

## 여드름 환자에서 분리된 *pseudomonas aeruginosa* 38에 대한 三黃瀉心湯의 효과

권도경<sup>1</sup>, 서부일<sup>1</sup>, 박지하<sup>1</sup>, 노성수<sup>1</sup>, 김승모<sup>1</sup>, 구진숙<sup>2\*</sup>, 이은숙<sup>3</sup>

1 : 대구한의대학교 한의학과, 2 : 부부한의원, 3 : 대구한의대학교 한방피부미용학과

### The Antimicrobial Activity of Samhwangsasimtang against *pseudomonas aeruginosa* 38 isolated from an acne patient

Do-Kyong, Kwon<sup>1</sup>, Bu Il Seo<sup>1</sup>, Ji-Ha Park<sup>1</sup>, Seong-Soo Roh<sup>1</sup>,  
Seong-Mo Kim<sup>1</sup>, Jin-Suk Koo<sup>2\*</sup>, Eun-Sook Lee<sup>3</sup>

1 : Department of Oriental Medicine, Daegu Haany University, Gyeongbuk, Korea

2 : Couple Oriental Medical Hospital, 3 : Department of Herbal Skin Care, Daegu Haany University

#### ABSTRACT

**Objective :** I want to examine the antimicrobial activity of Samhwangsasimtang against *pseudomonas aeruginosa* 38 isolated from an acne patient.

**Method :** Antimicrobial activity was assayed through the hot water extract from Samhwangsasimtang against *pseudomonas aeruginosa* 38 isolated from an acne patient.

**Result :** The size of inhibition zone of Samhwangsasimtang extract was  $12.6 \pm 0.04$  mm. The optimal pH and temperature for the growth of isolated *pseudomonas aeruginosa* 38 were 6.0 and 37 °C, respectively. The minimum inhibitory concentration of Samhwangsasimtang extract was  $10 \pm 0.06 \mu\text{l}$  and the antimicrobial activity of Samhwangsasimtang extract was not destroyed by the heat (121 °C for 15 min) and not affected by pH.

**Conclusion :** Reviewing this experimental result, it appeared that Samhwangsasimtang had efficacy against *pseudomonas aeruginosa* 38 isolated from an acne patient.

**Key Words :** Antimicrobial activity, Samhwangsasimtang, *pseudomonas aeruginosa*, acne patient

## 서 론

*Pseudomonas aeruginosa*는 막대 모양의 간균의 형태를 띤 운동성을 가진 호기성인 Gram-negative 세균이다<sup>1,2)</sup>. 또한 동물의 병원성 균이기도 한 *Pseudomonas aeruginosa*는 식물의 병을 일으키는 식물병 병원균이기도 하다<sup>3)</sup>.

그람 염색에 의해 음성으로 염색되는 *pseudomonas aeruginosa*는 극성 편모를 가지며 catalase와 oxidase가 양성이다. 또한 glucose를 발효하지 않고 산화에 의해서 분해한다. 보통 한천에서 잘 발육하며, 혈액한천 배지에서 집락은 가장자리가 불규칙하고 조면 혹은 굵은 유리모양이며 용혈을 일으킨다. 점조성 균주는 청록색이나

\* 교신저자 : 구진숙, 부부한의원.

· Tel : 054-853-5511 · koojskbh@hanmail.net

· 접수 : 2010년 4월 19일 · 수정 : 2010년 6월 4일 · 채택 : 2010년 6월 22일

회색의 광택이 있는 집락을 나타내기도 한다고 알려져 있다. 자연계의 토양과 수중 등에 널리 분포한 이 *pseudomonas aeruginosa*는 기회감염과 원내감염 그리고 균교대증을 일으키며 대부분의 항균제에 내성을 나타내기도 하며 소독약에도 내성을 나타내는 균이 많은 것으로 알려져 있다. 또한 면역력이 약화된 개체에 기회감염과 병원감염을 일으켜 화상, 창상의 감염, 호흡기감염, 요로감염, 외과 수술 후 감염, 골수염, 외이염, 눈의 감염, 낭종성 섬유증, 패혈증 등을 일으키는 것으로 알려져 있으며 건조에는 약하나 수분에는 오래 견디는 것으로 알려져 있다<sup>4)</sup>.

이러한 *pseudomonas aeruginosa*는 세포표면에 다당류의 점액질을 분비하는데 이 점액질은 아주 다양한 역할을 한다. 이 점액질은 세포벽을 보호하는 역할을 하는 것과 동시에 세포 표면에 바이오필름을 형성하며 감염을 일으키게 하는 매개 역할을 하기도 한다. 이 점액질의 다당류 중 가장 주요한 성분인 lipopolysaccharide는 세포 외벽을 유지하는데 가장 중요한 역할을 하며 또한 감염을 매개 하는 가장 주요한 성분이라고 알려져 있다. 특히 pilin 과 flagellin이라고 하는 당단백질은 최근에 연구자들에게 주목을 받는 것으로서 *pseudomonas aeruginosa*의 인체세포에 고착하는 과정과 세포로 침입하는 과정에 관여하는 것으로 알려져 있다<sup>5)</sup>.

최근 들어 이러한 *pseudomonas aeruginosa*의 감염증에 의한 합병증으로 사망하는 경우는 항생제의 개발로 많이 감소하였다. 그러나 이러한 항생제들의 남용으로 인하여 항생제에 내성을 가지는 *pseudomonas aeruginosa*가 발견되기 시작하였고 이러한 내성균에 의한 감염으로 인한 사망이 증가하고 있는 추세이다. 또한 *pseudomonas aeruginosa*의 가장 큰 문제점은 multidrug efflux pumps를 가지고 있기 때문에 여러 가지 항생제에 대한 감수성이 매우 낮다는데 있다.

본 실험에서는 이러한 여러 가지 병을 일으키는 *pseudomonas aeruginosa*를 三黃瀉心湯을 이용하여 효과적으로 치료 및 예방할 수 있는지를 조사하고자 하였는데, 먼저, 여드름 환자로부터 *pseudomonas aeruginosa*를 분리 동정하여 *pseudomonas aeruginosa* 38이라고 명명하였으며 그 특성을 조사하였고, 한방임상에서 淸熱燥濕劑로 사용되고 있는 瀉心湯의 물 추출물을 이용하여 *pseudomonas aeruginosa*에 대한 항균활성의 효과에 대하여 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 三黃瀉心湯의 組成과 추출물의 제조

三黃瀉心湯은 황금(黃芩) 5 g, 황련(黃連) 5 g 및 대황(大黃) 5 g 으로 하였다.

2차 증류수 1L에 황금(黃芩) 5 g, 황련(黃連) 5 g 및 대황(大黃) 5 g 을 넣고 약탕기(대웅, Korea)로 2시간 30분가량 추출한 후 이 추출액을 filter paper (whatman No1 England)로 여과한 후 rotary vacuum evaporator (Buchi Rotavapor R-144, Germany)에서 60 cc로 농축하여 냉동실과 냉장실에 보관하면서 항균 활성을 측정하기 위한 시료로 사용하였다. 또한 pH가 항균 활성에 어떤 영향을 미치는지를 확인하기 위하여 열수 추출한 후 pH를 측정하였다.

Table 1. Medicinal stuff composition of Samhwangsasimtang

Medical stuffs	Capacity
황금(黃芩)	5 g
황련(黃連)	5 g
대황(大黃)	5 g

#### 2) 사용균주

본 실험에 사용한 균주는 2005년 6월에서 9월 까지 대구한의대학교 부속 한방병원에 내원한 여드름 환자의 창상부위에서 샘플을 수집하여 감기 환자의 구강부위를 면봉으로 도말하여 샘플을 수집하여 *pseudomonas aeruginosa* 38로 순수분리 동정된 균주를 사용하였다.

#### 3) 사용배지

균의 분리를 위해서는 Blood agar plate, M<sub>AC</sub>CONKEY agar plate, Nutrient agar plate (Difco, USA)를 사용하였고, *pseudomonas aeruginosa* 38에 대한 항균력 실험을 위해서는 Mueller Hinton agar와 Mueller Hinton broth (Difco, USA)를 사용하였다.

Table 2. Usage of media used in this study

Media	Usage
Blood agar plate	isolation of <i>pseudomonas aeruginosa</i> 38
M <sub>AC</sub> CONKEY agar plate	isolation of <i>pseudomonas aeruginosa</i> 38
Nutrient agar plate	isolation of <i>pseudomonas aeruginosa</i> 38
Mueller Hinton(broth)agar	antifungal test of <i>pseudomonas aeruginosa</i> 38
<i>pseudomonas</i> F agar	identification of <i>pseudomonas aeruginosa</i> 38

#### 4) 균주의 보관

순수 분리된 *pseudomonas aeruginosa* 38는 Nutrient broth에 접종하여 37 °C에서 30시간 배양한 다음 냉장실에 보관하면서 실험에 사용하였으며 4일에 한번씩 Blood agar plate에 배양한 다음 배양된 *pseudomonas aeruginosa* 38 colony를 새로운 Blood agar plate에 계대 하면서 균주를 보관 관리하였다.

## 2. 방법

### 1) *Pseudomonas aeruginosa* 38의 동정

#### (1) Direct smear

균의 분리를 위해 멸균면봉으로 여드름 환자의 창상에서 채취한 검체를 5 % Blood agar plate에 도말한 다음 37 °C에서 30 시간 배양한 후 집락 주위에 녹색의 불투명한 용혈이 있는 집락을 선택하였다.

#### (2) Gram staining

분리된 균은 Nutrient agar plate에 배양한 다음 Hucker 등의 방법을 변형하여<sup>6)</sup> 염 색하여 현미경으로 관찰하였다.

#### (3) Catalase test

Nutrient agar plate에 배양한 분리된 균체 소량은 10 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액에 넣어 거품의 발생 여부로 catalase 생성능을 조사하였다<sup>7)</sup>.

#### (4) Kanamycin susceptibility test

Nutrient agar plate 배지에 분리된 균을 고르게 퍼 바른 다음 그 위에 kanamycin disc를 놓고 24시간 배양을 하였다. 그 후 disk 주위에 발육억제대가 생성이 된 균주를 kanamycin에 감수성이 있는 것으로 확인하여 감수성이 없으면 일단 분리된 균을 1차적으로 *pseudomonas aeruginosa*로 추정을 하였다<sup>8)</sup>.

#### (5) Carbenicillin susceptibility test

Nutrient agar plate 배지에 분리된 균을 고르게 퍼 바른 다음 그 위에 Carbenicillin disc를 놓고 24시간 배양을 하였다. 그 후 disk 주위에 발육억제대가 생성이 된 균주를 kanamycin에 감수성이 있는 것으로 확인하여 감수성이 있으면 일단 분리된 균을 1차적으로 *pseudomonas aeruginosa*로 추정을 하였다<sup>8)</sup>.

#### (6) Gelatin solubility test

분리된 균을 nutrient broth에 배양한 다음, 균이 배양된 nutrient broth에 10 % gelatin를 1~2방울

떨어뜨려 탁도를 관찰 하였다. gelatin이 맑게 변하면 균에 용해된 것으로 확인을 하였다<sup>9)</sup>.

#### (7) Pyocyanin 색소 생성 test

분리된 균을 Mueller-Hinton agar 배지에 접종한 후 37 °C에서 5일간 배양한 다음 청녹색의 색소를 생성하는지 확인 하였다<sup>9)</sup>.

#### (8) Fluorescein 색소 생성 test

분리된 균을 *pseudomonas* F agar 배지에 접종한 후 37 °C에서 5일간 배양한 다음 녹색의 색소를 생성하는지 확인 하였다<sup>9)</sup>.

#### (9) Glucose 산화능 test

분리된 균을 1 %의 glucose가 첨가된 M<sub>AC</sub>CONKEY agar plate 배지에 접종한 후 37 °C에서 5일간 배양한 다음 붉은색의 색소를 생성하는지 확인 하였다<sup>9)</sup>.

#### (10) 42 °C 증식능 test

분리된 균을 *pseudomonas* F agar 배지에 접종한 후 42 °C에서 5일간 배양한 다음 증식을 하는지를 확인하였다<sup>9)</sup>.

### 2) *Pseudomonas aeruginosa* 38의 생육곡선 조사

500 ml의 삼각 플라스크에 nutrient broth를 100 ml 넣고 고압증기 멸균한 다음 배지를 식힌 후 전배양해 놓은 *pseudomonas aeruginosa* 38을 1cc 접종하여 37 °C shaking incubator에서 160 stroke/min으로 진탕배양하면서 각 시간대 별로 spectrophotometer (Shimadzu, Japan)을 이용하여 660nm에서 흡광도를 측정하여 생육곡선을 확인하였다.

### 3) *Pseudomonas aeruginosa* 38의 생육최적 pH 조사

Nutrient broth 배지의 pH를 각각 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 9.0로 조정한 다음 100 ml 의 삼각 플라스크에 pH가 조정된 배지를 각각 20 ml씩 분주하여 고압증기 멸균한 후 식힌 다음 전 배양한 균체를 400 µl 접종하여 shaking incubator에서 160 stroke/min으로 30 시간 배양한 후 spectrophotometer (Shimadzu, Japan)을 이용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하여 *pseudomonas aeruginosa* 38의 생육 최적 pH를 확인하였다.

### 4) *Pseudomonas aeruginosa* 38의 생육최적온도 조사

Nutrient broth 배지를 100 ml의 삼각 플라스크에 20 ml씩 분주하여 고압증기 멸균한 후 식힌 다음 전 배양한 균체를 400 µl 접종하여 25 °C, 35 °C, 37

℃, 42 ℃ shaking incubator에서 160 stroke/min으로 30시간 배양한 후 spectrophotometer (Shimadzu, Japan)을 이용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하여 *pseudomonas aeruginosa* 38의 생육최적온도를 확인하였다.

5) *Pseudomonas aeruginosa* 38에 대한 三黃瀉心湯 추출물의 항균활성 측정

三黃瀉心湯 추출물의 *pseudomonas aeruginosa* 38에 대한 항균활성 측정은 Zaika의 방법<sup>10)</sup>을 변형하여 한천배지 확산법(disc-agar plate diffusion method)으로 측정을 하였다. 항균활성을 측정하기 위하여 Macfarland tube No. 0.5의 탁도로 맞춘 전배양한 *pseudomonas aeruginosa* 38 균액을 멸균된 면봉으로 Mueller-Hinton agar plate에 얇게 도말한 다음 三黃瀉心湯 추출물을 50 μl loading 해서 미리 건조시켜 놓은 paper disk (φ 8mm, Do910606 Toyo Roshi Kaisha, Ltd, Japan)를 올려 놓은 다음 37 ℃ incubator에서 30 시간 배양하여 paper disk 주위에 형성된 inhibition zone을 Autocaliper (CD-20제, Absolute Digimatic Mitutoyo corp, Japan)로 직경을 mm 단위로 측정하여 항균력을 확인하였다.

6) 三黃瀉心湯 추출물의 MIC(Minimal Inhibitory Concentration)검색

MIC는 오 등의 방법<sup>11)</sup>을 이용하여 검색하였다. 10 ml의 Mueller-hinton broth가 들어있는 6개의 시험관에 전배양한 *pseudomonas aeruginosa* 38를 10<sup>5</sup> cfu/ml의 농도로 분주한 후 三黃瀉心湯 추출물을 각각의 시험관에 4, 8, 12, 16, 20, 24 μl의 양만큼 첨가한 후 37 ℃에서 30 시간 배양하여 탁도를 나타내지 않는 최소저해농도를 MIC(Minimal Inhibitory Concentration)로 나타내었다.

7) 三黃瀉心湯 추출물의 열 안정성 조사

三黃瀉心湯 추출물의 열 안정성을 조사하기 위하여 三黃瀉心湯 추출물과 이 三黃瀉心湯 추출물을 121 ℃, 1.5기압에서 15분간 멸균한 추출물을 60 μl씩 분주하여 건조시켜 놓은 disk paper를 *pseudomonas aeruginosa* 38 를 MacFarland tube No 0.5의 탁도로 맞추어 얇게 도말한 Mueller Hinton agar 배지위에 올려놓은 다음 37 ℃에서 30시간 배양하여 두 가지 시료의 inhibition zone 크기를 비교하여 열에 대한 안전성을 조사하였다.

8) 三黃瀉心湯 추출물의 pH 안정성 조사

三黃瀉心湯 추출물의 pH 안정성을 조사하기 위하

여 추출한 시료를 각각 10cc 취하여 염산 또는 수산화나트륨으로 pH를 5, 7, 9, 11로 조절한 후 상온에서 1시간 가량 방치 하였다. 이후 다시 최적 pH인 7로 중화시켜서 추출물을 60 μl씩 분주하여 건조시켜 놓은 disk paper를 *pseudomonas aeruginosa* 38 를 MacFarland tube No 0.5의 탁도로 맞추어 얇게 도말한 Mueller Hinton agar 배지위에 올려놓은 다음 37 ℃에서 30시간 배양하여 각 시료의 inhibition zone 크기를 비교하여 pH에 대한 안전성을 조사하였다.

결 과

1. 분리한 균주의 동정과 특성

분리한 *pseudomonas aeruginosa* 38 균주의 형태학적인 특성을 조사한 결과 Gram staining 하였을 때 Gram 음성을 나타내었고 간균의 형태를 나타내었다. Blood agar plate에 30시간 배양하였을 때 적혈구를 부분적으로 용혈하여 α-용혈(녹색)을 생성하였다.

분리한 *pseudomonas aeruginosa* 38 균주의 생화학적인 특성을 조사한 결과 glucose 산화력이 있는 것을 확인하였으며, catalase test에서는 양성반응을 보였다. 또한 항생제 kanamycin에는 저항성을 보였으며 carbenicillin에는 감수성이 있는 것으로 나타났으며 *pseudomonas aeruginosa*가 생성하는 색소인 pyocyanin과 fluorescein을 생성하는 것으로 확인 하였으며 gelatin의 액화 능력이 있으며 42 ℃에서 생육이 가능한 것으로 나타났다.

최종적으로 API Kit system (Bio Merieux)을 이용하여 동정해본 결과도 *pseudomonas aeruginosa*로 확인 되었다.

Table 3. Morphological and biochemical characteristics of selected *pseudomonas aeruginosa* 38

Morphological and Biochemical characteristic	
Direct smear	positive
Gram staining	negative
Catalase test	positive
Kanamycin susceptibility test	resistant
Carbenicillin susceptibility test	susceptible
Gelatin solubility test	soluble
Pyocyanin production test	positive
Fluorescein production test	positive
Glucose oxidation test	negative
42 ℃ growth test	positive

## 2. *Pseudomonas aeruginosa* 38의 생육 곡선

nutrient broth 배지에 *pseudomonas aeruginosa* 38를 37 °C에서 배양하며 생육곡선을 조사한 결과, 분리된 *pseudomonas aeruginosa* 38는 약 24시간 가까이 배양하였을 때 stationary phase에 도달하는 것으로 확인되었다(Fig. 1).

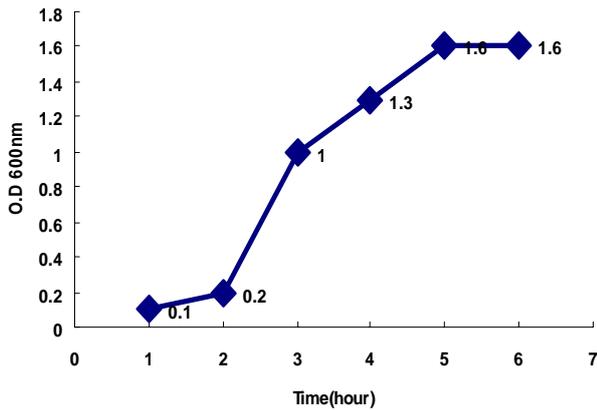


Fig. 1. Time course of selected *pseudomonas aeruginosa* 38

## 3. *Pseudomonas aeruginosa* 38의 생육 최적 pH

pH 가 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0으로 조정된 nutrient broth 배지에 *pseudomonas aeruginosa* 38를 배양하여 *pseudomonas aeruginosa* 38의 생육 최적 pH를 조사한 결과, 생육을 위한 최적의 pH는 6.0로 나타났으며, 알칼리 쪽의 pH 보다는 약산성 쪽에서 균의 생육이 왕성한 것으로 나타났다(Table 4).

Table 4. Optimum pH of selected *pseudomonas aeruginosa* 38

pH	O,D 660nm
5.0	1.1
6.0	1.5
7.0	1.3
8.0	1.0
9.0	0.7

## 4. *Pseudomonas aeruginosa* 38의 생육 최적온도

Nutrient broth 배지에 *pseudomonas aeruginosa* 38를 각 25 °C, 35 °C, 37 °C, 42 °C에서 배양하여 *pseudomonas aeruginosa* 38의 생육 최적온도를 조

사한 결과, 생육을 위한 최적의 온도는 37 °C로 나타났으며, 42 °C에서 배양한 경우 생육도는 약 50 %가 감소하는 것으로 나타났다(Table 5).

Table 5. Optimum temperature of selected *pseudomonas aeruginosa* 38

Temp ( °C )	O,D 660nm
25	0.8
35	1.2
37	1.6
42	0.9

## 5. 三黃瀉心湯 추출물의 *pseudomonas aeruginosa* 38에 대한 항균활성

*pseudomonas aeruginosa* 38의 항균활성을 측정 실험을 5회 이상 실시하여 inhibition zone의 크기를 측정된 결과를 sigma plot 5.0 program을 이용하여 평균 ± 표준편차로 나타내었을 때, inhibition zone의 크기는 12.6 ± 0.04로 나타났다 (Table 6).

Table 6. Antimicrobial activity of extract from Samhwangsasimtang

Extract	Inhibition zone (mm)
Samhwangsasimtang	12.6 ± 0.04

## 6. 三黃瀉心湯 추출물의 MIC(Minimal Inhibitory Concentration)검색

항생제에 대한 세균의 감수성 측정에 가장 널리 사용되는 MIC(Minimal Inhibitory Concentration)검색을 실시한 결과, 三黃瀉心湯 추출물의 MIC는 10 ± 0.06 μl 로 확인 되었다(Table 7).

Table 7. Minimal Inhibitory Concentration of samhwangsasimtag Extract against selected *pseudomonas aeruginosa* 38

Extract	±MIC (μl)
Samhwangsasimtang	10 ± 0.06

## 7. 三黃瀉心湯 추출물의 열 안정성

三黃瀉心湯 추출물과 그 추출물을 고압 증기 멸균한 두 시료를 가지고 5회 이상 실험하여 inhibition zone의 크기를 측정된 결과를 sigma plot 5.0 program을 이용하여 평균 ± 표준편차로 나타내었을 때, 고압 증기 멸균한 시료가 더 큰 inhibition zone을 가지는 것으로 보아, 이 추출물은 열에 매우 안정하다는 것을 확인할 수 있었다(Table 8).

Table 8. Effect of heat treatment on the growth inhibitory activity of Samhwangsasimtang extract against selected *pseudomonas aeruginosa* 38

Extract	Inhibition zone (mm)	
	100 °C 2.5hr	121 °C 15min
Samhwangsasimtang	10.1 ± 0.09	13.0 ± 0.05

## 8. 三黃瀉心湯 추출물의 pH 안정성

三黃瀉心湯 추출물의 pH 안정성을 5회 이상 실험하여 inhibition zone의 크기를 측정한 결과를 sigma plot 5.0 program을 이용하여 평균 ± 표준편차로 나타내었을 때, 그 결과는 pH 3, 5, 7, 9, 11 등의 다양한 pH에서도 inhibition zone의 크기에 변화가 없는 것으로 보아, 이 추출물은 다양한 범위의 pH에서 안정성을 가지는 것으로 확인 되었다(Table 9).

Table 9. Effect of pH treatment on the growth inhibitory activity of Samhwangsasimtang extract against selected *pseudomonas aeruginosa* 38

Extract	Inhibition zone (mm)			
	pH 5	pH 7	pH 9	pH 11
Samhwangsasimtang	12.5 ± 0.02	12.5 ± 0.02	12.5 ± 0.02	12.5 ± 0.03

## 고찰

三黃瀉心湯은 大黃, 黃連, 黃芩으로 구성된 처방으로, 《金匱要略》에 처음으로 수록된 처방으로, 「心氣不足, 吐血, 衄血, 瀉心湯主之.」라고 기록되어 있다<sup>12)</sup>. 이 瀉心湯은 瀉火解毒, 清化濕熱하는 효능을 지니고 있어서, 모든 실열화증(實熱火證)을 치료한다<sup>13)</sup>. 本方은 비록 瀉心湯의 이름이 있지만, 실제로는 心火만을 瀉하는 것이 아니라, 모든 實火를 瀉하며, 熱毒을 解하고, 濕熱을 清하는 方劑이다. 예를 들면, 外感熱病으로 高熱, 面紅, 目赤, 煩躁, 神昏發狂, 舌苔黃膩하는 증상이 나타나는 것을 치료하며, 또한 熱이 심하여 迫血妄行하여 吐血, 衄血의 증상이 나타나는 것을 치료한다. 疔瘡走黃, 丹毒, 癰腫, 敗血症, 眼目紅腫, 濕熱黃疸 및 下痢膿血 등의 증상을 치료한다<sup>13)</sup>. 그런데, 三黃瀉心湯에 관한 실험 연구를 살펴보면, 高脂血症에 효과가 있음을 밝히고 있는 연구가 있으나<sup>14)</sup>, 清熱製劑임에도 불구하고, 항균효과를 탐색한 연구는 없었다.

*Pseudomonas aeruginosa*는 pseudomonadaceas family에 속하는 호기성의 그람음성 간균이며 하나의 극성 flagellum에 의해 운동성을 가진다. 대개의 경우 pyocyanin이라는 청록색의 색소를 생성하는 것이 특징

이다<sup>15,16)</sup>. *Pseudomonas aeruginosa*는 진주색을 띠며 포도의 향과 비슷한 향기를 내는 것으로 알려져 있으며 또한 디젤유와 항공유를 탄소원으로 하여 생육할 수 있기 때문에 탄화수소를 이용하는 미생물로 알려져 있다. 또한 호기성 세균으로 알려져 있는 *pseudomonas aeruginosa*는 산소가 고갈되거나 매우 적은 상태에서도 생육을 할 수 있는 것으로도 알려져 있다<sup>2)</sup>. *Pseudomonas*속에 속하는 *pseudomonas aeruginosa*는 푸른색을 띠는 pyocyanin, 황색을 띠는 pyoverdin, 붉은 색을 띠는 pyorubin이라는 다양한 색소를 분비하며, King 등은 이러한 색소를 많이 생산하기 위한 배양조건을 확립하기도 하였다<sup>15)</sup>. 이들 색소 중 pyocyanin은 세균에 독성을 나타내는 색소이며 산화적 스트레스에 의해 *caenorhabditis elegans*를 죽음에 이르게 하기도 하는 것으로 알려져 있다<sup>17)</sup>. 또한 pyoverdin과 pyorubin의 확인과 42 °C에서 생육할 수 있는 가를 확인함으로써 병원성이 있는 *Pseudomonas aeruginosa* 인지를 확인할 수 있다.

또한 이 균은 습한 환경에서 잘 자라며 사람의 피부, 외이, 상기도, 또는 대장 등에서 집락을 형성하여 생존하며 대부분의 병원성 감염균이다. 건강한 사람에게는 거의 감염을 일으키지 않으며 정상적인 피부 또는 점막의 방벽이 파괴되거나 통과되는 경우 특히 화상, 수술, 기관삽관 등에서 감염이 잘 일어나며 화학요법에 의한 항암요법, 당뇨, 암, AIDS 등으로 인한 면역기능이 저하 되었을 때 또는 항생제 치료에 의한 정상 세균층의 보호기능이 상실 되었을 때 감염이 잘 일어난다<sup>18)</sup>. 감염의 과정을 보면 pilin 과 flagellin이라고 하는 당단백질은 최근에 연구자들에게 주목을 받는 것으로서 *pseudomonas aeruginosa*의 인체세포에 고착하는 과정과 세포로 침입하는 과정에 관여하는 것으로 알려져 있다<sup>5)</sup>. 세포의 침입 후 세포 아래의 조직의 손상이 일어난다.

*Pseudomonas aeruginosa*에 의한 호흡기의 감염은 대부분 면역력이 저하된 사람에게서 발생하며 중환자실에서 기관삽관이 된 경우 가장 흔하게 발생한다. 그 외 만성 폐질환이 있는 사람, 울혈성 심부전, AIDS 등으로 인해 발생되기도 하며 또한 혈액에 감염 되었을 경우 열, 빈혈, 빈호흡, 쇠약 등의 증세가 나타나며 지남력이 상실되고 저혈압의 증세가 나타나며 황달현상이 나타나기도 한다<sup>19)</sup>. *Pseudomonas aeruginosa*는 또한 습한 조건에서 흔히 발견되기 때문에 악성 외이도염을 잘 일으킨다. *Pseudomonas aeruginosa*에 의한 악성 외이도염은 흔히 나이 많은 당뇨 환자에서 주로 발생하며 耳痛과 耳漏 현상을 일으킨다. 또한 심해지면 안면신경의 마비가 일어나며 외이도의 부종, 홍반, 화농성 분비 등이 일어나며 소아와 성인에게서 만성 화농성 중

이염을 일으키기도 한다<sup>4)</sup>. 또한 이로 인하여 뇌수막염과 뇌농양을 포함한 중추신경계를 감염시켜 다른 세균성 뇌수막염과 마찬가지로 열, 두통, 정신의 혼미 등을 일으키기도 한다<sup>4)</sup>.

*Pseudomonas aeruginosa*는 또한 피부와 연부조직에 감염을 일으켜 수포, 농포, 대수포, 피하결절, 심부농양, 봉와직염 등을 일으키며 패혈증을 일으키기도 하며 사지, 회음부, 얼굴 또는 구인두등에 심한 괴사 또는 괴저를 일으키기도 한다. 이러한 현상은 피부가 외상, 화상, 피부염, 또는 말초혈관 질환 등으로 인해 손상 받을 때 발생하기 쉬우며 심한 화상에 의한 피부 손상 시에 발생하기 쉬우며 열이 나거나 저체온, 혼미, 핏뇨, 저혈압, 때때로 호흡부전이나 폐렴 등을 일으키기도 한다<sup>18)</sup>. 또한 *pseudomonas aeruginosa*는 경우에 따라 노인에서 요로감염을 동반한 뼈와 관절에 감염을 일으켜 척추 골수염을 일으키기도 한다. 이 경우 허리와 목의 통증을 주로 호소하며 열이나 전신증상은 드물다. 또한 위장관의 어디에서나 발생하여 이장관 감염을 일으켜 괴사성 장염 또는 유사 질환을 유발하기도 한다<sup>18)</sup>.

이러한 여러 가지 질병을 일으킬 수 있는 *pseudomonas aeruginosa*는 우리 주위에서 매우 흔하게 볼 수 있는 기회감염 균이지만 이 균의 가장 걱정스러운 특징은 항생제에 대한 감수성이 약하다는 데 있다. 이러한 항생제에 대한 낮은 감수성은 항생제에 저항할 수 있는 유전자들에 의해 생성되는 multidrug efflux pump들에 의해 생겨난다. 이러한 pump들에 의해 항생제의 세포내 유입이 제한되어 지기 때문에 항생제에 대한 감수성이 낮아지는 것으로 알려져 있다. 또한 쉽게 돌연변이를 일으킴으로써 이러한 항생제 저항성을 가지기도 하며 자연계에서 쉽게 다른 유전자를 도입함으로써 저항성을 가지기도 한다. 최근의 연구에 의하면 형태적으로 이 균들이 돌연변이를 일으켜 항생제 저항성을 가지면 바이오필름을 형성하거나 또는 세포의 크기가 작아지는 현상을 보이기도 한다고 알려져 있다<sup>5)</sup>.

이들 *pseudomonas aeruginosa*의 서식은 벌꿀에 의해서 막을 수 있다는 연구 결과도 있으며<sup>20)</sup>, 또한 우리 몸에 유익한 박테리아나 효모로 만들어진 식이 보충제를 섭취함으로써 *pseudomonas aeruginosa*의 서식을 막거나 또는 *pseudomonas aeruginosa*로 인한 발병을 막을 수 있다는 연구 결과도 있다<sup>21)</sup>. 현재 *pseudomonas aeruginosa*에 저항할 수 있는 Immunoprophylaxis에 대한 연구도 활발히 이루어지고 있는 실정이다<sup>22)</sup>.

최근 들어 이러한 항생제에 저항성을 가지는 *pseudomonas aeruginosa*가 많이 발견되면서 이러한

내성균에 의한 감염으로 인한 사망이 증가하고 있는 추세여서 사회적인 문제로 대두되고 있다. 그런데, 최근까지 한의학계에서는 한약제에 대한 항균활성의 검색은 많이 이루어져 왔으나 한약제제에 대한 항균활성의 검색에 대해서는 연구가 미진한 편이었다. 그리하여 본 연구에서는 이러한 여러 가지 질병을 일으키는 *pseudomonas aeruginosa*를 三黃瀉心湯의 물 추출물을 이용하여 효과적으로 치료 및 예방할 수 있는지를 조사하기 위하여 여드름 환자에 창상에서 *pseudomonas aeruginosa*를 분리 동정하여 *pseudomonas aeruginosa* 38이라고 명명하였으며, 그 항균효과와 특성을 조사하였다.

분리 동정된 *pseudomonas aeruginosa* 38은 37 °C 에서 약 24시간 가까이 배양하였을 때 stationary phase에 도달하는 것으로 확인되었으며, 생육최적 pH를 조사한 결과 생육을 위한 최적의 pH는 약산성인 6.0으로 나타났다. 또한 생육을 위한 최적의 온도는 37 °C로 나타났다. 三黃瀉心湯의 물 추출물로 항균 활성을 측정된 결과는 inhibition zone의 크기가  $12.6 \pm 0.04$ 로 나타나, 항균효과가 우수한 것으로 판명되었다. 三黃瀉心湯의 추출물로 MIC(Minimal Inhibitory Concentration)를 검색한 결과, 三黃瀉心湯 추출물의 MIC는  $10 \pm 0.06 \mu\text{l}$ 로 확인되었으며, 이 추출물은 열에 매우 안정하다는 것을 확인할 수 있었고, 또한 다양한 범위의 pH에서 안정성을 가지는 것으로 확인되었다.

본 연구 결과로 보아 여드름 환자의 피부에서 분리된 *pseudomonas aeruginosa* 38에 대하여 三黃瀉心湯의 추출물은 높은 항균활성을 보였으며 적은 농도에서도 항균 활성이 강한 것을 확인할 수 있었다. 이러한 연구 결과를 바탕으로 三黃瀉心湯의 항균활성에 대하여 임상에서 직접 활용할 수 있도록 더 많은 연구가 필요하리라고 본다.

## 결 론

여드름환자의 피부에서 분리한 *pseudomonas aeruginosa* 38에 대한 三黃瀉心湯의 항균효과를 규명하기 위하여 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 항균활성의 측정결과 三黃瀉心湯 추출물의 inhibition zone은  $12.6 \pm 0.04$  mm 이었다.
2. 三黃瀉心湯 추출물의 MIC(Minimal Inhibitory Concentration)는  $10 \pm 0.06 \mu\text{l}$  이었다.
3. 고압 증기 멸균한 시료가 더 큰 inhibition zone

(13.0 ± 0.05 mm)을 가지는 것으로 보아, 이 추출물은 열에 매우 안정하다는 것을 확인할 수 있었다.

4. 다양한 pH에서도 inhibition zone의 크기에 변화가 없는 것으로 보아, 이 추출물은 다양한 범위의 pH에서 안정성을 가지는 것으로 확인 되었다.

이상과 같은 결론으로 여드름환자의 피부에서 분리 동정된 *pseudomonas aeruginosa* 38에 대한 三黃瀉心湯의 추출물은 높은 항균효과를 보여 주었다.

## 참고문헌

- Holt JG, Kreig NR, Sneath HA, Stalery JT, Williams ST, Bergy's Manual of Systemic Bacteriology, 9th ed. The Williams & Wilkins Co, Baltimore, Md, 1994;93-168.
- Collins FM. Effect of aeration on the formation of nitrate-reducing enzymes by *P. aeruginosa*. Nature. 1955;175(4447):173-4.
- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology, 4th ed. Mosby Inc, St. Louis, 2002;297-304.
- Morrison AJ, Wenzel RP. Epidemiology of infectins due to *Pseudomonas aeruginosa*. Rev Infect Dis. 1984;6(Suppl):S627-42.
- Cornelis P. Pseudomonas: Genomics and Molecular Biology, 1st ed. Caister Academic Press, Norfolk, UK, 2008;87-128.
- Smibert RM, Krieg NR. General characterization, In Gerhardt P, Murray RGE, Costilow RN, Nester EW, Wood WA, Krieg NR, Phillips GB. Manual of methods for general bacteriology. American Society for Microbiology. Washington, D.C. 1981;409-43.
- Facklam R, Elliott JA. Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, gram-positive cocci, excluding the streptococci and enterococci. Clin Microbiol Rev. 1995;8:479-95.
- Burdash NM, West ME. Identification of Streptococcus pneumoniae by the Phadebact coagglutination test. J Clin Microbiol. 1982;15(3):391-4.
- 이건섭, 김승곤, 김신무, 정경석, 김영권, 정태화, 오홍백. 진단병원미생물학. 서울:고려의학. 1989 : 466-467.
- Zaika LL. Spices and herbs: their antibacterial activity and its determination. J Food Saf. 1988;9(2):97-118.
- 오덕환, 함홍시, 박부길, 안철, 유진영, 식품부패 및 병원미생물에 대한 천연약용식물 추출물의 항균 효과 : 한국식품과학회지. 1998;30(4):957-63.
- 史定文, 王建平. 金匱要略自學輔導. 北京:中醫古籍出版社. 1988 : 146-147.
- 서부일. 알기 쉬운 방제학. 대구:대원당기획출판사. 2008 : 73-75.
- 정명현, 한성준. 생약복합제제(三黃瀉心湯, 黃連解毒湯)가 흰쥐의 실험적 고지혈증에 미치는 영향. 생약학회지. 1996;27(4):397-407.
- King EO, Ward MK, Raney DE. "Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin.". J Lab Clin Med. 1954; 44(2):301-7.
- Hassett DJ. Anaerobic production of alginate by *Pseudomonas aeruginosa*: alginate restricts diffusion of oxygen. J Bacteriol. 1996;178(24):7322-5.
- Prithiviraj B, Bais H, Weir T, Suresh B, Najarro E, Dayakar B, Schweizer H, Vivanco J. Down regulation of virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* by salicylic acid attenuates its virulence on Arabidopsis thaliana and Caenorhabditis elegans. Infect Immun. 2005;73(9):5319-28.
- Fine MJ, Smith MA, Carson CA, et al. Prognosis and outcomes of patients with community-acquired pneumonia. A meta-analysis. JAMA. 1996;275(2):134-41.
- Diekema DJ, Pfaller MA, Jones RN, et al. Survey of bloodstream infections due to gram-negative bacilli: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, and Latin America for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997. Clin Infect Dis. 1999;29(3):595-607.
- Kwakman PH, Van den Akker JP, Güçlü A, Aslami H, Binnekade JM, de Boer L, Boszhard L, Paulus F, Middelhoek P, te Velde AA, Vandenbroucke-Grauls CM, Schultz MJ, Zaat SA. Medical-grade honey

kills antibiotic-resistant bacteria in vitro and eradicates skin colonization, Clin Infect Dis. 2008;46(11):1677-82.

21. Forestier C, Guelon D, Cluytens V, Gillart T, Sirot J, de Champs C. Oral probiotic and prevention of *Pseudomonas aeruginosa* infections: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study in ICU-patients. Crit Care. 2008;12(3):R69.
22. Döring G, Pier GB. Vaccines and immunotherapy against *Pseudomonas aeruginosa*. Vaccine. 2008;26(8):1011-24.