대학 한약학과 본초학실(권동렬 교수)에서 감정하여 사용하였다.

실험에서 사용된 시약은 Oxacillin, Ampicillin, Vancomycin, Gentamicin, Mueller-Hinton Broth (DIFCO), Mueller-Hinton Agar (BD), N,N-dicyclohexylcarbodiimide, Dimethyl sulfoxide, Triton X-100(SIGMA), Tris-(hydroxymethyl) aminomethane (AMRESCO), Sodium axide (Fluka), MTT[3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, 5 mg/ml]를 사용하였다.

본 실험에 사용한 균주 MRSA [ATCC 33591]와 MSSA

[ATCC 25923]는 ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)에서 구입하였고, DPS-1,2는 원광대학교 병원에서 MRSA 보균자로부터 채취하여 임상균주로 사용하였다.

2. 방법

1) 시료의 조제방법

黃連 30g, 白芍藥, 當歸, 生地黃, 烏梅 각 2g을 70% EtOH 500ml로 2시간씩 2회에 달여 추출하였으며, 감압농축 후 동결 건조하여 12.1g (수득률 : 31.8%)을 얻었고, -20°C 에서 보관하였다. 시약은 DMSO에 녹여 실험에 사용하였다(Table 1).

Table 1. The composite of *Tonghyeonipal-dan*.

Herb name	Scientific name	Parmacognostic name	Weight (g)
黃連	<i>Coptis chinensis</i>	Coptidis Rhizoma	30
生地黃	<i>Rehmannia glutinosa</i>	Rehmanniae Radix	2
烏梅	<i>Prunus mume</i> Sieb. et Zucc	Mume Fructus	2
芍藥	<i>Lindera strychnifolium</i>	Paeonia Radix	2
當歸	<i>Angelica gigas</i>	Angelicae gigantis Radix	2

2) 균주 배양

각각의 균주들은 -70°C Deep freeze에서 15% glycerol에 보관하였고, Mueller-Hinton Agar (MHA)에 접종하여 37°C incubator에서 24시간 배양 후 0.5 McFarland 표준 탁도 (1.5×10^8 CFU/ml)로 실험에 사용하였다.

3) Antimicrobial resistance testing

mecA 유전자 검출을 위한 PCR (Polymerase Chain Reaction)은 MRSA Primer Mix Kit (Genotek Co, Korea)을 이용하여 제조사의 지시에 따라 시행하였다. 균주는 MHA에서 2회 계대배양 하여 사용하였고, 300 μl 의 세포용해 완충액에서 1-5개의 집락을 풀고, 현탁 후에 95°C 에서 5분 동안 가열하였다. 13,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상층액 2 μl 를 DNA 추출에 사용하였다. PCR 산물은 2% agarose gel에 전기영동한 후 ethidium bromide 로 염색하여 자외선 투영기 위에서 554 bp의 band를 확인하였으며, 본원에서 분리된 mecA 양성 균주를 양성 대조로, 표준균주인 *S. aureus* ATCC 25923을 음성 대조로 이용하였다(Table 2).

Table 2. Determination of the mecA gene of the *S. aureus* strains used in the experiment.

<i>S. aureus</i> strain	Class	MecA gene	β -Lactamase activity	Antibiotic resistance pattern
ATCC 33591	MRSA	+	+	AM*, OX*
ATCC 25923	MSSA	-	-	-
Clinical isolates				
DPS-1 [†]	MRSA	+	+	AM, OX
DPS-2	MRSA	+	+	AM, OX

+ : positive - : negative *AM : ampicillin *OX : oxacillin

[†]DPS : staphylococcal strains from the Department of Plastic Surgery, Wonkwang University Hospital.

4) Disc diffusion method (디스크 확산법)

항균효과는 disc diffusion method을 통해 측정하였다.

Mueller-Hinton Agar (MHA)를 고압 멸균하여 petri-dish에 굳혔다. 모든 균주는 37°C incubator에서 24시간 배양하였으며, 1.5×10^8 CFU/ml을 희석하여 MHA에 최종적으로 1.5×10^5 CFU/ml이 되도록 한 후, MHA에 100 μ l씩 골고루 도말하였다. 다음으로 멸균 된 paper disc (6mm)에 통현이팔단 (500 ~ 2,000 μ g)을 10 μ l씩 주입하여 완전히 흡수시킨 후 37°C incubator에서 24시간 배양시켜 paper disc 주위에 형성된 inhibition zone의 직경을 측정하였다¹⁸⁻¹⁹.

5) Minimum inhibitory concentration (MIC, 최소억제농도)

Minimum inhibitory concentration (MIC)는 배지 미량 희석법을 통해 측정하였다. 통현이팔단 에탄올추출물을 액체 배지에 농도별로 첨가하고, 여기에 탁도를 1.5×10^8 CFU/ml로 맞춘 균을 10 μ l 접종하여 최종적으로 1.5×10^6 CFU/ml이 되게 하였다. 다음으로 37°C incubator에서 18시간 배양한 후에 MTT[3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, 5 mg/ml]사용하여 색이 변하지 않는 가장 낮은 농도를 측정하였다²⁰⁻²¹.

6) Fractional inhibitory concentration index (FICI, 약물병용효과)

THD와 상용 항생제인 AM, OX, VC, GE를 병행처리 하였을 때 상승효과가 있는지를 측정하기 위해 Checkerboard dilution test를 실시하였다. 두 항균물질은 MHB를 보충하여 순차적으로 희석하였다. 접종원은 37°C incubator에서 24시간 배양한 후에 사용하였으며, 최종적으로 1.5×10^6 CFU/ml이 되게 하였다. Fractional inhibitory concentration index (FICI) = FICA + FICB = [A]/MIC[A] + [B]/MIC[B] [A]는 병용 시에 THD의 MIC이며, MIC[A]는 THD를 단독으로 사용 시에 MIC이다. [B]는 병용 시에 상용 항생제의 MIC이며, MIC[B]는 상용 항생제를 단독으로 사용 시에 MIC이다. FICI는 <0.5, synergy; 0.5 to 0.75, partial synergy; 0.76 to 1.0, additive effect; > 1.0 to 4.0, indifference; and > 4.0, antagonism 을 따른다. 따라서 이들의 범위에 따라 두 항균물질의 다양한 synergy 비율을 측정하였다²²⁻²³.

7) Time-kill assay

Time-kill 은 THD의 시간에 따른 박테리아의 증식정도를 보기위해 4시간, 8시간, 16시간, 24시간 별로 CFU/ml를 측정하여 나타내었다²⁴⁻²⁵. 박테리아는 18시간 배양하여 탁도를 1.5×10^8 CFU/ml로 맞춘 균을 10 μ l 접종하여 최종적으로 1.5×10^6 CFU/ml이 되게 하였고, 약물농도는 THD 1/2 MIC와 항생제 1/2 MIC를 각각 측정한 다음, THD 1/2 MIC + 항생제 1/2 MIC를 처리하여 측정하였다. Control로써는 MHB에 균만 접종하였다.

8) Membrane permeability of THD combination with detergent

THD와 *S. aureus*의 membrane 투과성을 증진시킨다고 알려진 Detergent인 TX-100, Tris를 병용하였을 때, 얼마만큼 membrane 투과성을 증진시키는 지를 알아보기 위해 위 실험을 하였다²⁶⁻²⁸.

9) Metabolic inhibition of THD combination with ATPase-inhibitor

THD와 *S. aureus*의 energy 대사를 저해시킨다고 알려진 약물인 NaN₃, DCCD를 병용하였을 때, 얼마만큼 energy 대사를 저해시키는지 알아보기 위해 위 실험을 하였다²⁶⁻²⁸.

10) 통계분석

모든 실험은 3회 이상 반복으로 이루어졌으며, 실험결과와 각 항목에 따라 평균치 $\pm$ 표준편차 (SEM)를 구하여 그 유의성은 Student's *t*-test (SPSS, ver.22) 분석법을 이용하여 신뢰수준 95% ($p < 0.05$)에서 통계적 유의차를 평가하였다.

결 과

1. Disc diffusion method (디스크 확산법)

*S. aureus*에 대한 THD의 항균활성은 디스크 확산법을 통해 저해환의 직경을 측정하여 농도별 항균력을 비교하였다. MSSA 표준균주 (ATCC 25923)와 MRSA (ATCC 33591)는 2000 μ g/mL에서 8~9 mm의 저해환이 관찰되었고, 두 MRSA 임상균주 (DPS-1, 2)에서는 1000 μ g/mL 이상의 농도에서 8~10 mm의 저해환이 관찰되었다(Table 3).

Table 3. Antibacterial activities of THD extract against *S. aureus* strains.

<i>S. aureus</i> strain	Diameter of zone of inhibition (mm)			
	AM	THD		
	500 μ g	500 μ g	1,000 μ g	2,000 μ g
ATCC 25923	44	ND	ND	9
ATCC 33591	7	ND	ND	8
DPS-1*	9	ND	9	10
DPS-2	23	ND	8	10

* DPS : indicates *staphylococcal* strains from the Department of Plastic Surgery, Wonkwang University Hospital, * ND : No detected activity at this concentration.

2. Minimum inhibitory concentration (MIC, 최소억제농도) 측정

모든 *S. aureus*에 대한 THD의 최소억제농도(MIC)를 측정한 결과 1,000 ~ 2000 μ g/mL로 나타났다. THD에 대한 효과를 상용 항생제와 비교하기 위하여 AM, OX, GT, VC의 최소억제농도 (MIC)를 같이 측정하였다(Table 4).

Table 4. Antibacterial activity of THD extract against 4 strains of *S. aureus*.

<i>S. aureus</i> strain	MIC (μ g/ml)				
	THD*	AM	OX	GT	VC
ATCC 23923 (MSSA)	2000	3.9	3.9	0.98	1.95
ATCC 33591 (MRSA)	2000	1000	500	1.95	3.9
DPS-1 (MRSA)	1000	500	500	62.5	1.95
DPS-2 (MRSA)	1000	62.5	125	31.25	1.95

* THD : *Tonghyeonipal-dan* ethanol extract

3. 약물병용효과 (Fractional inhibitory concentration Index, FICI)

MSSA, MRSA 표준균주 (ATCC25923, ATCC33591)와 MRSA 임상균주 (DPS-1, 2)에 대한 THD와 4개의 항생제의 배합을 통해 병용효과를 측정하였다. 그 결과 MSSA 표준균주는 1개의 배합이, MRSA 표준균주는 3개의 배합이, MRSA 임상균주 (DPS-1)에서는 3개의 배합이, MRSA 임상균주 (DPS-2)에서는 4개의 배합이 병용효과가 있음을 확인할 수 있었다(Table 5).

Table 5. MIC of THD combination with antibiotics against *S. aureus*.

<i>S. aureus</i> strains	MIC of THD (μg/mL)		MIC of antibiotics (μg/mL)		FICI	Synergy
	THD alone	With AM	AM alone	With THD		
MSSA (ATCC 25923)	2,000	500	3.9	0.24	0.3125	synergy
MRSA (ATCC 33591)	2,000	500	1000	250	0.5	synergy
MRSA (DPS-1)	1,000	62.5	500	31.25	0.125	synergy
MRSA (DPS-2)	1,000	62.5	62.5	7.8	0.1875	synergy
	THD alone		OX alone			
	THD alone	With OX	OX alone	With THD		
MSSA (ATCC 25923)	2000	2000	3.9	3.9	2	indifference
MRSA (ATCC 33591)	2000	500	500	62.5	0.375	synergy
MRSA (DPS-1)	1000	125	500	31.25	0.1875	synergy
MRSA (DPS-2)	1000	62.5	125	7.8	0.125	synergy
	THD alone		GT alone			
	THD alone	With GT	GT alone	With THD		
MSSA (ATCC 25923)	2,000	2000	0.98	0.98	2	indifference
MRSA (ATCC 33591)	2,000	2000	1.95	1.95	2	synergy
MRSA (DPS-1)	1,000	125	62.5	7.8	0.25	synergy
MRSA (DPS-2)	1,000	62.5	31.25	7.8	0.3125	synergy
	THD alone		VC alone			
	THD alone	With VC	VC alone	With THD		
MSSA (ATCC 25923)	2000	2000	1.95	1.95	2	indifference
MRSA (ATCC 33591)	2000	2000	3.9	3.9	2	indifference
MRSA (DPS-1)	1000	1000	1.95	1.95	2	indifference
MRSA (DPS-2)	1000	250	1.95	0.24	0.375	synergy

The synergistic combinations were investigated in the checkerboard method. FIC indices were interpreted as follows: the FIC index was interpreted as follows: synergy, <0.5; partial synergy, 0.5–0.75; additive effect, 0.76–1.0; indifference, >1.0–4.0; and antagonism, >4.0

4. The time-kill assay

병용효과가 나타난 조성에 대하여 Time-kill assay를 실시한 결과 6가지의 조성에서 시간에 따른 균의 억제 양상이 나타났다. MSSA 표준균주 (ATCC25923)에서는 THD와 Ampicillin의 배합이 효과가 있었고, MRSA 표준균주 (ATCC33591)에서는 THD와 Ampicillin의 배합이 효과가 있었고, MRSA 임상균주 (DPS-1)에서는 THD와 Ampicillin, Oxacillin, Gentamicin 각각의 배합이 효과가 있었고, MRSA 임상균주 (DPS-2)에서는 THD와 Gentamicin의 배합이 효과가 있었다. 위의 6가지의 조성은 단일 약물에서는 균의 생장 억제가 나타나지 않았으나, 배합 시에 균의 생장이 시간에 따라 억제되었다가, 24h 이내에 사멸하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

Fig. 1. Time-kill curves of *S. aureus* using THD with antibiotics. Viable counts were conducted at 4, 8, 16 and 24 h. The data are average of triple-independent experiments. * $P < 0.05$ as compared to antibiotic alone, were determined.

5. Membrane투과성에 대한 THD와 Detergent의 병용효과

Detergent가 THD와의 병용을 통해 membrane 투과성이 강화되는지를 보기 위해 500 μg/mL THD와 0.001% TX-100, 15.6 μg/mL Tris를 각각 병용하였을 때의 균생장 억제 정도를 OD값을 통해 측정하였다. 그 결과 0.001% TX-100, 15.6 μg/mL Tris를 단독으로 처리하였을 때보다 THD와 병용하였을 때 균의 생장이 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

Fig. 2. Effect of membrane-permeabilizing agents on the susceptibility of *S. aureus* (ATCC 33591) to THD. The viability of bacteria was determined by a spectrophotometer (optical density at 600 nm, OD₆₀₀) after incubation of 24 h. The data are Mean ± S.D. for triple-independent experiments. * $P < 0.001$ as compared to detergent alone were determined.

6. Energy 대사저해에 대한 THD와 ATPase-inhibitor의 병용효과

ATPase-inhibitor와 THD의 병용을 통해 energy 대사저해가 강화되는 효과를 보기위해 500 μg/mL THD와 62.5

μg/mL DCCD, 0.001% NaN₃를 각각 병용하였을 때의 항균력을 OD값을 통해 측정하였다. 그 결과 62.5 μg/mL DCCD, 0.001% NaN₃를 단독으로 처리하였을 때보다 THD와 병용하였을 때 균의 생장이 억제되는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 3).

Fig. 3. Effect of ATPase-inhibitor agent DCCD on the susceptibility of *S. aureus* (ATCC 33591) to THD. The viability of bacteria was determined by a spectrophotometer (optical density at 600 nm, OD₆₀₀) after incubation of 24 h. The data are Mean ± S.D. for triple-independent experiments. **P* < 0.001 as compared to ATPase-inhibitor alone were determined.

고찰

기존 항생제 및 항균물질의 작용기전은 세포벽 합성의 억제 및 파괴, 균의 핵산 합성과 단백질 합성의 억제 및 핵산의 대사 억제 등의 원리를 통해 균의 성장을 억제하는 것이다²⁹⁾. 이러한 항생제의 작용에 대하여 MRSA에는 항생제와의 친화성이 낮은 단백질의 생산과 항생제 분해효소의 분비 및 세포 외로의 이물질을 배출하는 등의 여러 기전을 통해 기존 항생제에 대한 저항성을 나타내었다⁷⁻⁸⁾. 이에 본 연구에서는 전통 한의학 처방인 통현이팔단의 에탄올 추출물(THD)을 이용하여 MRSA에 대한 항균활성평가 및 기존 항생제와의 병용효과와 다양한 기전실험을 진행하였다.

본 실험에서는 Disc zone과 최소저해농도(MIC)의 측정을 통해 THD가 MRSA에 대하여 항균활성을 보인다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 THD와 기존항생제의 병용효과에 대한 실험과 Time-kill을 통해 MRSA의 성장을 낮추는데 충분한 상승효과가 있음을 확인할 수 있었다. 이는 THD가 MRSA의 내성기전의 작용을 방해하여 기존 항생제의 치료효과를 높였거나, 또는 항생제와의 병용으로 MRSA의 성장을 방해하는데 복합적으로 작용했을 것으로 본다. 이에 대하여 더 자세히 확인하기 위해 THD와 세포막 투과성에 영향을 주는 Detergent와 Energy 대사에 영향을 주는 ATPase-inhibitor를 MRSA에 병용 투여하여 그 성장효과를 확인해본 결과, 균이 억제되는 것을 확인하였다. 이 결과로 THD가 MRSA의 세포막 투과성 및 에너지 대사에 영향을 준다는 것을 확인할 수 있었다. THD의 세포막 투과성에 대한 효과와 에너지 대사 저해 효과가 항생제와 상승효과를 나타낸 주요 원인이 아닌지 생각된다.

위 실험을 통해 THD가 MRSA에 대해 항균효과 있음을 확인하였고, 나아가 기존 항생제와의 병용실험을 통하여 같이 사용할 때, 항생제의 농도를 낮출 수 있음을 확인할 수 있었다. 또한 기전실험을 통해 THD가 MRSA의 막 투과성과 ATPase의 억제를 통해 항균활성을 나타낸다는 것을 확인하였다. 이

로써, THD가 MRSA의 치료에 효과적인 후보물질임을 시사하는 바이다.

결론

Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)에 대해 통현이팔단 에탄올 추출물(THD)을 사용하여 항균활성을 측정한 결과는 다음과 같다.

1. THD의 Disc 실험을 통해 1,000~2,000 μg의 농도에서 8~10 mm의 저해환을 관찰할 수 있었다.
2. THD의 MRSA에 대한 최소억제농도(MIC)는 1,000~2,000 μg/mL이었다.
3. THD는 항생제와의 병용처리 시 병용효과가 있음을 확인할 수 있었다.
4. THD와 항생제를 병용처리 하여 Time-kill assay를 실시한 결과 24 h 내에 균이 억제되었음을 확인할 수 있었다.
5. THD 500 μg/mL에 0.001% Triton-X (TX), 15.6 μg/mL Tris를 각각 병용하였을 때 세포막 투과성이 증가하여 MRSA의 생존력이 확연히 감소됨을 확인하였다.
6. THD 500 μg/mL에 62.5 μg/mL DCCD, NaN₃ 0.001%를 각각 병용하였을 때 ATP 합성의 저해작용을 통해 MRSA의 생존력이 감소됨을 확인하였다.

이상의 실험 결과, THD가 MRSA에 대해 항균작용이 있음을 검증하였으며, 항생제와의 병용 실험에서 MRSA, MSSA 표준균주 및 MRSA 임상균주에 대하여 병용효과가 있음을 확인할 수 있었다. 또한 여러 기전에서 MRSA의 성장을 억제하는 것을 확인할 수 있었다.

감사의 글

This research was financially supported by the National Research Foundation of Korea(NRF) grant funded by the Korea government(MSIP)(2008-0062484)

References

1. Cookson B. Five decades of MRSA: controversy and uncertainty continues. *Lancet*. 2011 ; 378(9799) : 1291-2.
2. Favero MS. Outbreaks of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2003 ;

- 24(10) : 787.
3. Rosanova MT, Beberian G, Bologna R, Giménez S, Sarkis C, Buchovsky A, Pérez-Md G, Pinheiro J, Lede R. Descriptive study of bone and joint infections in children in times of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *Rev Chilena Infectol*. 2015 ; 32(3) : 321-5.
4. Paul M, Bishara J, Yahav D, Goldberg E, Neuberger A, Ghanem-Zoubi N, Dickstein Y, Nseir W, Dan M, Leibovici L. Trimethoprim-sulfamethoxazole versus vancomycin for severe infections caused by methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: randomised controlled trial. *BMJ*. 2015 ; 350 : h2219.
5. Sharma-Kuinkel BK, Mongodin EF, Myers JR, Vore KL, Canfield GS, Fraser CM, Rude TH, Fowler VG Jr, Gill SR. Potential Influence of *Staphylococcus aureus* Clonal Complex 30 Genotype and Transcriptome on Hematogenous Infections. *Open Forum Infect Dis*. 2015 ; 2(3) : ofv093.
6. Khokhlova OE, Hung WC, Wan TW, Iwao Y, Takano T, Higuchi W, Yachenko SV, Teplyakova OV, Kamshilova VV, Kotlovsky YV, Nishiyama A, Reva IV, Sidorenko SV, Peryanova OV, Reva GV, Teng LJ, Salmina AB, Yamamoto T. Healthcare- and Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Fatal Pneumonia with Pediatric Deaths in Krasnoyarsk, Siberian Russia: Unique MRSA's Multiple Virulence Factors, Genome, and Stepwise Evolution. *PLoS One*. 2015 ; 10(6) : e0128017.
7. Turos E, Coates C, Shim JY, Wang Y, Leslie JM, Long TE, Suresh Kumar Reddy G, Ortiz A, Culbreath M, Dickey S. N-Methylthio β -lactam antibacterials: Effects of the C3/C4 ring substituents on anti-MRSA activity. *Bioorg med chem*. 2005 ; 13(23) : 6289-308.
8. Bush K, Heep M, Macielag MJ, Noel GJ. Anti-MRSA beta-lactams in development, with a focus on ceftobiprole: the first anti-MRSA beta-lactam to demonstrate clinical efficacy. *Expert Opin Investig Drugs*. 2007 ; 16(4) : 419-30.
9. Kim KJ, Yu HH, Cha JD, Seo SJ, Choi NY, You YO. Antibacterial activity of *Curcuma longa* L. against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytother Res*. 2005 ; 19(7) : 599-604.
10. Saad A, Fadli M, Bouaziz M, Benharref A, Mezrioui NE, Hassani L. Anticandidal activity of the essential oils of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* and their synergism with amphotericin B and fluconazol. *Phytomedicine*. 2010 ; 17(13) : 1057-60.
11. Ettetfagh KA, Burns JT, Junio HA, Kaatz GW, Cech NB. Goldenseal (*Hydrastis canadensis* L.) extracts synergistically enhance the antibacterial activity of berberine via efflux pump inhibition. *Planta Med*. 2011 ; 77(8) : 835-40.
12. Yoon JI, Bajpai VK, Kang SC. Synergistic effect of nisin and cone essential oil of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu against *Listeria monocytogenes* in milk samples. *Food Chem Toxicol*. 2011 ; 49(1) : 109-14.
13. Lee JW, Ji YJ, Lee SO, Lee IS. Effect of *Salvia miltiorrhiza* bunge on antimicrobial activity and resistant gene regulation against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Microbiol*. 2007 ; 45(4) : 350-7.
14. Obiang-Obounou BW, Kang OH, Choi JG, Keum JH, Kim SB, Mun SH, Shin DW, Kim KW, Park CB, Kim YG, Han SH, Kwon DY. The mechanism of action of sanguinarine against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Toxicol Sci*. 2011 ; 36(3) : 277-83.
15. Kim E, Choi CH, Kim IH, Lee HI, Song YS. Antibacterial Effect of Huanggeumjakyak-tang against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Orien Rehabil Med*. 2013 ; 23(3) : 15-26.
16. Heo Jun. paginal translation. Donguibogam. Seoul : Yeogang publisher. 2005 : 1925.
17. Yu HH, Kim KJ, Cha JD, Kim HK, Lee YE, Choi NY, You YO. Antimicrobial activity of berberine alone and in combination with ampicillin or oxacillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Med Food*. 2005 ; 8(4) : 454-61.
18. Lee YS, Kang OH, Choi JG, Oh YC, Chae HS, Kim JH, Park H, Sohn DH, Wang ZT, Kwon DY. Synergistic effects of the combination of galangin with gentamicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Microbiol*. 2008 ; 46 : 283-8.
19. Kwon DY, Kang OH, Choi JG, Lee YS, Oh YC, Chae HS, Lee GH, Park PS, Kim YC, Sohn DH, Park H, Lee JH. Antibacterial effect of *Dryopteris crassirhizoma* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia*. 2007 ; 78 : 430-3.
20. Bala M, Ray K, Gupta SM. Comparison of disc diffusion results with minimum inhibitory concentration (MIC) values for antimicrobial susceptibility testing of *Neisseria gonorrhoeae*. *Indian J Med Res*. 2005 ; 122 : 48-51.
21. CLSI. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standards. CLSI document M2 A7. Wayne, PA. 2001.
22. Shahverdi AR, Fakhimi A, Zarrini G, Dehghan G, Iranshahi M. Galbanic acid from *Ferula szowitsiana* enhanced the antibacterial activity of penicillin G and cephalexin against *Staphylococcus aureus*. *Biol Pharm Bull*. 2007 ; 30 : 1805-7.
23. Guadalupe MN, Blanca EL, Mariano VP, Fortino SS. In vitro activity effects of combinations of cephalothin, dicloxacillin, imipenem, vancomycin and

- amikacin against methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. strains. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2006 ; 5 : 25.
24. Timurkaynak F, Can F, Azap OK, Demirbilek M, Arslan H, Karaman SO. In vitro activities of non-traditional antimicrobials alone or in combination against multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care units. *Int J Antimicrob Agents.* 2006 ; 27 : 224-8.
25. Nascimento AM, Brandao MG, Oliveira GB, Fortes IC, Chartone SE. Synergistic bactericidal activity of *Eremanthus erythropappus* oil or beta-bisabolene with ampicillin against *Staphylococcus aureus*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2007 ; 92 : 95-100.
26. Choi JG, Kang OH, Obiang-Obounou B, Lee YS, Chae HS, Oh YC, Sohn DH, Park H, Choi HG, Kim SG, Shin DW, Kwon DY. Antibacterial activity of *Ecklonia cava* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. *Foodborne Pathog Dis.* 2010 ; 7 : 435-41.
27. Linnett PE and Beechey RB. Inhibitors of the ATP synthetase system. *Methods Enzymol.* 1979; 55 : 472-518.
28. Zhao WH, Hu ZQ, Okubo S, Hara Y, Shimamura T. Mechanism of synergy between epigallocatechin gallate and β -lactams against methicillin-resistant *staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 ; 45(6) : 1737-42.
29. Teethaisong Y, Autarkool N, Sirichaiwetchakoon K, Krubphachaya P, Kupittayanant S, Eumkeb G. Synergistic activity and mechanism of action of *Stephania suberosa* Forman extract and ampicillin combination against ampicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Sci.* 2014 ; 21 : 90.