

## 5종 단미제의 *Staphylococcus aureus*에 대한 in vitro 항균력 평가

대구한의대학교 한의과대학 부인과 교실  
박은영, 김동철

### ABSTRACT

#### A Study on Antibacterial Effects of Five Single Herbs Aqueous Extracts against *Staphylococcus aureus*

Eun-Young Park, Dong-Chul Kim

Dept. of Oriental Obstetric & Gynecology, College of Oriental Medicine,  
Daegu Haany University

**Objectives:** The object of this study was to observe the in vitro antibacterial effects of five single(Pulsatillae Radix, Patrinae Radix, Sanguisorbae Radix, Sophorae Flos, and Sophorae Radix) aqueous herbal extracts, traditionally used for treating various gynecological diseases including mastitis in Korea, against *Staphylococcus aureus*.

**Methods:** Antibacterial activities against *Staphylococcus aureus* of aqueous extracts of Pulsatillae Radix, Patrinae Radix, Sanguisorbae Radix, Sophorae Flos, and Sophorae Radix were detected using standard agar microdilution methods. In addition, the effects on the bacterial growth curve were also monitored at Minimal Incubation Concentration(MIC) and MIC $\times$ 2 levels. The effects on the intracellular killing and bacterial invasion of individual test materials were also observed using murine macrophage(Raw 264.7) and human mammary gland carcinoma cell(MCF-7).

**Results:** MIC of aqueous extracts of Pulsatillae Radix, Patrinae Radix, Sanguisorbae Radix, Sophorae Flos, and Sophorae Radix against *Staphylococcus aureus* were detected as 0.215 $\pm$ 0.107 mg/ml, 0.273 $\pm$ 0.107 mg/ml, 0.469 $\pm$ 0.297 mg/ml, 11.850 $\pm$ 8.406 mg/ml, and 0.664 $\pm$ 0.546 mg/ml, respectively. MIC of Ciprofloxacin was detected as 0.469 $\pm$ 0.297  $\mu$ g/ml at same conditions. In addition, all five single aqueous herbal extracts were also showed marked dosage-dependent inhibition of bacterial growth. The effects of intracellular killing with Raw 264.7 and inhibition of bacterial invasion with MCF-7 cells were detected, in the order of Sophorae Flos, Pulsatillae Radix, Patrinae Radix, Sanguisorbae Radix and Sophorae Radix aqueous extracts in the present study.

**Conclusions:** The results obtained in this study suggest that all five single aqueous herbal extracts showed antibacterial effects against *Staphylococcus aureus* and they also showed dosage-dependent inhibitory effects on the bacterial growth. They showed the significant intracellular killing and inhibition of bacterial invasion effects. It means, all five single aqueous herbal extracts may show potent anti-infectious effects against *Staphylococcus aureus* for mastitis.

**Key Words:** Pulsatillae Radix, Patrinae Radix, Sanguisorbae Radix, Sophorae Flos, Sophorae Root, Ciprofloxacin, *Staphylococcus aureus*, Antibacterial effect, Mastitis

## I. 서 론

유방염 및 유방농양은 어느 연령에서나 발생할 수 있으나, 수유기 여성에게서 자주 발생한다<sup>1)</sup>. 유방염은 74~95%가 산후 12주 이내에 나타나며 특히 산후 2~3주 이내에 다발하고, 유방농양은 산후 6주 이내에 다발한다<sup>1)</sup>.

유방염은 주로 임상 양상으로 진단하며, 국소적인 편측 유방의 발적 및 경도 증가, 통증이 나타난다. 또한 38.5℃ 이상의 발열, 불쾌감, 피로, 신체통 및 두통을 동반한다<sup>2)</sup>. 세균 배양은 정상 세균총의 존재 등으로 잘 이루어지지 않고 있으나<sup>1)</sup>, *Staphylococcus aureus*(*S. aureus*)는 Gram 양성기의 기회감염균으로 유방염의 가장 흔한 원인균으로 알려져 있으며<sup>3,4)</sup> 이외에 다양한 질병의 원인으로 주목받고 있다<sup>5)</sup>.

현재까지 유방염의 치료에는 다양한 항생제가 사용되어 왔으며, 그 중 부작용이 적고 안정성이 확보된  $\beta$ -lactam계 항생제를 주로 사용해왔다<sup>1,3)</sup>. 하지만 이에 대한 내성균주의 출현이 증가하고 있으며<sup>6-8)</sup>, Ciprofloxacin은 퀴놀론계 중에서 가장 항균력이 강한 항생제의 하나로 현재 유방염에 흔히 처방되고 있으나<sup>4,9,10)</sup>, 독성으로 사용에 제한이 있으며 이에 대한 내성균주 역시 출현하고 있다<sup>11-3)</sup>. 따라서 기존 항생제의 사용을 줄이면서 효과가 우수한 대체 약물, 특히 천연물 유래의 치료제를 개발하는 것이 필요하다.

한의학에서 유방의 염증성 질환은 乳癰을 비롯하여 吹乳, 妬乳 乳疽, 乳癆 乳發 등에 해당하며<sup>14)</sup>, 乳癰은 유방이 癰腫膿瘍하는 질환을 의미한다<sup>15)</sup>.

乳癰의 원인은 忿怒傷肝, 厚味所養, 肝鬱胃熱, 餘乳鬱結, 口氣所吹 등으로 다양하며<sup>16)</sup>, 肝鬱胃熱의 實證에 속하는 경우가 많아서 疏肝清胃, 通乳散結하여 치료한다<sup>15)</sup>.

白頭翁, 敗醬, 地榆, 槐花 및 苦參은 유방염을 위시한 부인과의 염증성, 감염성 질환에 자주 사용되는 단미제이다. 본 연구에서는 표준액체배지 희석법<sup>17)</sup>을 사용하여 이들 약재와 Ciprofloxacin이 *S. aureus* 세균주에 대한 Minimal Inhibition Concentration(MIC)을 측정하고, 시간대별 균성장 곡선<sup>18)</sup>을 평가하여 항균력을 살펴보았다. 또한 murine macrophage 세포주인 Raw 264.7 세포를 이용하여 탐식세포 내 사멸 효과 및 사람 유방암 상피세포 유래인 MCF-7 세포를 이용하여 상피세포 내 *S. aureus* 침투율 저해 효과를 관찰하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 약재 및 시료

본 실험에 사용된 모든 약재는 제천 한방 약초(제천, 한국)에서 구입한 것을 현미경 하에서 관능검사를 통하여 선정하여 사용하였다. 배지 및 시약으로 사용된 Brain-heart Infusion(BHI), Muller Hinton(MH) agar 또는 broth, Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)/F12 medium, heat inactivated horse serum, RPMI 1640은 Difco(MI, USA)에서 각각 구입하였으며, fetal bovine serum(FBS)는 Invitrogen(NY, USA)에서, 대조 약물인 Ciprofloxacin hydrochloride hydrate는 Hangzhou Tacon Co.(China)에서 각각

구입하여 사용하였다. 또한 96 well-plate는 Greiner(Germany)에서 구입하였으며, 이외 대부분 시약은 Aldrich-Sigma(MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

## 2. 시료의 준비

시중에서 구입한 白頭翁, 敗醬, 地榆, 槐花 및 苦蔘 각 10 g을 취하여 정제수 100 ml로 80°C에서 3시간 동안 3번 가열 추출한 후, 흡인 여과하였다. 여과액을 rotary vacuum evaporator(Buchi Rotavapor R144, Buchi Labortechnik AG, Switzerland)로 감압·농축하여 점조성의 추출물을 얻은 후, programmable freeze dryer(Labconco Freezone1, Labconco Corp., MO, USA)를 사용하여 동결 건조하여 갈색 또는 연갈색의 白頭翁 물 추출물(Pulsatillae Radix Aqueous Extracts, PuR), 敗醬 물 추출물(Patrinae Radix aqueous extracts, PaR), 地榆 물 추출물(Sanguisorbae Radix aqueous extracts, SaR), 槐花 물 추출물(Sophorae Flos aqueous extracts, SoF) 및 苦蔘 물 추출물(Sophorae Radix aqueous extracts, SoR)을 각각 1.329(수율 13.29%), 1.588(수율 15.88%), 1.817(수율 18.17%), 1.642(수율 16.42%) 및 1.543(수율 15.43%) g을 얻어 실험에 사용하였다. 준비한 각각의 동결 건조 추출물은 -20°C의 냉장 보관 후 실험에 사용하였으며, 구입한 Ciprofloxacin은 4°C 냉장 보관 후 사용하였다. 모든 동결 건조 추출물은 사용한 용매인 증류수에 25 mg/ml의 농도까지 비교적 잘 용해되었고, Ciprofloxacin은 25 µg/ml까지 비교적 잘 용해되었다.

## 3. 균주 및 배지

*S. aureus*는 American Type Culture

Collection Center(VA, USA)에서 동결 건조 상태로 구입하여 BHI agar에 녹인 후, BHI agar에 3회 계대 배양한 후 사용하였으며, MH agar 또는 broth에서 유지하였다. 또한 murine macrophage 세포주인 Raw 264.7 세포 및 사람 유방암 상피세포 유래인 MCF-7 세포는 각각 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 실험에 사용한 Raw 264.7 세포는 DMEM에 10% FBS, 100 U/ml penicillin 및 100 µg/ml streptomycin을 혼합한 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였으며, MCF-7 세포는 10% FBS가 첨가된 RPMI 1640를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 계대 배양하여 유지하였다. 실험 과정의 모든 세포는 80~90%의 confluence에서 실험하였고, 20 passages를 넘기지 않은 세포만 사용하였다.

## 4. 세균수의 측정

비교적 정확한 흡광도(Optical Density; OD)와 세균수의 상관관계를 알아보기 위하여, 정량 평판법(Quantitative Plating Methods, Standard Plate Count)<sup>19)</sup>을 이용하여 균수를 측정하였다. *S. aureus*를 spectrophotometer(Milton Roy Spectronic 20D; Milton Roy Company, PA, USA)를 이용하여 600 nm(OD<sub>600</sub>)에서의 흡광도를 0.5 Mcfarland standard와 같은 탁도로 조정 한 다음, 균액을 10, 100, 1000 및 10,000배로 단계 희석하여 균의 농도가 1×10<sup>4</sup> CFU/ml가 되도록 만들어 MH agar에 접종하였으며 37°C, 10% CO<sub>2</sub> 조건에서 24시간 배양하여 조직배양접시에 형성된 집락수를 희석된 순서대로 OD와 비교하였다. 0.5 Mcfarland standard 탁

도는 1.175% barium chloride dihydrate ( $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 0.05 ml와 1% sulfuric acid ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 9.95 ml를 혼합하여 준비하였다.

### 5. 항균 활성도 측정

PuR, PaR, SaR, SoF, SoR의 *S. aureus* 에 대한 MIC를 표준 액체배지 희석법<sup>17)</sup>을 이용하여 측정하였다. 5종 단미제의 추출물을 25 mg/ml의 농도로 멸균증류수에 용해한 다음 계단식으로 배수 희석하여 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.563, 0.782, 0.391, 0.195, 0.098 및 0 mg/ml의 총 10종의 농도를 준비하고, 각각 멸균된 96 well plate에 100  $\mu\text{l}$ 씩 분주하였다. 여기에 *S. aureus*의 단일 집락을 MH broth에 접종하고 48시간이 지난 후  $\text{OD}_{600}$ 을 spectrophotometer로 측정하여  $1.5 \times 10^6$  CFU/ml의 cell suspension을 준비하여 100  $\mu\text{l}$ 를 분주하고, 37°C에서 48시간 동안 배양하였다.

25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 멸균증류수에 용해한 Ciprofloxacin(Cipro)을 계단식으로 배수 희석하여 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.563, 0.782, 0.391, 0.195, 0.098 및 0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 총 10종의 농도를 준비하고, 같은 방법으로 bacteria suspension( $1.5 \times 10^6$  CFU/ml)을 첨가한 다음 48시간 동안 37°C에 배양하였다. MIC는 각각의 growth control well과 시료가 함유된 well의 *S. aureus*의 성장을 육안적으로 비교 관찰하여 균의 성장 억제가 나타나는 최소 농도로 결정하였다. 모든 실험은 5회 반복하였다.

### 6. 시간별 *S. aureus* 성장 곡선 측정

각각 동결 건조 추출물의 균 성장 저해능을 평가하기 위해 Janssen 등의 방법<sup>18)</sup>에 따라 MH broth에 *S. aureus*를

접종한 후,  $\text{OD}_{600}$ 을 spectrophotometer로 측정하여 Mcfarland 0.5 standard( $1.5 \times 10^8$  CFU/ml)로 각 균의 탁도를 조절한 다음 100배 희석 하였다. PuR(0.125 및 0.430 mg/ml), PaR(0.273 및 0.546 mg/ml), SaR(0.469 및 0.938 mg/ml), SoF(11.850 및 23.700 mg/ml), SoR(0.664 및 1.328 mg/ml) 및 Cipro(0.469 및 0.938 mg/ml)을 각각 MIC 및 MIC $\times 2$  농도로 준비한 cell suspension과 혼합한 다음 37°C에 배양하면서 24, 48, 72, 96 및 120시간 마다 OD를 측정하여 시료를 첨가하지 않은 대조군의 균 성장과 비교하였다. 모든 실험은 5회 반복하였다.

### 7. 탐식세포 내 세균 사멸 효과 측정

*S. aureus*에 대한 탐식세포 내 세균 사멸 효과는 Cuffini등의 방법<sup>20)</sup>에 따라 murine macrophage 세포주인 Raw 264.7 세포를 이용하여 평가하였다. 24-well plate에 Raw 264.7 세포( $10^6$  cell/well)를 배양한 4%의 heat-inactivated adult horse serum을 포함한 DMEM/F12 medium 1ml를 분주한 다음  $2 \times 10^7$  CFU의 *S. aureus*를 첨가하고, 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  조건하에 30분 동안 배양하여 탐식을 촉진하였다. 이후 Sub-MIC (1/2 MIC) 농도의 추출물을 각각 첨가하고, 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  조건에서 6시간 배양하였다. 세포만 수집하여 PBS로 세척한 다음, 5 mg/ml의 lysostaphin을 처리하여 세포막 또는 세포 밖에 부착된 세균을 사멸시키고 Raw 264.7 세포들을 멸균 증류수로 용해한 후, 생균수를 각각 측정하였다. 본 실험에서는 5회 반복 실험을 시행하였으며, 추출물을 처리하지 않은 배양 well을 대조군으로 사용하여 탐식세포 내 세균 사멸 효과를 평가하였다.

## 8. 상피세포 내 세균 침투 저해 효과 측정

*S. aureus*의 상피세포 내 침투 저해 효과를 Almeida 등의 방법<sup>21)</sup> 및 Menzies and Kourteva<sup>22)</sup>의 방법에 따라 사람 유방암 상피세포 유래인 MCF-7 세포를 이용하여 평가하였다. 24-well plate에 MCF-7 세포를 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 5%의 FBS 및 1% 항진균제(penicillin, streptomycin 및 amphotericin B)가 포함된 DMEM/F12 medium에 사용 전 20 시간 동안 배양하였다. 배양한 MCF-7 세포(2×10<sup>4</sup> cells)를 멸균 PBS로 3회 반복 세척한 후, 2.1×10<sup>9</sup> CFU/ml의 *S. aureus*가 포함된 DMEM/F12 medium 1 ml와 Sub-MIC(1/2 MIC) 농도의 추출물을 각각 첨가하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 1시간 배양한 후 상층 액을 제거하였다. 이후 멸균 PBS로 3회 반복 세척한 다음 5 mg/ml의 lysostaphin을 첨가하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 2시간 배양하여 세포 밖에 부착된 세균을 제거하였다. 처리가 완료된 MCF-7 세포를 다시 멸균 PBS로 3회 반복 세척한 다음 0.25% trypsin 처리를 하여 부유시키고, 0.025%의 Triton X-100이 포함된 멸균 증류수로 세포를 용해시킨 다음 생균수를 측정하였다. 본 실험에서는 5회 반복 실험을 시행하였으며, 추출물을 처리하지 않은 배양 well을 대조군으로 사용하여 상피세포 내 침투 저해 효과를 평가하였다.

## 9. 통계처리

모든 수치는 5회 반복실험의 평균±표준편차로 표시하였으며, 군 성장 곡선에 미치는 영향, 상피세포 내 세균 침투 저해 효과 및 세포 내 세균 사멸 효과는

다중 비교 검정을 이용하여 통계 처리를 하였고, 분산 동질성을 Levene test를 실시하여 검정하였다.

등분산일 경우, one way ANOVA test를 실시한 다음 least-significant differences (LSD) test로 사후 검정을 하여 군 간의 유의성을 측정하였다. 비등분산일 경우에는 비모수 검정인 Kruskal-Wallis H test를 실시하여 유의성이 인정된 경우, Mann-Whitney U(MW) test를 실시하여 군 간의 유의성을 검정하였다. 모든 통계처리는 SPSS for Windows(Release 14.0K, SPSS Inc.USA)를 이용하였으며, p-value가 0.05 이하일 때 통계적 유의성을 인정하였고, 후보 물질의 효과를 더욱 명확히 하기 위하여, 처리 군과 미처리 대조군과의 percent change를 아래의 공식을 이용하여 측정하였다.

EQUATION. Percentage Changes as Compared Control(%)

$$= ((\text{Data of test material treated groups} - \text{Data of control}) / \text{Data of control}) \times 100$$

## III. 결 과

### 1. 항균 활성도

PuR, PaR, SaR, SoF, SoR의 *S. aureus*에 대한 MIC는 각각 0.215±0.107(0.098~0.391), 0.273±0.107(0.195~0.391), 0.469±0.297(0.195~0.782), 11.850±8.406(3.125~25), 0.664±0.546(0.195~1.563) mg/ml로 관찰되어 PuR, PaR, SaR, SoR 및 SoF 순으로 *S. aureus*에 대한 항균력을 나타내었다. 한편 Cipro의 MIC는 0.469±0.297(0.195~0.782) µg/ml로 관찰되었다(Table 1).

Table 1. Minimal Inhibition Concentration against *S. aureus* Detected in This Study by Agar Microdilution Method (mean±S.D.)

Test Materials	MIC	Ranges
Pulsatillae Radix Aqueous Extracts (PuR)	0.215±0.107 (mg/ml)	0.098~0.391 (mg/ml)
Patrinae Radix Aqueous Extracts (PaR)	0.273±0.107 (mg/ml)	0.195~0.391 (mg/ml)
Sanguisorbae Radix Aqueous Extracts (SaR)	0.469±0.297 (mg/ml)	0.195~0.782 (mg/ml)
Sophorae Flos Aqueous Extracts (SoF)	11.850±8.406 (mg/ml)	3.125~25.000 (mg/ml)
Sophorae Radix Aqueous Extracts (SoR)	0.664±0.546 (mg/ml)	0.195~1.563 (mg/ml)
Ciprofloxacin (Cipro)	0.469±0.297 (µg/ml)	0.195~0.782 (µg/ml)

## 2. 시간대별 *S. aureus* 성장 곡선

1) PuR의 시간대별 균 성장곡선에 미치는 영향

배양 24시간 후부터 대조군에 비해 유의성 있는( $p<0.01$  또는  $p<0.05$ ) 용량 의존적인 생균수의 감소가 관찰되었다(Fig. 1).

PuR의 MIC 농도(0.215 mg/ml) 처리군의 생균수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 대조군에 비해 각각 -26.86, -31.61, -25.25, -19.30 및 -20.07%의 변화를 나타내었다.

PuR의 MIC×2 농도(0.430 mg/ml) 처리군의 생균수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 대조군에 비해 각각 -39.56, -38.60, -35.06, -32.86 및 -33.37%의 변화를 나타내었다.

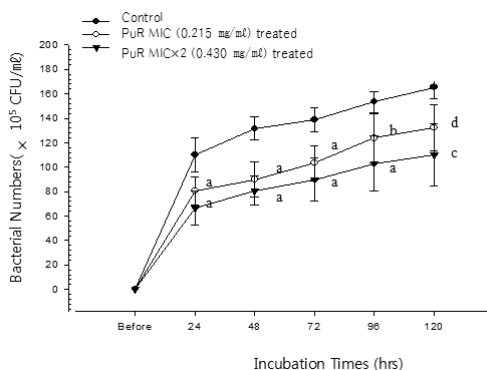


Fig. 1. Effects of Pulsatillae Radix Aqueous Extracts(PuR) on the Growth of *Staphylococcus aureus* with Incubation Times.

(a :  $p<0.01$ , b :  $p<0.05$ ) as compared with control by LSD test

(c :  $p<0.01$ , d :  $p<0.05$ ) as compared with control by MW test

2) PaR의 시간대별 균 성장곡선에 미치는 영향

배양 24시간 후부터 대조군에 비해 유의성 있는( $p<0.01$  또는  $p<0.05$ ) 용량 의존적인 생균수의 감소가 관찰되었다(Fig. 2).

PaR의 MIC 농도(0.273 mg/ml) 처리군의 생균수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 대조군에 비해 각각 -24.55, -22.92, -20.59, -20.90 및 -18.79%의 변화를 나타내었다.

PaR의 MIC×2 농도(0.546 mg/ml) 처리군의 생균수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 대조군에 비해 각각 -33.69, -31.97, -31.63, -30.79 및 -30.92%의 변화를 나타내었다.

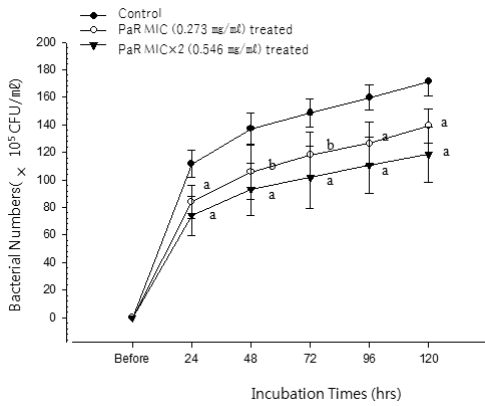


Fig. 2. Effects of Patrinae Radix Aqueous Extracts(PaR) on the Growth of *Staphylococcus aureus* with Incubation Times. (a :  $p < 0.01$ , b :  $p < 0.05$ ) as compared with control by LSD test

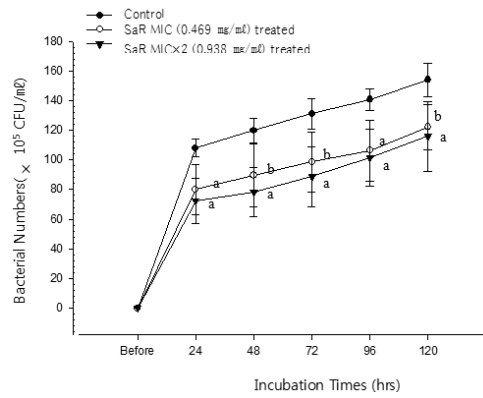


Fig. 3. Effects of Sanguisorbae Radix Aqueous Extracts(SaR) on the Growth of *Staphylococcus aureus* with Incubation Times. (a :  $p < 0.01$ , b :  $p < 0.05$ ) as compared with control by LSD test

3) SaR의 시간대별 균 성장곡선에 미치는 영향

배양 24시간 후부터 대조군에 비해 유의성 있는( $p < 0.01$  또는  $p < 0.05$ ) 용량 의존적인 생균수의 감소가 관찰되었다(Fig. 3).

SaR의 MIC 농도(0.469 mg/ml) 처리군의 생균수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 대조군에 비해 각각 -25.74, -25.21, -24.73, -24.47 및 -20.68%의 변화를 나타내었다.

SaR의 MICx2 농도(0.938 mg/ml) 처리군의 생균수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 대조군에 비해 각각 -32.96, -34.72, -32.37, -27.88 및 -24.71%의 변화를 나타내었다.

4) SoF의 시간대별 균 성장곡선에 미치는 영향

배양 24시간 후부터 대조군에 비해 유의성 있는( $p < 0.01$  또는  $p < 0.05$ ) 용량 의존적인 생균수의 감소가 관찰되었다(Fig. 4).

SoF의 MIC 농도(11.850 mg/ml) 처리군의 생균수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 대조군에 비해 각각 -31.17, -27.27, -26.13, -22.28 및 -17.77%의 변화를 나타내었다.

SoF의 MICx2 농도(23.700 mg/ml) 처리군의 생균수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 대조군에 비해 각각 -43.24, -36.99, -30.79, -26.08 및 -24.53%의 변화를 나타내었다.

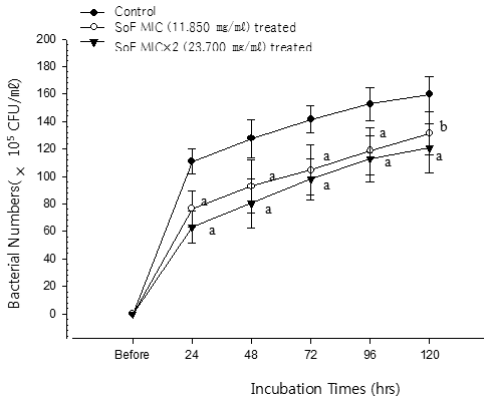


Fig. 4. Effects of Sophorae Flos Aqueous Extracts(SoF) on the Growth of *Staphylococcus aureus* with Incubation Times. (a : p<0.01, b : p<0.05) as compared with control by LSD test

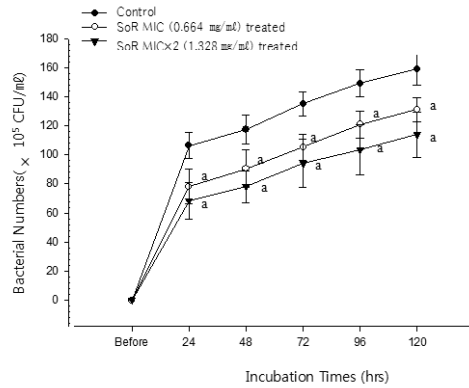


Fig. 5. Effects of Sophorae Radix Aqueous Extracts(SoR) on the Growth of *Staphylococcus aureus* with Incubation Times. a : p<0.01 as compared with control by LSD test

5) SoR의 시간대별 균 성장곡선에 미치는 영향

배양 24시간 후부터 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 용량 의존적인 생균수의 감소가 관찰되었다(Fig. 5).

SoR의 MIC 농도(0.664 mg/ml) 처리군의 생균수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 대조군에 비해 각각 -26.50, -23.00, -22.07, -18.93 및 -17.61%의 변화를 나타내었다.

SoR의 MIC×2 농도(1.328 mg/ml) 처리군의 생균수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 대조군에 비해 각각 -35.71, -33.39, -30.37, -30.47 및 -28.43%의 변화를 나타내었다.

6) Cipro의 시간대별 균 성장곡선에 미치는 영향

배양 24시간 후부터 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 용량 의존적인 생균수의 감소가 관찰되었다(Fig. 6).

Cipro의 MIC 농도(0.469 µg/ml) 처리군의 생균수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 대조군에 비해 각각 -41.73, -46.35, -45.22, -42.15 및 -38.10%의 변화를 나타내었다.

Cipro의 MIC×2 농도(0.938 µg/ml) 처리군의 생균수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 대조군에 비해 각각 -58.98, -62.21, -63.33, -62.50 및 -58.77%의 변화를 나타내었다.



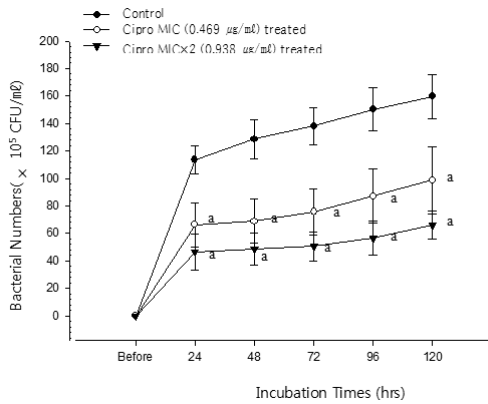


Fig. 6. Effects of Ciprofloxacin(Cipro) on the Growth of *Staphylococcus aureus* with Incubation Times.  
a : p<0.01 as compared with control by LSD test

### 3. 탐식세포 내 세균 사멸 효과

Murine macrophage 유래의 Raw 264.7 세포를 이용한 탐식세포 내 *S. aureus*에 대한 사멸 효과를 평가한 결과, sub-MIC (MIC1/2) 농도의 PuR, PaR, SaR, SoF, SoR은 매체 처리 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 탐식세포 내 세균수의 감소를 나타내었다(Fig. 7).

Raw 264.7 세포 내 세균수는 MIC1/2 농도의 Cipro(0.235 µg/ml), PuR(0.108 mg/ml), PaR(0.137 mg/ml), SaR(0.235 mg/ml), SoF(5.930 mg/ml), SoR(0.332 mg/ml)에서 매체 대조군에 비해 각각 -85.86, -50.35, -42.21, -37.17, -53.66, -32.25%의 변화를 나타내었다.

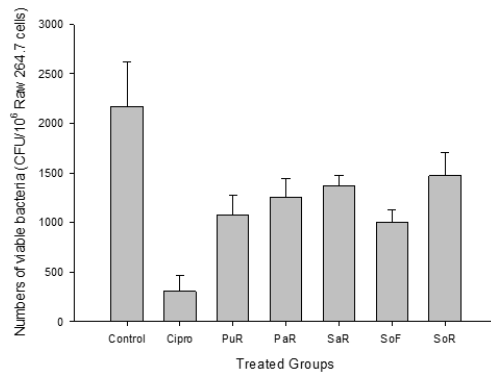


Fig. 7. Results of Intracellular Killing Assay against *Staphylococcus aureus* on Raw 264.7 cells.

a : p<0.01 as compared with control by LSD test

Cipro : Ciprofloxacin

PuR : Pulsatillae Radix Aqueous Extracts

PaR : Patriniae Radix Aqueous Extracts

SaR : Sanguisorbae Radix Aqueous Extracts

SoF : Sophorae Flos Aqueous Extracts

SoR : Sophorae Radix Aqueous Extracts

### 4. 상피세포 내 세균 침투 저해 효과

사람 유방암 유래의 MCF-7 세포를 이용하여, *S. aureus*의 상피세포 침투 저해 효과를 평가한 결과, sub-MIC(MIC1/2) 농도의 PuR, PaR, SaR, SoF, SoR은 매체 처리 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 상피세포 내 세균수의 감소를 나타내었다(Fig. 8).

MCF-7 세포 내 세균수는 MIC1/2 농도의 Cipro(0.235 µg/ml), PuR(0.108 mg/ml), PaR(0.137 mg/ml), SaR(0.235 mg/ml), SoF(5.930 mg/ml), SoR(0.332 mg/ml)에서 매체 대조군에 비해 각각 -79.27, -28.59, -23.12, -19.70, -45.33, -15.26%의 변화를 나타내었다.

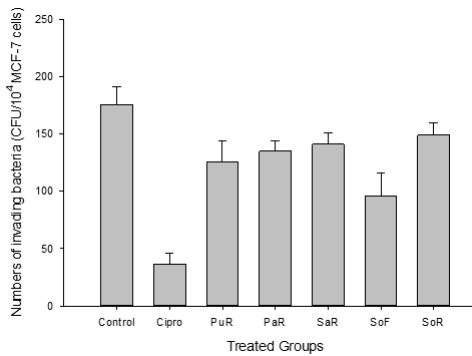


Fig. 8. Results of Bacterial Invasion Assay against *Staphylococcus aureus* on MCF-7 cells.

a :  $p < 0.01$  as compared with control by LSD test

Cipro : Ciprofloxacin

PuR : Pulsatillae Radix Aqueous Extracts

PaR : Patriniae Radix Aqueous Extracts

SaR : Sanguisorbae Radix Aqueous Extracts

SoF : Sophorae Flos Aqueous Extracts

SoR : Sophorae Radix Aqueous Extracts

#### IV. 고찰

유방염은 18~50세의 여성에서 흔히 발생하는 유방의 염증성 질환으로<sup>23)</sup>, 특히 수유기에 발생률이 높으며, 수유하는 여성의 2.5%에서 33%까지 보고되고 있어 산모에게 중요한 질환 중의 하나이다<sup>24)</sup>.

한의학에서 유방의 염증성 질환은 乳癰을 비롯하여 吹乳, 妬乳 乳發, 乳疽, 乳癆 등으로 불리며, 乳癰을 기준으로 하여 輕症은 吹乳 및 妬乳라고 하며, 乳癰보다 염증의 범위가 큰 것을 乳發, 깊은 것을 乳疽, 전신 증상과 함께 나타나는 유방염을 乳癆라 하였다<sup>14)</sup>.

乳癰의 원인에 대하여 《東醫寶鑑》<sup>16)</sup>에서는 “乳母가 忿怒所逆하고 鬱悶所遏하며 厚味所養하여 厥陰의 血이 운행하지 않으면 乳竅가 폐색되고 乳汁이 不通하며 陽明의 血이 滲하는 고로 熱이 심

해서 化膿한다. 아이가 胸膈에 滯痰이 있을 때 口氣가 熱하므로 이때에 젓꼭지를 물고 자면 熱氣가 吹注하여 乳房으로 들어가 結核을 이루게 된다.”고 하였으며, “乳癰은 대부분 기름진 음식을 먹어서 생긴 濕熱로 痰이 膈間에 쌓인 후 乳汁과 相搏하여 형성된다. 또한, 유아의 口氣로 생기거나 忿怒한 기운이 몰아치다가 막혀 생기기도 한다.”고 하여 忿怒傷肝, 厚味所養, 肝鬱胃熱, 餘乳鬱結의 內因뿐만 아니라 口氣所吹의 外因도 밝히고 있다.

乳癰은 발생 시기에 따라 산후의 수유기에 발생하는 外吹乳癰, 임신 중 발생하는 內吹乳癰, 임신 및 출산과 관계없이 발생하는 非授乳期 乳癰으로 분류할 수 있다<sup>15)</sup>. 外吹乳癰은 초기에는 排乳不暢, 혹은 乳竅不通, 乳房脹痛, 兼現寒熱, 頭痛, 煩躁口渴 하다가 乳癰이 化膿되면 乳房의 結腫이 점차 커지며, 紅腫熱痛, 疼痛이 극렬해지고 脹痛이 搏動性으로 轉化하여 高熱不退, 口渴, 便秘가 발생한다. 排膿되면 대부분 점차 치유되나, 膿이 囊을 형성하면 囊乳癰으로 轉變하고, 혹은 瘡口가 수렴되지 않으면 乳漏로 전화한다. 內吹乳癰은 유방이 結塊腫痛하며 피부색의 변화가 없다가 점차 붉은색으로 변하며 消散되지 않으면 化膿하여 潰한다<sup>15)</sup>.

乳癰의 치료는 膿이 未成한 초기에는 活血敗毒, 風熱解散 하거나 消散을 위주로 하며, 膿已成時에는 穿之排膿 하거나 刀鍼으로 排膿하고, 膿이 潰한 뒤에 不斂時에는 補氣血 하면서 敗毒 하거나 內托排膿을 위주로 한다<sup>25)</sup>.

서양 의학에서는 유아의 코나 상기도에 있던 병원균이 유두 파열이나 마찰

부위를 통하여 감염되거나, 임파액, 유즙, 정맥혈이 울체되어 유방염이 발생한다고 하였다<sup>26)</sup>. *S. aureus*가 가장 흔한 원인균이며, 그 다음이 streptococcus로 지목되고 있다<sup>3,4)</sup>.

유방염의 치료법에는 일반 요법, 약물 요법, 외과적 처치가 있다. 일반 요법은 예방 및 안정, 온수 찜질, 수유 혹은 다른 방법을 통해 남아있는 유즙을 제거하는 것이다. 약물 요법은 적절한 항생제와 진통제를 투여하는 것이며, 외과적 처치는 유방농양으로 진행된 후 즉시 절개 배농술을 시행하는 것이다<sup>1)</sup>.

유방염에 사용하는 항생제는 시기에 따라 변화됐으며  $\beta$ -lactam계 항생제는 다른 항생제에 비하여 부작용이 적고 안정성이 확보되어 오랫동안 유방염의 치료제로 사용되고 있다<sup>1,3)</sup>. 초기의 Penicillin에 대하여  $\beta$ -lactamase를 생산하는 내성 균주가 증가하여 methicillin, oxacillin, nafcillin 등의 penicillin계 항생제와 cephalosporine계 항생제가 개발되었으나, 이에 대한 내성균의 증가로<sup>6-8)</sup> 강력한 항균력을 나타내는 fluoroquinolone계 항생제가 개발되었다<sup>9)</sup>. 이 중 Ciprofloxacin은 광범위 항생제로  $\beta$ -lactam계 항생제나 aminoglycoside계 항생제에 내성을 나타내는 균주에 유효하며, 특히 MRSA(methicillin resistant *staphylococcus aureus*)를 포함한 그람 양성균에도 항균 작용을 나타내어 비뇨기계 감염, 하부 호흡기계 감염, 피부 및 피부 구조의 감염, 골 및 관절 감염에 사용되며<sup>27)</sup> 유방염에도 흔히 처방된다<sup>4,9,10)</sup>. Ciprofloxacin은 DNA 복제 시스템에 필요한 효소인 DNA-gyrase 및 topoisomerase IV를 억제하여 항균 작용을 나타내는데<sup>28)</sup>, 최근 이에 대한 내성 균주 역시 출현

하고 있다<sup>11-13)</sup>. 또한 비교적 독성이 강하여 아급성 심장 독성<sup>28)</sup>, 광 독성을 포함한 피부 발적과 신장 독성<sup>30)</sup>, 미성숙 동물에서의 연골 독성<sup>31)</sup> 및 건초염과 건파열<sup>32)</sup> 등의 독성을 초래하였다. 따라서 이러한 내성균의 출현 및 독성으로 말미암은 부작용에 대처하기 위해 사용량의 조절이 필요할 것으로 생각하며 이를 대체할 수 있는 효과가 우수한 약물, 특히 부작용이 적은 천연물 유래의 치료제를 개발하는 것이 필요하다.

본 연구에서 사용된 白頭翁, 敗醬, 地榆, 槐花, 苦蔘은 解毒하는 효능이 우수하여 부인과의 염증성, 감염성 질환에 빈용되는 약제이다. 白頭翁은 清熱解毒, 涼血止痢의 효능이 있어서 熱毒血痢, 陰痒帶下 및 아메바성 이질에 전통적으로 사용해왔으며, 敗醬은 清熱解毒, 消腫排膿 및 祛瘀止痛, 地榆는 涼血止血 및 害毒斂瘡, 槐花는 涼血止血, 清肝瀉火, 苦蔘은 清熱燥濕, 殺蟲利尿의 효능이 있다<sup>33,34)</sup>. 각각의 약재에 관한 최근 연구 결과에 따르면 白頭翁은 항원충 효과<sup>35)</sup>와 MRSA와 *Candida albicans*에 대한 항균 효과<sup>36)</sup>가 알려졌으며, 敗醬은 혈관 신생 효과<sup>37)</sup>, 항산화<sup>38)</sup>, 항염<sup>39)</sup> 및 *S. aureus*에 대한 항균 활성<sup>34)</sup>, 地榆는 식품 위해성 세균에 대한 항균 활성<sup>40)</sup>, 槐花는 항균 활성<sup>41)</sup>, 苦蔘은 MRSA를 비롯한 다양한 균주에 대해 비교적 강력한 항균력을 나타내는 것으로 알려졌다<sup>42)</sup>.

본 연구에서는 白頭翁, 敗醬, 地榆, 槐花 및 苦蔘 5종 단미제의 물 추출물의 *S. aureus*에 대한 항균력을 알아보기 위하여 표준액체배지 희석법<sup>17)</sup>으로 MIC를 측정하고 시간대별 균생장 곡선<sup>18)</sup>에 미치는 영향을 살펴보았다.

표준액체배지 희석법으로 MIC를 측정 한 결과, *S. aureus*에 대한 Cipro의 MIC는  $0.469 \pm 0.297$  ( $0.195 \sim 0.782$ )  $\mu\text{g/ml}$ 로 관찰되었으며 Seral 등<sup>10)</sup>의 결과와 유사한 결과를 나타내어 본 실험 방법의 객관성을 증명할 수 있었다. PuR, PaR, SaR, SoF, SoR의 MIC는 각각  $0.215 \pm 0.107$  ( $0.098 \sim 0.391$ ),  $0.273 \pm 0.107$  ( $0.195 \sim 0.391$ ),  $0.469 \pm 0.297$  ( $0.195 \sim 0.782$ ),  $0.664 \pm 0.546$  ( $0.195 \sim 1.563$ ),  $11.850 \pm 8.406$  ( $3.125 \sim 25$ )  $\text{mg/ml}$ 로 관찰되어 PuR, PaR, SaR, SoR, SoF 순으로 *S. aureus*에 대한 항균력을 나타내었다.

시간대별 균성장 곡선 결과는 MIC 및 MIC $\times 2$ 에서 SoF, PuR, SoR, PaR, SaR 순으로 각각 용량 의존적인 시간대별 균성장 억제를 나타내었다. 5종 단미제의 물 추출물은 Cipro보다 낮은 균 성장 억제 효과를 나타내었으나 모두 통계적으로 유의한 효과를 나타내었다.

*S. aureus*는 polymorphonuclear neutrophil leukocytes(PMN) 등 탐식 세포내에서 생존할 수 있으며, 이로 인해 PMN 및 항생제에 저항성을 나타내고 병이 재발하게 한다<sup>43-45)</sup>. 또한 *S. aureus*는 세포 표면의 부착 단백질인 adhesion을 이용하여 상피세포 표면에 부착하며<sup>46)</sup> fibronectin-binding proteins를 통해 상피세포 내로 침투하는 것으로 알려졌다<sup>47)</sup>. 따라서 탐식세포 내에서 생존하는 병원균의 제어가 필요하며 상피세포 내 침투율을 억제해야 한다. Ciprofloxacin은 탐식세포에 매우 빨리 흡수되어 탐식세포 내 병원균의 사멸 능력이 강력한 것으로 알려졌고 상피세포 등 세포 내 침투성 역시 매우 우수한 것으로 알려졌다<sup>10,48)</sup>. 이에 본 연구에서는 murine macrophage 세포주인 Raw 264.7 세포를 이용하여 탐식세포 내

사멸 효과 및 사람 유방암 상피세포 유래인 MCF-7 세포를 이용하여 상피세포 내 *S. aureus* 침투 억제 효과를 평가하였다.

Raw 264.7 세포를 이용하여 *S. aureus*의 탐식세포 내 사멸을 관찰한 결과, SoF, PuR, PaR, SaR, SoR 순으로 *S. aureus*의 사멸이 증가함을 확인하였다. 또한 MCF-7 세포를 이용하여 *S. aureus*의 침투율을 관찰한 결과, SoF, PuR, PaR, SaR, SoR 순으로 *S. aureus*의 침투율이 억제됨을 확인하였다. 5종 단미제의 물 추출물은 Cipro보다 낮은 *S. aureus*의 사멸 효과 및 침투율 저해 효과를 나타내었으나 모두 통계적으로 유의한 효과를 나타내었다.

이상의 실험 결과로 PuR, PaR, SaR, SoF, SoR은 *S. aureus*에 대해 비교적 우수한 항균력을 나타내며, MIC 및 MIC $\times 2$ 에서 각각 용량 의존적인 시간대별 균성장 억제를 나타냄을 알 수 있었다. 또한 SoF, PuR, PaR, SaR, SoR 순으로 우수한 탐식세포 내 *S. aureus* 사멸 및 상피세포 내 침투율 저해 효과를 알 수 있었다.

본 연구에 사용된 단미제에 관하여 동물 실험 등의 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각되며, 두 가지 이상의 단미제를 병용하였을 때 나타나는 상승 작용에 관한 연구가 필요할 것으로 생각된다. 또한 한약은 단미제로도 효과가 나타나지만, 주로 군신좌사(君臣佐使) 이론에 따라 방제를 구성하여 치료에 활용한다. 따라서 본 연구 결과를 바탕으로 5종의 단미제를 군약(君藥)이나 신약(臣藥)으로 활용하여 방제를 구성하여 in vitro에서 *S. aureus*에 대한 항균 작용에 관한 연구도 의미가 있으리라 생각된다.

이러한 연구를 통해 우수한 효과가 입증된다면 현재 사용되는 항생제의 사용량을 줄일 수 있을 뿐만 아니라, 항생제의 부작용 및 내성을 줄일 수 있는 한약물 사용의 근거를 마련할 수 있을 것으로 기대된다.

## V. 결 론

전통적으로 유방염 등의 부인과에 관련된 염증성, 감염성 질환에 자주 사용되어 온 약재인 白頭翁, 敗醬, 地榆, 槐花, 苦蔘 물 추출물의 *S. aureus*에 대한 항균력과 균 성장 억제, 탐식세포 내 사멸 효과 및 상피세포 내 *S. aureus* 침투 저해 효과에 대하여 연구한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. *S. aureus*에 대한 5종 단미제 물 추출물의 MIC를 평가한 결과, PuR, PaR, SaR, SoR, SoF 순으로 항균력을 나타내었다.
2. *S. aureus*를 이용하여 5종 단미제 물 추출물의 균 성장 억제를 평가한 결과, SoF, PuR, SoR, PaR, SaR 순으로 용량 의존적인 시간대별 균 성장 억제를 나타내었다.
3. Raw 264.7 세포를 이용하여 5종 단미제 물 추출물의 탐식세포 내 사멸을 비교한 결과, SoF, PuR, SoR, PaR, SaR 순으로 탐식세포 내 *S. aureus* 사멸 효과를 나타내었다.
4. MCF-7 세포를 이용하여 5종 단미제 물 추출물의 상피세포 내 *S. aureus* 침투율을 비교한 결과, SoF, PuR, PaR, SaR, SoR 순으로 상피세포 내 *S. aureus*

침투 저해 효과를 나타내었다.

이상의 결과로 5종의 단미제는 앞으로 *S. aureus*로 인한 유방염의 치료에 도움을 줄 수 있을 것으로 기대한다.

□ 투 고 일 : 2013년 1월 23일

□ 심 사 일 : 2013년 2월 1일

□ 게재확정일 : 2013년 2월 8일

## 참고문헌

1. Department of Child and Adolescent Health and Development. Mastitis: causes and management. World Health Organization(Geneva):2000. Available from URL:[http://libdoc.who.int/hq/2000/WHO\\_FCH\\_CAH\\_00.13\\_spa.pdf](http://libdoc.who.int/hq/2000/WHO_FCH_CAH_00.13_spa.pdf).
2. Wambach KA. Lactation mastitis: a descriptive study of the experience. J Hum Lact. 2003;19:24-34.
3. Nordeng H, Tufte E, Nylander G. Treatment of mastitis in general practice. Tidsskr Nor Laegeforen. 2003;123(21):3027-30.
4. Spencer JP. Management of mastitis in breastfeeding women. Am Fam Physician. 2008;78:727-31.
5. Cassat J, et al. Transcriptional profiling of a Staphylococcus aureus clinical isolate and its isogenic agr and sarA mutants reveals global differences in comparison to the laboratory strain RN6390. Microbio. 2006;152:3075-90.
6. Kevin P, Jaime F. Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus:

- a growing public health problem. *Pediatric Health*. 2007;1(1):95-105.
7. Deresinski S. Methicillin-resistant staphylococcus aureus: an evolutionary epidemiologic and therapeutic odyssey. *Clin Infect Dis*. 2005;40(4):562-73.
  8. 최성화 등. 부산 지역 설사 환자에서 분리한 MRSA 균주의 다양성 분석. *J of Life Sci*. 2008;18(8):1083-9.
  9. Appelbaum PC, Hunter PA. The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. *Int J Antimicrob Agents*. 2000;16:5-15.
  10. Seral C, Van Bambeke F, Tulkens PM. Quantitative analysis of gentamicin, azithromycin, telithromycin, Ciprofloxacin, moxifloxacin and oritavancin(LY333328) activities against intracellular *Staphylococcus aureus* in mouse J774 macrophages. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47:2283-92.
  11. Ackermann G, et al. Resistant to moxifloxacin in toxigenic *Clostridium difficile* isolates is associated with mutations in *gyrA*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45:2348-53.
  12. Akasaka T, et al. Type II topoisomerase mutations in fluoroquinolone-resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in 1998 and 1999: role of target enzyme in mechanism of fluoroquinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45:2263-8.
  13. Bachoual R, et al. Single or double mutation alterations of *gyrA* associated with fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Microb Drug Resist*. 2001;7:257-61.
  14. 배종국. 한방유방학. 서울:정담. 2005 :153-81.
  15. 한방여성의학 편찬위원회. 한방여성의학 II. 서울:정담. 2007:446-9.
  16. 許浚. 東醫寶鑑. 경남:동의보감출판사. 2006:681-3.
  17. Pfaller MA, et al. Collaborative investigation of variables in susceptibility testing of yeasts. *Antimicrob Agents Chemother*. 1990;34:1648-54.
  18. 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.
  19. Tenover FC, et al. Characterization of staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin and other glycopeptides. *J Clin Microbiol*. 1998;36:1020-7.
  20. Cuffini AM, et al. Enhanced *Staphylococcus aureus* susceptibility to immuno-defense induced by sub-inhibitory and bactericidal concentration of imipenem. *J Antimicrob Chemotherp*. 1993;31:559-68.
  21. Almeida RA, et al. *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. *J Dairy Sci*. 1996;79 :1021-6.
  22. Menzies BE, Kourteva I. Internalisation of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces apoptosis. *Infect Immunol*. 1998;66:5994-8.
  23. 정상철. 핵심유방학개론. 서울:고려의학. 1998:14-7.
  24. 신혁재. 유방염의 최신지견. 의약정보. 2011;37(1):22-7.

25. 송병기. 한방부인과학. 서울:행림출판. 1992:273-4.
26. 대한병리학회. 병리학. 서울:고문사. 1990:1054-5.
27. Fass RJ. Ciprofloxacin: Best use of this new broad-spectrum antibiotic. Postgrad Med. 1990;87(8):117-31.
28. K Drlica K, Zhao X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. Microbiol Mol Biol Rev. 1997;61(3):377-92.
29. Pispirigos K, Chrysanthopoulos K. Evaluation of cardiac subacute toxicity of Ciprofloxacin in rats using serum biochemical parameters. Arzneimittelforschung. 2001;51:582-7.
30. Pons R, Escutia B. Ciprofloxacin-induced vasculitis with cutaneous and renal involvement. Nefrologia. 2001;21:209-12.
31. Egerbacher M, Edinger J, Tschulenk W. Effects of enrofloxacin and Ciprofloxacin hydrochloride on canine and equine chondrocytes in culture. Am J Vet Res. 2001;62:704-8.
32. Williams RJ II, et al. The effect of Ciprofloxacin on tendon, paratenon, and capsular fibroblast metabolism. Am J Sports Med. 2000;28:364-9.
33. 김인락 등. 本草學. 서울:永林社. 2007: 186-8, 205-56, 389-92, 434-47, 467-9, 478-89, 576-8, 583-5, 629-31.
34. 김동현 등. 한방약리학. 서울:신일상사. 2006:223-5, 331-4, 369-70, 409-13.
35. Youn HJ, et al. Anti-protozoal efficacy of medicinal herb extracts against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*. Vet Parasitol. 2003;116:7-14.
36. 성인화. 白頭翁에서 분리한 Linoleic acid 와 시약용 Linoleic acid의 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*와 *Candida albicans*에 대한 항균효과 비교. 대한화학요법회지. 2002;20:295-302.
37. Jeon J, et al. Aqueous extract of the medicinal plant *Patrinia villosa*Juss. induces angiogenesis via activation of focal adhesion kinase. Microvasc Res. 2010;80:303-9.
38. Xie Y, et al. Chemical composition and antioxidant activity of volatiles from *Patrinia villosa* Juss obtained by optimized supercritical fluid extraction. J Pharm Biomed Anal. 2008;48:796-801.
39. Li N, et al. Studies on anti-inflammation chemical constituents of *Patrinia villosa*. Zhong Yao Cai. 2008;31:51-3.
40. 김세령, 원지혜, 김미라. 地榆 에탄올 추출물의 식품 위해성 세균에 대한 항균 활성 및 *Salmonella* serotype Typhimurium TA100에 대한 항돌연 변이 활성 효과. 한국식품조리과학회지. 2011;27(4):17-26.
41. Kimura M, Yamada H. Interaction in the antibacterial activity of flavonoids from *Sophora japonica* L. to *Propionibacterium*. Yakugaku Zasshi. 1984;104:340-6.
42. Cha JD, et al. Antibacterial activity of sophoraflavanone G isolated from the roots of *Sophora flavescens* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Phytother Res. 2009;23:1326-31.
43. Garcia I, et al. Uptake and intracellular activity of ofloxacin isomers in human phagocytic and

- nonphagocytic cells. Int J Antimicrob Agents. 2000;15:201-5.
44. Gresham HD, et al. Survival of *Staphylococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection. J Immunol. 2000;164:3713-22.
45. Maurin M, Raoult D. Use of aminoglycosides in treatment of infections due to intracellular bacteria. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45:2977-86.
46. Navarre WW, Schneewind O. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. Microbiol Mol Biol Rev. 1999;63:174-229.
47. Dziewanowska K, et al. Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalisation of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. Infect Immunol. 1999;67:4673-8.