

석창포 hexane 추출물이 *Staphylococcus aureus* SA2의 Chloramphenicol Acetyltransferase에 미치는 영향

문경호 · 권주열 · 박민수 · 김혜경 · 이정규[#]

경성대학교 약학대학

(Received December 22, 2003; Revised February 11, 2004)

Effect of Hexane Extract of *Acori graminei* Rhizoma on Chloramphenicol Acetyltransferase of *Staphylococcus aureus* SA2

Kyung Ho Moon, Joo Yeoul Kwon, Minsoo Park, Hyekyung Kim and Chung Kyu Lee[#]

College of Pharmacy, Kyungsung University, Busan 608-736, Korea

Abstract — One subfraction from the hexane fraction of *Acori graminei* Rhizoma, the E4 fraction which is mainly consisted of acorenone, showed a potential inhibitory activity against chloramphenicol acetyltransferase (CAT) of *S. aureus* SA2 that is a multidrug-resistant strain to 10 usual antibiotics. The combination therapy of this fraction with chloramphenicol resulted in reduction of the minimal inhibitory concentration from 128 $\mu\text{g/ml}$ to 8 $\mu\text{g/ml}$. The E4 fraction also revealed to prevent the induction of CAT from this strain.

Keywords □ chloramphenicol acetyltransferase, *Staphylococcus aureus* SA2, growth inhibition, antibiotics resistance, resistance inhibition, *Acori graminei* Rhizoma, acorenone

황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)은 여러 가지 항생제들에 대해 동시에 내성을 보이는 다제내성균(multi-resistant strain)¹⁻⁴⁾으로 새로운 항생제가 꾸준히 개발되고 있음에도 불구하고 계속적으로 내성을 획득하게 되어 여전히 인류를 위협하고 있다.^{5,6)}

사람과 가축의 황색포도상구균 감염증에 흔히 이용되는 클로람페니콜(Cm)은 50S ribosomal subunit와 결합함으로써 단백질 합성 과정 중 transpeptidation 단계를 방해하여 정균작용을 일으키는 항생제로 알려져 있다.⁷⁾ 황색포도상구균에 있어서 Cm에 대한 내성은 Cm이 chloramphenicol acetyl transferase(CAT)의 작용에 의하여 acetyl coenzyme A와 반응하여 아세틸화 됨으로써 무독화되기 때문인 것으로 알려져 있는데 황색포도상구균의 경우 적어도 5종류의 CAT이 있는 것으로 보고되었다.^{8,9)}

저자 등은 천연 자원으로부터 항생제의 내성을 억제하는 물질을 개발하고자 하는 일련의 연구¹⁰⁻¹⁵⁾ 결과, 석창포 *Acorus gramineus* Solander 근경의 정유로부터 분리 정제한 acorenone

이 Cm에 대하여 강력한 내성 억제 작용을 보였으며 *E. coli*의 CAT에 대하여 비상경적 억제제로 작용함이 밝혀진 바가 있다.¹⁴⁾ 석창포의 hexane 추출물의 E4 성분과 Cm의 병용 투여 시 *S. aureus* SA2에 대한 최소억제농도를 128 $\mu\text{g/ml}$ 에서 8 $\mu\text{g/ml}$ 로 낮추어 석창포 추출물의 Cm 항생제 내성균 치료에 있어 임상 적용 가능성을 보여주었다.¹⁵⁾

이에 본 연구에서는 석창포의 E4 분획이 *S. aureus* SA2가 생산하는 CAT의 동태에 미치는 영향을 관찰하였다.

재료 및 방법

시약

액체 배지(tryptic soy broth, TSB)와 agar는 Difco 제품을, Cm, acetyl CoA, Tris 등은 Sigma 제품 것을 사용하였으며 나머지 시약은 실험 목적에 적합한 규격품을 사용하였다.

균주

항생제 다제 내성균 *S. aureus* SA2는 클로람페니콜을 비롯하여 ampicillin, clindamycin, erythromycin, gentamicin, kanamycin, methicillin, streptomycin, tetracycline 및 tobramycin

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 051-620-4880 (팩스) 051-620-4880
(E-mail) cklee@star.ks.ac.kr

등에 내성을 보이는 다제내성 균으로 본 대학 실험실에서 배양한 것이다.^{16,17)}

석창포의 추출 및 분획

실험에 사용할 석창포 추출물은 김 등¹⁴⁾의 방법에 따라 수행하였다. 석창포를 수증기 증류하여 핵산 분획을 얻고 칼럼 크로마토그래피를 반복하여 얻어진 분획 중 E4 분획을 실험에 사용하였으며 TLC 상에서 acorenone을 함유하는 것이다.

병용효과

액체 TSB 배지에서 12시간 이상 배양한 *S. aureus* SA2 배양액을 1×10^5 colony forming unit가 되도록 하여, 균의 성장에 영향을 미치지 않는 정도의 항생제와 생약 추출물이 들어 있는 TSB 배지에 접종시킨 다음 37°C에서 24시간 동안 배양하여 600 nm에서 optical density(O. D., absorbance)를 측정하여 성장 여부(세균수)를 측정하되(초기균수 1.07×10^9 cell은 O. D. 약 1.0을 나타냄) 항생제만 처리한 것을 대조군으로 하고 항생제와 추출물을 병용 처리한 것을 실험군으로 하여 균의 성장억제 정도를 관찰하고 내성균의 성장을 억제하는 최소농도를 구하였다.

CAT 활성 측정

CAT 활성은 Cm과 acetyl-CoA의 반응 결과 생성된 CoA-SH 양을 5,5-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid, DTNB)로 측정하는 Ellman의 방법을 사용하였다.¹⁸⁾ 즉 Cm이 함유한 TSB 배지에서 *S. aureus* SA2를 배양한 다음 흡광도를 측정한 후 세균수가 1×10^9 가 되도록 배양액을 취한 다음 4°C에서 10,000 rpm으로 2분간 원심분리하여 pellet을 얻고 이 pellet을 170 μ l의 0.25 M Tris 완충용액(TB, pH 8.0)에 현탁시킨 다음 여기에 20 μ l의 lysostaphin(200 μ g/ml)과 10 μ l의 DNase(2,000 unit/ml)를 가하고 37°C에서 20분간 처리한 다음 10,000 rpm, 4°C에서 5분간 원심분리하여 효소추출물을 얻었다. CAT의 활성은 880 μ l의 TSB 배지에 100 μ l의 2 mM DTNB를 넣고 37°C에서 20분간 방치한 다음 100 μ l의 1 mM acetyl-CoA와 100 μ l의 효소 추출물을 넣은 후 1분 후에 20 μ l의 10 mM Cm을 넣고 412 nm에서 1분 후 O. D.를 측정하여 활성을 nmol/min/ 10^9 cells로 나타내었다.

경시변화

50 μ g/ml의 Cm을 함유한 TSB 배지에 임의량의 *S. aureus* SA2를 접종한 다음 37°C에서 5시간 배양하고 흡광도를 측정하여 세균수를 구하고, 다시 세균수가 1×10^9 되도록 배양액을 취하여 효소원을 제조하여 효소의 온도에 대한 안정성을 두 가지 방법으로 측정하였다. 즉 세균 pellet을 -20°C에 저장하여 일정 시간이 경과한 후 효소원을 제조하여 활성을 보았으며 또한 효소원을 조제한 다음 4°C와 -20°C에 각각 보관한 다음 시간 경과

에 따른 따라 활성의 변화를 관찰하였다.

결과 및 고찰

온도 및 시간 경과에 따른 CAT의 안정성 변화

S. aureus SA2를 Cm이 50 μ g/ml의 농도로 들어있는 TSB에서 37°C에서 5시간 배양한 후 흡광도를 측정하여 세균수를 구하고 세균수가 1×10^9 되도록 배양액을 취하여 효소원을 제조하여 효소의 온도에 대한 안정성을 두 가지 방법으로 측정해보았다 (Table I). 세균 pellet을 -20°C에 저장하여 일정 시간이 경과한 후 효소원을 제조하여 활성을 보았으며 또한 효소원을 조제한 다음 4°C와 -20°C에 각각 보관한 다음 시간에 따라 활성을 측정하여 보았다. -20°C에 보관 시 pellet으로 보관하는 것과 효소원으로 보관하는 것 자체에는 별 차이가 없었으며 효소원으로 보관할 경우 4°C보다 -20°C에서 보관하는 것이 훨씬 안정하였다. 하루가 경과함에 따라 5% 정도의 활성이 손실되므로 향후 실험에는 효소원을 즉시 조제하여 사용하였다.

***S. aureus* SA2에 존재하는 CAT의 특성과 석창포 E4 분획의 영향**

*S. aureus*에서 CAT은 Cm에 의한 유도 효소로 알려져 있으므로 *S. aureus* SA2가 생산하는 CAT의 유도 여부를 검토한 결과는 Table II에 나타난 바와 같다. 즉 Cm이 없는 TSB에서 배양한 균을 Cm이 50 μ g/ml의 농도로 들어있는 TSB에서 배양하면

Table I – Stabilities of CAT in *S. aureus* SA2 on storage temperature and time

Form of sample	Storage temp. (°C)	% CAT activity on days after isolation*						
		0	1	2	3	4	5	
Cell pellet	-20	100	94.7	90.5	80.0	74.7	55.8	
CAT isolated	4	100	89.9	86.9	74.7	61.1	53.1	
CAT isolated	-20	100	94.7	91.6	82.1	73.7	57.9	

*Incubation was carried out for five hrs at 37°C in presence of 50 μ g of Cm/ml of liquid medium and activity was measured spectrophotometrically at 412 nm. Ratio (%) were compared with that of day 0.

Table II – CAT induction of *S. aureus* SA2 by chloramphenicol according to the growth

O. D. ²⁾ of incubate	CAT activity ¹⁾ (nmol/min/ 10^9 cells)
0.10	10.06
1.12	12.62
2.88	8.56
3.96	7.41

¹⁾Incubation was carried out as footnote of Table I.

²⁾Optical density at 412 nm according to Ellman (Reference 18). Differences in O. D. were due to the time of incubation. O. D. of 1.07×10^9 cells/ml was nearly 1.0.

Table III – Variation of CAT activity in the presence of E4 fraction of *Acori graminei* Rhizoma

E4 fraction ($\mu\text{g/ml}$)	O. D. ²⁾	CAT Activity ¹⁾ (nmol/min/ 10^9 cells)	No. of <i>S. aureus</i> SA2 represented by O. D. ²⁾
0	3.52	8.82	3.90
100	4.12	7.94	4.58
200	4.42	6.26	4.78
400	4.52	4.68	4.80

¹⁾Incubation for two hrs in presence of various concentration of E4 fraction.

²⁾O. D. of the initial 1.07×10^9 cells/ml was adjusted to 1.0.

서 시간에 따라 CAT의 활성을 측정하였다. 4시간이 경과한 후 흡광도 0.097에서 이미 높은 활성을 보였으며 1.1 부근에서는 조금 증가한 활성을 보이고 2.88, 3.96에서는 활성이 점차 감소하였다. 이것으로 보아 Cm에 의하여 CAT 활성을 유도되며 또한 세균의 성장률이 둔화되면서 CAT 활성도 감소함을 알 수 있었다. 이것은 Cm의 농도가 감소함에 기인하는 것으로 사료된다.

한편 TSB(Cm, 50 $\mu\text{g/ml}$ 포함)에서 배양한 *S. aureus* SA2를 여러 농도의 E4 분획을 함유한 TSB(Cm, 50 $\mu\text{g/ml}$ 포함)에서 37°C로 2시간 배양한 다음 흡광도와 CAT 활성을 검토한 결과는 Table III에 나타난 바와 같다. E4 분획의 농도가 증가함에 따라 CAT의 활성을 감소하였으나 예상과는 달리 흡광도는 오히려 증가하였다. *S. aureus* SA2의 성장 정도를 배지의 흡광도로 측정 한 실험에서도 같은 결과가 나왔으며 이것은 E4 분획 속에는 내성균의 성장을 촉진하는 물질과 CAT의 활성을 억제하는 물질이 섞여 있음을 의미한다. 따라서 이것은 내성균 성장억제물질인 acorenone 외에 다른 성분을 함께 함유한 분획이나 총추출물을

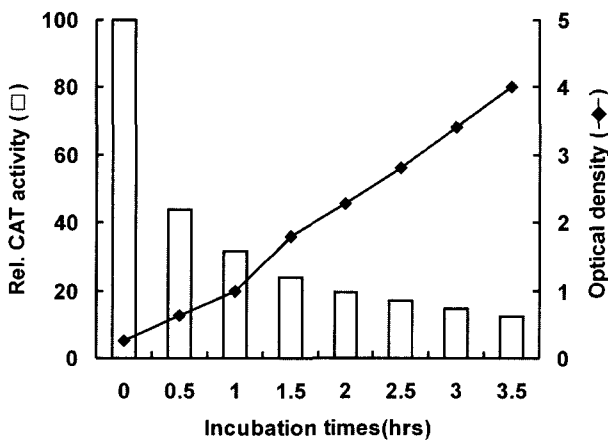


Fig. 1 – Reduction of CAT activities during incubation. Cells which were incubated for one night in presence of Cm (50 $\mu\text{g/ml}$) were incubated again in the medium without Cm and CAT activity was measured spectrophotometrically at 412 nm at an interval of 30 mins. Relative activities were obtained from initial (0 time) activity as 100 and initial O. D. was adjusted to 1.0. For detail refer to the footnotes of previous Tables.

대상으로 내성억제를 검색하는데 있어서, 성장억제 현상뿐만 아니라 활성물질을 검색하는 것은 활성성분을 농축 가능성이 있음을 말해준다.

CAT 활성의 경시변화

S. aureus SA2를 TSB 배지에서 배양할 때 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 Cm이 있는 경우와 없는 경우, 시간에 따른 CAT 활성의 변화를 측정하면 Fig. 1에 나타난 바와 같은 결과를 얻을 수 있었다. Cm을 함유한 경우 30분 안에 50% 이상의 활성이 감소하였으며 시간에 따라 활성의 감소 정도는 커졌다. *S. aureus* SA2는 Cm이 없는 배지에서 배양했을 때 0.71 nmol/min/ 10^9 cells의 CAT 활성을 가지고 있었다. 이러한 결과에서 *S. aureus* SA2가 생성한 CAT는 전형적인 유도효소임을 알 수 있다.

E4 분획과 Cm의 병용효과

TSB(Cm, 50 $\mu\text{g/ml}$ 포함)에서 배양한 *S. aureus* SA2를 초기 균수 2×10^6 cells/ml, Cm 32 $\mu\text{g/ml}$, 그리고 여러 농도의 E4 분획이 들어있는 TSB에서 4시간 동안 배양하여 흡광도와 CAT 활성을 조사하였다. E4 분획의 농도 증가에 따라 성장은 억제되었으나 CAT 활성은 거의 비슷하게 나타났다(Table IV). 이것은 균이 이미 CAT를 가지고 있는 경우 E4 분획의 첨가에 의해서 성장이 느려지지만 E4 분획의 양이 충분치 않을 경우 다시 성장할 가능성을 말해준다.

한편 Cm이 없는 배지에서 배양한 *S. aureus* SA2(균의 초기 농도: 5×10^4 cells/ml)와 Cm(50 $\mu\text{g/ml}$)이 함유된 배지에서 배양

Table IV – Effect of the combination of E4 and Cm on CAT activity*

E4 fraction ($\mu\text{g/ml}$)	O. D.	CAT activity (nmol/min/ 10^9 cells)
0	2.78	8.74
100	2.58	8.47
200	2.04	9.26
400	0.60	9.09

*Cm (50 $\mu\text{g/ml}$) was combined with various concentration of E4 fraction and incubated in TSB media containing 5×10^4 /ml of *S. aureus* SA2. For O. D. refer to the footnote of Table III.

Table V – Effect of E4 on growth of *S. aureus* SA2

E4 ($\mu\text{g/ml}$)	Growth after 12 hours*	
	Cm free	with Cm (50 $\mu\text{g/ml}$)
10	+	+
25	-	+
50	-	+
75	-	-
100	-	-
150	-	-
200	-	-

*Initial number of *S. aureus* SA2: 5×10^4 /ml.

+, full growth and -, no growth.

한 *S. aureus* SA2에 대하여 다시 E4 분획의 효과를 비교하였다 (Table V). 두 균주를 별도로 사용하여 12시간 배양한 결과 Cm(50 µg/ml)이 함유된 배지에서 배양한 *S. aureus* SA2의 성장을 억제하는데는 높은 농도의 E4 분획이 필요함을 알 수 있다.

결 론

이상과 같이 석창포의 E4 분획은 acorenone과 같은 강력한 내성억제 성분으로 인해 내성억제 경향도 있으나 한편으로 내성균의 성장을 촉진하는 경향도 있으므로 내성균의 성장 억제 여부 보다는 target enzyme인 CAT의 동태에 미치는 영향을 파악하는 것이 내성 기전을 밝히는데 중요하며, 임상적으로 Cm의 효능을 증대시키기 위하여서는 감염균의 Cm 내성 획득여부를 확인 후 Cm과 E4 분획의 성분을 복합적으로 사용하는 것이 효과적일 것으로 생각되며, 이 분획의 대부분을 차지하는 acorenone을 순수 분리하여 효과를 측정해 보면 더욱 강한 활성을 보일 것으로 판단된다.

감사의 말씀

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R05-2000-000-00197-0)지원으로 수행된 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

문 헌

- Parker, M. T., Asheshov, E. H., Hewitt, J. H., Nakhla, L. S. and Brock, B. M. : Endemic staphylococcal infections in *Staphylococcus aureus*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **236**, 466 (1974).
- Parker, M. T. : The significance of phage-typing patterns in *Staphylococcus aureus*. *Staphylococci and staphylococcal infections. Clinical and Epidemiological Aspects.* **1**, 33 (1983).
- Rountree, P. M. : History of staphylococcal infection in Australia. *Med. J. Aust.* **2**, 543 (1978).
- Bulger, R. and Sherris, J. C. : Decreased incidence of antibiotic resistance among *Staphylococcus aureus*. *Ann. Intern. Med.* **69**, 1099 (1968).
- Baird-Parker, A. C. : Classification and identification of staphylococci and their resistance to physical agents. *The Staphylococci*, 1 (1972).
- Oeding, P. : Taxonomy and identification. *Staphylococci and staphylococcal infections. Clinical and Epidemiological Aspects.* **1**, 1 (1983).
- Shaw, W. V. : Chloramphenicol acetyltransferase: enzymology and molecular biology. *Crit. Rev. Biochem.* **14**, 1 (1983).
- Sands, L. C. and Shaw, W. V. : Mechanism of chloramphenicol resistance in staphylococci: characterization and hybridization of variants of chloramphenicol acetyltransferase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **3**, 299 (1973).
- Shaw, W. V. : Bacterial resistance to chloramphenicol. *Br. Med. Bull.* **40**, 36 (1984).
- Kim, H. K., Park, S. W., Park, J. N., Moon, K. H. and Lee, C. K. : Screening and isolation of antibiotic resistance inhibitors from herb materials. I. - Resistance inhibition of 21 Korean plants. *Natural Product Sciences* **1**(1), 50 (1995).
- Park, J. N., Kim, H. K., Moon, K. H. and Lee, C. K. : Screening and isolation of antibiotics resistance inhibitors from herb materials. II. - Inhibitory effects of 'Chwinamool' (*Aster scaber*), *Kor. J. Pharmacogn.* **28**(3), 162 (1997).
- Lee, C. K., Kim, H. K., Moon, K. H. and Shin, K. H. : Screening and isolation of antibiotic resistance inhibitors from herb materials. III. - Resistance inhibition of volatile components of Korean aromatic herbs, *Arch. Pharm. Res.* **21**(1), 62 (1998).
- Kim, H. K., Moon, K. H., Ryu, S. Y., Moon, D. C. and Lee, C. K. : Screening and isolation of antibiotic resistance inhibitors from herb materials. IV. - Resistance inhibitors from *Anethum graveolens* and *Acorus gramineus*. *Arch. Pharm. Res.* **21**(1), 62 (1998).
- Kim, H.-K., Moon, K. H. and Lee, C. K. : Screening and isolation of antibiotics resistance inhibitors from herb materials. V. - Resistance inhibition by acorenone from *Acorus gramineus* Solander. *Nat. Prod. Sci.* **6**(1), 36 (2000).
- Moon, K. H., Kwon, J. Y., Kim, H.-K., Bong, S. S. and Chung, K. L. : Effect of hexane extract of *Acori graminei* Rhizoma on the growth of chloramphenicol resistant bacteria. *Nat. Prod. Sci.* **9**(3), 183 (2003).
- Kang, J. S. and Moon, K. H. : Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolated in Pusan. *Yakhak Hoeji* **34**, 122 (1990).
- Kim, K. H., Lee, D. W. and Moon, K. H. : Characterization of antibiotic resistant plasmid of *Staphylococcus aureus*. *Yakhak Hoeji* **36**, 486 (1992).
- Ellman, G. L. : Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **82**, 70 (1959).