

Gardnerella vaginalis에 대한 한약재의 항균활성

김연희* · 이흥식¹

세명대학교 한의학과, ¹고려대학교 생명정보공학과

Antibacterial Effects of Oriental Herb Extract Against *Gardnerella vaginalis*. Kim, Younhee* and Heung-Shick Lee¹. Department of Oriental Medicine, Semyung University, Checheon, Choongbuk 390-230, Korea, ¹Department of Biotechnology and Bioinformatics, Korea University, Jochiwon, Choongnam 339-700, Korea - To investigate the potential of treatment, antimicrobial activity of various oriental herb extracts were tested for *Gardnerella vaginalis*, which is the predominant organism in bacterial vaginosis. Among the tested 14 oriental herbs, water-extracts of Kalkeun, Kosam, Nuro, Pakjakyak, Sukchangpo, Shiyup, Junghyang and Hwangryun represented antibacterial activities against *G. vaginalis*. The minimal inhibition concentration (MIC) of Shiyup against *G. vaginalis* was 0.63 mg/mL, and those of Pakjakyak and Hwangryun, Kalkeun and Nuro, Kosam, Sukchangpo and Junghyang were 1.25 mg/mL, 2.5 mg/mL, and 5 mg/mL, respectively. Therefore, the water-extracts of Kalkeun, Kosam, Nuro, Pakjakyak, Sukchangpo, Shiyup, Junghyang and Hwangryun were considered to be potential treatment of bacterial vaginosis caused by *G. vaginalis*.

Key words: Antibacterial effect, bacterial vaginosis, *Gardnerella vaginalis*

질감염은 원인에 따라 세균성, 곰팡이성, 원충류성 및 바이러스성으로 나누며, 세균성 질감염의 주요 원인균으로 알려져 있는 *Gardnerella vaginalis*는 그람 양성 또는 그람 다양성으로서 비운동성을 나타내는 다형태성 혐기성 간균이다 [1]. *G. vaginalis*는 1955년 Gardner와 Dukes[2]에 의해 그람음성 간균이면서 혈액한천배지에서만 성공적으로 분리되었기 때문에 *Haemophilus vaginalis*로 명명되었다. 그러나 *Haemophilus* 속의 균들과 달리 X인자와 V 인자를 필요로 하지 않고, 그람염색에 의해 양성반응을 나타내며 형태적으로도 상이했기 때문에 발견자인 Gardner의 이름에 따라 1980년 Greenwood와 Pickett[3]가 *Gardnerella vaginalis*로 명명하였다.

세균성 질증은 비염증성으로 질내의 정상균총인 *Lactobacillus*가 *G. vaginalis*, 혐기성균, *Mycoplasma hominis* 등으로 대체되는 특징을 나타낸다[1]. 또한 유산을 생성하는 유산간균의 수가 감소하면서 질의 pH가 4.5 이상으로 증가하고, 질 상피세포 중 clue cell이 20% 이상이며, 균질한 백색 질분비물이 나타난다. 특히 질분비물에 10% KOH를 첨가하면 독특한 amine 냄새가 난다[4]. 세균성 질증은 저체중 조숙아의 출산[5, 6]을 2배로 증가시키거나[7] HIV(Human Immunodeficiency Virus)의 감염율을 증가시키기도 한다[8]. 더욱이 세균성 질증은 양막염, 제왕절개술 후 자궁내막염, 유산 후 골반염, 자궁적출술 후 봉와직염(phlegmon) 등의 빈도를 증가시킨다[9]. 한편 세균성 질증을 나타내는 여성 중 98% 이상에서 *G. vaginalis*가 발견되며[10, 11] *G. vaginalis*가 HIV의 발현을 자극하는 것으로 보고되고 있다[12]. 따라

서 이 세균에 대한 항균활성 연구의 중요성이 강조되고 있다.

세균성 질증에 대한 외용약이 많이 알려져 있으나 국부적인 pH의 역할을 포함하여 질내 정상 세균총의 교란 등과 같은 복합적인 문제로 인하여 어떤 약재도 이 세균의 항균치료를 위한 완벽한 치료제로 작용하지 못하고 있으며[13, 14] 약재의 부작용과 지속적인 재발성이 문제점으로 대두되고 있다. 따라서 효과적이고 안전한 외용약의 필요성이 절실하다.

본 연구에서는 문헌적으로 항균성이 높은 한약재들을 선별하여 이들의 *G. vaginalis*에 대한 항균작용을 탐색한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

재료

이 실험에서 사용한 한약재는 갈근, 감초, 고삼, 금은화, 누로, 맥문동, 목향, 백작약, 방풍, 사상자, 석창포, 시엽, 정향, 황련으로 시중에서 정선한 것을 사용하였다(Table 1). 배지 및 시약으로 사용된 brain heart infusion(BHI)과 말의 혈청(heat inactivated horse serum)은 Difco(Sparks, USA) agar는 Junsei(Japan), agarose는 Acros(New Jersey, USA), ampicillin은 Sigma(St Louis, USA)에서 구입하였다. 종이 디스크(8 mm)는 Toyo Roshi Kaisha(Japan)에서 구입하였다.

균주 및 배지

Gardnerella vaginalis(ATCC49145)는 미국 ATCC(American Type Culture Collection)에서 동결건조된 것을 구입하여 modified BHI media에 녹인 후 modified BHI agar에 2-3 회 계대배양 후 사용하였다.

*Corresponding author

Tel: 82-43-646-1346, Fax: 82-43-646-1349

E-mail: ykim@semyung.ac.kr

*G. vaginalis*는 modified BHI agar나 modified BHI media를 배지로 사용하였으며, 10% CO₂를 유지하는 CO₂ 배양기(Sanyo, Japan) 내에서 37°C로 배양하였다.

Modified BHI media는 3.7%의 BHI powder와 20% 말의 혈청을 포함하며, 10% NaOH로 최종 pH를 7.4로 설정하였다. 이때 열처리된 말의 혈청(heat inactivated horse serum)은 BHI용액을 별도로 멸균하여 혼합하였다. Modified BHI agar는 상기한 modified BHI media 이외에 1.5% agar를 추가하여 제조한 후 87×10 mm 페트리 접시나 60×15 mm 조직배양접시에 부어 평판배지로 만들어 사용직 전까지 냉장 보관하였다.

한약재의 추출

건조된 한약재를 각각 15 g씩 150 ml의 증류수에 넣고 약 2시간 동안 약하게 끓였다. 탕액을 2000×g로 20분간 원심분리하여 상층액을 회수한 후, 진공농축기를 이용하여 약 15 ml 정도로 농축한 후 동결건조기로 건조하였다. 건조된 시료에 대해 건조중량을 측정 후, 증류수에 녹여 모두 50 mg/mL 또는 100 mg/mL의 농도로 만들었다. 한약 추출물은 상기의 과정 중 유입되는 세균이나 진균의 제거를 위해 121°C에서 15분간 고압 증기멸균하였으며, 각각 1 ml씩 나누어 사용 직전까지 영하 20°C에 냉동 보관하였다.

추출물의 항균효과

감수성 디스크 검사를 하기 위해 *G. vaginalis*의 lawn cell plate를 준비하였다. 우선 *G. vaginalis*의 단일집락을 modified BHI 액체배지에 접종하여 배양한 지 48시간 지난 후 분광기(Bio-Rad SmartSpec 3000, USA)로 배양액의 흡광도(OD₆₀₀)를 측정하여 균수를 계산한 후, 87×15 mm 평판배지 당 2×10⁷ cfu(colony forming unit)의 *G. vaginalis*가 들어갈 수 있게 modified BHI 액체배지로 희석하였다. 2×10⁷ cfu의 *G. vaginalis*를 47°C의 3 ml top agarose(5% agarose)와 혼합하여 37°C의 modified BHI 평판배지의 표면에 얇게 덮어 *G. vaginalis*가 평판배지에 균등하게 배열된 lawn cell

plate를 준비한 후 20분 동안 상온에서 굳혀 사용하였다.

100 mg/mL의 추출물을 종이 디스크에 20 또는 40 μl(2 또는 4 mg)씩 떨어뜨린 후 멸균된 핀셋으로 디스크를 lawn cell plate에 올려놓았다. 각 회의 실험에는 0.5 μg의 ampicillin을 대조군으로 포함시켰다. 디스크를 올려놓은 lawn cell plate는 10% CO₂항온배양기에서 37°C로 배양하였다. 48시간 후 추출물에 의해 *G. vaginalis*의 세균성장이 조금이라도 억제된 시료를 항균성이 있는 것으로 보았다.

항균활성도 조사

항균성을 나타낸 시료의 *G. vaginalis*에 대한 최소저지농도(Minimal Inhibition Concentration; MIC)의 결정은 표준 액체배지 희석법을 이용하였다.

*G. vaginalis*의 단일집락을 modified BHI 액체배지에 접종한 지 48 시간 후 OD₆₀₀를 측정하여 각 실험에 대해 2×10⁶ cell이 들어가도록 overnight culture를 희석하여 최종 부피 800 μl로 cell suspension을 준비하였다. 한약재 추출액을 modified BHI 배지를 사용하여 각각 200 μl의 부피로 준비한 후, cell suspension과 혼합하여 최종농도 20, 10, 5, 2.5, 0.25, 0.63, 0 mg/mL 등이 되도록 한 후 37°C, 10% CO₂ 조건에서 48시간 배양하였다. 대조군으로는 추출물(extract only), 배지(media only), 시료를 넣지 않은 culture(culture only)를 별도로 배양하였다. MIC는 48시간 후 추출물에 의해 세균의 성장이 억제된 마지막 tube의 시료농도로 결정하였다. 모든 실험은 2-4회 반복하였다.

결과 및 고찰

감수성 디스크 검사를 하기 위해 *G. vaginalis*의 lawn cell plate를 준비하였다. 우선 *G. vaginalis*의 단일집락을 접종하여 배양한 지 48시간 지난 cell suspension의 흡광도를 측정하여 OD₆₀₀=1일 때, 약 1.7×10⁷ cfu (colony forming unit)의 공식을 이용하여 균수를 계산한 후, 87×15 mm 평판배지 당 2×10⁷ cfu의 *G. vaginalis*가 자랄 수 있도록 modified

Table 1. Oriental herbs used in this study.

Oriental herb	Family name	Scientific name	Part of plants
갈근 (Kalkeun, 葛根)	콩과	<i>Pueraria lobata</i>	덩이뿌리
감초 (Kamcho, 甘草)	콩과	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	뿌리(뿌리줄기)
고삼 (Kosam, 苦參)	콩과	<i>Sophora flavescens</i>	뿌리(뿌리줄기)
금은화 (Keumenhwa, 金銀花)	인동과	<i>Lonicera japonica</i>	꽃봉오리
누로 (Nuro, 漏蘆)	영거시과	<i>Rhaponticum uniflorum</i>	뿌리
맥문동 (Macmoondong, 麥門冬)	백합과	<i>Ophiopogon japonicus</i>	덩이뿌리
목향 (Mokhyang, 木香)	국화과	<i>Saussurea lappa</i>	뿌리
방풍 (Bangpoong, 防風)	미나리과	<i>Saposhnikovia divaricata</i>	뿌리
백작약 (Bakjakyak, 白芍藥)	미나리아재비과	<i>Paeonia lactiflora</i>	뿌리
사상자 (Sasangja, 蛇床子)	미나리과	<i>Cnidium monnieri</i>	열매
석창포 (Sukchangpo, 石菖蒲)	천남성과	<i>Acorus gramineus</i>	뿌리줄기
시엽 (Shiyup, 柿葉)	감나무과	<i>Diospyros kaki</i>	잎
정향 (Junghyang, 丁香)	도금양과	<i>Syzygium aromaticum</i>	꽃봉오리
황련 (Hwangryun, 黃連)	미나리아재비과	<i>Coptis chinensis</i>	뿌리줄기

BHI 액체배지로 희석한 후 top agarose를 이용하여 lawn cell plate를 준비하였다.

추출물의 항균효과

본 연구에 사용된 14가지의 한약재에 대한 수용성 추출물이 *Gardnerella vaginalis*에 대해 항균효과가 있는가를 파악하기 위하여 디스크감수성 조사를 하였다. 각 추출물 중 48 시간 동안 *G. vaginalis*의 성장을 억제시킨 것은 갈근, 고삼, 누로, 백작약, 석창포, 시엽, 정향, 황련의 수용성 추출물로 나타났다(Table 2). 저지환의 크기는 2 mg과 4 mg의 추출물에 대해 비교적 비슷한 것들과 차이가 큰 것들이 있었다. 시엽(저지환 7.5~9.5 mm), 정향(저지환 10~17 mm), 황련(저지환 9.8~11.0 mm)이 넓은 저지환을 보여 매우 강력한 항균효과를 나타냈고, 갈근(저지환 6.5~8.7 mm), 누로(저지환 4.7~7.3 mm), 백작약(저지환 7.0~8.0 mm)도 상당히 좋은 항균효과를 나타냈다. 고삼(저지환 1.8~7.3 mm)과 석창포(저지환 1.3~3.2 mm)는 약한 항균효과를 나타내었다(Table 2 and Fig. 1). 그러나 감초, 금은화, 맥문동, 목향, 방풍, 사상자는 *G. vaginalis*에 대해 전혀 항균효과를 나타내지 않았다.

항균활성도 조사

항균성을 나타낸 추출물에 대하여 표준액체배지 희석법을 이용하여 *G. vaginalis*에 대한 MIC를 결정하였다(Fig. 2). 시엽의 MIC는 0.63 mg/mL로 항균효과가 가장 우수한 것으로 나타났고, 백작약과 황련의 MIC는 1.25 mg/mL, 갈근과 누로의 MIC는 2.5 mg/mL, 고삼, 석창포, 정향의 MIC는 5 mg/mL이었다. 저지환의 크기가 비교적 넓지만 MIC가 높은 것은 이들 약재 추출물의 살균효과와 추출물의 안정성에 기인하는 것으로 보인다. *G. vaginalis*의 배양은 일반 세균에 비해 비교적 배양 조건이 까다롭다고 알려져 있으므로 일부 한

Table 2. Disk Susceptibility of oriental herb extracts against *Gardnerella vaginalis*. Two and four mg of extracts were applied to the disks on the *G. vaginalis* lawn cell plate and incubated at 10% CO₂ environment, 37°C for 48 hours. Inhibition zone was measured in mm. The experiments were performed three times.

Oriental herbs	Inhibition zone (mm)	
	2 mg added	4 mg added
Kalkeun	6.50±0.71	8.67±1.75
Kamcho	0.00	0.00
Kosam	1.83±0.76	7.33±1.53
Keumeunhwa	0.00	0.00
Nuro	4.67±0.58	7.33±1.52
Macmoondong	0.00	0.00
Mokhyang	0.00	0.00
Bangpoong	0.00	0.00
Pakjakyak	7.00±0.70	8.00±0.70
Sasangja	0	0
Sukchangpo	1.33±0.57	3.17±0.76
Shiyup	7.50±0.70	9.5±0.70
Junghyang	10.00±0.00	17.00±2.82
Hwangryun	9.75±3.18	11.00±1.41

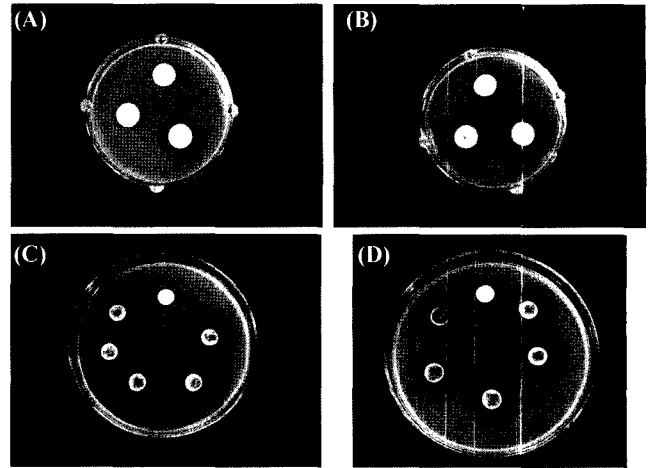


Fig. 1. Effect of oriental herb extracts on the growth inhibition of *Gardnerella vaginalis*. Herb extracts of (A) Sukchangpo, (B) Pakjakyak, (C) Junghyang and (D) Hwangryun were applied to the disks on the *G. vaginalis* lawn cell plates and incubated at 10% CO₂ environment, 37°C for 48 hours. Amount of each herb extracts were as follows: (A) 0, 2 and 4 mg from the top counter-clockwise, (B) 0, 2 and 4 mg from the top clockwise, (C) and (D), 0, 1, 1.5, 2, 2.5 and 3 mg from the top clockwise.

약재 추출물은 느린 생장기간 동안 지속적으로 영향을 미치기에 충분한 안정성을 유지하지 못할 것으로 생각된다. 시엽이 다른 약재 추출물보다 저지환의 크기가 현저하게 크지는 않았으나 낮은 MIC(0.63 mg/mL)를 나타낸 것은 성분의 안정성이 높거나(또는 높고) 살균효과가 우수한 것으로 보여진다.

갈근은 콩과 식물로서, 덩이뿌리에 유효성분이 많이 있는 것으로 알려져 있다. 그 성분에는 isoflavone 계 성분인 puerarin, daidzin, β -sitosterol 등이 있다. 이는 혈압 강하, 혈당강하, 진경작용 및 해열 작용을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 고삼 또한 콩과 식물로서, 뿌리나 뿌리줄기에 유효성분이 많은 것으로 알려져 있다. Alkaloid 성분인 *d*-matrine, *d*-oxymatrine, *d*-sophoranol 등과 flavonoid 성분인 xanthohumol 등을 가지고 있으며, 이뇨작용, 부정맥 억제작용, 트리코모나스 및 결핵균에 대한 항균작용이 알려져 있다. 누로는 엉거시과 식물로서, 뿌리에 유효 성분인 휘발성 유지가 많고 화농성 유선염, 종기 및 직장의 케양 치료에 이용되며 해열작용을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 백작약은 미나리아재비과의 식물로서 뿌리에 유효 성분이 많다. Paeoniflorin, paeonol, 안식향산, 탄닌, β -sitosterol 등의 성분을 가지고 있으며, 항균작용이 우수해서 황색포도상구균의 억제에 사용되어 왔다. 석창포는 천남성과 식물로서 뿌리줄기에 유효성분이 많다. β -asarone, asarone, caryophyllene 등의 성분을 가지고 있고 진정작용, 해열작용, 소화액 분비촉진작용 등이 알려져 있다. 자궁출혈의 치료나 위통, 복통 치료 등에도 사용되고 있다. 시엽은 감나무과 식물로서 잎에 유효성분이 많다. Flavonoid, glycoside, 탄닌, phenol, 수지, 쿠마린류 등을 함유하고 있고, 기침, 천식, 내출혈 치료에 사

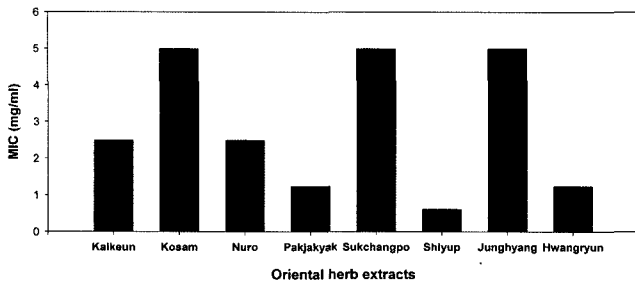


Fig 2. Comparison of MICs tested, by microdilution assay.

용된다. 정향은 도금양과 식물로서 꽃봉오리에 유효성분이 많은데, eugenol, acetyl eugenol, β -caryophyllene 등을 가지고 있다. 항균작용이 우수하여 구충, 진위, 치통경감 등에 이용된다. 황련은 미나리아재비과 식물로서 berberine 성분이 많아 강력한 항균작용을 하는 것으로 알려져 있다. 용혈성 연쇄구균, 뇌막염균, 폐렴쌍구균, 콜레라균, 탄저균, 황색포도상구균에 대한 강한 항균작용을 가지고 있고, 적리균, 디프테리아균, 고초균, 폐렴간균, 페스트균, 부르셀라균, 파상풍균, 결핵균 등에 대해서도 우수한 항균작용을 한다[15].

세균성 질증의 발생 원인은 잘 밝혀지지 않고 있으나 성생활의 문란, 항생제의 과용, 경구피임제의 광범위한 사용, 긴장 및 스트레스로 인한 질생리의 변화 등으로 기인한다고 보고되고 있다[16]. 본 연구는 재발의 가능성이 높고 많은 문제를 가지고 있는 세균성질증의 주요 원인균 *G vaginalis*의 치료를 위한 외용약으로서의 개발 가능성을 보여주었고, 각 한약재의 추출물 중 유효성분 및 이의 안정성, 질내 정상균총에 대한 영향 등에 대한 연구가 따른다면 임상에서의 응용이 가능할 것으로 생각된다.

요 약

세균성 질감염의 주요 원인균인 *Gardnerella vaginalis*에 대한 외용약으로의 응용가능성을 알아보기 위하여 여러 한약재 추출물의 *G vaginalis*에 대한 항균효과를 조사하였다. 문헌적으로 항균성이 높은 한약재인 갈근, 감초, 고삼, 금은화, 누로, 맥문동, 목향, 백작약, 방풍, 사상자, 석창포, 시엽, 정향, 황련의 수용성 추출물이 *G vaginalis*에 대한 항균 효과가 있는지의 여부를 조사한 결과, 갈근, 고삼, 누로, 백작약, 석창포, 시엽, 정향, 황련의 수용성 추출물이 *G vaginalis*에 대해 항균작용을 나타내었다. 특히 시엽의 *G vaginalis*에 대한 최소저지농도 (MIC)는 0.63 mg/mL, 백작약과 황련의 MIC는 1.25 mg/mL, 갈근과 누로의 MIC는 2.5 mg/mL, 고삼, 석창포, 정향의 MIC는 5 mg/mL로 시엽, 백작약 및 황련, 갈근 및 누로, 고삼, 석창포, 정향의 순서로 시엽이 가장 높은 항균효과를 나타냄을 알 수 있었다. 따라서 본 연구의 결과는 갈근, 고삼, 누로, 백작약, 석창포, 시엽, 정향, 황련의 수용성 추출물이 *G vaginalis*로 야기된 세균성질증의 치료를 위한 외용약으로 응용될 수 있는 가능성을 보여준다.

감사의 글

이 논문은 2004학년도 세명대학교 교내학술연구비 지원에 의해 수행된 연구임.

REFERENCES

1. Aroutcheva, A. A., J. A. Simones, K. Behbakht, and S. Faro. 2001. *Gardnerella vaginalis* isolated from patients with bacterial vaginosis and from patients with healthy vaginal ecosystems. *Clin. Infect. Dis.* **33**: 1022-1027.
2. Gardner, H. L. and C. H. Dukes. 1955. *Haemophilus vaginalis* vaginitis: a newly defined specific infection previously classified as "nonspecific" vaginitis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **69**: 962-976.
3. Greenwood, J. R. and M. J. Pickett. 1980. Transfer of *Haemophilus vaginalis* Gardner and Dukes to a new genus, *Gardnerella*: *G. vaginalis* (Gardner and Dukes) comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **30**: 170-178.
4. Eschenbach D. A., S. Hillier, C. Stevens, T. DeRouen, K. K. Holmes. 1988. Diagnosis and clinical manifestation of bacterial vaginosis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **158**: 819-828.
5. Hauth, J. C., R. L. Goldenberg, W. W. Andrews, M. B. Dubard, and R. L. Copper. 1995. Reduced incidence of preterm delivery with metronidazole and erythromycin in women with bacterial vaginosis. *N. Engl. J. Med.* **333**: 1732-1736.
6. Hillier, S. L., R. P. Nugent, D. A. Eschenbach, M. A. Krohn, R. S. Gibbs, D. H. Martin, M. F. Cotch, R. Edelman, J. G. Pastorek, A. V. Rao, D. McNellis, J. A. Regan, J. C. Carey, and M. A. Klebanoff. 1995. Association between bacterial vaginosis and preterm delivery of low-birth weight infant. *N. Engl. J. Med.* **333**: 1737-1742.
7. McDonald H. M., J. A. O'Loughlin, P. Jolley, R. Vigneswaran, P. J. McDonald. 1991. Vaginal infection and preterm labour. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* **98**: 427-435.
8. Mayaud, R. 1997. Tackling bacterial vaginosis in developing countries. *Lancet* **350**: 530-531.
9. Hillier S. L. 1992. Clindamycin treatment of bacterial vaginosis. *Rev. Contemp. Pharmacother.* **3**: 263-268.
10. Catlin B. W. 1992. *Gardnerella vaginalis*: characteristics, clinical considerations, and controversies. *Clin. Microbiol. Rev.* **5**: 213-237.
11. Eschenbach D. A. 1993. History and review of bacterial vaginosis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **169**: 441-445.
12. Hashemi F. B., M. Ghassemi, K. A. Roebuck, G. T. Spear. 1999. Activation of human immunodeficiency virus type I expression by *Gardnerella vaginalis*. *J. Infect. Dis.* **179**: 924-930.
13. Bannatyne, R. M. and A. M. Smith. 1998. Recurrent bacterial vaginosis and metronidazole resistance in *Gardnerella vaginalis*. *Sex. Transm. Infect.* **74**: 455-456.
14. Hay, P. E. 1998. Therapy of bacterial vaginosis. *J. Antimicrob. Chemother.* **41**: 6-9.
15. 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순 외 98인. 1997. 중약대사전. 도서출판 정담.
16. Gardner, H. L. and R. H. Kaufman. 1969. Benign disease of the vulva and vagina. *The C.V. Mosby Company.* **10**: 141.

(Received Feb. 26, 2006/Accepted Mar. 15, 2006)