

大黃膏의 메티실린 내성 황색 포도상구균에 대한 항균활성

이순애^{1#}, 공룡^{1#}, 강옥화¹, 서윤수¹, 주전¹, 김상아¹, 송옥희¹, 김민철¹, 한형선¹,
최지나¹, 이영섭², 권동렬^{1*}

1 : 원광대학교 약학대학 한약학과, 원광한약연구소

2 : 농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부 인삼특작이용팀

The antimicrobial activity of *Daehwanggo* against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Sun-Ae Lee^{1#}, Ryong Kong^{1#}, Ok-Hua Kang¹, Yun-Soo Seo¹, Tian Zhou¹, Sang-A Kim¹,
Ok-Hee Song¹, Min-Chul Kim¹, Hyoung-Sun Han¹, Ji-Na Choi¹, Young-Seob Lee², Dong-Yeul Kwon^{1*}

1 : Department of Oriental Pharmacy, College of Pharmacy, Wonkwang Oriental Medicines Research Institute,
Wonkwang University, Iksan, Jeonbuk 570-749

2 : Department of Herbal Crop Research, National Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA, 92 Bisanro,
Eumsung, Chungbuk 369-873, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : Infectious diseases by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) are a growing problem worldwide. Characteristic of MRSA is endlessly mutation to resist antibiotics. *Daehwanggo* (DHG) is one of the oriental medicine prescriptions contained in Principles and Practice of Eastern Medicine. *Daehwanggo* was mainly used for external preparation from old times. The purpose of this study is to confirm possibility as supplementary drug of DHG about antibiotics through observation of synergy effect between DHG and commercial antibiotics and to observe restriction on growth of MRSA on any pathway through observation of mechanism.

Methods : The minimum inhibitory concentration (MIC) of DHG against MRSA is 500 ~ 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ by broth dilution method. In the checkerboard method, the combinations of DHG with antibiotics has partial synergistic effect or synergy effect and DHG markedly reduced the MICs of the antibiotics oxacillin (OX), gentamicin (GT) against MRSA. In the inhibition of resistance mechanism of DHG against MRSA, the expression of resistance gene and protein about β -lactam antibiotic was reduced. Also, we observed the effect of DHG about cell membrane permeability against MRSA, and confirmed that DHG suppressed growth of strains by increasing cell membrane permeability.

Results : Basis on the result, we speculate that DHG increase antibacterial activity of antibiotics against MRSA by changing the structure of cell wall of MRSA.

Conclusions : These data suggest that *Daehwanggo* possesses possibility as supplementary drug about antibiotics against MRSA.

Key words : *Daehwanggo* (DHG), MRSA, β -lactam antibiotic

*Corresponding author : Professor Dong-Yeul Kwon, Department of Oriental Pharmacy, College of Pharmacy and Wonkwang-Oriental Medicines Research Institute, Iksan-daero 460, Iksan, Jeonbuk 570-749, Republic of Korea.

· Tel : +82-63-850-6802 · E-mail : sssimi@wku.ac.kr

#First author : Dr Sun-Ae Lee, Department of Oriental Pharmacy, College of Pharmacy and Wonkwang-Oriental Medicines Research Institute, Iksan-daero 460, Iksan, Jeonbuk 570-749, Republic of Korea.

· Tel : +82-63-850-6802 · E-mail : parvyolra@naver.com

#First author : Ryong Kong, Department of Oriental Pharmacy, College of Pharmacy and Wonkwang-Oriental Medicines Research Institute, Iksan-daero 460, Iksan, Jeonbuk 570-749, Republic of Korea.

· Tel : +82-63-850-6802 · E-mail : kongryong22@naver.com

· Received : 20 January 2017 · Revised : 2 March 2017 · Accepted : 15 March 2017

I. 서론

*Staphylococcus aureus*는 사람 몸속에 공생하기도 하지만, 때로는 병원균으로써 기회감염을 일으키는 원인이 되기도 하는데 주로 화농성질환이나 식중독, 폐렴, 패혈증 등을 일으킨다.¹⁾ 하지만, MRSA의 등장으로 일반적인 항생제에 의한 치료가 어려워지고 이는 심각한 문제로 다가오게 되었다. MRSA는 항생제에 내성을 나타내어 쉽게 치료가 되지 않는 것이 특징으로 항생제에 대한 내성기작은 항생제에 따라 여러 기전이 보고되어 있으며,^{2,3)} 특히 β -lactam계 항생제에 대한 MRSA의 내성 기작에는 PBP2a와 β -lactamase가 있는 것으로 알려져 있다.^{4,5)}

PBP2a는 MRSA의 세포외벽에 위치한 sensor-inducer 단백질인 MecR1이 외부독성 물질을 감지하여 세포내에서의 신호전달과정을 거쳐 staphylococcal chromosome cassette mec (SCCmec)에 위치한 *mecA*의 전사를 유도하며 이를 통해 생산되어지며, *mecA*의 전사는 같은 SCCmec에 위치한 *mecI*의 전사에 의해 조절된다.^{6,7)} β -lactamase 또한 대표적인 β -lactam계 항생제에 대한 MRSA의 내성 기전이다. MRSA가 β -lactam계 항생제에 노출 시 MRSA의 세포외벽에 위치한 sensor-inducer 단백질인 BlaR1이 이를 감지하여 세포내의 신호전달과정을 거쳐 *blaZ*의 전사를 유도하여 β -lactamase가 생산되며, 생산된 β -lactamase는 β -lactam계 항생제의 β -lactam 고리를 가수분해 하여 비활성 시킨다. *blaZ*의 전사는 같은 염색체상에 위치한 *blaI*의 전사에 의해 조절된다.^{8,9)} 이외에도 다양한 항생제에 대한 내성기전이 발견되고 있으며, 항생제를 사용함에 따라 꾸준히 증가하는 세균의 내성을 극복하기 위하여 새로운 항생제의 연구 및 개발이 필요한 상황이다.

이에 임상에서는 약물 내성 균주에 대한 항균효과를 높이기 위해 교차내성 (cross-tolerance of drugs, 交叉耐性)이 적거나 없고, 작용 기전이 서로 다른 약제를 사용하는 복합요법을 사용하고 있으며, 연구에서도 이들 내성 균주를 극복하기 위해 내성이 없는 항생물질을 개발하거나 찾고 있다. 천연물은 이러한 경향에 맞추어 새로운 항생물질을 찾는 데 있어서 중요한 자원이 되고 있다.¹⁰⁻¹²⁾

따라서 본 연구에서는 전통적으로 사용되어 온 처방 중 하나인 大黃膏를 이용하여 MRSA에 대한 항균 실험을 실시하고, 임상에서 사용되는 항생제와의 병용처리를 통해 내성을 극복할 수 있는 새로운 소재를 찾고자 하였다.

이 실험에서 사용된 大黃膏는 許俊의 『東醫寶鑑諸瘡門軟癰』에 수록된 대표적인 外治 처방으로 大黃, 當歸, 黃柏으로 각등분하여 구성되어 있다. 약제를 粉末한 다음 生地黃汁에 개어 膏藥으로 만들어 뽕두라지 같은 작은 부스럼(小節)에 도포하여 치료한다고 하였다.

大黃은 瀉下通便, 攻積, 清熱瀉火, 解毒, 活血祛瘀, 清火濕熱의 약리학적 효능을 가지고 있으며, 當歸는 活血調經, 潤腸通便, 止痛의 약리학적 효능을 가지고 있으며 黃柏은 清熱燥濕, 瀉火解毒, 退虛熱의 약리학적 효능을 가지고 있으며, 當歸, 黃柏의 단일 약제에 대한 생리학적 활성과 항균 효과에 대해서는 보고되어 있지만 처방인 大黃膏에 대한 항균활성에 대한 연구는 아직까지 보고된 바가 없다. 따라서 이들이 함께 처방된 대황고도 MRSA에 항균활성이 있을 것이라고 보고 실험을 진행했다.

本 연구에서는 大黃膏의 Disc 확산 실험 및 최소억제농도 (minimum inhibitory concentration, MIC)를 측정하여 MRSA에 대한 항균활성 및 활성농도를 검증하고, 기존 항생제와 大黃膏 에탄올 추출물을 병행 처리하여 병용효과를 확인하였으며, 시간에 따른 성장억제정도를 확인하였다. 또한, 세포막 투과성 실험과 PCR, Western blot을 통해 大黃膏 에탄올 추출물이 MRSA의 내성기전에 미치는 영향을 확인하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용된 약재인 大黃 (백제허브, 한국), 當歸 (백제허브, 한국), 黃柏 (백제허브, 한국) 에서 구입하여 권동렬교수가 감정하여 사용하였다.

2) 시약

Mueller-Hinton agar (MHA)와 Mueller-Hinton broth (MHB)는 Difco™ (Baltimore, MD, USA)에서, Dimethyl sulfoxide (DMSO), Triton X-100 (TX-100), Oxacillin 및 Gentamicin, MTT[3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, 5 mg/ml]는 Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)에서 구입하여 실험에 사용하였다.

3) 균주 및 배양

본 실험에 사용한 community acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) USA 300은 가톨릭의과대학 연구원으로부터 분양받았고, hospital acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (HA-MRSA)에서 표준균주 ATCC 33591은 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 구입하였고, CCARM 3090, 3091, 3095, 3102는 서울여대 항생제 내성 균주은행 (Culture Collection of Antimicrobial Resistant Microbes, CCARM, Korea)으로부터, 임상균주 DPS-1, DPS-2, DPS-3은 원광대학교 병원 성형외과 (Department of plastic surgery, DPS)로부터 분양받아 실험에 사용하였다.

균주는 -79℃ 냉동고에서 30% glycerol에 보관하다가, Mueller-Hinton agar (MHA) 또는 Trypsin-Soy agar (TSA)에 접종한 후 37℃ 항온기 (incubator)에서 24시간 배양하여 실험에 사용하였다.

2. 방법

1) 大黃膏의 제조

大黃(Rhei Rhizoma) 5 g, 當歸(Angelicae gigantis Radix) 5 g, 黃柏(Phellodendri Cortex) 5 g 을 70% ethanol 500 ml로 추출하여 감압농축, 동결건조의 과정을 거쳐 12.1%의 수득률을 얻었다.

2) 디스크 확산법 (Disc diffusion method)

大黃膏 에탄올 추출물(DHG)의 항균효과는 디스크 확산법을 통해 MRSA에 대한 항균활성을 측정하였다.^{17,18)} 고압 멸균된 MHA에 24시간 배양된 균 100 μ l를 골고루 도말하여 최종적으로 1.5×10^6 CFU/ml이 되게 하였다. 다음으로 멸균된 paper disc (6 mm)에 DHG (50 μ g, 100 μ g, 200 μ g, 400 μ g)과 Oxacillin 10 μ g을 각각 20 μ l씩 주입하여 완전히 흡수시킨 후 37°C incubator에서 24시간 배양시켜 paper disc 주위에 형성된 clear zone을 측정하였다.

3) 최소억제농도 (Minimum inhibitory concentration, MIC)

최소억제농도(MIC)는 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2000) 방법에 따라 액체배지 희석법을 통해 측정하였다.¹⁹⁾ DHG를 액체배지에 농도별로 희석하여, 여기에 탁도 0.5 McFarland 1.5×10^8 CFU/ml을 기준으로 10 μ l씩 접종하여 최종적으로 1.5×10^6 CFU/well이 되게 하였다. 다음으로 37°C 항온기에서 24시간 배양 후 미생물이 증식되지 않는 가장 낮은 약물의 농도를 MIC로 측정하였다.^{20,21)}

4) 약물병용효과 (Fractional inhibitory concentration index, FICI)

DHG와 항생제의 병용효과를 보기위해 checkerboard dilution test를 실시하였다.²²⁾ 상용 항생제는 oxacillin (OX)과 gentamicin (GT)이며 상기 액체배지 희석법과 동일한 방법으로 항생제를 병용하였을 때 MIC를 측정하였다.

FICI 산출기준은 다음과 같다.^{23,24)}

Fractional inhibitory concentration index (FICI)

$$= FIC_A + FIC_B = A/MIC_A + B/MIC_B$$

(MIC_A : 약물A의 MIC,

MIC_B : 약물B의 MIC,

A : 약물B를 병용한 약물A의 농도,

B : 약물A를 병용한 약물B의 농도)

FICI < 0.5, synergy; 0.5 ≤ FICI < 0.75, partial synergy; 0.75 ≤ FICI < 1.0, additive effect; 1.0 ≤ FICI < 4.0, no synergy; FICI > 4.0, antagonism.

5) Time-kill curve assay

DHG와 항생제 OX 및 GT을 병용했을 때 MRSA의 증식 변화를 보기위해 4시간, 8시간, 16시간, 24시간 별로 생육곡선을 나타내었다. 약물농도는 subinhibitory concentration (sub-IC)에서 DHG와 항생제를 단일 및 병용처리하여 측정하였다. 박테리아는 24시간 배양된 균을 사용하였으며, 1.5

$\times 10^6$ CFU/ml 을 기준으로 하여 MHB를 10~100배씩 순차적으로 희석한 다음, 100 μ l 도말하였다. control로써는 MHB에 균만을 배양하였다. Colony counts는 37°C incubator에서 24시간의 간격을 두고 30 ~ 300 colonies를 측정하였다.

6) 세포막 투과성 (cytoplasmic membrane permeability) 억제

DHG의 항균활성이 세포막 투과성 강화제와 병합하였을 때 활성의 변화를 보기 위해 detergent인 Triton X-100 (TX-100)을 사용하여 균의 세포막 투과성 억제에 의한 성장 억제 정도를 확인하였다.

7) RNA 분리 및 RT-PCR

DHG에 의한 항균활성 기전을 확인하기 위하여 MRSA 내성 관련 mRNA의 발현 정도를 보기 위하여 RT-PCR 방법을 사용하였다. RNA를 추출하기 위해 균주를 MHB에 희석 (OD₆₀₀ 0.35 ~ 0.45)한다. 희석 후 oxacillin과 여러 농도의 DHG를 처리 후 30분간 배양한 다음, 13,000 rpm에서 1분간 원심분리 후 균을 모아 easy-RED™ BYF Total RNA Extraction Kit (Intron co.)를 제조사의 지시에 따라 사용하여 RNA를 추출 후 Power cDNA Synthesis Kit (Intron co.)를 이용하여 cDNA를 만들었다. 여기에 *mecA*, *mecI*, *blaZ*, *blaI*, *16s rRNA*의 primer를 넣고 thermal cycler를 이용하여 증폭시켰다. 이때 *mecA*, *mecI*, *16s rRNA*는 95°C에서 3분 반응시킨 후, 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 50초 동안 30 cycle로 반응시킨 후, 마지막으로 72°C에서 90초 동안 반응시켰고, *blaZ*, *blaI*는 95°C에서 3분 반응시킨 후, 95°C에서 30초, 51°C에서 30초, 72°C에서 50초 동안 30 cycle로 반응시킨 후, 마지막으로 72°C에서 90초 동안 반응시켰다. 사용한 primer의 sequence는 Table 2.에 나타내었다. 만들어진 DNA를 2% 아가로스 겔에 전기 영동시켜 UV 검출기로 확인하였다.

8) Western blot 분석

DHG에 의한 항균활성의 기전을 확인하기 위해 western blot 분석을 실시하였다. Protein을 추출하기 위해 균주를 MHB에 희석 (OD₆₀₀ 0.35 ~ 0.45) 후, oxacillin과 여러 농도의 DHG를 처리 후 20분간 배양한 다음, 13,000 rpm에서 1분간 원심분리 후 균을 모아, 350 μ l의 SMART™ Bacterial Protein Extraction Solution (Intron co.)을 첨가하여 1분간 vortexing 후 13,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 취한다. 상층액의 단백질 농도는 BSA (bovine serum albumin)를 표준화하여 Bio-Rad Protein Assay Kit를 사용하여 정량하였다. 20 ~ 30 μ g의 lysate를 8 ~ 12% mini gel SDS-PAGE로 변성 분리하여, 이를 PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane (BIO-RAD, Richmond, CA, USA)에 200 mA로 2시간 동안 transfer하였다. 그리고 membrane의 blocking은 5% skim milk가 함유된 TBST (0.1% Tween20 + TBS) 용액에서 상온에서 2시간 동안 실시하였다. PBP2a의 발현 양을 검토했기 위한 항체로는 monoclonal mouse anti-PBP2a (1:1000) (DiNonA, Seoul, Korea)를 TBST 용액에

희석하여 상온에서 2시간 반응시킨 후 TBST로 3회 세정하였다. 2차 항체로는 HRP (horse radish peroxidase)가 결합된 anti-mouse IgG (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK)를 1:2000으로 희석하여 상온에서 1 시간 동안 반응시킨 후, TBST로 3회 세정하여 ECL 기질 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)과 반응 후 ImageQuant LAS 4000 Mini Biomolecular Imager (GE Healthcare)를 통해 확인하였다.

9) 통계분석

모든 실험은 3회 이상 반복으로 이루어졌으며, 실험결과를 각 항목에 따라 평균치±표준편차 (SEM)를 구하여 그 유의성은 Student's t-test 분석법을 이용하여 신뢰수준 95% (p < 0.05)에서 통계적 유의차를 평가하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 디스크 확산법 (Disc diffusion method)

MRSA에 대한 DHG의 항균활성을 확인하기 위하여 디스크 확산법을 이용해 확인한 결과, ATCC 33591에서는 DHG의 농도가 50 µg ~ 200 µg/ 20 µl에서는 항균활성이 일정 수준으로 미미하였으나, 400 µg/ 20 µl 이상에서 항균활성이 높게 나타나는 것을 확인하였다(Figure 1).

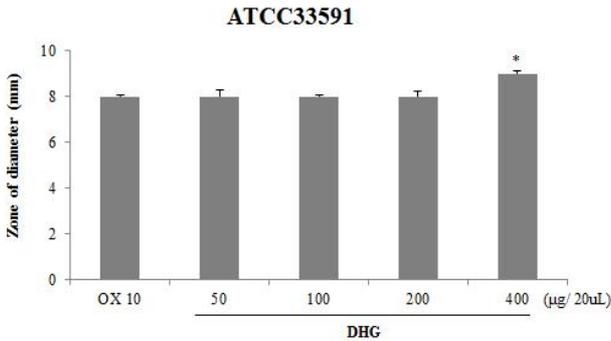


Figure 1. Diameter of inhibition zone (mm) of DHG against MRSA (ATCC 33591). *P<0.05 as compared to OX, were determined.

CCARM 3090에서는 DHG의 50 µg/ 20 µl의 농도에서는 항균활성이 미미하였으나, 농도가 100 µg/ 20 µl 이상에서 항균활성이 높게 나타내며, 농도 의존적으로 항균활성이 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Figure 2).

DPS-1에서는 DHG의 농도가 50 µg ~ 200 µg/ 20 µl 사이에서는 항균활성이 미미했으나 400 µg/ 20 µl에서는 항균활성이 크게 증가하는 것을 확인하였다(Figure 3).

2. 최소억제농도

(Minimum inhibitory concentration, MIC)

DHG의 항균활성을 최소억제농도(MIC)를 통해 확인한 결과, 실험에 사용한 MRSA 모든 균주에 대하여 500 ~ 2,000 µg/ml에서 균의 생장이 억제되는 것을 확인하였다(Table 3).

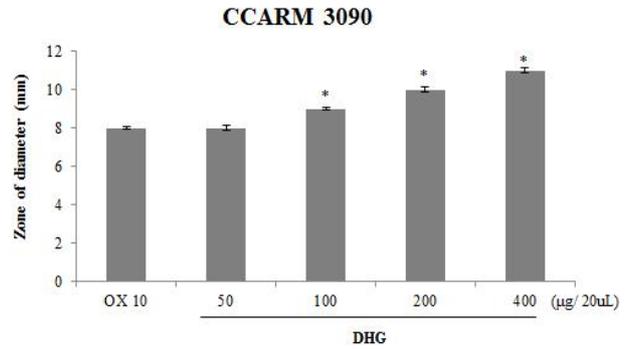


Figure 2. Diameter of inhibition zone (mm) of DHG against MRSA (CCARM 3090). *P<0.05 as compared to OX, were determined.

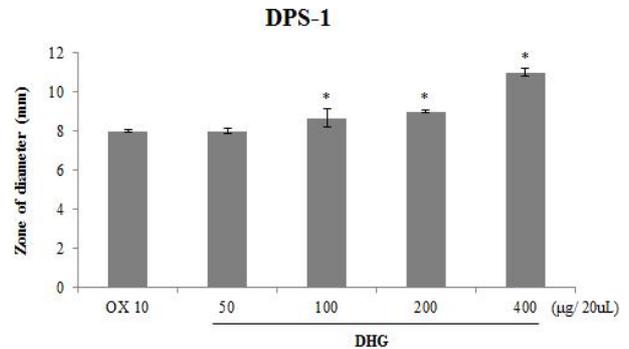


Figure 3. Diameter of inhibition zone (mm) of DHG against MRSA (DPS-1). *P<0.05 as compared to OX, were determined.

Table 3. The minimum inhibitory concentrations (MIC) of DHG against MRSA.

Strains	Type	MIC (µg/ml)		
		DHG	OX	GT
ATCC 33591	HA-MRSA	2000	500	62.5
CCARM 3090	HA-MRSA	1000	250	125
CCARM 3091	HA-MRSA	2000	2000	2000
CCARM 3095	HA-MRSA	1000	500	125
CCARM 3102	HA-MRSA	2000	500	500
DPS-1	HA-MRSA	1000	250	62.5
DPS-2	HA-MRSA	500	<0.97	62.5
DPS-3	HA-MRSA	2000	1000	1000

HA, hospital-acquired; DHG, *Daehwanggo*; OX, oxacillin; GT, gentamicin.

3. 약물병용효과 (Fractional inhibitory concentration index, FICI)

1) DHG와 oxacillin의 병용효과

DHG와 베타락탐계 (β-lactams) 항생제인 oxacillin (OX)을 병용한 결과, 모든 균주에 대하여 Partial synergy 효과 (0.5 ≤ FICI ≤ 0.75)를 나타냈다(Table 4).

2) DHG와 Gentamicin의 병용효과

DHG와 아미노글리코사이드계 (aminoglycoside) 항생제인 gentamicin (GT)을 병용한 결과, ATCC33591, CCARM 3090, DPS-3에서 synergy 효과 (FICI ≤ 0.5)가 나타났으며, 나머

지 균주에서도 partial synergy 효과 ($0.5 \leq FICI \leq 0.75$)를 나타냈다(Table 5).

Table 4. Results of the combination of DHG and oxacillin (OX) against MRSA.

Strains	Agent	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		FICI	Outcome
		Alone	Combination		
ATCC 33591	DHG	2000	1000	0,625	Partial S.
	OX	500	62,5		
CCARM 3090	DHG	1000	500	0,75	Partial S.
	OX	250	62,5		
CCARM 3102	DHG	2000	1000	0,625	Partial S.
	OX	500	62,5		
DPS-1	DHG	2000	1000	0,625	Partial S.
	OX	250	31,25		
DPS-3	DHG	2000	1000	0,625	Partial S.
	OX	1000	125		

The combination test was investigated using the checkerboard method. The fractional inhibitory concentration indices (FICI) were 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

Table 4. Results of the combination of DHG and oxacillin (OX) against MRSA.

Strains	Agent	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		FICI	Outcome
		Alone	Combination		
ATCC 33591	DHG	2000	250	0,375	Synergy
	GT	62,5	15,6		
CCARM 3090	DHG	1000	250	0,3125	Synergy
	GT	125	7,8		
CCARM 3091	DHG	2000	250	0,625	Partial S.
	GT	2000	1000		
CCARM 3095	DHG	1000	250	0,75	Partial S.
	GT	125	62,5		
CCARM 3102	DHG	2000	250	0,625	Partial S.
	GT	500	250		
DPS-1	DHG	2000	1000	0,625	Partial S.
	GT	62,5	7,8		
DPS-2	DHG	500	31,25	0,56	Partial S.
	GT	62,5	31,25		
DPS-3	DHG	2000	125	0,25	Synergy
	GT	1000	125		

The combination test was investigated using the checkerboard method. The fractional inhibitory concentration indices (FICI) were 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. Time-kill curve assay

DHG와 OX, GT를 sub-IC에서 단일 또는 병용하였을 때, MRSA의 성장곡선을 다음과 같이 나타냈다(Figure 4-7).

1) DHG + OX에서 ATCC 33591의 성장곡선

DHG와 OX의 1/2 또는 3/4 MIC를 단일 및 병용하여 ATCC 33591에 24시간동안 처리한 결과, OX와 DHG의 sub-IC와 비교할 때, DHG 1/2 + OX 1/2와 DHG 3/4 + OX 1/2에서 균의 증식이 억제된 것을 확인하였다(Figure 4).

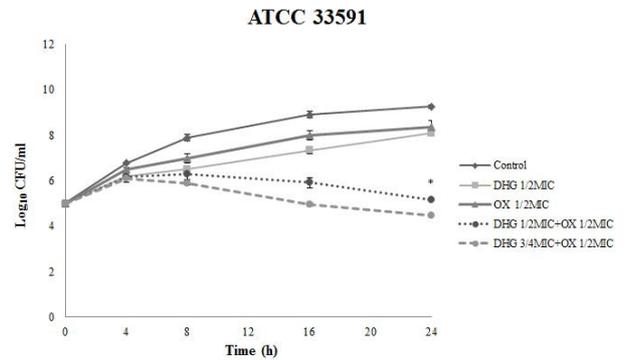


Figure 4. Growth curves for MRSA (ATCC 33591) in the single or combination of *Daehwanggo* ethanol extract (DHG) and oxacillin (OX). *P<0.05 as compared to OX alone, were determined.

2) DHG + GT에서 ATCC 33591과 CCARM 3102와 DPS-3의 성장곡선

DHG와 GT의 1/2 MIC를 단일 및 병용하여 ATCC 33591에 24시간동안 처리한 결과, GT와 DHG를 병용하였을 때 시간에 따라 균의 생장이 점점 억제되다가 24시간 경과 후 균이 완전히 사멸 하였다(Figure 5).

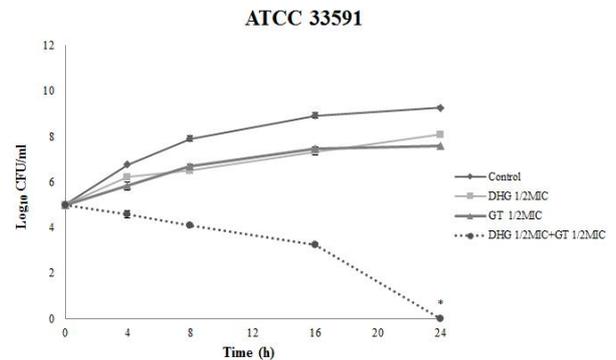


Figure 5. Growth curves for MRSA (ATCC 33591) in the single or combination of *Daehwanggo* ethanol extract (DHG) and gentamicin (GT). *P<0.05 as compared to GT alone, were determined.

DHG와 GT의 1/2 또는 3/4 MIC를 단일 및 병용하여 CCARM 3102에 24시간동안 처리한 결과, GT와 DHG의 sub-IC와 비교할 때 DHG 1/2 + GT 1/2와 DHG 3/4 + GT 1/2에서 균의 증식이 억제된 것을 확인하였다(Figure 6).

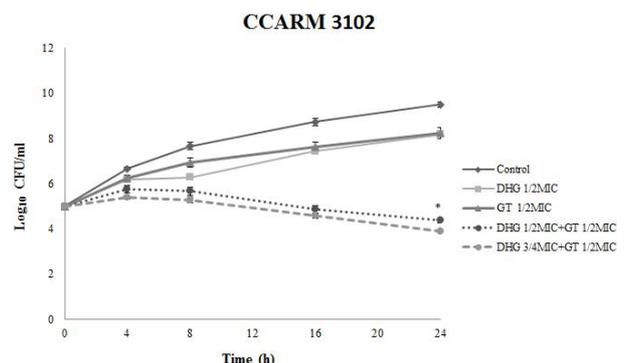


Figure 6. Growth curves for MRSA (CCARM) 3102 in the single or combination of *Daehwanggo* ethanol extract (DHG) and gentamicin (GT). *P<0.05 as compared to GT alone, were determined.

DHG와 GT의 1/2 MIC를 단일 및 병용하여 DPS-3에 24 시간동안 처리한 결과, GT와 DHG를 병용시 4시간이 경과할 때 까지는 균이 다소 증가했으나, 그 이후에는 균의 생장이 점점 억제되다가 24시간이 지났을 때에 균이 완전히 사멸하는 것을 확인하였다(Figure 7).

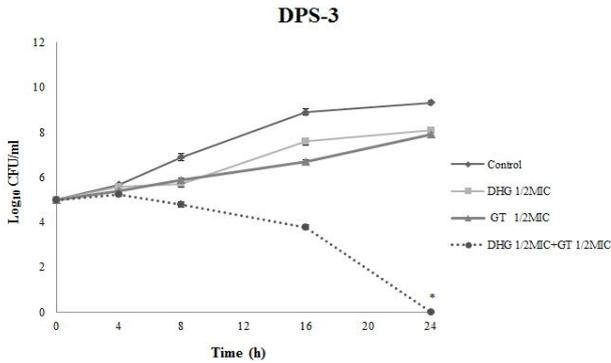


Figure 7. Growth curves for MRSA (DPS-3) in the single or combination of *Daehwanggo* ethanol extract (DHG) and gentamicin (GT). *P<0.05 as compared to GT alone, were determined.

5. DHG와 막 투과성 증진제와의 병용효과

DHG가 MRSA의 막 투과성에 미치는 영향을 확인하기 위해, 균에 막 투과성 증진제인 TX-100과 DHG를 단독 또는 병용 투여 한 결과, 0.0001%의 TX-100을 단독으로 처리하였을 때에는 균의 생장의 억제정도가 낮았으나, DHG와 병용 하였을 때는 균의 성장억제가 크게 증가된 것을 확인할 수 있었다(Figure 8).

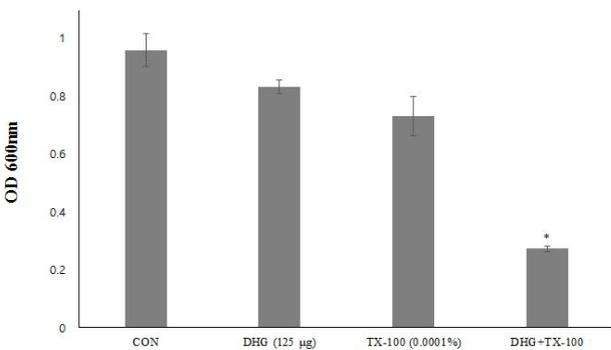


Figure 8. Effect of the membrane-permeabilizing agent TX-100 on the susceptibility of MRSA (ATCC 33591) to DHG. The viability of bacteria was determined spectrophotometrically (optical density at 600 nm, OD600) after incubation for 24 h with 125 µg/ml DHG and 0.0001% TX-100. The data are average of triple-independent experiments. *p < 0.05 compared to control alone.

6. RT-PCR 분석

DHG가 MRSA의 항생제 내성 유전자에 미치는 영향을 보기 위해 RT-PCR을 수행한 결과, oxacillin을 단독으로 처리한 균주에서는 *mecA*, *mecI*, *blaZ*, *blaI*의 발현이 대조군과 비교하여 증가하였으나, DHG (500~1,000 µg/ml)를 병용처리 하였을 때, 유전자의 발현이 모두 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 9-10).

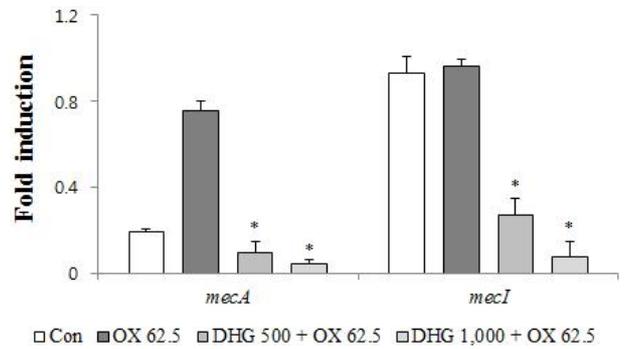
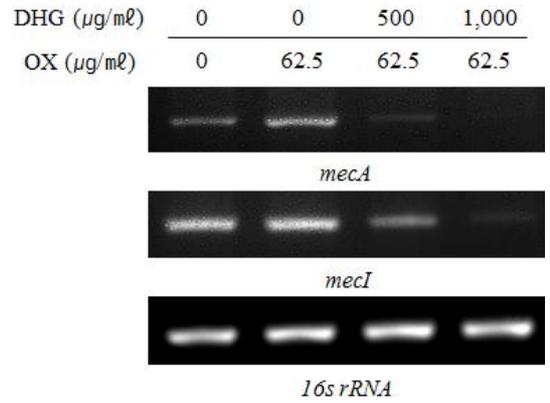


Figure 9. The gene expression related to PBP2a. PCR showing the expression of *mecA* and *mecI* of MRSA exposed to DHG of various concentrations in combination with 62.5 µg/ml oxacillin. 16s rRNA was used as loading control. The data are mean ± S.D. for triple-independent experiments. *P<0.05 as compared to OX alone, were determined.

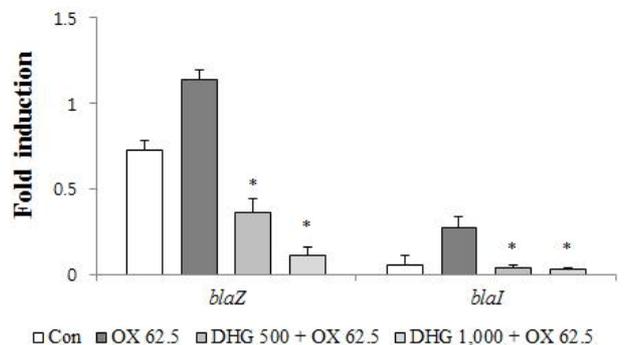
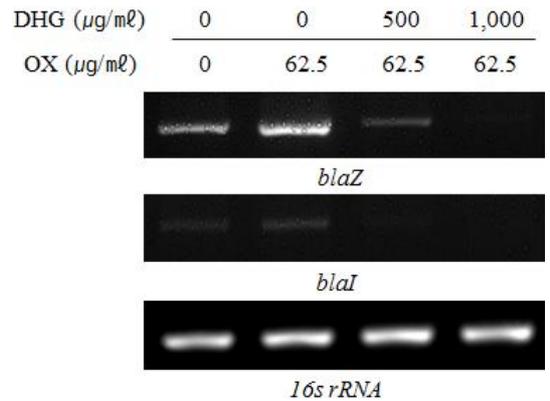


Figure 10. The gene expression related to β-lactamase. PCR showing the expression of *blaZ* and *blaI* of MRSA exposed to DHG of various concentrations in combination with 62.5 µg/ml oxacillin. 16s rRNA was used as loading control. The data are mean ± S.D. for triple-independent experiments. *P<0.05 as compared to OX alone, were determined.

7. Western blot 분석

DHG가 MRSA의 항생제 내성에 관여하는 protein에 미치는 영향을 보기 위해 Western blot을 수행한 결과, DHG (500 ~ 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)와 oxacillin (62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 병용처리 하였을 때 PBP2a의 발현이 크게 감소하는 것을 확인하였다 (Figure 11).

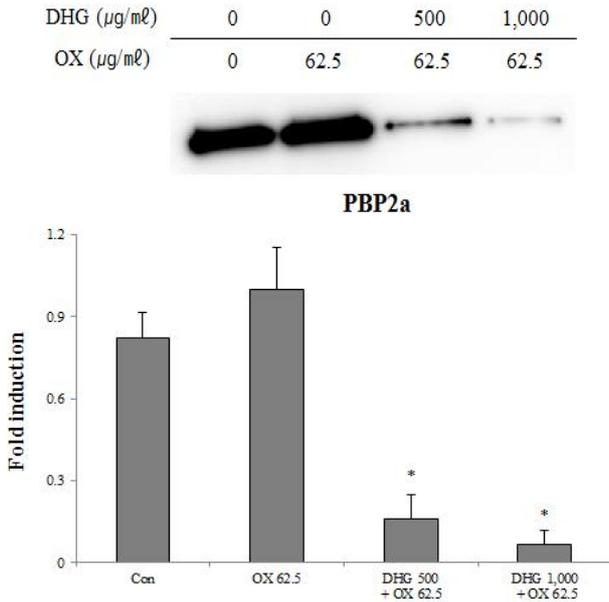


Figure 11. The effect of DHG on PBP2a production in MRSA. MRSA were treated with DHG of various concentrations in combination with 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ oxacillin. The data are mean \pm S.D. for triple-independent experiments. *P<0.05 as compared to OX alone, were determined.

IV. 고찰

MRSA에 의한 감염 질병은 다양한 항생제에 대한 내성을 가지고 있기 때문에 그 치료가 매우 어렵고, 전 세계적으로 심각한 문제로 대두되고 있다. 항생제의 내성과 부작용 문제로 MRSA와 같은 다제내성균이 증가하면서 이로 인한 감염이 환자의 사망률과도 직결되었고, MRSA에 선택적이고, 치료 성공률이 높은 항균제의 개발이 시급해졌다. 현재 MRSA의 내성기전에 대해서는 완벽히 규명된 것은 아니지만, 항생제에 따라 여러 기전이 보고되어 있으며, 밝혀진 내성기전에는 β -lactamase를 통한 항생제 분해와, PBP2a 등의 생산을 통한 표적 물질의 변화, Efflux pump를 통한 세포외로의 항생제 유출 등의 기전이 밝혀진바 있으며, 세균은 여러 가지 내성 기전이 복합적으로 작용하여 항생제에 내성을 가지게 된다.²⁵⁻²⁷⁾

최근에는 이와 같은 내성기전을 극복하기 위한 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 그 중에서 식물 또는 동물에서 유래하는 천연물에 대한 연구가 각광받고 있다. 이러한 연구는 해당 천연물을 그대로 이용하거나 천연성분을 분리함으로써 기존 항생제를 대체할 수 있는 새로운 항생물질 및 이를 보조할 수 있는 보조물질을 찾는 것이 주요 목적이다.²⁸⁻³¹⁾

본 실험은 DHG의 MRSA에 대한 항균활성 및 상용 항생제와의 상승작용과 시간에 따른 성장억제 효과, 세포막 투과도 변화와 에너지대사에서의 작용기작을 조사하였다. 大黃, 當歸,

黃柏 세 약물로 이루어진 DHG는 디스크 확산법을 통해 MRSA ATCC 33591, CCARM 3090, DPS-1에서 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g}/20\mu\text{l}$ 에서 기존항생제인 OX 10 $\mu\text{g}/20\mu\text{l}$ 와 비교하여 항균효과가 있음을 확인할 수 있었고, 또한 MRSA 표준균주와 임상균주를 포함한 8균주에서 최소억제농도가 500~2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 가 되는 것을 확인하였다. DHG를 기존 항생제 중 베타 락탐계 항생제인 OX와 아미노글리코사이드계 항생제인 GT와 병용하여 시너지효과를 측정 한 결과, 대부분의 균주에 대하여 상승효과를 나타내었으며, DHG와 항생제 OX, GT를 병용하여 MRSA의 성장곡선을 분석한 결과, 표준균주 및 임상균주에서 눈에 띄게 MRSA의 생장이 억제된 것을 확인하였다. 이는 DHG가 MRSA에 대하여 항균효과 뿐 아니라, 항생제의 내성을 낮추어줄 수 있는 항균보조제로써의 가능성을 보여주는 것이라고 할 수 있다. DHG의 MRSA 막 투과성을 살펴보기 위해 TX-100과 DHG를 개별, 또는 병용투여 했을 때의 결과는 각각 투여하였을 때는 균의 성장억제 정도가 미미하였으나, DHG와 TX-100의 병용투여에서는 균의 성장억제 정도가 개별 투여했을 때보다 현저히 증가됨을 확인할 수 있었다. RT-PCR을 이용해 항생제 내에서 관련 유전자의 발현정도에 대한 실험에서는 *mecA*와 *mecI*의 발현정도를 확인한 결과 OX를 단독 처리하였을 때는 *mecA*와 *mecI*의 발현이 증가되었으나, DHG를 병용 처리하였을 때는 유전자의 발현이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 마찬가지로 *blaZ*와 *blaI*에서도 옥사실린을 처리하였을 때는 유전자 발현이 증가되었으나, DHG를 같이 처리했을 때 유전자 발현이 억제되는 것을 확인하였다. Western blot분석을 통해 DHG (500 ~ 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)와 OX (62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 병용처리 하였을 때 PBP2a 발현이 크게 줄어드는 것을 확인하였다.

이를 통해 DHG가 MRSA에 대한 항균효과 및 Oxacillin이나 Gentamicin과 같은 항생제와 상승효과가 나타나는 것은 DHG가 MRSA의 세포벽에 영향을 줌으로써, 세포벽에 위치한 sensor-inducer 단백질에 영향을 주고 이는 균의 내성기전을 억제시켜, 결과적으로 항생제에 대한 감수성을 높여줌으로써 이와 같은 효과가 나타나는 것으로 추측한다.

위 실험들로 보아 大黃膏 에탄올 추출물에는 MRSA의 성장을 억제할 수 있는 항균효과가 있음을 확인하였고, 또한 기존 항생제와 병용하였을 때 약물 상승효과와 시간에 따른 균의 성장억제 및 기전실험을 통한 항균효과 확인으로 항생제 후보 물질 중 하나로 충분한 가치가 있음을 확인할 수 있었으며, 더 나아가 기존 항생제와 병용 사용할 수 있는 후보물질이 될 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

DHG의 MRSA에 대한 항균활성을 측정한 결과는 다음과 같다.

1. DHG 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g}/20\mu\text{l}$ 에서 디스크 확산법을 통해 MRSA (ATCC 33591, CCARM 3095, DPS-1) 균주에서 8~14 mm의 clear zone을 형성했다.

2. MRSA에 대한 DHG의 최소억제농도는 (MIC)는 500 ~ 2,000 $\mu\text{g/ml}$ 이었다.
3. DHG와 항생제 oxacillin 및 gentamicin의 병용결과, synergy 및 partial synergy를 나타냈다.
4. DHG와 TX-100의 병용투여를 통해 DHG가 막 투과성을 영향을 주어 균의 성장을 억제시키는 것을 확인하였다.
5. DHG와 oxacillin을 병용 처리하였을 때, *mecA*, *mecI*, *blaZ*, *blaI* 유전자 발현이 모두 감소하였다.
6. DHG와 oxacillin을 병용 처리하였을 때, 내성 단백질인 PBP2a의 발현이 크게 감소하였다.

이상 실험 결과를 통해, 大黃耆의 에탄올 추출물이 MRSA에 항균효과가 있다는 것을 확인하였고, 항생제와의 병용실험 및 time-kill을 통해 두 약물 사이에 상승효과가 있음을 확인하였으며, 세포막 투과도 측정 및 PCR, Western blot을 통해 大黃耆의 에탄올 추출물이 MRSA의 내성기전을 억제하여 항균활성을 나타낸다는 것을 확인할 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 한국연구재단의 이공분야기초연구사업(NRF-2016R1D1A1B03934552)과 2017년도 정부[미래창조과학부]의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(No. 2017-0062484)의 지원에 의해 수행된 결과로 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Foster TJ. The Staphylococcus aureus "superbug". J Clin Invest. 2004 ;114(12):1693-1696.
2. Meziane-Cherif D, Saul FA, Moubareck C, Weber P, Haouz A, Courvalin P, Périchon B. Molecular basis of vancomycin dependence in VanA-type Staphylococcus aureus VRSA-9. J Bacteriol. 2010;192(20):5465-5471.
3. Nishi H, Komatsuzawa H, Fujiwara T, McCallum N, Sugai M. Reduced content of lysyl-phosphatidylglycerol in the cytoplasmic membrane affects susceptibility to moenomycin, as well as vancomycin, gentamicin, and antimicrobial peptides, in Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48(12):4800-4807.
4. Fishovitz J, Hermoso JA, Chang M, Mobashery S. Penicillin-binding protein 2a of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. IUBMB Life. 2014;66(8):572-577.
5. Bhattacharya PK. Emergence of antibiotic-resistant bacterial strains, Methicillin-resistant Staphylococcus aureus, extended spectrum beta lactamases, and multi-drug resistance is a problem similar to global warming. Rev Soc Bras Med Trop. 2014;47(6):815-816.
6. Najar-Peerayeh S, Jazayeri Moghadas A, Behmanesh M. Antibiotic Susceptibility and mecA Frequency in Staphylococcus epidermidis, Isolated From Intensive Care Unit Patients. Jundishapur J Microbiol. 2014;7(8):e11188.
7. Aedo S, Tomasz A. Role of the Stringent Stress Response in the Antibiotic Resistance Phenotype of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother. 2016;60(4):2311-2317.
8. Pence MA, Haste NM, Meharena HS, Olson J, Gallo RL, Nizet V, Kristian SA. Beta-Lactamase Repressor BlaI Modulates Staphylococcus aureus Cathelicidin Antimicrobial Peptide Resistance and Virulence. PLoS One. 2015;10(8):e0136605.
9. Gregory PD, Lewis RA, Curnock SP, Dyke KG. Studies of the repressor (BlaI) of beta-lactamase synthesis in Staphylococcus aureus. Mol Microbiol. 1997;24(5):1025-1037.
10. Khodabakhsh P, Shafaroodi H, Asgarpanah J. Analgesic and anti-inflammatory activities of Citrus aurantium L. blossoms essential oil (neroli): involvement of the nitric oxide/cyclic-guanosine monophosphate pathway. J Nat Med. 2015;69(3):324-331.
11. Azanchi T, Shafaroodi H, Asgarpanah J. Anticonvulsant activity of Citrus aurantium blossom essential oil (neroli): involvement of the GABAergic system. Nat Prod Commun. 2014;9(11):1615-1618.
12. Lu D, Xia Y, Tong B, Zhang C, Pan R, Xu H, Yang X, Dai Y. In vitro anti-angiogenesis effects and active constituents of the saponin fraction from Gleditsia sinensis. Integr Cancer Ther. 2014;13(5):446-457.
13. Zhou L, Li D, Jiang W, Qin Z, Zhao S, Qiu M, Wu J. Two ellagic acid glycosides from Gleditsia sinensis Lam. with antifungal activity on Magnaporthe grisea. Nat Prod Res. 2007;21(4):303-309.
14. Ahn YJ, Lee CO, Kweon JH, Ahn JW, Park JH. Growth-inhibitory effects of Galla Rhois-derived tannins on intestinal bacteria. J Appl Microbiol. 1998;84(3):439-443.
15. An RB, Oh H, Kim YC. Phenolic constituents of galla Rhois with hepatoprotective effects on tacrine- and nitrofurantoin-induced cytotoxicity in Hep G2 cells. Biol Pharm Bull. 2005;28(11):2155-2157.
16. Lee JJ, Cho WK, Kwon H, Gu M, Ma JY. Galla

- rhois exerts its antiplatelet effect by suppressing ERK1/2 and PLC β phosphorylation. *Food Chem Toxicol*. 2014;69:94–101.
17. Veljic M, Tarbuk M, Marin PD, Ciric A, Sokovic M, Marin M. Antimicrobial activity of methanol extracts of mosses from Serbia. *Pharm Biol*. 2008;46:871–875.
 18. 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.
 19. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standards. CLSI document M7–A5. Wayne, PA: CLSI, 2000.
 20. Mun SH, Kang OH, Joung DK, Kim SB, Seo YS, Choi JG, Lee YS, Cha SW, Ahn YS, Han SH, Kwon DY. Combination Therapy of Sophoraflavanone B against MRSA: In Vitro Synergy Testing. *Foodborne Pathog Dis*. 2014;11(3):234–239.
 21. Mun SH, Kang OH, Joung DK, Kim SB, Choi JG, Shin DW, Kwon DY. In vitro anti-MRSA activity of carvone with gentamicin. *Exp Ther Med*. 2014;7(4): 891–896.
 22. Mun SH, Joung DK, Kim YS, Kang OH, Kim SB, Seo YS, Kim YC, Lee DS, Shin DW, Kweon KT, Kwon DY. Synergistic antibacterial effect of curcumin against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytomedicine*. 2013;20(8–9):714–718.
 23. Mun SH, Lee YS, Han SH, Lee SW, Cha SW, Kim SB, Seo YS, Kong R, Kang DH, Shin DW, Kang OH, Kwon DY. In vitro Potential Effect of Morin in the Combination with β -Lactam Antibiotics Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Foodborne Pathog Dis*. 2015;12(6):545–550.
 24. Santiago C, Pang EL, Lim KH, Loh HS, Ting KN. Reversal of ampicillin resistance in MRSA via inhibition of penicillin-binding protein 2a by *Acalypha wilkesiana*. *Biomed Res Int*. 2014;2014:965348.
 25. Otto CC, Cunningham TM, Hansen MR and Haydel SE. Effects of antibacterial mineral leachates on the cellular ultrastructure, morphology, and membrane integrity of *Escherichia coli* and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob*. 2010;9:26.
 26. Greninger AL, Chatterjee SS, Chan LC, Hamilton SM, Chambers HF, Chiu CY. Whole-Genome Sequencing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Resistant to Fifth-Generation Cephalosporins Reveals Potential Non-mecA Mechanisms of Resistance. *PLoS One*. 2016;11(2):e0149541.
 27. Al-Habib A, Al-Saleh E, Safer AM and Afzal M. Bactericidal effect of grape seed extract on Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA). *J. Toxicol. Sci*. 2010;35:357–364.
 28. 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.
 29. 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):1057–1060.
 30. Ettfagh 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):835–840.
 31. 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):109–114.