

대황목단탕의 메티실린 내성 황색 포도상구균에 대한 항균활성

한형선, 권동렬*, 강옥화*

원광대학교 약학대학 한약학과, 원광한약연구소

The Antimicrobial Activity of *Daehwangmokdan-tang* against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Han Hyoung-Sun, Dong-Yeul Kwon* and Ok-Hwa Kang*

Department of Oriental Pharmacy, College of Pharmacy,
Wonkwang University, Wonkwang Oriental Medicines Research Institute, Iksan, Jeonbuk, 54538, Republic of Korea

ABSTRACT

Objective : Infectious diseases are a growing problem worldwide by Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Daehwangmokdan-tang* is one of the oriental medicine prescriptions contained in Principles and Practice of Eastern Medicine. This study investigated the antibacterial activity of EtOH 70% extracts of *Daehwangmokdan-tang* (DMT) which prescription is composed of oriental medicine against MRSA.

Methods : The antimicrobial activity and active concentration of MRSA were verified by measuring the minimum inhibitory concentration (MIC) of DMT. In addition, the effects of the disease were checked by treating the existing antibiotics and large ethanol extract in parallel, and the extent of growth suppression was checked over time. In addition, cell membrane permeability experiment confirmed the effect of large DMT on the immunity mechanism of MRSA.

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

Conclusion : Basis on the result, we speculate that DMT may be useful for the treatment of MRSA infections when used in combination with β -lactam antibiotic.

Key words : *Daehwangmokdan-tang* (DMT), Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), Antimicrobial, Synergistic effect

I. 서 론

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)는 유럽을 포함하여 전 세계적으로도 가장 문제가 되는 hospital-acquired infection 병원체이다.¹⁾ Methicillin에 내성을 보이는 메티실린 내성 황색포도상구균 (MRSA: methicillin resistant staphylococcus aureus)이 보고된 이후, 1980년대부터 변종

*S. aureus*인 MRSA에 대하여 glycopeptide계 약물인 vancomycin, teicoplanin, daptomycin 등 기존의 PC계열과 다른 기작을 가지고 있는 abiotics를 1차로 사용하거나 새롭게 개발된 여러 항생제를 사용했으나 계속해서 내성을 가진 세균의 출현비율이 나날이 증가하면서 임상 의학적으로 심각한 문제로 제기되고 있다.²⁾ 최근에는 병원 감염관리 활동을 MRSA에 의한 병원감염은 줄고 있는 추세이지만, 지역사회에서의 MRSA 감염

*Corresponding author : Ok-Hwa Kang and Dong-Yeul Kwon, PhD Department of Oriental Pharmacy, College of Pharmacy and Wonkwang Oriental Medicines Research Institute, Wonkwang University, Iksan 54538, Jeonbuk, Korea.

· Tel : +82-63-850-6802 · Mobile : +82-10-4658-9188 · E-mail : sssimi@wku.ac.kr, okey@wku.ac.kr

· Received : 09 April 2020 · Revised : 20 May 2020 · Accepted : 25 May 2020

은 지속적으로 증가되고 있는 실정이다.³⁾

MRSA는 methicillin에만 내성을 보이는 것이 아니고, 대부분의 항생제에 강한 내성을 가지고 있다. 항생제의 사용이 많아지면서 병원균들도 내성을 갖는 다양한 변종 균이 생겨나기 시작했기 때문이다. 특히 MRSA는 대부분의 항생제에 내성을 보여 극히 제한된 항생제로만 치료가 가능한 병원균이다.⁴⁾

β -lactam antibiotics를 MRSA에 노출시키면 세포외벽에 위치한 *BlaR1*가 이를 감지하여 세포내 전달과정을 통하여 *BlaZ*의 전사를 유도하여 β -lactamase가 생산된다.⁴⁾ β -lactamase는 *S. aureus*의 세포벽 합성을 담당하고 있는 PBP의 활성을 방해하는 작용을 가지고 있어 β -lactam antibiotics의 β -lactam Ring을 가수분해함으로써 transpeptidase 효소의 활성부위에 β -lactam Ring이 부착하지 못하도록 하여 내성을 획득하게 되는데 이러한 과정을 거쳐 *S. aureus*는 세포벽 생합성이 정상적으로 이루어지게 되면서 황색포도상구균은 MRSA가 된다.⁴⁾

전통적으로 오랜 시간 사용해오면서 약효를 보였던 식물 또는 동물 등 천연물질속에는 다양한 생리 활성물질을 함유하고 있어 발전된 연구기법을 활용하여 새로운 의약품으로 개발하여 활용할 수 있는 경우가 많다. 최근에는 MRSA와 같은 세균의 내성문제를 극복하기 위한 방법으로도 천연물질속에서 항균 작용 및 병원성 독소를 해독하는 효능을 가지는 물질을 찾아 내 합성항생제와 병용 투여하여 상승효과를 가지는 적정량을 알아냄으로써, 합성항생제의 사용량을 줄여 내성문제를 해결하려는 많은 연구가 이루어지고 있다.⁵⁻⁸⁾ 특히, 다양한 기전을 가지고 있는 천연생약을 조합하여 전통적으로 사용해온 한의학 처방 중에는 기존에 알고 있던 것보다 더 많은 생리활성작용이 인정되거나 많은 효능과 활용가치가 보고되고 있어 연구가치가 매우 높은 자원으로 평가 받고 있다.⁹⁾

이번 연구에 사용된 대황목단탕 (大黃牡丹湯·DMT)은 金匱要略·瘡癰腸癰浸淫脈證并治編에 수록된 처방약으로 동과자, 대황, 목단피, 도인, 망초가 방제구성을 이루고 있으며, 腸癰을 치료하는 대표적 방제이다.¹⁰⁾ 腸癰은 초기에 濕熱鬱蒸이 있고, 氣血이 응집하여 장의 경락이 엉켜서 생긴다. 이처럼 장운은 장내에 鬱結되어 瘀熱이 생겨나 消散되지 못하여 생겨난 것으로, DMT는 瀉熱破瘀하여 散結消腫의 효능을 가지고 있다.¹¹⁾ 방제 중에 대황은 苦寒하고 攻下하여 濕熱鬱結을 배설하고, 장 속에 쌓인 瘀血을 없앤다. 도인은 苦平하여 성질이 파열하기 좋아 하고 대황과 배합하여 장 속에 쌓인 어혈을 깨고 열을 내려 혈액의 상태를 개선 한다. 이 두 약제를 君藥으로 삼고, 단단한 것을 부드럽게 하고 맺힌 것을 풀어놓는 작용을 가진 망초, 血熱을 식혀주고 瘀血작용을 가지고 腫脹을 없애는 목단피를 臣藥으로 하고 있다. 여기에 장을 맑게 하고 利濕作用을 하며 排膿散結의 효능이 있는 동과자 등을 배합하여, 장 속의 濕熱과 瘀血을 없애 장 속의 용종과 선종 등 腸癰을 스스로 낫게한다.¹¹⁾

이와 같이 DMT를 구성하고 있는 대황, 목단피, 도인에서 부분적인 항균·항염작용 등의 약리작용이 보고된 적은 있으나, 여러 가지 약제를 혼합하여 처방된 DMT에 대한 항균활성과 해독작용 등에 관한 연구는 아직까지 보고된 적이 없다. 따라서, DMT가 합성항생제의 사용량을 줄여 내성을 극복 할 수 있는 소재인지를 확인해 보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. DMT의 제조

본 실험에 사용된 약재는 백제허브 (한국)에서 구입하여 권동렬 교수가 감정하여 사용하였다. 동과자 20 g, 대황 8 g, 목단피 6 g, 도인 6 g, 망초 4 g을 70% ethanol 500 ml로 추출하여 감압농축, 동결건조의 과정을 거쳐 12.0%의 수득율을 얻었다 (Table 1).

Table 1. The Composition of Daehwangmokdan-tang.

Herb name	Parmacognostic name	Weight (g)
冬瓜子	Benincasae Semen	20g
大黃	Rhei Radix et Rhizma	8g
牡丹皮	Moutan Cortex Radicis	6g
桃仁	Persicae Semen	4g
芒硝	Natrii Sulfas	4g

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 실험에서는 8가지 MRSA 균주가 사용되었다. 사용된 균주인 ATCC 25923, 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-2는 원광대학교 병원 성형외과 (Department of plastic surgery, DPS)로부터 분양받아 실험에 사용하였다. 균주는 -80℃ 냉동고에서 30% glycerol에 보관 되었고, Mueller-Hinton agar (MHA) 또는 Trypsin-Soy agar (TSA)에 접종한 후 37℃ 항온기에서 24시간 배양하여 실험에 사용하였다.

4. 최소억제농도

(Minimum inhibitory concentration, MIC)

최소억제농도 (MIC)는 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2000)의 방법인 액체배지 희석법에 따라 측정하였다. DMT를 액체배지에 농도별로 희석한 후, 탁도 0.5 McFarland standard를 기준으로 10 μ l씩 접종하여 final bacterial concentration 1.5×10^5 CFU/well이 되게 하였다. 다음으로 37℃ 항온기에서 24시간 배양 후, 각각의 MIC는 DMT 단독투여 또는 Gentamicin (GEN) 과의 병용투여를 통해 미생물이 증식되지 않는 가장 낮은 약물의 농도로 측정되었다.

5. 약물병용효과 (Fractional inhibitory concentration index, FICI)

DMT와 항생제와의 병용효과를 확인하기 위한 fractional inhibitory concentration index (FICI)를 측정하기 위해 checkerboard dilution test를 실시하였다. DMT와 GT는 1:1 비율로 약물처리 하였고, 실험방법은 앞서 시행한 액체배지 희석법과 동일하게 시행하였다. FICI 산출 공식은 다음과 같다.

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

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.

6. Time-kill curve assay

DMT 단독투여 또는 GEN와 병용했을 때 MRSA의 증식 변화를 보기 위해 타임킬 분석법을 시행하였다. MRSA는 24시간 배양 후, 최종적으로 탁도를 1.5 X 10⁵ CFU/ml로 맞추었고 0, 4, 8, 16, 24 시간 별로, 약물투여 농도는 MHB에 균만 접종한 Control, DMT 1/2 MIC와 GEN 1/2 단독투여군, DMT 1/2 MIC와 GT 1/2 MIC 병용투여군으로 나누어 진행하였다. Colony counts는 37°C incubator에서 24시간의 간격을 두고 30 ~ 300 colonies를 측정하였다.

7. Membrane permeability inhibition

DMT의 membrane permeability 증진과 MRSA의 성장 억제를 알아보기 위해 *S. aureus*의 membrane permeability를 증진시키는 Detergent인 TX-100 단독투여와 DMT 단독투여, TX-100과 DMT의 병용투여를 비교하였다.

8. Metabolic inhibition

DMT의 Energy 대사 연관성 유무를 알아보기 위하여, ATPase inhibitor로써 사용되는 DCCD 단독투여와 DMT 단독투여, DCCD와 DMT의 병용투여를 비교하였다.

9. 통계분석

모든 실험은 3회 이상 반복으로 이루어졌으며, 실험결과는 각 항목에 따라 평균치 ± 표준편차 (SD)를 구하여 그 유의성은 GraphPad Prism 분석법을 이용하여 신뢰수준 95% (p < 0.05)에서 통계적 유의차를 평가하였다.

III. 결 과

1. DMT와 그 구성 약제의 MIC

DMT와 그 구성 약제인 대황, 목단피, 망초, 도인, 동과자의 MRSA 균주에서 항균활성을 비교하였다. 그 결과, 대황과 DMT에서만 항균활성이 측정되었고 나머지 약제에서는 MIC가 5,000 이상으로 항균활성이 나타나지 않았다 (Table 2).

Table 2. The Antimicrobial Activity of Benincasae Semen, Rhei Radix et Rhizoma, Moutan Cortex Radicis, Persicae Semen, Natrii Sulfas and DMT against MRSA.

Drug	MIC (µg/ml)		
	ATCC 33591	CCARM 3090	DPS-1
Benincasae Semen	> 5,000	> 5,000	> 5,000
Rhei Radix et Rhizma	312.5	312.5	625
Moutan Cortex Radicis	> 5,000	> 5,000	> 5,000
Persicae Semen	> 5,000	> 5,000	> 5,000
Natrii Sulfas	> 5,000	> 5,000	> 5,000
DMT	2,000	500	2,000

2. DMT의 항균활성

DMT 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).

Table 3. The antimicrobial activity of Oxacillin (OX), Ampicillin (AM), Gentamicin (GEN), DMT against MRSA.

Strains	MIC (µg/ml)			
	OX	AM	GEN	DMT
ATCC 25923	< 0.9	< 0.9	< 0.9	500
ATCC 33591	500	125	3.9	2000
CCARM 3090	250	31.2	62.5	500
CCARM 3091	2000	62.5	2000	2000
CCARM 3095	500	31.2	125	1000
CCARM 3102	500	125	500	2000
DPS-1	250	62.5	125	2000
DPS-2	< 0.9	1.9	62.5	200

OX, oxacillin; GEN, gentamicin; AM, Ampicillin; DMT, Daehwangmokdan-tang

3. DMT와 Gentamicin (GEN)과의 약물병용효과 (Fractional inhibitory concentration index, FICI)

DMT와 아미노글리코사이드계 (aminoglycoside) 항생제인 GEN을 병용한 결과, DPS-2에서 synergy 효과 (FICI ≤ 0.5)가 나타났으며, 나머지 균주에서도 partial synergy 효과 (0.5 ≤ FICI ≤ 0.75)를 나타냈다 (Table 4).

Table 4. Results of the Combination of DMT and GEN against MRSA.

Strains	Agent	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		FICI	Outcome
		Alone	Combination		
ATCC 33591	DMT	2000	250	0.63	Partial S.
	GEN	7.8	3.9		
CCARM 3090	DMT	500	250	0.53	Partial S.
	GEN	62.5	1.9		
CCARM 3091	DMT	2000	1000	0.63	Partial S.
	GEN	2000	62.5		
CCARM 3095	DMT	1000	500	0.53	Partial S.
	GEN	125	3.9		
CCARM 3102	DMT	2000	500	0.53	Partial S.
	GEN	500	15.6		
DPS-1	DMT	2000	1000	0.53	Partial S.
	GEN	125	3.9		
DPS-2	DMT	1000	250	0.5	Synergy
	GEN	125	15.6		

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

1) DMT와 GEN 병용투여에 의한 ATCC 33591균주의 성장곡선

MRSA 균주에서 DMT와 GEN의 상승효과를 알아보기 위해 time-kill curve assay를 수행하였다. 표준균주 ATCC 33591 균주의 성장 곡선은 DMT 1/2 MIC와 GEN 1/2 MIC를 단일

및 병용하여 ATCC 33591에 24시간동안 처리한 결과, 배양 4 시간 후 부터 MRSA의 생장이 감소하기 시작하였다 (Figure 1).

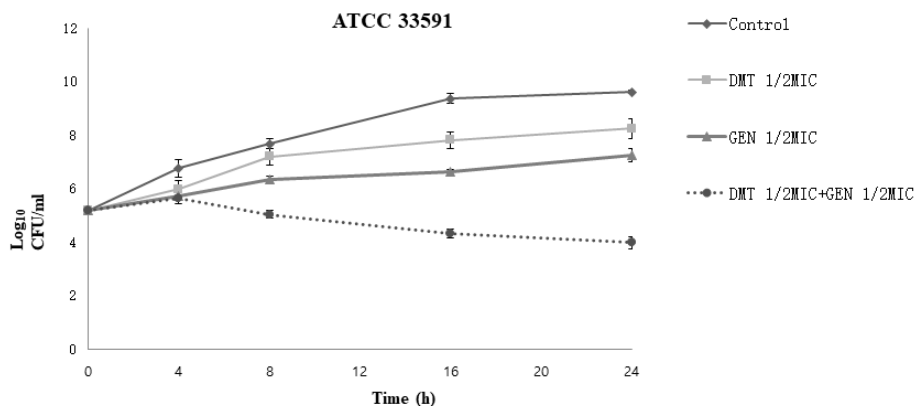


Figure 1. Time-kill curve of sub-inhibitory concentrations of GEN alone, DMT alone, and GEN and DMT in combination against ATCC 33591. The untreated sample was used as the control. The time-kill assay was performed three times and the data represent the mean \pm standard deviation; CFU, colony-forming units; MIC, minimum inhibitory concentration.

2) DMT와 GEN 병용투여에 의한 임상균주 (DPS-1, DPS-2)의 성장곡선

임상균주 DPS-1과 DPS-2 균주에서 DMT와 GEN의 상승

효과를 알아보기 위해 time-kill curve assay를 수행하였다.

DPS-1균주는 DMT 1/2 MIC와 GEN 1/2 MIC를 단일 및 병용하여 배양 8시간 후부터 균 생장에 변화를 보이기 시작하면서 항균활성을 보였다. 또한 DPS-2균주는 배양하기 시작하면서

부터 균 성장을 억제하여 24시간에는 control과 가장 큰 차이를 나타냈다 (Figure 2).

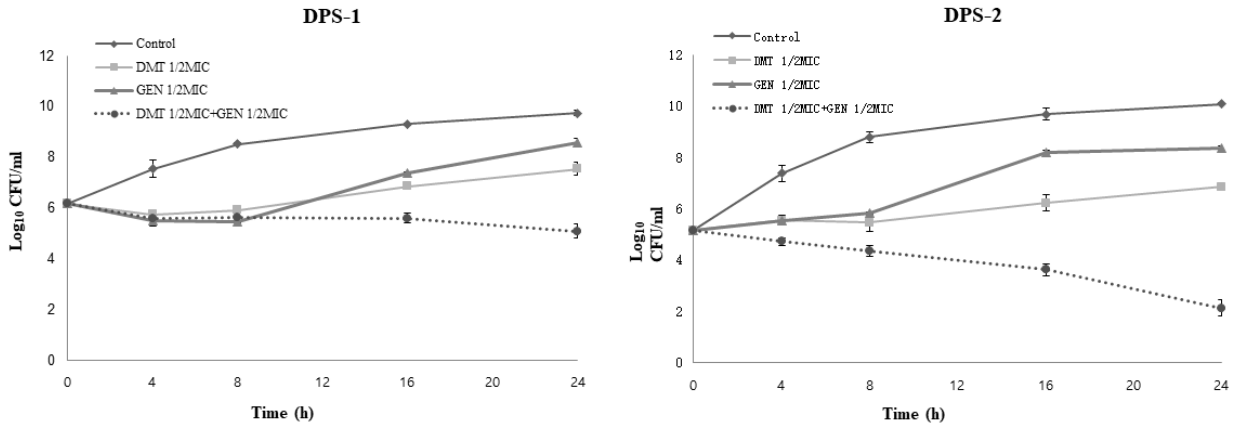


Figure 2. Time-kill curve of sub-inhibitory concentrations of GEN alone, DMT alone, and GEN and DMT in combination against DPS-1(left) and DPS-2 (right). The time-kill assay was performed three times and the data represent the mean \pm standard deviation; CFU, colony-forming units; MIC, minimum inhibitory concentration.

3) DMT와 GEN 병용투여에 의한 임상균주 (CCARM 3090, 3091, 3095, 3102)의 성장곡선

임상균주 CCARM 3090, 3091, 3095, 3102 균주에서 DMT와 GEN의 상승효과를 알아보기 위해 time-kill curve assay를 수행하였다. CCARM 3095, 3102균주는 DMT 1/2 MIC와 GEN 1/2 MIC를 단일 및 병용하여 배양하였을 때 균

생장이 지연되는 것을 볼 수 있었다. 또한 CCARM 3090, 3091 균주에서는 배양하기 시작하면서부터 균 성장을 억제하여 24시간에는 control과 가장 큰 차이를 나타냈다 (Figure 3).

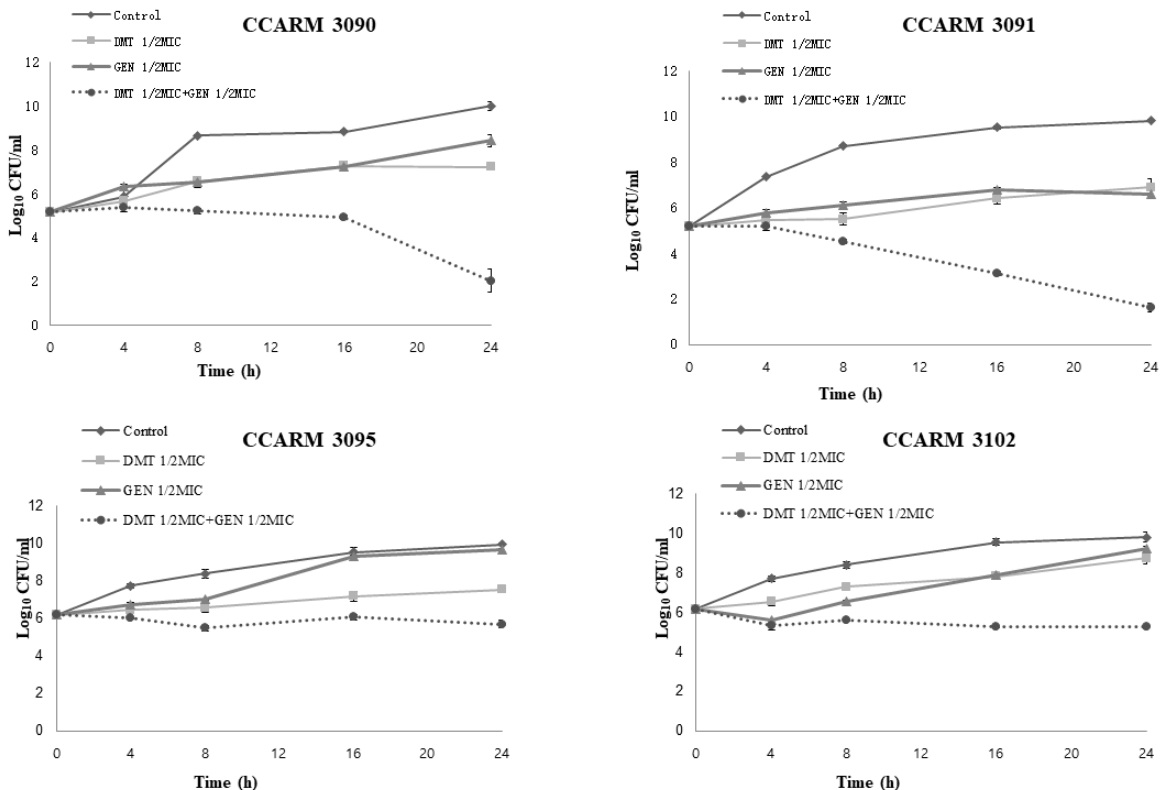


Figure 3. Time-kill curve of sub-inhibitory concentrations of GEN alone, DMT alone, and GEN and DMT in combination against CCARM 3090, 3091, 3095, and 3102. The time-kill assay was performed three times and the data represent the mean \pm standard deviation; CFU, colony-forming units; MIC, minimum inhibitory concentration.

5. MRSA에 대한 DMT의 세포막 투과성의 영향

DMT가 MRSA의 막 투과성에 미치는 영향을 확인하기 위해, 균에 막 투과성 증진제인 TX-100과 DMT를 단독 또는 병용 투여 항균 활성의 영향을 실험하였다. 그 결과 DMT 단독의 OD 600 값 (1/32 MIC)과 비교하여 1/32 MIC DMT 및 0.00001% TX-100의 존재 하에서 현탁액의 OD 600 값은 51.4 % 감소했다 (Figure 4).

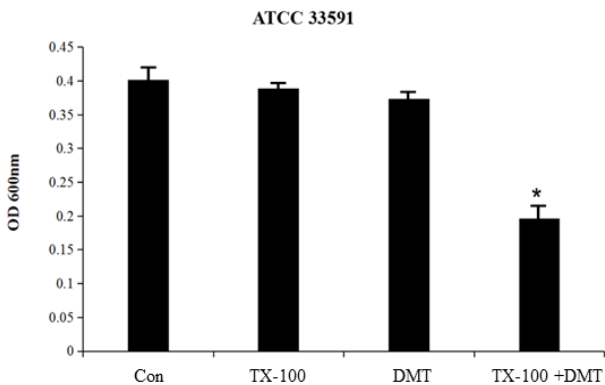


Figure 4. The effect of membrane-permeabilizing agents on susceptibility of MRSA (ATCC 33591) to DMT. Bacterial viability was determined by absorbance at 600 nm after incubation for 24 h with DMT concentrations of 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1/32 MIC DMT), and 0.00001% Triton X-100, or their combinations (DMT + TX-100). The data are presented as the mean \pm S.D. of three independent experiments. * $P < 0.001$ compared with DMT alone. CON, untreated control MRSA.

6. MRSA에 대한 DMT의 에너지 대사에의 영향

ATPase 억제제를 사용하여 MRSA균주에서 에너지 대사에 영향을 주는지 (DCCD)를 이용하여 실험하였다. 그 결과 Figure 5에서 보면, MRSA는 단독으로 DMT (1/16 MIC) 또는 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DCCD의 존재 하에서 생존 가능 하였다. 그러나, DMT와 DCCD를 병용 투여 하였을 때는 균 생장이 억제되어 61%의 생존을 감소가 나타났다 (Figure 5).

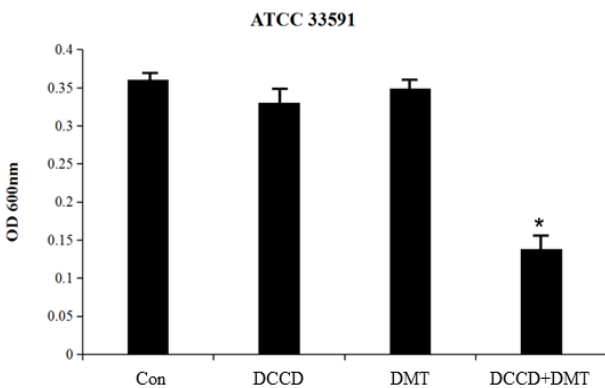


Figure 5. The effect of ATPase inhibitors on susceptibility of MRSA (ATCC 33591) to DMT. Bacterial viability was determined by absorbance at 600 nm after incubation for 24 h with DMT concentrations of 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1/16 MIC DMT), 125 μg DCCD or their combinations (DMT + DCCD). The data are presented as the mean \pm S.D. of three independent experiments. * $P < 0.01$ compared with DMT alone. CON, untreated control MRSA.

IV. 고찰

오랜 시간 전통적으로 사용해온 한의학 처방은 다양한 기전을 가지고 있는 생약을 조합하여 사용해온 방식으로 많은 임상 경험을 가지고 있고 상대적으로 부작용이 적으며, 특히 한의학 처방은 발전된 분석 방법에 의해서 많은 생리활성작용이 인정되거나 기존에 알고 있던 것보다 더 많은 효능과 활용가치가 보고되고 있어 연구가치가 매우 높은 자원으로 평가 받고 있다.¹²⁾

따라서 본 연구에서도 전통적으로 사용하여온 처방 중 하나인 대황목단탕 에탄올 추출물 (DMT)을 이용하여 MRSA에 대하여 항균 실험을 실시하고, 임상에서 주로 사용되고 있는 antibiotics인 Oxacillin (OX), Ampicillin (AM), Gentamicin (GEN)와의 병용처리를 통해 DMT와 합성항생제의 상승효과를 찾아내 합성항생제의 사용량을 줄여 내성을 극복 할 수 있는 가능성이 있는 소재를 찾고자 하였다.

대황목단탕은 임상에서 발열, 오한이 있으면서 충수염이나 맹장염이 화농이 되기 바로 전에 가장 많이 쓰는 처방이다.¹³⁾ DMT 구성약재들 중 대황, 목단피, 도인 등에 포함되어 있는 성분에서 MRSA에 부분적인 항균·항염작용 등의 약리작용이 보고된 적은 있으나,¹⁴⁻¹⁷⁾ 구성 방제인 DMT에 대한 항균활성과 항독성효과에 관한 연구는 아직까지 보고 바가 없다. 따라서, 대황과 여러 가지 약재가 혼합하여 처방된 DMT도 MRSA에 의한 항균작용이 있을 것으로 판단하고 DMT를 이용하여 실험을 진행하였다.

본 연구에서는 DMT의 MRSA에 대한 항균 활성 및 내성 극복에 대한 평가를 실시하였다. DMT에 대한 항균 활성을 측정하기 위해 MIC를 실시한 결과, MRSA 및 MSSA 균주에 대하여 200 ~ 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 항균 활성이 있다는 것을 확인하였다 (Table 3). 또한, DMT를 구성하는 약재들의 MIC를 측정하여 어떤 약재에 의해 항균 활성이 나타나는지를 확인한 결과, 대황에서 MRSA에 대한 항균 활성이 있음을 확인하였다. 대황 추출물 및 함유성분 emodin이 MRSA에 대한 항균활성과 항생제와 시너지 효과가 있음이 밝혀졌다.¹⁸⁾ 이는 DMT가 MRSA에 대한 항균 활성을 나타내는데 대황이 큰 역할을 한다는 것을 확인할 수 있었다 (Table 2). 또한, DMT와 기존 항생제와의 상승효과를 통해 항생제의 내성 극복에 유효한지를 확인하였다. DMT와 GEN의 상승효과를 확인한 결과, 8개의 균주에 대해서 partial synergy 및 synergy 효과가 있음을 확인하였다 (Table 4). 또한, 상승효과를 보이는 두 약물조합을 이용해 Time-kill assay를 실시한 결과, 8개 균주에 대해서 DMT와 GEN을 단독으로 사용하였을 때와 비교하여 두 약물을 같이 병용 시에 시간이 지남에 따라 균의 생장이 억제되는 것을 확인하였다 (Figure 1-3). 이는 DMT 자체의 항균 활성뿐만 아니라, 항생제의 사용량을 줄임으로써 내성을 극복 하는데 도움을 줄 수 있다고 볼 수 있다.

DMT가 여러 유형의 항생제와 같이 병용하였을 때 세포막을 투과성과 에너지 대사에 영향을 주는지 알아보았다. 먼저, 박테리아의 세포막 투과성에 영향을 주는 시약인 TX-100과 DMT의 병용효과를 확인한 결과, MRSA의 생장이 억제되지 않는 농도의 TX-100과 DMT를 같이 병용시에 균의 생장이 억제되는 것을 확인하였다 (Figure 4). 이에 DMT와 세포막

투과에 영향을 주는 약물과 병용 시 상승효과를 보일 수 있다는 것을 알 수 있었다. 또한, 박테리아에 ATPase inhibitor로 작용하는 DCCD와 DMT의 병용효과를 확인한 결과, 두 약물을 병용시 균의 생장이 억제되는 것을 확인하였다 (Figure 5). 이는 DMT가 ATPase inhibitor 역할을 하는 약물과도 좋은 시너지를 보일 수 있다는 것을 의미한다.

이번 연구의 시작에서 DMT와 더불어 그 조성약제들의 항균활성을 시험하였다. 그 결과 대항에서만 항균활성이 나타났다. 이러한 결과를 통해 DMT의 항균작용은 대항에 의해 발현된다고 짐작할 수 있다. 그러나 대항의 경우 그 성미가苦辣하고峻烈하여 정기를 손상시킬 수 있어 사용 시에는 주의가 필요하다. 또한 동과자, 대항, 목단피, 도인, 망초의 구성인 DMT를 이용한 연구는 방제연구에 있어 시사하는 바가 크다 하겠다.

위 실험들로 보아 DMT에는 MRSA의 생장을 억제할 수 있는 항균효과가 있음을 확인하였고, 또한 기존 항생제와 병용하였을 때 약물 상승효과와 시간에 따른 균의 생장억제 실험을 통한 항균효과를 확인함으로써 항생제 후보물질 중 하나로 충분한 가치가 있음을 확인할 수 있었으며, 더 나아가 세균감염질환에 기존 항생제와 병용 사용할 수 있는 후보물질이 될 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

대항목단당 에탄올 추출물 (DMT)의 MRSA에 대한 항균활성을 측정된 결과는 다음과 같다.

1. DMT와 그 구성 약제인 대항, 목단피, 망초, 도인, 동과자의 MRSA 균주에서 항균활성을 비교한 결과, 대항과 DMT에서만 항균활성이 측정되었고 나머지 약제에서는 MIC가 5,000 이상으로 항균활성이 나타나지 않았다.
2. MRSA에 대한 DMT의 최소억제농도는 (MIC)는 500 ~ 2,000 $\mu\text{g/ml}$ 이었다.
3. DMT와 항생제 oxacillin 및 gentamicin의 병용결과, synergy 및 partial synergy를 나타냈다.
4. DMT와 TX-100의 병용투여를 통해 DMT가 막 투과성을 영향을 주어 균 생장을 억제시키는 것을 확인하였다.
5. DMT와 DCCD의 병용투여를 통해 DMT가 에너지대사에 영향을 주어 균의 생장을 억제시키는 것을 확인하였다.

이상 실험 결과를 통해, DMT가 MRSA에 항균효과가 있다는 것을 확인하였고, 항생제와의 병용실험을 통해 두 약물 사이에 상승효과가 있음을 확인하였으며, 세포막 투과도 측정을 통해 DMT의 MRSA 내성기전을 억제하여 항균활성을 나타낸다는 것을 확인할 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 한국연구재단의 이공분야기초연구사업 (NRF-2016R1D1A1B03934552)과 2017년도 정부(과학기술정보통신부)의 지원을 받아 수행된 연구임 (No. NRF-2017R1A2B1009979).

References

1. Livornese LL Jr, Dias S, Samel C, Romanowski B, Taylor S, May P, Pitsakis P, Woods G, Kaye D, Levison ME, Johnson CC. Hospital-acquired Infection with Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* Transmitted by Electronic Thermometers. *Ann Intern Med.* 1992; 15;117(2):112-6.
2. Holmes NE, Turnidge JD, Munckhof WJ, Robinson JO, Korman TM, O'Sullivan MV, Anderson TL, Roberts SA, Warren SJ, Johnson PD. Antimicrob Agents Chemother. Vancomycin AUC/MIC ratio and 30-day mortality in patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Epub Jan 18.* 2013; 57(4): 1654-63.
3. Köck R, Becker K, Cookson B, van Gemert-Pijnen JE, Harbarth S, Kluytmans J, Mielke M, Peters G, Skov RL, Struelens MJ, Tacconelli E, Navarro Torné A, Witte W, Friedrich AW. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. *Euro Surveill.* 2010; 14;15(41):1968.
4. 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; 25;10(8):e0136605.
5. 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.
6. Saad A, Fadli M, Bouaziz M, Benharref A, Mezrioui NE, Hassani L. Anticandidal activity of the essential oils of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* and their synergism with amphotericin B and fluconazol. *Phytomedicine.* 2010;17(13):1057-60.
7. Ettefagh KA, Burns JT, Junio HA, Kaatz GW, Cech NB. Goldenseal (*Hydrastis canadensis* L.) extracts synergistically enhance the antibacterial activity of berberine via efflux pump inhibition. *Planta Med.* 2011;77(8): 835-40.
8. Yoon JI, Bajpai VK, Kang SC. Synergistic effect of nisin and cone essential oil of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu against *Listeria monocytogenes* in milk samples. *Food Chem Toxicol.* 2011;49(1):109-14.

9. Taleghani A, Emami SA, Tayarani-Najaran Z. Artemisia: a promising plant for the treatment of cancer. *Bioorg Med Chem*. 2020; 1;28(1):115180.
10. Chen JF. Synopsis of the Golden Chamber. 1st. Beijing: People's Medical Publishing House, 2000; 626–31.
11. kim DH, Yoon M, Shin SS. Analysis for Compatibility of Daehwangmokdan-tang and Its Pharmacological Activities. *Herbal Formula Science* 2018; 26;(1): 81–102.
12. Zhou L, Li D, Wang J, Liu Y, Wu J. Antibacterial phenolic compounds from the spines of *Gleditsia sinensis* Lam. *Nat Prod Res*. 2007; 21(4):283–91.
13. Xian ZW. Modern research and application of Chengqi Decoction. 1st. Beijing: People's Medical Publishing House. 2011; 333–5.
14. Duan F, Xin G, Niu H, Huang W. Chlorinated emodin as a natural antibacterial agent against drug-resistant bacteria through dual influence on bacterial cell membranes and DNA. *Sci Rep*. 2017; 5:7(1):12721.
15. Gong Y, Lee DY, Lee JW, Choi DJ, Kim GS, Lee SH, Lee YS. Potentiating activity of rhein in targeting of resistance genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Asian Pacific Journal of Tropical medicine*. 2019; 12(1): 14–8.
16. Lee JH, Kim YG, Ryu SY, Lee JT. Calcium-chelating alizarin and other anthraquinones inhibit biofilm formation and the hemolytic activity of *Staphylococcus aureus*. *Sci Rep*. 2016; 14;6:19267. doi: 10.1038/srep19267.
17. Gonzalez DJ, Vuong L, Gonzalez IS, Keller N, McGrosso D, Hwang JH, Hung J, Zinkernagel A, Dixon JE, Dorrestein PC, Nizet V. Phenol soluble modulins variants of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* captured using mass spectrometry-based molecular networking. 2014; 13(5):1262–72.
18. Lee YS, Kang OH, Choi JG, Oh YC, Keum JH, Kim SB, Jeong GS, Kim YC, Shin DW, Kwon DY. Synergistic effect of emodin in combination with ampicillin or oxacillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Pharm Biol*. 2010; 48(11):1285–90.