대한한방부인과학회지
THE JOURNAL OF ORIENTAL OBSTETRICS & GYNECOLOGY
VOL.24 NO.2 : 001-012 (2011)

淸帶湯의 Gardnerella vaginalis에 대한 시험관내 항균력 및 Clindamycin과의 병용 효과

대구한의대학교 한의과대학 부인과 교실
권지명, 김동철

ABSTRACT

Antibacterial Effects of *Chungdae-tang* Aqueous Extracts, and Their Combination Effects with Clindamycin against Gardnerella vaginalis In Vitro

Ji-Myung Kwon, Dong-Chul Kim
Dept. of Oriental Obstetrics & Gynecology, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University

Objectives: The object of this study was to observe the in vitro antibacterial effects of *Chungdae-tang* aqueous extracts, traditionally used for treating various gynecological diseases including vaginitis in Korea against Gardnerella vaginalis, and combination effects of *Chungdae-tang* extracts with Clindamycin were also monitored in this study.

Methods: Antibacterial activities against Gardnerella vaginalis of *Chungdae-tang* aqueous extracts were detected using standard agar microdilution methods. In addition, the effects on the bacterial growth curve were also monitored at MIC and MIC×2 levels. The combination effects of *Chungdae-tang* aqueous extracts with Clindamycin were observed by Checkerboard microtiter assay, and the effects of bacterial growth curve treated with or *Chungdae-tang* aqueous extracts MIC+Clindamycin MIC, 1/2MIC and 1/4MIC, respectively. In the present study, Gardnerella vaginalis were incubated under 37℃, 10% CO_2; and bacterial growth curves were calculated at 24, 48, 72, 96 and 120hrs after incubations.

Results: MIC of *Chungdae-tang* aqueous extracts against Gardnerella vaginalis were detected as 3.906±2.344(0.782~6.250) mg/㎖, respectively. MIC of Clindamycin was detected as 0.010±0.006(0.004~0.016) μg/㎖ at same conditions. In addition, Clindamycin and *Chungdae-tang* aqueous extracts also showed marked dosage-dependent inhibition of bacterial growth, and more dramatical inhibitions were detected in Clindamycin+*Chungdae-tang* aqueous extracts MIC treatment as compared with each of single Clindamycin MIC and *Chungdae-tang* aqueous extracts MIC treatments, respectively. In addition, quite similar inhibitory effects on bacterial growth were detected in Clindamycin 1/4 MIC+*Chungdae-tang* aqueous extracts MIC treatment as compared with single Clindamycin MIC treatment in the present study. FIC index in combination of *Chungdae-tang* and Clindamycin were detected as 0.775±0.285 (0.500~1.250) at Checkerboard microtiter assay.

Conclusions: The results obtained in this study suggest that *Chungdae-tang* aqueous extracts showed antibacterial effects against Gardnerella vaginalis, and it also showed dosage-dependent inhibitory effects on the bacterial growth. In addition, combination treatment of *Chungdae-tang* aqueous extract with Clindamycin showed more potent inhibitory effects on the growth of Gardnerella vaginalis with FIC index 0.775±0.285(0.500~1.250), respectively. It means, the combination of *Chungdae-tang* aqueous extract with Clindamycin is partially synergistic effects. It, therefore, is expected that effective dosages of Clindamycin will be reduced to 1/4 or over 1/4 levels as combination with *Chungdae-tang* extracts, respectively.

Key Words: Gardnerella vaginalis, *Chungdae-tang*, Clindamycin, MIC, synergistic effects

교신저자(김동철) : 경북 포항시 남구 대잠동 907-8번지 대구한의대 부속 포항한방병원
전화 : 054-271-8002 이메일 : kdc072@dhu.ac.kr

Ⅰ. 서 론

질감염은 원인에 따라 세균성, 진균성, 원충성 및 바이러스성으로 구분하며, 세균성 질감염의 주요 원인균인 Gardnerella vaginalis는 그람 양성 또는 그람 다양성의 비운동성 혐기성 간균이다[1].

세균성 질증은 비염증성으로 질내의 정상세균총인 Lactobacillus가 질내에서 Gardnerella vaginalis, 혐기성균, Mycoplasma hominis 등으로 대치되는 특징을 나타내며, 세균성 질증을 나타내는 여성 중 98% 이상에서 Gardnerella vaginalis가 발견되고 있어[1] 이 세균에 대한 항균활성 연구의 중요성이 대두되고 있다[2].

세균성 질증의 치료는 Metronidazole과 Clindamycin을 질내 주입하거나 경구로 투여하는 방법을 주로 사용하는데[3] 내성과 부작용, 지속적인 재발성 등으로 인해 보다 효과적이고 안전한 치료법이 절실한 실정이다[2].

한의학에서 질염은 帶下, 陰痒 등의 범주에 속하며[4], 발현되는 증상에 의거하여 陰部搔痒, 陰門搔痒, 陰蠶, 陰蝕으로 표현된다[5].

淸帶湯[6]은 龍膽瀉肝湯[7]의 변방으로 急性實證性濕熱帶下, 자궁염, 외음염, 소변불리 등에 쓰이는 처방이다. 기존 연구에서는 龍膽瀉肝湯의 항염작용에 대한 연구[8,9]가 있으나 세균성 질염에 대한 본격적인 연구는 아직 보고된바 없다.

이에 본 연구에서는 淸帶湯의 Gardnerella vaginalis 에 대한 항균활성도(Minimal Inhibition Concentration; MIC)를 평가하고, 시간대별 균생장 곡선과 Checkerboard microtiter assay[10]법으로 Clindamycin과 淸帶湯의 병용효과를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 재 료

1) 약 재

본 실험에 사용된 약재는 효성약업사(대구, 한국)에서 구입하고 엄선하여 사용하였다.

2) 시약 및 기기

본 실험에 배지 및 시약으로 사용된 Brain Heart Infusion(BHI)과 말 혈청(heat inactivated horse serum)은 Difco, MI, USA에서, agar는 Junsei, Japan에서 구입하였고, 대조약물인 Clindamycin 및 이외 시약은 Aldrich-Sigma, MO, USA에서 구입하여 사용하였다.

실험에 사용한 기기는 96 well microtiter plate (Greiner, Frickenhausen, Germany), rotary vacuum evaporator (N-N type; LAB Camp, Dajeon, Korea), programmable freeze dryer (PVTFD10A; Ilshin Lab., Seoul, Korea), spectrophotometer (Milton Roy Spectronic 20D; Milton Roy Company, PA, USA) 등을 사용하였다.

Table 1. Composition of *Chungdae-tang* Used in This Study

學 名	藥物名	重 量(g)
Gentiana scabra var. buergeri	草龍膽	8
Akebia quinata Decne	木 通	6
Alisma canaliculatum A.Br. & Bouche	澤 瀉	6
Poria cocos Wolf	赤茯苓	6
Bupleurum falcatum L.	柴 胡	6
Rehmannia glutinosa (Gaertn.) LIBOSCH.	生地黃	4
Angelica gigas Nakai	當 歸	4
Plantago asiatica L.	車前子	4
Citrus unshiu MARKOVICH	靑 皮	4
Scutellaria baicalensis GEORGI	黃芩(炒)	4
Gardenia jasminoides for grandiflora MAKINO	山梔子(炒)	2
Glycyrrhiza uralensis FISCH	炙甘草	2
Total : 12 types		56

2. 방 법

1) 실험액 제조

본 실험에 사용된 1첩 분량의 조성은 Table 1과 같다. 선정된 약재 각 1첩 분량 56 g을 취하여, 정제수 560 ml로 가열 추출한 후, 흡인 여과한 여과액을 rotary vacuum으로 감압·농축하여 점조성의 추출물을 얻은 다음 programmable freeze dryer 를 사용하여 동결 건조시켜, 진갈색의 淸帶湯 추출물 12.47 g (수율 : 22.27%)을 얻어 실험에 사용하였다. 준비한 淸帶湯 추출물은 -20 ℃의 냉장고에 보관 후 실험에 사용하였으며, 구입한 Clindamycin은 4 ℃의 냉장고에 보관한 후 사용하였다. 淸帶湯 추출물은 사용한 용매인 증류수에 25 mg/ml의 농도까지 비교적 잘 용해되었고, Clindamycin은 0.128 μg/ml까지 비교적 잘 용해되었다.

2) 균주 및 배지

Gardnerella vaginalis ATCC14018는 (American Type Culture Collection Center, VA, USA)에서 동결건조 상태로 구입하여 modified BHI 배지에 녹인 후 modified BHI agar에 2~3회 계대배양한 후 사용하였다. Modified BHI media는 김 등의 방법[2]에 따라, 3.7%의 BHI powder와 20%말의 혈청을 포함하며, 10% NaOH로 최종 pH를 7.4로 설정하였다. 이때 열처리된 말의 혈청은 BHI 용액과 별도로 멸균하여 혼합하였다. Modified BHI agar는 상기한 Modified BHI media 이외에 1.5% agar를 추가하여 제조한 후 87×15 mm의 조직배양접시에 평판배지로 만들어 사용직전까지 냉장 보관 후 사용하였다.

3) 균 수의 측정

정확한 흡광도(OD)와 세균수의 상관관계를 알아보기 위하여 정량 평판법(Quantitative Plating Methods, Standard Plate Count)을 이용하여 균수를 측정하였다[11]. Gardnerella vaginalis를 spectrophotometer를 이용하여, 600 nm에서의 흡광도를 Mcfarland 0.5 standard와 같은 탁도로 조정한 다음 균액을 10, 100, 1000 및 10000배로 단계 희석하여 균의 농도가 1×10^4 CFU/ml이 되도록 만들어 modified BHI agar에

접종하여, 37℃, 10% CO_2조건에서 24시간 배양한 다음 조직배양접시에 형성된 집락수를 희석된 순서대로 OD와 비교하였다. 0.5 Mcfarland standard 탁도는 1.175% barium chloride dihydrate ($BaCl_2$ $2H_2O$)0.05 ml과 1% sulfuric acid (H_2SO_4) 9.95 ml을 혼합하여 준비하였다[12].

4) 항균활성도(MIC) 측정

淸帶湯 추출물의 Gardnerella vaginalis에 대한 최소저지농도(MIC)를 표준 액체배지 희석법[13]을 이용하여 측정하였다. 즉, 淸帶湯 추출물을 25 mg/ml의 농도로 멸균증류수에 용해시킨 다음 계단식으로 배수 희석하여, 12.5, 6.25, 3.125, 1.563, 0.782, 0.391, 0.195, 0.098 및 0 mg/ml의 총 10가지 농도를 준비하고, 각각 멸균된 96 well plate에 100 ㎕씩 분주한 다음, Gardnerella vaginalis의 단일집락을 modified BHI 액체배지에 접종한 지 48 시간 후 OD600을 spectrophotometer로 측정하여, 2×10^6cell이 들어가도록 준비한 cell suspension 100 ㎕를 분주하였다. 이후 37℃, 10% CO_2조건에서 48시간 배양하였다. Clindamycin 역시 0.128 μg/ml의 농도로 멸균증류수에 용해시킨 다음 계단식으로 배수 희석하여, 0.064, 0.032, 0.016, 0.008, 0.004, 0.002, 0.001, 0.0005 및 0 μg/ml의 총 10 가지 농도를 준비하고 동일한 방법으로 cell suspension (2×10^6cell)을 첨가한 다음 48시간 동안 37 ℃, 10% CO_2조건하에 배양하였다. Pfaller 등[14]의 방법에 따라 MIC는 각각의 growth control well과 시료가 함유된 well의 Gardnerella vaginalis의 생장을 육안적으로비교 관찰하여 균의 생장억제가 나타나는 최소농도로 결정하였다. 모든 실험은 5회 반복하였다.

5) 시간별 Gardnerella vaginalis 생장곡선

각각 단일 물질의 균 생장 저해능을 평가하기 위해 Janssen 등[15]의 방법에 따라 Modified BHI 액체 배지에 Gardnerella vaginalis를 접종한 후 OD600을 spectrophotometer로 측정하여 Mcfarland 0.5 standard (1.5×10^8CFU/ml)로 각 균의 탁도를 조절한 다음 100배 희석하였다. 淸帶湯 (3.906 및 7.812 mg/ml) 추출물 및 Clindamycin (0.01 및 0.02 μg/ml)을 각각 MIC 및 MIC×2 농도로 준비한 cell suspension과 혼합한 다음 37℃, 10% CO_2조건하에 배양하면서 24, 48, 72, 96 및 120시간마다 OD를 측정하여, 시료를 첨가하지 않은 각각의 대조군과 균의 생장과 실험군에서의 균 생장 억제를 비교하였다. 모든 실험은 5회 반복하였다.

Clindamycin과 淸帶湯 추출물의 균 생장에 미치는 병용효과를 평가하기 위해 동일한 방법으로 준비된 cell suspension에 Clindamycin MIC (0.01 μg/ml), 淸帶湯 추출물 MIC (3.906 mg/ml), Clindamycin MIC + 淸帶湯 추출물 MIC, Clindamycin 1/2 MIC (0.005 μg/ml) + 淸帶湯 추출물 MIC 및 Clindamycin 1/4 MIC (0.0025 μg/ml) + 淸帶湯 추출물 MIC농도를 첨가한 다음 37℃, 10% CO_2조건하에 배양하면서 24, 48, 72, 96 및 120 시간 마다 OD를 측정하여, 시료를 첨가하지 않은 각각의 대조군과 균의 생장과 실험군에서의 균 생장 억제를 비교하였다. 모든 실험은 5회 반복하였다.

6) Checkerboard Microtiter Assay

Checkerboard microtiter assay[10]법을 이용해 淸帶湯 추출물과 Clindamycin의 병용에 따른 효과를 관찰하였다. Checkerboard 검사는 96 well microtiter plate에 modified

BHI 배지에 혼합된 균 액 140 ㎕와 시험할 두 가지 물질을 30 ㎕씩 각각 첨가하였고, 균 액은 0.5 Mcfarland 탁도의 균 액을 희석하여, 최종 농도가 2×10^6CFU/ml이 되게 하였다. 각 항균제 농도는 MIC의 0.06배부터 4배정도 에서 2배씩 희석해, 96 well plate에 직각으로 분주하여, 100가지의 다양한 농도 조합이 이루어지도록 하였다. 이후 37℃, 10% CO_2조건하에 48 시간 배양한 후 각 well의 균생장을 육안적으로 판독하였다. 병합효과는 윤정숙 등[10]의방법에 따라 Fractional inhibitory concentration(FIC) index를 다음과 같이 계산하여 평가하였다.

FIC A = (MIC of Drug A in combination) / (MIC of Drug A alone)

FIC B = (MIC of Drug B in combination) / (MIC of Drug B alone)

FIC index = FIC A + FIC B

[Dug A = Clindamycin; Drug B = Chungdae-tang aqueous extracts]

판독은 FIC index 0.5이하일 경우 상승, 0.5에서 1사이일 경우 부분상승, 1에서 4사이일 경우 무관, 4이상일 경우 길항으로 해석하였다[10]. 모든 실험은 5회 반복하였다.

7) 통계처리

모든 수치는 5회 반복실험의 평균±표준편차로 표시하였으며, 균생장 곡선에 미치는 영향은 다중비교검증을 이용하여 통계처리를 실시하였고, 분산동질성을 Levene test를 실시하여 검증하였다. 등분산일 경우 one way ANOVA test를 실시한 다음 least-significant differences test로 사후 검증을 실시하여 군 간의 유의성을 측정하였다. 비등분산일 경우에는 비모수 검증인 Kruskal-Wallis H test를 실시하여 유의성이 인정된 경우에는 Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank Sum W를 실시하여 군 간의 유의성을 검증하였다. 모든 통계처리는 SPSS for Windows(Release 14.0K, SPSS Inc., USA)를 이용하였으며, p-value가 0.05 이하인 경우 통계적 유의성을 인정하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 항균 활성도(MIC)

Clindamycin과 淸帶湯 추출물의 Gardnerella vaginalis에 대한 MIC를 평가한 결과 淸帶湯 추출물의 MIC는 3.906 ±2.344 mg/ml이었고 Clindamycin은 0.01 ±0.006 μg/ml로 관찰되었다(Table 2).

Table 2. MIC against Gardnerella vaginalis Detected in This Study by Agar Microdilution Method

Test materials	MIC	Ranges
Chungdae-tang extracts(mg/ml)	3.906 ±2.344	0.782 ~6.250
Clindamycin (μg/ml)	0.010 ±0.006	0.004 ~0.016

2. 시간대별 Gardnerella vaginalis의 생장곡선

1) 淸帶湯 추출물의 효과

배양 24시간 후부터 대조군에 비해 유의성 있는($p<0.01$) 용량 의존적인 균 수의 감소가 각각 인정되었다(Fig. 1).

대조군의 균 수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 105.80±10.28, 124.00±6.67, 136.40±7.99, 145.20±11.73 및 156.40±8.11 $\times10^5$CFU/ml로 관찰되었다.

淸帶湯 추출물 MIC 농도 처리군의 균 수는 각각 85.80±6.72, 93.40±6.19, 101.00

±11.02, 109.60±10.67 및 114.20±13.99×10^5 CFU/ml로 관찰되었다.

淸帶湯 추출물 MIC×2농도 처리군의 균 수는 각각 68.20±8.58, 85.20±22.12, 92.80±17.38, 100.00±18.89 및 107.00±19.39×10^5 CFU/ml로 관찰되었다.

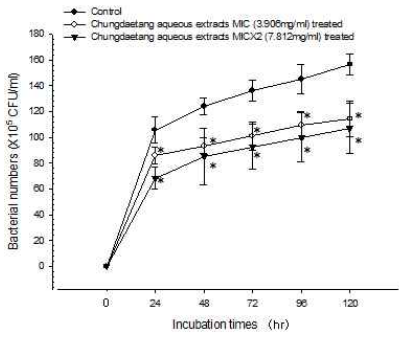

Fig. 1. Effects of *Chungdae-tang* Aqueous Extracts on the Growth of Gardnerella Vaginalis with Incubation Times(*p<0.01).

2) Clindamycin의 효과

배양 24시간 후부터 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 처리 용량 의존적인 균 수의 감소가 각각 인정되었다(Fig. 2).

대조군의 균 수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 각각 106.80±13.05, 121.00±10.32, 132.60±12.10, 141.40±10.24 및 151.00±13.10×10^5CFU/ml로 관찰되었다.

Clindamycin MIC 농도 처리군의 균 수는 각각 65.40±4.51, 73.40±14.33, 83.20±12.34, 91.40±14.71 및 98.40±16.95×10^5 CFU/ml로 관찰되었다.

Clindamycin MIC×2농도 처리군의 균 수는 각각 58.80±5.12, 63.80±5.89, 71.20±10.50, 80.00±12.86 및 85.40±12.68×10^5 CFU/ml로 관찰되었다.

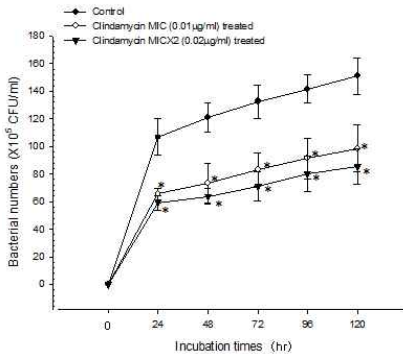

Fig. 2. Effects of Clindamycin on the Growth of Gardnerella Vaginalis with Incubation Times(*p<0.01).

3) Clindamycin과 淸帶湯 추출물의 병용 효과

배양 24시간 후부터 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 처리 용량 의존적인 균 수의 감소가 모든 실험군에서 인정되었다(Fig. 3).

특히 Clindamycin 1/4 MIC + 淸帶湯 추출물 MIC 농도 처리군에서는 Clindamycin MIC 농도 처리군과 유사한 시간대별 균 생장저해 효과를 나타냈다.

대조군의 균 수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 각각 109.40±5.86, 121.40±9.07, 132.80±9.83, 139.00±13.19 및 148.20±12.99×10^5CFU/ml로 관찰되었다.

Clindamycin 단독 MIC 농도 처리군의 균 수는 각각 65.00±8.63, 70.80±11.43, 77.40±13.72, 86.80±9.76 및 94.40±11.41×10^5 CFU/ml로 관찰되었다.

淸帶湯 추출물 단독 MIC 농도 처리군의 균 수는 각각 85.40±9.91, 94.60±9.15, 103.40±12.22, 108.20±14.82 및 116.20±15.69×10^5CFU/ml로 관찰되었다.

Clindamycin MIC + 淸帶湯 추출물 MIC 농도 처리군의 균 수는 각각 31.20±6.18, 35.80±5.76, 47.00±12.06, 50.60±12.72 및 54.40±14.22×10^5CFU/ml로 관찰되었다.

Clindamycin 1/2 MIC + 淸帶湯 추출물 MIC 농도 처리군의 균 수는 각각 45.20 ±6.22, 51.40±4.93, 59.20±8.23, 68.40±10.26 및 78.80±7.98×10^5CFU/ml로 관찰되었다.

Clindamycin 1/4 MIC + 淸帶湯 추출물 MIC 농도 처리군의 균 수는 각각 63.80 ±8.67, 72.20±7.05, 78.60±8.20, 85.40±11.50 및 96.00±12.08×10^5CFU/ml로 관찰되었다.

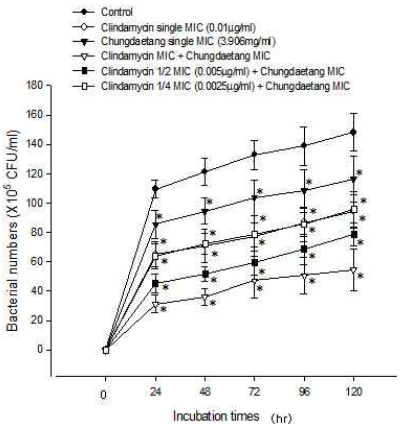

Fig. 3. Effects of *Chungdae-tang* Aqueous Extracts and Clindamycin Combinationon the Growth of Gardnerella Vaginalis with Incubation Times(*p<0.01).

3. Checkerboard microtiter assay에 의한 병용효과

Checkerboard microtiter assay법을 이용한 淸帶湯 추출물과 Clindamycin의 병용에 따른 효과를 관찰하였다.

Gardnerella vaginalis에 대해 Clindamycin 단독 처리 시 MIC는 0.0120±0.0057 μg/ml였으나, 淸帶湯 추출물과 병용 처리 시 0.0045±0.0034 μg/ml으로 낮아졌다. 淸帶湯 추출물 단독 처리 시 MIC는 3.750±2.369 mg/ml였으나, Clindamycin과 병용 시 1.329±0.524 mg/ml로 낮아졌다. 따라서 FIC index는 0.775±0.285로 나와 부분 상승작용이 있는 것으로 나타났다(Table 3).

Table 3. Activity of Clindamycin and *Chungdae-tang* Combination on Gardnerella Vaginalis by Checkerboard Microtiter Assay

Test materials	Single treatment		Combination treatment		FIC index	
	MIC	Range	MIC	Range	FIC	Range
Chungdae-tang extracts(mg/ml)	3.750 ±2.369	1.563 ~6.250	1.329 ±0.524	0.391 ~1.563	0.775 ±0.285	0.500 ~1.250
Clindamycin (μg/ml)	0.0120 ±0.0057	0.0040 ~0.0160	0.0045 ±0.0034	0.0005 ~0.0080		

Ⅳ. 고 찰

세균성 질증은 유산을 생성하는 유산간균의 수가 감소하면서 질의 pH가 4.5 이상으로 증가하고, 질 상피세포 중 clue cell이 20% 이상을 차지하며, 균질한 백색 질 분비물이 출현하는 것이 특징이다. 또한 저체중 조숙아 출산을 2배로 증가시키고[15] human immunodeficiency virus (HIV)의 감염율을 증가시키기도 하며[16] 양막염, 제왕절개술 후 자궁내막염, 유산 후 골반염, 자궁적출술 후 봉와직염 등의 발생 빈도를 증가시키는 것으로 알려져 있다[17].

세균성 질증에 대한 내복·외용약은

많이 알려져 있으나, 내복약의 다양한 부작용과 지속적인 재발문제, 외용약에 의한 국부적인 pH의 변화나, 질내 정상 세균총의 교란 등과 같은 복합적인 문제로 인하여 아직까지 이상적인 치료제가 개발되지 않은 상태로써[18] 보다 효과적이고 안전한 치료제의 개발이 절실한 실정이다[2].

한의학에서 帶下의 병기는 주로 濕熱下注, 濕毒, 心肝火鬱, 濕熱下注, 脾腎陽虛, 肝腎陰虛 등으로 분류되고 있다[19]. 변증시치에 있어서는 濕熱或濕毒帶下에 龍膽瀉肝湯, 芩柏樗根丸, 脾虛帶下에 完帶湯, 腎陰虛帶下에 知柏地黃湯, 腎陽虛帶下에 內補丸, 鹿角兎絲子丸 등을 사용한다[19].

淸帶湯은 濕熱帶下에 사용되는 龍膽瀉肝湯 변방으로 세균성질염의 급성기에 적용할 수 있을 것으로 사료된다.

구성 약물 중 木通[20,21], 澤瀉[22,23], 當歸[24-26], 黃芩[27-29], 山梔子[30] 및 甘草[2,31-33] 등은 이미 항균효과가 입증된 바 있다.

Clindamycin은 lincosamide 계열 항생제로, 현재 좌창 과 일부 메치실린 내성 황색 포도상구균(MRSA, methicillin-resistant Staphylococcusaureus)감염증에 흔히 사용되고 있다[34]. 주로 감수성 있는 혐기성 세균에 의한 호흡기 감염, 패혈증 및 복막염에 작용되지만, penicillin에 과민반응을 나타내는 환자에서는 호기성 세균 감염증에도 종종 이용되고 있다[35]. 이외에도 toxic shock syndrome에도 적용되고 있으며[36], MRSA에 의한 피부 및 연부 조직 감염증[34], 세균증 질증[37], 바베시아증[38], 톡소플라스마증[39] 및 Pneumocystis jirovecii에 의한 폐렴[40]에도 이용되고 있다.

그러나 Clindamycin의 일반적인 부작용으로는 설사, 위막성 결장염, 오심, 구토, 복통, 복부 경련, 발진, 소양증, 금속성 풍미, 접촉성 피부염 등이 알려져 있으며[41], 특히 clindamycin에 내성을 나타내는 Clostridium difficile, 증식에 의한 설사, 결장염, 독성 거대 결장증이 문제시되고 있다[41,42]. 또한 일부 환자에서 anaphylaxis, blood dyscrasias, 다발성관절염, 황달 및 간 손상이 보고된 바 있다[41]. 근래에 들어 Clindamycin에 대해 Gardnerella vaginalis를 포함한 다양한 내성 균주의 출현이 문제시 되고 있어[43], 항생제의 과남용을 방지하고 항생제의 효력을 높일 수 있는 방법의 개발이 시급한 실정이다.

표준액체배지희석법에 의한 MIC 측정은 세균 및 다양한 감염증에 대한 후보물질의 항균활성을 측정하는 가장 기본적인 방법이다[2,10,11,13], Gardnerella vaginalis에 대한 Clindamycin의 MIC는10% CO_2 조건하에서 대략 0.004 μg/ml로 알려져 있으며[44], 질염 유래 병원성 Gardnerella vaginalis 임상분리균주에서는 대략 0.016~0.19 μg/ml으로 알려져 있다[45]. 본 실험의 결과에서도, 10% CO_2 조건하에서 0.010±0.006 μg/ml로 관찰되어, Muli, Altrichter 등의[44,45] 연구들과 유사한 항균활성이 인정되었다. 또한 淸帶湯 추출물의 MIC는 3.906±2.344 mg/ml로 관찰되어 Gardnerella vaginalis에 대해 비교적 우수한 항균력을 나타내었다.

시간대별 균생장 곡선에 미치는 영향 역시 세균 및 다양한 감염증에 대한 후보물질의 항균활성을 측정하는 가장 기본적인 방법이다[14]. 본 실험의 결과 Clindamycin, 淸帶湯 추출물은 MIC 및 MIC×2에서 각

각 처리 용량 의존적인 시간대별 균 생장 억제를 나타내었고, 淸帶湯과 Clindamycin 병용 처리 시 단독 처리군에 비해 우수한 균 생장 저해 효과가 인정되었고, 각각의 단독 처리군에 비해 현저히 우수한 시간대별 균 생장 억제 효과가 Clindamycin 1/2 MIC + 淸帶湯 추출물 MIC 농도 처리군에서 인정되었으며, Clindamycin 1/4 MIC + 淸帶湯 추출물 MIC 농도 처리군에서는 Clindamycin MIC 농도 처리군과 유사한 시간대별 균 생장저해 효과를 나타내어 Clindamycin 의 사용량을 1/4까지 줄일 수 있을 것으로 판단된다.

일반적으로 화학요법제인 항생제와 천연추출물의 병용 효과는 Checkerboard microtiter assay 법을 이용하여 평가되어 왔다[46]. 본 실험에서 淸帶湯 추출물과 Clindamycin의 병용에 따른 효과를 관찰한 결과 FIC index는 0.775±0.285 로 산출되어 淸帶湯 추출물과 Clindamycin은 부분 상승작용이 있는 것으로 생각된다.

이상의 실험 결과를 종합하면 淸帶湯 추출물은 Gardnerella vaginalis에 대해 항균력을 나타내었으며, 처리 용량 의존적인 시간대별 균 생장 억제효과를 보였고, Clindamycin과의 병용 시에는 각각의 단독 처리군보다 더욱 우수한 시간대별 균 생장 억제 효과와 부분상승작용을 나타내었다. 淸帶湯 추출물과 Clindamycin 병용시 FIC index가 0.775±0.285(0.500~1.250)로 산출되어 단독처리군보다 항균력이 더욱 상승하는 것으로 나타났다.

이상의 실험 결과로 淸帶湯 추출물은 Gardnerella vaginalis에 대해 비교적 우수한 항균력을 나타내었고, Clindamycin과의 병용 시 부분 상승작용이 있는 것으로 관찰되어 Clindamycin의 사용량을 대략 1/4 또는 그 이상 줄일 수 있을 것으로 기대되며 Clindamycin의 과남용에 따른 부작용 및 내성을 줄일 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

淸帶湯 추출물의 Gardnerella vaginalis에 대한 항균력과 Clindamycin과의 병용 효과를 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 淸帶湯 추출물은 Gardnerella vaginalis에 대해 비교적 우수한 항균력을 나타내었으며, 용량 의존적인 시간대별 균 생장 억제 효과를 보였다.
2. 淸帶湯 추출물은 Clindamycin과의 병용 시 각각의 단독 처리군보다 더욱 우수한 시간대별 균 생장 억제를 나타내었다.
3. 淸帶湯 추출물과 Clindamycin 병용 시 Checkerboard microtiter assay에서 FIC index가 0.775±0.285로 산출되어 부분 상승작용이 있는 것으로 관찰되었다.

□ 투 고 일 : 2011년 4월 30일
□ 심 사 일 : 2011년 5월 9일
□ 심사완료일 : 2011년 5월 11일

참고문헌

1. Aroutcheva AA et al. Gardnerella vaginalis isolated from patients with bacterial vaginosis and from patients

with healthy vaginal ecosystems. Clinical Infectious Disease. 2001;33 :1022-7.
2. 김연희, 이홍식. Gardnerella vaginalis에 대한 한약재의 항균활성. 한국미생물·생명공학회지. 2006;34:70-3.
3. 조성남. 질염. 대한산부인과학회 연수강좌. 2004;33:77-85.
4. 임성민, 이동녕, 김형준. 질염에 대한 가자, 차전자, 천궁, 포공영, 황금의 효과. 대한한방부인과학회지. 2004;17(4) :34-45.
5. 葛洪. 肘後備急方. 北京:人民衛生出版社. 1996:108.
6. 김영훈. 청강의감. 서울:성보사. 2001: 256, 379.
7. 鞠潤範 등. 方劑學. 서울:永林社. 2008: 193-5.
8. 윤상현, 나영설, 민병일. 龍膽瀉肝湯이 어성초에 의한 뇌졸중에 병발된 폐렴의 치험 3례. 경희의학. 1991;7(4):431-8.
9. Lee TY, Chang HH. Longdan Xiegan Tang has immunomodulatory effects on CD4+CD25+ T cells and attenuates pathological signs in MRL/lpr mice. Int J Mol Med. 2010;25(5):677-85.
10. 윤정숙, 문희원, 이미애. 다제내성 Pseudomonas aeruginosa 균주의 항균제 병합효과. 대한임상미생물학회지. 2006;9:1-6.
11. Pfaller MA et al. Standardized susceptibility testing of fluconazole: an international collaborative study. Antimicrob Agents Chemother. 1992; 36:1805-9.
12. Tenover FC et al. Characterization of staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin and other glycopeptides. J Clin Microbiol. 1998;36:1020-7.
13. Pfaller MA et al. Multicenter evaluation of four methods of yeast inoculum preparation. J Clin Microbiol. 1988; 26:1437-41.
14. Janssen AM, Scheffer JJ, Baerheim SA. Antimicrobial activity of essential oils: a 1976-86 literature review. Aspects of the test methods. Planta Med. 1987;53:395-8.
15. Hauth JC et al. Reduced incidence of preterm delivery with metronidazole and erythromycin in women with bacterial vaginosis. N Engl J Med. 1995;333:1732-6.
16. Mayaud R. Tackling bacterial vaginosis in developing countries. Lancet. 1997; 350:530-1.
17. Hillier SL. Clindamycin treatment of bacterial vaginosis. Rev Contemp Pharmacother. 1992;3:263-8.
18. Hay PE. Therapy of bacterial vaginosis. J Antimicrob Chemother. 1998;41:6-9.
19. 대한한방부인과학 편찬위원회. 한방여성의학. 서울:정담. 2002:267-9.
20. 한복진, 우상규, 신현경. 목통(Akebia quinata Decaisne)의 물추출물이 Clostridium perfringens 및 주요 장내미생물의 생육에 미치는 영향. 산업미생물학회지. 1995;23:633-40.
21. 김정균 등. 천연한약재 (목통, 삼릉, 치자) 추출물의 항산화효과 및 항균활성효과. 농업생명과학연구. 2003;37 :69-75.
22. 도정애. 택사의 항균 및 항진균 작용에 관한 연구. 생약학회지. 1996;27:378-82.

23. 서권일 등. 택사 추출물의 항균 및 항산화 효과. 생명과학회지. 2000;10:524-8.
24. 유시용 등. 당귀와 백지로부터 분리한 Coumarin계 물질들의 식물병원균에 대한 항균활성. 한국농약과학회지. 2001;5:26-35.
25. 윤경원, 최성규. 당귀속 2종 식물의 항균활성. 한국자원식물학회지. 2004;17:278-82.
26. Lee S et al. Antibacterial coumarins from Angelica gigas roots. Arch Pharm Res. 2003;26:449-52.
27. Yang D et al. Study on the inhibitory activity, invitro, of baicalein and baicalin against skin fungi and bacteria. ZhongYaoCai. 2000;23:272-4.
28. Yang ZC et al. The synergistic activity of antibiotics combined with eight traditional Chinese medicines against two different strains of Staphylococcus aureus. Colloids Surf B Biointerfaces. 2005;41:79-81.
29. Wu J, Hu D, Wang KX. Study of Scutellaria baicalensis and Baicalin against antimicrobial susceptibility of Helicobacter pylori strains in vitro. ZhongYaoCai. 2008;31:707-10.
30. 최철순 등. 치자(梔子) 수용성 추출액의 결핵균 외의 기타 Mycobacteria에 대한 항균작용. 大韓微生物學會誌. 1986;21:53-62.
31. Fukai T et al. Antimicrobial activity of licorice flavonoids against methicillin-resistant Staphylococcusaureus. Fitoterapia. 2002;73:536-9.
32. He J et al. Antibacterial compounds from Glycyrrhiza uralensis. J Nat Prod. 2006;69:121-4.
33. Yang C et al. Determination of glycyrrhizic acid in different decoctions of sanaotang by HPLC and comparison with antifugal effects in vitro. ZhongguoZhongYaoZaZhi. 2007;32:1031-4.
34. Daum RS. Clinical practice. Skin and soft-tissue infections caused by methicillin-resistant Staphylococcusaureus. N Engl J Med. 2007;357:380-90.
35. Darley ES, MacGowan AP. Antibiotic treatment of gram-positive bone and joint infections. J Antimicrob Chemother. 2004;53:928-35.
36. Russell. Clindamycin in the treatment of streptococcal and staphylococcal toxic shock syndromes. Ann Pharmacother. 2000;34:936-9.
37. Lamont RF. Can antibiotics prevent preterm birth--the pro and con debate. BJOG. 2005;112:67-73.
38. Homer MJ et al. Babesiosis. Clin Microbiol Rev. 2000;13:451-69.
39. Pleyer U, Torun N, Liesenfeld O. Ocular toxoplasmosis. Ophthalmologe. 2007;104:603-15.
40. Fishman JA. Treatment of infection due to Pneumocystis carinii. Antimicrob Agents Chemother. 1998;42:1309-14.
41. Rossi S. Australian Medicines Handbook Pty Ltd, Adelaide, 2006.
42. Starr J. Clostridium difficile associated diarrhoea:diagnosis and treatment. BMJ. 2005;331:498-501.
43. Pigrau C et al. Osteomyelitis of the jaw:resistance to clindamycin in

patients with prior antibiotics exposure. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009;28:317-23.

44. Muli F, Struthers JK. Use of a continuous-culture biofilm system to study the antimicrobial susceptibilities of Gardnerella vaginalis and Lactobacillus acidophilus. Antimicrob Agents Chemother. 1998;42:1428-32.

45. Altrichter T, Heizmann WR. Gardnerella vaginalis: transport, microscopy, testingresistance. Geburtshilfe Frauenheilkd. 1994;54:606-11.

46. Zhang L et al. High-throughput synergy screening identifies microbial metabolites as combination agents for the treatment of fungal infections. Proc Natl Acad Sci USA. 2007;104:4606-11.