

*Mycoplasma hyopneumoniae*에 대한 *Origanum vulgare* 추출물의 항마이코플라즈마 및 항염증 효과

최명진 · 황미현 · 최재영 · 이중수 · 박승춘*

경북대학교 수의과대학
(게재승인: 2009년 9월 2일)

Anti-mycoplasmal and anti-inflammatory effect of *Origanum vulgare* extract against *Mycoplasma hyopneumoniae*

Myung-Jin Choi, Mi-Hyun Hwang, Jae-Young Choi, Joong-Su Lee, Seung-Chun Park*

College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea
(Accepted: September 2, 2009)

Abstract : In the present study, ten herbal extracts, *Citrus unshiu* Markovich, root and stem of *Berberis koreana*, *Morus alba*, *Dendrobium moniliforme*, *Aster gramineus*, *A. scabar*, *Alisma canaliculatum*, *Fallopia japonica* and *Origanum (O.) vulgare* were determined to examine anti-mycoplasmal activity. Among them, *O. vulgare* extract (OVE) showed strong anti-mycoplasmal activity and was analyzed by gas-chromatography/mass spectrometry (GC/MS). As the results, OVE was consisted of carvacrol (68.78%), o-cymene (9.80%), terpinene (7.61%) and thymol (4.03%) as main ingredients. To investigate inflammatory activity by intact pathogenic *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyo*) at 30 µg/ml, we examined induced transcription of proinflammatory cytokines such as cyclooxygenase-2, tumor necrosis factor- α , interleukin (IL)-1, IL-6 and inducible nitric oxide synthase in RAW 264.7 cells. With the above results, we further investigated whether OVE could reduce inflammation induced by *M. hyo* at minimal inhibitory concentration. The result showed that 32 µg/ml of OVE inhibited nitric oxide production by 60%. This study also evaluated the combination of OVE with antibacterials against *M. hyo* for application. Based on these results, it could be concluded that *M. hyo* induces inflammation in RAW 264.7 cells and OVE protects this inflammation, indicating that OVE may be useful for industrial animals.

Keywords : antibiotics, inflammation, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Origanum vulgare*, phytochemicals

서 론

사계절이 있는 국내의 돈사 내부 환경은 환기의 문제로 만성호흡기 질병관리가 어려우며, 이러한 문제로 인해 국내에서 호흡기 질환은 급성과 만성에 한꺼번에 나타나는 경향이 있다. 이러한 문제는 국내뿐만 아니라 환경이 좋은 축산 선진국에서도 집약적 다두 사육 방식으로 인하여 분변 유래의 질병과 호흡기 분비물로 인한 전파성 질병이 다발하고 있다. 결과적으로 이는 생산성 저하

로 양돈업의 기반을 흔드는 중요한 요소 중 하나로 자리 잡고 있다 [3].

특히 돼지의 만성호흡기질환은 복합감염을 많이 보이고 있으며 특히 *Mycoplasma hyopneumoniae*(*M. hyo*)에 의해 발병되는 만성호흡기 질환은 국내 뿐만 아니라 전 세계적으로 양돈장에서 경제적 손실을 일으키는 질병이며 [5], 이는 돼지 유행성 폐렴을 유발시켜 돼지 호흡기 복합 감염증(porcine respiratory disease)의 주요 인자중 하나로 알려져 있다 [11].

*Corresponding author: Seung-Chun Park
College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea
[Tel: +82-53-950-5964, Fax: +82-53-950-5964, E-mail: parksch@knu.ac.kr]

*M. hyo*의 주요 전염경로는 공기접촉감염이며, 감염돈과 함께 회복된 돼지인 보균돈으로 질병이 전파된다 [5]. 임상 증상은 지속적인 마른기침, 성장지연, 사료효율 저하 등의 특징과 함께 높은 발병율을 보이거나 폐사율은 거의 없는 편이며 [20], 감염은 균주와 섬모상피의 receptor-ligand interaction에 의해 시작되며, 이는 세포내 칼슘의 농도를 증가시켜 결국 섬모의 탈락을 일으키는 메카니즘을 가진다 [15, 16, 23].

또한 mycoplasma 폐렴의 경우 다른 세균이나 바이러스와의 복합감염으로 질병이 더욱 악화된다. 복합감염의 주요 인자로는 *Pasturella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis*, *Salmonella* Chlerasuis 그리고 *Ascaris suum* 등이 있다. 마이코플라즈마 감염증의 예방을 위하여 *M. hyo* 백신을 예방차원에서 사용하고 있으나 아직도 도태되는 돼지의 60%가 마이코플라즈마 감염소견을 가지고 있는 실정이다 [7].

위의 결과를 종합시 *M. hyo* 백신으로 마이코플라즈마 폐렴을 관리하고 예방하기에는 한계가 있는 것으로 생각되며, 최근 새로운 예방 및 치료방법에 대한 연구가 진행되고 있다. 그 예로 *in vitro*에서 *M. hyo*가 fluoroquinolone, tetracycline, spiramycin 그리고 tiamulin등의 항생제에 감수성이 있음을 밝혀낸 연구 자료가 있다 [6].

그러나 최근 항생제의 오남용에 대한 우려와 내성균주의 출현 및 축산물의 안전성 문제 등이 공중보건학적인 문제로 대두되고 있다 [2]. 본 연구는 이러한 문제를 해결하기 위해 항마이코플라즈마와 항염증 효과를 갖고 있는 천연 식물 추출물을 탐색하고자 하였다.

따라서 본 연구에서는 1차적으로 여러 가지 식물 추출물에서 항마이코플라즈마에 효과가 있는 phytochemicals에서 스크리닝 과정을 거쳐 가장 항균 효과가 탁월한 추출물을 선택 하였으며, 마이코플라즈마의 항염증 검증을 위하여 RAW 264.7 세포주에서 염증성 사이토카인의 유전자 및 단백질 발현을 조사한 후에 선발된 식물 추출물의 염증 억제 유무를 확인하였다. 확인된 식물 추출물에 대한 성분분석과 기존의 마이코플라즈마 항균제인 tiamulin(TIA)과의 병용 투여시 상호작용에 대하여 조사하였다.

재료 및 방법

병원성 *M. hyo*의 배양

M. hyo(ATCC strain 25934)는 modified Friis 배지 [24]를 이용하여 37°C에서 58 rpm으로 3일간 배양하여 13,000 g에서 30분 동안 원심분리하여 Friis 배지성분을 제거하였다. 원심분리 후에 마이코플라즈마를 수거한 후 차가운 멸균 phosphate buffer saline(PBS) 50 mL를 이용

하여 부유시킨 후 15,000 g에서 15분 동안 세척하였다. 이러한 과정을 2번 반복하였다. 손상되지 않은 마이코플라즈마 단백질은 27 gauge 바늘을 이용하여 PBS로 균질화를 실시하였다. 마이코플라즈마 균체 단백질을 bicinchoninic acid(BCA) assay(Pierce Biotechnology, USA)를 이용하여 측정하였다. 최종 균체농도는 BCA assay를 실시하여 단백질 농도를 측정하여 300 µg/mL($1 \times 10^{10} - 1 \times 10^{11}$ CCU)로 조정하여 사용하였다. 마이코플라즈마의 염증반응을 보기위하여 마우스 유래의 대식세포인 RAW 264.7 세포주(KCLB; Korean Cell Line Bank, Korea)을 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에 10% fetal bovine serum(FBS)와 100 µg/mL의 streptomycin과 100 unit/mL의 penicillin을 첨가하여 5% CO₂ 조건의 37°C에서 배양하였다.

시료추출 및 항마이코플라즈마 활성

가축사료 첨가용 소재로 활용 가능한 *Citrus unshiu* Markovich(진피), *Berberis koreana*(매자나무)의 뿌리 및 줄기, *Morusalba*(상백피), *Dendrobium moniliforme*(석곡), *Aster gramineus*(석창포), *A. scabar*(취나물), *Alisma canaliculatum*(택사) 그리고 *Fallopia japonica*(호장근)를 선정하여 miller로 분쇄하고 표준망체(40 mesh)를 통과한 분말에 10배 증류수를 첨가한 다음 95°C에서 2시간 환류 추출하였다. 한편 *Origanum vulgare* 추출물(OVE)은 ether 관류로 정유만을 모아서 농축 후에 시험에 사용하였다. 항균작용 검증을 위한 양성 대조용 물질로는 surfactin C, norfloxacin, streptomycin 그리고 TIA을 시험에 사용하였다. 항마이코플라즈마 활성을 측정하기 위하여 건조중량을 측정하여 96 well plate에 각 시료 추출물을 1,024 µg/mL에서 시작하여 2단계 희석으로 희석시킨 후에 10⁵ CCU의 마이코플라즈마를 이미 각 well에 100 µL씩 천연추출물 및 항균제가 포함된 well에 분주하여 3일, 7일 그리고 14일 후에 색의 변화를 보고 마이코플라즈마의 성장 유무를 판단하였다.

OVE의 gas-chromatography/mass spectrometry (GC/MS) 분석

OVE의 성분 분석을 위하여 GC/MS analysis을 실시하였다. 분석기기는 Hewlett-Packard(HP) 6890 Plus GC gas chromatograph with(MSD)-HP 5973 MSD mass selective detector 이었다. 시료는 HPLC 급의 메탄올로 1 : 1,000(v/v)으로 희석하여 1 µL을 HP-5 컬럼에 주입하였다. GC oven의 온도는 50°C에서 4 min, 그리고 4°C/min의 속도로 280°C까지 올렸으며 마지막 2분 동안은 이 온도로 유지하였다. 이동상은 He gas로 순도는 99.99%로 0.7 mL/min의 속도로 흘렸다. 정량분석은 Area

normalization method로 계산하였다.

M. hyo에 의한 염증 발현 양상

RAW 264.7 세포를 10% FBS가 첨가된 phenol red free DMEM 배지를 이용하여 2×10^5 cells/mL로 6 well plate에 접종하고, 24시간 배양한 후 intact *M. hyo*를 30 µg/mL 농도로 처리하여 18시간 배양하였다. 양성대조군으로는 lipopolysaccharide(LPS)를 1 µg/mL의 농도로 처리하였다. 배양 후 상층액에서 염증성 사이토카인 mRNA를 측정하기 위하여 a solid phase sandwich Enzyme Linked-Immuno Sorbent Assay(ELISA; Camerillo, USA)에서 kit로 측정하여 450 nm에서 ELISA로 흡광도를 측정하여 사이토카인 단백질량을 정량하였다. 이와 더불어 mRNA cytokine 발현 양상을 함께 비교하기 위하여 *M. hyo* 처리 후에 세포를 모으고 Trizol reagent(Bioneer, Korea)를 사용하여 total RNA를 분리하여 0.02% Diethylpyrocar bonate(DEPC)에서 -20°C에서 냉동보관 하였다. 모든 시료는 260 nm/280 nm ratio가 1.80 이상을 확인하였다. 분리한 total RNA는 oligo(dT) 16 primer와 DEPC-DDW를 넣어 70°C에서 10분간 반응시킨 후 냉각시켰다. RT 반응은 AccuPower RT-Premix(Bioneer, Korea)을 이용하여 42°C에서 90분간 반응시키고 95°C에서 효소반응을 중지시켰다. RT products와 목적 primer(cyclooxygenase(COX)-2, IL-1β, IL-6, inducible nitric oxide synthase(iNOS), tumor necrosis factor(TNF)-α, β-actin)를 AccuPower PCR premix를 이용하여 MyCycler™ thermal cycler(Bio-Rad, Singapore)에서 PCR 반응시켰다. 반응조건은 denaturation 95°C/60초, annealing 55°C/45초(iNOS 60°C/45초), extension 72°C/45초였으며, COX-2, IL-1β, IL-6, iNOS 그리고 TNF-α는 총 35 cycles, β-actin는 30 cycles을 실시하였다. 최종 PCR 산물을 ethidium bromide로 염색한 1% TAE agarose gel 상에서 전기영동시킨 후 EAG-LE-EYETM(Stratagene, USA)을 이용하여 band의 위치를 확인하고 density를 측정하였다. Eagle-eye spot densitometry를 사용하여 density로 정량한 후, 각 cytokine의 intensity는 β-actin의 intensity에 대한 퍼센트로 나타내었다.

Nitric oxide(NO) 생성은 Griess reaction을 이용하여 nitrite 농도로 NO 생산을 측정하였다. Griess reagent A, B를 각각 50 µL [1% sulfanilamide와 0.1% N-(1-naphthyl ethylenediamine 2HCl in 5% H₃PO₄]를 첨가하여 반응시켰다. 대조군으로 Sodium nitrate를 standard로 사용하였다. 반응 후 ELISA reader(VersaMax microplate reader; Molecular Devices, USA)는 540 nm에서 측정을 하고 대조군과 비교를 하였다.

또한 사이토카인 단백질을 측정하기 위해 RT-PCR때와 동일한 시간과 농도로 세포를 처리한뒤 상층액을 채

거하고 PBS로 2회 세척한 후에 scrapper로 세포를 수확하고 lysis buffer를 넣어서 세포를 용해시켰다. 수확된 단백질은 bovine serum albumin를 이용하여 단백질량을 보정하였다.

RAW 264.7 세포주에서 Origanum vulgare 추출물(OVE)의 염증 억제효과

OVE의 32 µg/mL를 *M. hyo*를 처리하기 30분 전에 처리한 후 *M. hyo* 100 µg/mL를 처리하고 24시간 배양시켰다. 양성대조군은 LPS 1 µg/mL를 처리하고 음성대조군으로 LPS 없이 RAW 264.7 cell을 배양하여 cytokine 발현 양상을 상기의 방법으로 측정하였다.

Fractional inhibitory concentration(FIC)의 측정

호흡기세균인 *P. multocida* type A, *P. multocida* type D, *K. Pneumoniae* 2001, *K. Pneumoniae* 1560, *K. Pneumoniae* 2208 그리고 *S. aureus*(ATCC 6538) 균주를 5 mL TSB 배지에 37°C에서 하룻밤 진탕배양을 실시하였다. 배양된 각각의 균주는 멸균된 생리식염수로 희석하여 agar dilution method로 균수를 각각 계산한 후 10배 희석법으로 균주를 10⁴ CFU로 조정하여 minimal inhibitory concentration(MIC)측정을 위한 시험균주로 사용하였다. *M. hyo*는 상기에서 기술한 방법으로 배양하였다. 기존의 마이코플라즈마에 사용하는 항생제인 TIA과 OVE를 각각의 MIC를 기준으로 2배 희석법을 이용한 checkerboard method로 FIC를 측정하여 TIA과 OVE의 상호작용을 FIC index를 구하여 평가하였다 [8].

통계학의 해석

통계학적 분석은 SAS system을 이용하였으며, *M. hyo*와 OVE의 NO assay 결과는 one-way analysis of variance (ANOVA)법을 사용하였다.

결 과

병원성 M. hyo의 배양성

병원성 기전을 연구하기 위해서는 세포에서 반응을 일으킬 수 있는 *M. hyo*의 용량 선택이 중요하다. 그러나 *M. hyo*는 세균과는 달리 집락 수에 의한 접종 기준을 설정하기에는 많은 어려움이 있으므로 성장에 따른 배지 색을 기준으로 *M. hyo*의 단백질 양을 이용하여 실험에 사용하였다. Fig. 1은 마이코플라즈마 성장에 따른 색의 변화와 단백질 양의 상관관계를 나타내었다. 그 결과 마이코 플라즈마 농도 100 µg/mL에서 300 µg/mL는 10¹⁰CCU에 해당되었고, 10 µg/mL 농도에서는 10⁹CCU에 해당되었다.

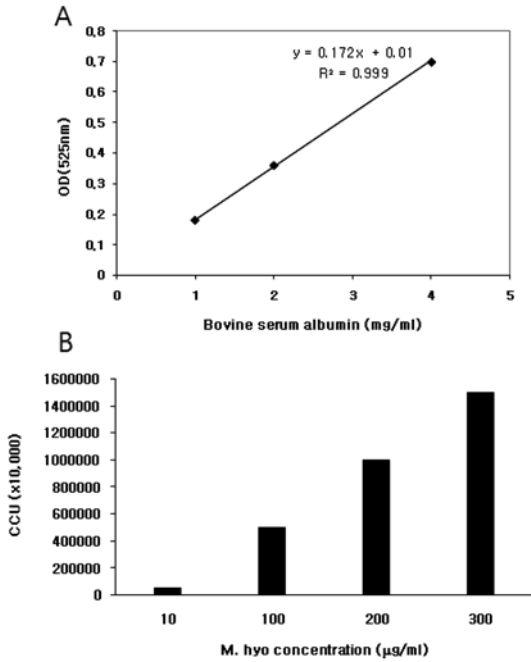


Fig. 1. Determination of mycoplasma concentration by bicinchoninic acid (BCA) protein assay.

Table 1. Minimal inhibitory concentration of phytobiotics against *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. Hyo*)

Phytobiotics	Culture time of <i>M. Hyo</i> (µg/mL)		
	3 day	7 day	14 day
<i>Citrus unshiu</i> Markovich	1,024	1,024	1,024
<i>Berberis koreana</i> (Root)	128	516	1,024
<i>Berberis koreana</i> (Stem)	516	1,024	1,024
<i>Morus alba</i>	516	516	1,024
<i>Dendrobium moniliforme</i>	128	516	1,024
<i>Acorus gramineus</i>	128	516	1,024
<i>Aster scabar</i>	128	516	1,024
<i>Alisma canaliculatum</i>	128	516	1,024
<i>Fallopia japonica</i>	64	128	128
<i>Origanum vulgare</i> extract (OVE)	2	16	32
Surfactin C	32	65	256
Streptomycin	1	32	32
Tiamulin	0.25	0.25	0.25
Norfloxacin	0.125	0.125	0.125

시료추출 및 항마이코플라즈마 활성

가축사료 첨가용 소재로 활용 가능한 *Citrus unshiu* Markovich(진피)의 9개 시료를 대상으로 항마이코플라즈마 활성에 대하여 시간에 따라 조사하였다. 그 결과를 Table 1에 나타내었다. 항균제인 TIA와 norfloxacin은

Table 2. Chemical composition from OVE

Compounds	Retention Time	Area (%)
α-pinene	8.443	0.21
α-pinene	8.662	1.54
Camphene	9.204	0.48
Mycrene	10.89	1.67
Terpinolene	11.831	1.37
O-cymene	12.14	9.8
Terpan	12.396	0.13
γ-terpinene	13.472	7.61
L-Linalool	15.069	1.96
Linalool	17.952	0.14
Thymol	22.04	4.03
Carvacrol	22.439	68.78
β-caryophyllene	26.242	2.05
β-caryophyllene	28.982	0.14
Trans-bicyclo[5.2.0]non-8-ene	31.218	0.1

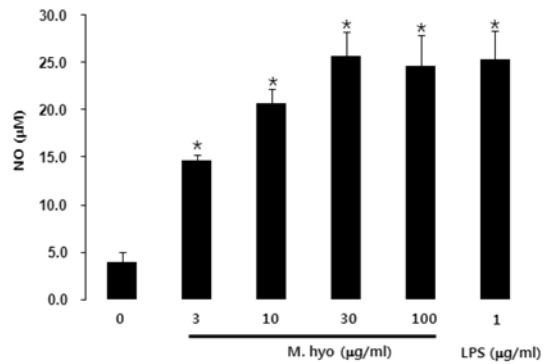


Fig. 2. Effect of *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyo*) on NO production in RAW 264.7 cells. 0: no treatment, 3: *M. hyo* (3 µg/mL) treatment, 10: *M. hyo* (10 µg/mL) treatment, 30: *M. hyo* (30 µg/mL) treatment, 100: *M. hyo* (100 µg/mL) treatment, 1: lipopo-lysaccharide(1 µg/mL) treatment. **p* < 0.05, compared with no treated RAW 264.7 cells.

phytobiotics의 열수추출물과 비교시 현격한 항마이코플라즈마 효과를 보여주었다. 허브 추출물인 OVE는 다른 열수 추출물과는 다르게 ether 추출로 만들어진 정유로 3일째 보여준 항마이코플라즈마의 효과가 14일 동안 꾸준히 항균 활성을 보여주었다. 14일째 *M. hyo*에 대한 OVE의 MIC값은 32 µg/mL로 3일째 항마이코플라즈마 활성보다 16배 감소한 결과로 나타났다.

OVE의 GC/MS 분석

항마이코플라즈마 활성과 항염증 활성을 갖는 OVE에 대한 성분 분석을 위하여 GC/MS analysis을 실시하여 그 결과를 Table 2에 나타내었다. GC/MS 분석 결과

주요 성분으로는 carvacrol(68.78%)이며 그 외 o-cymene (9.80%), γ -terpinene(7.61%) 그리고 thymol(4.03%)로 구성되어 있었다. 이 중 총 carvacrol thymol이 72.81%로 주요 성분임을 확인할 수 있었다.

***M. hyo*에 의한 염증 발현 양상**

RAW 264.7 cell에서 *M. hyo*에 따른 NO 생성량을 측정한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. *M. hyo*는 3 μ g/mL에서 30 μ g/mL까지의 농도에서 용량-의존적으로 NO의 생성량이 증가를 하였으며 30 μ g/mL에서는 LPS의 1 μ g/mL와 같은 수준으로 NO의 생성량을 보였다. 따라서 본 연구에서는 *M. hyo* 30 μ g/mL의 농도를 사용하였다. 그 후 병원성 *M. hyo*를 30 μ g/mL의 농도로 RAW 264.7 cells에서 전처리 후에 mRNA의 발현과 더불어 실질적인 염증성 단백질의 생성을 조사한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. IL-1 β 는 *M. hyo* 접종 후에 18시간째부터 단백질이 생성되었으나 mRNA의 발현은 전 처리 후 바로 발현되어 8시간까지 발현이 증가되는 양상을 보였으나 그 이후에는 변화가 없었다. 그러나 IL-6의 경우는 mRNA의 발현과 동시에 단백질이 생성 되는 것을 확인할 수가 있었다. NO의 발생은 iNOS mRNA의 발현 증가와 비슷한 시간에 증가되는 경향을 보였으나 TNF- α 는 단백질은 *M. hyo* 전처리 후에 빠른 생성을 보여 4시간에 최고점을 보였으나 mRNA의 발현은 변화가 없음을 확인할 수 있었다.

RAW 264.7 세포주에서 OVE의 억제효과

앞의 실험에서 항마이코플라즈마 효과를 보인 OVE가 항염증효과에 활성이 있는지를 조사하였다. 30 μ g/mL의 *M. hyo*는 22.75 μ M의 NO 생성을 보였으나 32 μ g/mL의 OVE 전처리 결과 9.16 μ M의 NO 생성을 하였다. 이는 *M. hyo* 단독 처리군과 비교하여 NO 생성이 60% 억제된 결과이다. 또한 단독으로 처리한 OVE는 무처리군과 같은 수준으로 NO 생성이 일어나지 않았다(Fig. 4).

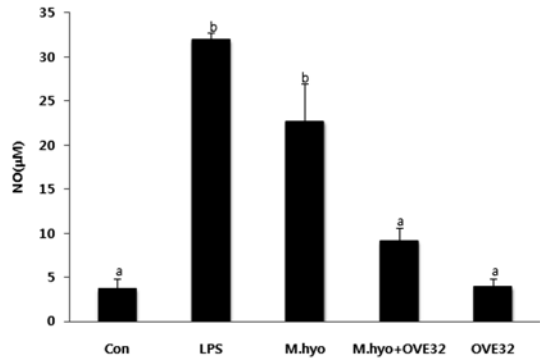


Fig. 4. Effect of OVE (32 μ g/ml) on NO production induced by intact *M. hyo* in RAW 264.7 cells. Con: no treatment, LPS: lipopolysaccharide (1 μ g/ml), *M. hyo*: *M. hyo* (30 μ g/ml), *M. hyo* + OVE: *M. hyo* (30 μ g/ml) after OVE (32 μ g/ml) treatment and OVE32: OVE 32 μ g/ml treatment. ^a*p* < 0.05 compared with the LPS treated RAW 264.7 cells. ^b*p* < 0.05 compared with the Con by ANOVA.

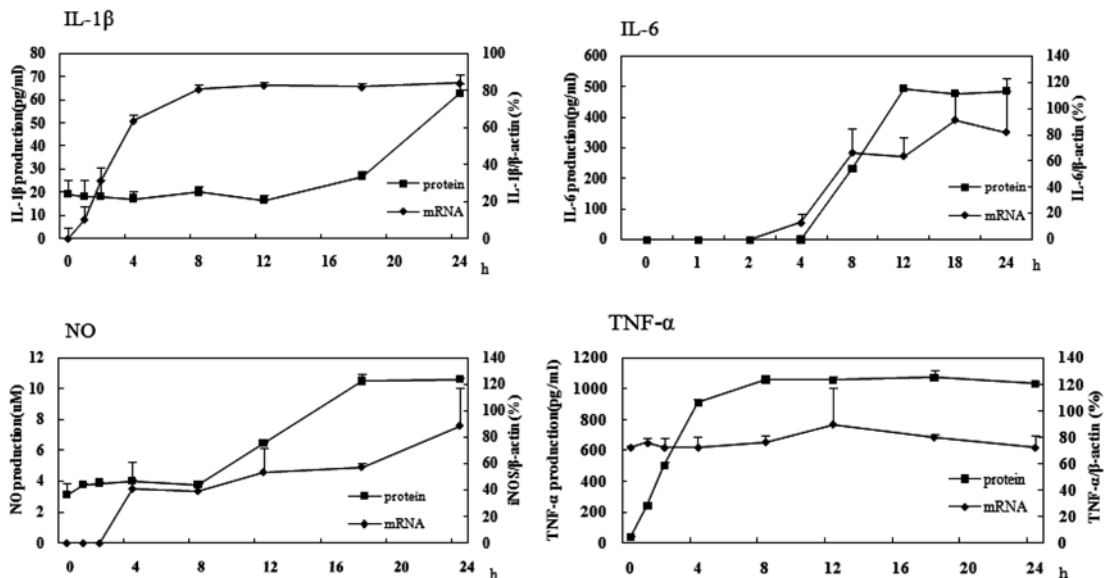


Fig. 3. Determination of proinflammatory cytokines and NO at protein (■) and mRNA (●) levels in RAW cells treated with *M. hyo*.

Table 3. Effects of OVE on mycoplasma-induced cytokine expression

Cytokine	Control	<i>Origanum vulgare</i> oil ($\mu\text{g/mL}$)				LPS (1 $\mu\text{g/mL}$)
		<i>M. hyo</i> (30 $\mu\text{g/mL}$)	2	16	32	
COX2	15.2 \pm 12.1	78.0 \pm 22.1	73.0 \pm 15.1	67.1 \pm 1.3	54.8 \pm 21	77.2 \pm 5.4
IL-1 β	2.4 \pm 2.3	68.5 \pm 27.8	43.7 \pm 4.4	27.7 \pm 2.1	15.2 \pm 4.3*	76.9 \pm 14.4
IL-6	4.2 \pm 2.2	34.0 \pm 13.4	42.1 \pm 6.3	23.5 \pm 17.7	12.7 \pm 6.4*	76.2 \pm 12.9
TNF- α	34.8 \pm 10	55.2 \pm 13.3	55.6 \pm 19.6	56.5 \pm 23.1	54.2 \pm 6.9	72.6 \pm 21.5
iNOS	12.6 \pm 18.8	45.1 \pm 12.3	45.6 \pm 13.5	26.3 \pm 14.5	19.5 \pm 7.6*	66.2 \pm 13.5

RAW 264.7 cells were treated with various concentrations of OVE in presence of *M. hyo* (30 $\mu\text{g/mL}$). Subsequently, the cells were assayed as described in the text. The cytokine's mRNA amounts are shown as percentages relative to β -actin mRNA. *Significant difference at $p < 0.05$ level compared with *M. hyo* (30 $\mu\text{g/mL}$).

Table 4. Minimum inhibitory concentration of tiamulin (TIA) and OVE

Organism	TIA ($\mu\text{g/mL}$)	OVE ($\mu\text{g/mL}$)	TIA/OVE ($\mu\text{g/mL}$)	Interpretation*	FIC index
<i>P. multocida</i> Type A	16	16	8/2	Synergism	0.63
<i>P. multocida</i> Type D	8	16	4/4	Synergism	0.75
<i>K. pneumoniae</i> 2001	32	16	8/2	Synergism	0.38
<i>K. pneumoniae</i> 1560	32	16	2/8	Synergism	0.56
<i>K. pneumoniae</i> 2208	16	16	8/4	Synergism	0.75
<i>M. hyopneumoniae</i>	0.25	32	0.06/4	Synergism	0.37
<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	32	16	32/8	Additive	1.00
<i>B. bronchiseptica</i>	64	16	32/4	Synergism	0.75

*The following method was used to interpret fractional inhibitory concentration (FIC) index. $\text{FIC}_{(\text{TIA})}$ and $\text{FIC}_{(\text{OVE})}$ represent the respective fraction of $\text{MIC}_{(\text{TIA})}$ and $\text{MIC}_{(\text{OVE})}$ present in the dilution of the mixture which corresponds to the $\text{MIC}_{(\text{TIA}+\text{OVE})}$. Then the results can be interpreted as follows: $\text{FIC}_{(\text{TIA})} + \text{FIC}_{(\text{OVE})} = 1$ simple additive effects; $\text{FIC}_{(\text{TIA})} + \text{FIC}_{(\text{OVE})} < 1$ synergism; $\text{FIC}_{(\text{TIA})} + \text{FIC}_{(\text{OVE})} > 1$ antagonism, if either $\text{FIC}_{(\text{TIA})}$ or $\text{FIC}_{(\text{OVE})} > 1$; $\text{FIC}_{(\text{TIA})} + \text{FIC}_{(\text{OVE})} > 1$ no interaction, if neither $\text{FIC}_{(\text{TIA})}$ or $\text{FIC}_{(\text{OVE})} > 1$.

Table 3에서 RAW 264.7 세포에 *M. hyo* 30 $\mu\text{g/mL}$ 처리 시 COX2, IL-1 β , IL-6, TNF- α , iNOS 값이 증가하였고, OVE 처리 시 사이토카인 수준은 농도-의존적으로 감소하였다.

FIC의 측정

돼지 유래 병원성세균에 대한 TIA와 OVE에 대한 시험관내 MIC와 FIC의 결과를 Table 4에 나타내었다. TIA 단독 투여 시 MIC는 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 에서 64 $\mu\text{g/mL}$ 였으나, OVE와 병용투여 시 0.06 $\mu\text{g/mL}$ 에서 32 $\mu\text{g/mL}$ 로 상대적으로 낮은 MIC 값을 보여주었다. 이러한 결과를 FIC index를 이용하여 해석한 결과 TIA와 OVE를 병용투여할 경우 시험관내에서 상승작용 혹은 상가작용을 한다는 것을 알 수 있다.

고 찰

우리나라의 양돈산업은 양돈장의 집약화, 다두화로 인

해 호흡기 질병이 빈번하게 발생하고 있다. 이는 돈군내 잠재성 질병으로 상존하여 사양관리 및 환경 변화로 임상형으로 진행되면서 만성 소모성 경과를 보이며 막대한 경제적 손실을 일으키고 있다 [4]. 그 중 *M. hyo*는 전세계적으로 돈군의 호흡기 감염을 일으키고 있는 병원체로, 세기관지와 기관지 상피세포의 점막에 부착하여 [22], 지속적인 마른기침, 성장지연, 사료효율 저하 등의 임상증상을 가지며, 돈군내 높은 발병율에 비해 폐사율은 매우 낮다 [20]. 이에 따라 돈군내 성행하는 mycoplasma 유발 호흡기 감염을 예방, 치료하고자 mycoplasma의 병인기전의 관한 연구 [15, 16]와 백신의 제조방법 및 효율증대 [23]에 관련된 많은 연구가 진행되었으나 돼지의 60%가 마이코플라스마 감염소견을 가지고 있는 것으로 보고되고 있다 [7].

위의 내용으로 볼 때, *M. hyo*는 집약적 양돈장 시스템과 보균돈의 생존 및 백신의 낮은 효율성으로 예방하기 어려운 질병임을 알 수 있다.

따라서 최근 *M. hyo* 유발 호흡기 질병을 백신이외의

방법으로 예방, 치료하고자 여러 연구가 진행되고 있으며 항생제의 적절한 병용으로 인한 항균효과의 상승작용을 유도 [21]하거나 천연물질을 이용한 항균과 항염증 효과를 기대하고 있다 [8].

따라서 본 연구에서는 약용식물의 추출물을 이용하여 *M. hyo*의 호흡기 질병에 대한 항균작용과 항염증 작용을 갖는 물질을 찾고자 하였다.

*M. hyo*의 균수는 균의 크기가 작으므로 하여 단백질의 양을 측정 한 후에 최종농도를 결정하였다 [17]. 본 연구에서는 Fig. 1에 나타난 것처럼 마이코플라즈마 농도 100 µg/mL은 10¹⁰ CCU에 해당되었으며 이러한 결과는 전보에서 보고한 내용과 일치하였다 [16].

*M. hyo*의 감염증에 대한 예방 및 치료는 현재 어려운 실정이므로 항생제를 대체할 식물항균제(phytobiotics) 개발을 위하여 첨가용 사료 소재로 활용 가능한 10개 식물추출물에 대한 항균활성을 비교한 결과 허브 추출물인 OVE는 다른 열수 추출물과는 다르게 강한 항마이코플라즈마의 효과를 보였다. 이러한 결과는 전보 [7]에서 보고한 세균 유래의 계면활성제인 surfactin C인 항 마이코플라즈마 물질보다 항균능력이 우수함을 보여준다. 이러한 항마이코플라즈마 활성에 대한 보고는 처음이나 OVE에 의한 생리활성 능력은 많이 알려져 있다. Savini 등 [19]은 최근에 Caco2 세포주에서 OVE에 대한 apoptosis을 유도하여 항암효과가 있다고 보고하였다. 미생물에 대한 많은 보고가 있으나 곰팡이인 *Typanosoma cruzi*에서 항곰팡이작용 [18] 그리고 장내 미생물감염증에 주원인균인 대장균과 포도상구균에 [14]에 우수한 항균력을 보이는 것으로 알려져 있다.

그러나 OVE은 시기, 계절 및 수확지의 장소에 따라 조금씩 달라지므로 성분분석을 통한 성분비율 및 지표물질의 확인이 중요하다. 따라서 본 연구에서는 GC/MS를 통하여 OVE의 주된 성분을 분석하였다. OVE의 구성성분은 carvacrol(68.78%)이 주를 이루고 그외 o-cymene(9.80%), terpinene(7.61%) 그리고 thymol(4.03%)로 구성되어 있다 [13]. 모두 성분은 carvacrol과 유사한 구조체 혹은 동족체로써 분류할 수 있으므로 품질 확인 및 성분확인을 위한 지표물질로 적절한 한 것으로 생각되었다.

OVE의 항마이코플라즈마 작용 외에 임상적으로 문제가 되는 만성 염증의 억제하는 효능을 검증하고자 하였다. 이러한 효능 검증을 위하여 먼저 병원성 *M. hyo*에 의한 염증사이토카인의 mRNA 수준과 단백질의 유도를 확인하였으며, 염증억제에 대한 효능 검증을 위해서는 RAW 264.7 세포주에 시료처리에 따른 NO 발생 감소를 측정함으로써 항염증 작용 정도를 측정하였다 [10]. 그 결과 *M. hyo*는 3 µg/mL에서 30 µg/mL까지는 농도-의존

적으로 RAW 264.7 세포주에서 NO 생성을 유도하였으나, 100 µg/mL에서는 NO 생성량이 약간 떨어지는 것으로 보아 이는 *M. hyo*로 인한 세포독성작용으로 인한 상대적 세포수의 감소에 따른 NO의 생성량 감소로 사료된다. 따라서 *M. hyo*의 염증 유도 농도는 30 µg/mL과 100 µg/mL로 설정하였으며 이는 LPS의 1 µg/mL 처리 시와 비슷한 수준의 NO 생성을 보였다.

위의 결과를 기초로 OVE의 마이코플라즈마의 MIC를 기준으로 RAW 264.7 세포주에 OVE 32 µg/mL로 전처리를 실시한 후에 *M. hyo*의 30 µg/mL를 처리하였다. 그 결과 *M. hyo*의 단독처리군보다 60% 낮은 NO 생산을 보여 항염증작용이 있음을 확인하였다. 이러한 결과는 OVE의 항염증 작용을 입증시켜주는 결과이며, 앞서 보고된 surfactin(50 µg/mL)과 함께 *M. hyo*(100 µg/mL)를 처리한 군이 *M. hyo*(100 µg/mL)의 단독처리군보다 약 33% 낮은 NO 생산을 보인 결과 보다 우수함을 알 수 있었다 [8]. 한편 RT-PCR을 이용하여 염증 관련 사이토카인을 측정 한 결과, OVE 처리군은 *M. hyo* 단독처리군과 비교하여 확인한 농도-의존적 감소를 보였으며 이는 NO 생산결과와 함께 OVE의 항염증작용을 입증시켜주었다.

기존의 마이코플라즈마에 사용하는 항생제인 TIA과의 상호작용을 알아보기 위하여 여러 호흡기 세균에서 MIC와 FIC를 측정하였을 때, TIA와 OVE의 MIC값은 각각 0.25-64 µg/mL 그리고 16-32 µg/mL이었으나, 병용투여하였을 때 MIC 값은 TIA와 OVE에서 0.06-32 µg/mL 그리고 2-8 µg/mL로 감소하였으며 FIC 값 또한 0.37-1.00 이었다. 시험균주인 *S. aureus*에서 뚜렷한 상가 작용을 보였으며, 나머지 호흡기 세균에서는 상승작용을 일으키는 것으로 나타났다. 따라서 OVE는 항생제와의 병용투여제로서 좋은 항마이코플라즈마 제제라고 할 수 있겠으며, 이는 수의임상에서 사용가능 함을 알려준다. OVE는 항마이코플라즈마 제제로 알려진 *Pseudomonas* spp. No. 57-250에서 생산되는 micacocidin의 마이코플라즈마에 대한 MIC 값인 0.06 µg/mL에 비해서 항마이코플라즈마 효과는 떨어지나, micacocidin의 생합성 과정이 복잡한데 비해 [9], OVE의 획득은 손쉬우며 위에서 언급하였던 항 *T. cruzi* 작용 [18] 및 *E. coli*와 *S. aureus* 196E의 발육 억제 작용 [14] 그리고 항염증작용으로 수의임상에서의 다양한 응용이 가능할 것으로 사료되었다.

결 론

본 연구의 결과 9가지 약용식물의 열수추출물과 *O. vulgare*의 정유추출물을 MIC값을 이용하여 항마이코플라즈마 효과를 측정 한 결과 *O. vulgare*의 정유추출물

(OVE)이 가장 효과가 좋은 것으로 판단되었다. OVE는 GC/MS분석을 이용하여 72.81% carvacrol-thymol로 이루어진 물질로 밝혀졌으며, OVE의 염증 억제 정도를 측정하기 위한 과정으로 *M. hyo*에 의한 cytokine 발현 양상을 알아본 결과, 24시간의 *M. hyo*의 처리시간이 적합하다고 판단되었다. RT-PCR과 NO assay를 통해 농도의 존적인 항염증 작용을 확인하였고, OVE가 마이코플라즈마에 사용되는 항생제인 TIA과의 병용투여로 호흡기 세균에서 항균작용의 상가작용과 상승작용을 일으킴을 확인하였다. 따라서, 이 연구에서 사용된 OVE는 천연 식물 추출물로 항마이코플라즈마를 위한 수의학적 응용의 소재로 충분한 가치가 있다고 평가된다.

감사의 글

이 논문은 2008년 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구입니다 (KRF-2008-521-E00146).

참고문헌

1. 김재영, 이용섭, 임용호. 수종의 한약재 추출물의 항산화 활성 및 항진균 활성. 한국미생물생명공학회지 2009, **37**, 42-48.
2. 김홍태, 이우원, 정경태, 이승미, 손은정, 이강록, 김금향, 이동수, 이근우. 유통되는 쇠고기에서 분리한 대장균의 항생제 내성 조사·연구. 한국가축위생학회지 2008, **31**, 17-29.
3. 송동준, 서동균, 이춘식, 배영찬, 김일일, 김봉환. 돼지 호흡기질병 병인체 의 항균제 감수성 조사. 한국가축위생학회지 2000, **23**, 19-28.
4. 이정아, 김성국, 조옥숙, 오강희, 박영구. 돼지의 호흡기질병 감염상황 조사. 한국가축위생학회지 1997, **20**, 27-36.
5. 이합희, 제임스 라, 한정희. 돼지 마이코플라즈마 폐렴 예방백신의 접종시기별 방어효과에 관한 연구. 한국가축위생학회지 2008, **31**, 291-303.
6. Hannan PC, Windsor HM, Ripley PH. *In vitro* susceptibilities of recent field isolates of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyosynoviae* to valnemulin (Econor), tiamulin and enrofloxacin and the *in vitro* development of resistance to certain antimicrobial agents in *Mycoplasma hyopneumoniae*. Res Vet Sci 1997, **63**, 157-160.
7. Hwang MH, Chang ZQ, Kang EH, Lim JH, Yun HI, Rhee MH, Jeong KS, Park SC. Surfactin C inhibits *Mycoplasma hyopneumoniae*-induced transcription of proinflammatory cytokines and nitric oxide production in murine RAW 264.7 cells. Biotechnol Lett

- 2008, **30**, 229-233.
8. Hwang MH, Kim MH, Gebru E, Jung BY, Lee SP, Park SC. Killing rate curve and combination effects of surfactin C produced from *Bacillus subtilis* complex BC1212 against pathogenic *Mycoplasma hyopneumoniae*. World J Microbiol Biotechnol 2008, **24**, 2277-2282.
9. Ino A, Hasegawa Y, Murabayashi A. Total synthesis of the antimycoplasmal antibiotic micacocidin. Tetrahedron Lett 1998, **39**, 3509-3512.
10. Kim HG, Yoon DH, Kim CH, Shrestha B, Chang WC, Lim SY, Lee WH, Han SG, Lee JO, Lim MH, Kim GY, Choi S, Song WO, Sung JM, Hwang KC, Kim TW. Ethanol extract of *Inonotus obliquus* inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264.7 macrophage cells. J Med Food 2007, **10**, 80-89.
11. Madsen ML, Nettleton D, Thacker EL, Edwards R, Minion FC. Transcriptional Profiling of *Mycoplasma hyopneumoniae* during Heat Shock Using Microarrays. Infect Immun 2006, **74**, 160-166.
12. Maes D, Segales J, Meys T, Sibila M, Pieters M, Haesebrouck F. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. Vet Microbiol 2008, **126**, 297-309.
13. Mockute D, Bernotiene G, Judzentiene A. The essential oil of *Origanum vulgare L. ssp. vulgare* growing wild in Vilnius district (Lithuania). Phytochemistry 2001, **57**, 65-69.
14. Park CS, Park GS, Kim ML. Effect of *Oregano (Origanum vulgare L.)* on the survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *staphylococcus aureus* 196E during cold storage. Korean J Soc Food SCI 1997, **13**, 440-447.
15. Park SC, Hsu WH, Yun HI, Jung KS, Jang KH, Oh TH, Lee KW, Yi SJ. Changes of intracellular calcium after administration of pathogenic and non-pathogenic *Mycoplasmas* in porcine ciliated tracheal cells. J Vet Clin Med 2001, **18**, 93-97.
16. Park SC, Yibchok-Anun S, Cheng H, Young TF, Thacker EL, Minion FC, Ross RF, Hsu WH. *Mycoplasma hyopneumoniae* increases intracellular calcium release in porcine ciliated tracheal cells. Infect Immun 2002, **70**, 2502-2506.
17. Ruiz A, Galina L, Pijoan C. *Mycoplasma hyopneumoniae* colonization of pigs sired by different boars. Can J Vet Res 2002, **66**, 79-85.
18. Santoro GF, das Graças Cardoso M, Guimarães LG, Salgado AP, Menna-Barreto RF, Soares MJ. Effect

- of *Oregano* (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. *Parasitol Res* 2007, **100**, 783-790.
19. **Savini I, Arnone R, Catani MV, Avigliano L.** *Origanum vulgare* induces apoptosis in human colon cancer caco2 cells. *Nutr Cancer* 2009, **61**, 381-389.
 20. **Schafer ER, Oneal MJ, Madsen ML, Minion FC.** Global transcriptional analysis of *mycoplasma hyopneumoniae* following exposure to hydrogen peroxide. *Microbiology* 2007, **153**, 3785-3790.
 21. **Stipkovits L, Miller D, Glavits R, Fodor L, Burch D.** Treatment of pigs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida*, and *Actinobacillus pleuropneumoniae* with various antibiotics. *Can J Vet Res* 2001, **65**, 213-222.
 22. **Tajima M, Yagihashi T.** Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* with the porcine respiratory epithelium as observed by electron microscopy. *Infect Immun* 1982, **37**, 1162-1169.
 23. **Wenzel RP, Craven RB, Davies JA, Hendley JO, Hamory BH, Gwaltney JM Jr.** Field trial of an inactivated *Mycoplasma pneumoniae* vaccine. I. Vaccine efficacy. *J Infect Dis* 1976, **134**, 571-576.
 24. **Zhang Q, Young TF, Ross RF.** Microtiter plate adherence assay and receptor analogs for *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Infect Immun* 1994, **62**, 1616-1622.