

完帶湯의 *Gardnerella vaginalis*에 대한 시험관내 항균력 및 Clindamycin과 병용효과

대구한의대학교 한의과대학 부인과교실

이승혜, 김동철

ABSTRACT

In Vitro Antibacterial Effects of Wandae-tang Aqueous Extracts and Their Combination Effects with Clindamycin against *Gardnerella Vaginalis*

Seung-Hye Lee, Dong-Chul Kim

Dept. of Oriental Obstetrics & Gynecology, College of Oriental Medicine,
Dae-Gu Hanny University

Objectives: The object of this study was to observe the in vitro antibacterial effects of Wandae-tang extracts and combination of Wandae-tang extracts and Clindamycin against *Gardnerella vaginalis* ATCC14018.

Methods: Antibacterial activities against *Gardnerella vaginalis* ATCC14018 of Wandae-tang extracts were detected using standard agar microdilution methods. In addition, the effects on the bacterial growth curve were also monitored at minimal inhibitory concentration(MIC) and MIC \times 2 levels. The combination effects of Wandae-tang extracts with Clindamycin were observed by Checkerboard microtiter assay, and the effects of bacterial growth curve was treated with Wandae-tang extracts MIC+Clindamycin MIC, 1/2 MIC and 1/4 MIC, respectively.

Results: MIC of Wandae-tang extracts and Clindamycin against *Gardnerella vaginalis* ATCC14018 were detected as $1.719\pm 0.856(0.782\sim 3.125)$ mg/ml and $0.010\pm 0.006(0.004\sim 0.016)$ μ g/ml. In addition, Clindamycin and Wandae-tang extracts were also showed marked dosage-dependent inhibition of bacterial growth, and more dramatical inhibitions were detected in Clindamycin+Wandae-tang extracts MIC treatment. Fractional inhibitory concentration index in combination of Wandae-tang extracts and Clindamycin were detected as $0.294\pm 0.052(0.250\sim 0.375)$ at Checkerboard microtiter assay.

Conclusions: The results obtained in this study suggest that Wandae-tang extracts showed antibacterial effects against *Gardnerella vaginalis* ATCC14018, and they also showed dosage-dependent inhibitory effects on the bacterial growth. In addition, combination treatment of Wandae-tang extracts with Clindamycin showed more synergistically potent inhibitory effects on the growth of *Gardnerella vaginalis*.

Key Words: *Gardnerella Vaginalis*, Wandae-tang, Clindamycin, MIC

I. 서 론

감염성 질염은 원인에 따라 세균성, 곰팡이성, 원충류성 및 바이러스성으로 나뉘는데¹⁾, 이 중 세균성 질증은 비염증성으로 질 내의 정상세균총인 유산간균이 *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, 혐기성균 등으로 대체되는 특징을 나타낸다²⁾. 주 증상은 질 분비물의 증가와 악취, 소양감, 성교통이며 특히 질 분비물에 10% KOH를 첨가하면 독특한 amine 냄새가 난다³⁾.

세균성 질증을 나타내는 여성 중 98% 이상에서 발견되어 세균성 질증을 일으키는 주요 원인균으로 알려진 *Gardnerella vaginalis*⁴⁾는 유산간균이 주축이 되어 있는 질의 주된 균주가 혐기성 세균으로 대체되어 발생하는 대표적인 원인균으로⁵⁾, 성병뿐 아니라 여러 가지 산부인과적, 소아과적 질환과도 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되고 있다. 그 중 대표적 질환으로는 양막 조기파수, 산후 자궁내막염, 제왕절개 후 자궁내막염 등과 신생아 뇌막염이 그 대표적 질환이다⁶⁾. 이 외에도 *Gardnerella vaginalis*가 Human Immunodeficiency Virus (HIV)의 발현을 자극하는 것으로 보고되어 있어⁷⁾, 이 세균에 대한 항균활성 연구의 중요성이 대두되고 있다.

세균성 질증의 치료는 크게 경구약과 질내 도포약으로 구분되며, 경구용으로는 Metronidazole이, 질내 도포제로는 Clindamycin이 대표적인 약제로 사용되어 왔으나 내성과 부작용, 지속적인 재발성 등으로 인해 보다 효과적이고 안전한 치료법이 절실한 실정이다⁸⁾.

한의학에서 세균성 질증은 陰戶病의

범주에 포함되는데, 그 증상에 따라 帶下, 陰痒症으로 표현되며, 병인으로는 濕熱 또는 濕毒과 관련하여 설명하고 있다⁹⁾.

完帶湯은 《傳青主婦科·女科上倦帶下¹⁰⁾》에 수록되어 있으며, 補中建脾하여 化濕止帶하는 효능이 있는 대표적인 固崩止帶劑로 각종 여성 질환에 이용되어 왔다¹¹⁾. 기존 연구에서는 完帶湯의 이뇨, 소염 및 항균작용에 대한 연구¹²⁾가 있으나 세균성 질염에 대한 본격적인 연구는 아직 보고된 바 없다.

이에 본 연구에서는 *Gardnerella vaginalis* 세균주를 이용하여 完帶湯 물 추출물의 항균력을 평가하였으며, Clindamycin과 完帶湯 물 추출물의 병용효과 및 시간대별 균 성장곡선을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재 료

1) 약재 및 균주

본 실험에 사용된 약재는 효성약품사(대구, 한국)에서 매입한 것을 현미경하에서 관능검사를 통하여 선정하여 사용하였고, *Gardnerella vaginalis* ATCC14018은 American Type Culture Collection Center (VA, USA)에서 동결건조 상태로 구입하였다.

2) 시약 및 기기

배지 및 시약으로 사용된 Brain Heart Infusion(BHI)와 말 혈청(heat inactivated horse serum)은 Difco.(MI, USA)에서, agar는 Junsei(Japan)에서 각각 구입하였고, 대조약물인 Clindamycin은 Aldrich-Sigma(MO, USA)에서 구입하여 사용

하였다.

실험에 사용한 기기는 96 well microtiter plate(Greiner, Frickenhausen, Germany), rotary vacuum evaporator(N-N type; LAB Camp, Dajeon, Korea), programmable freeze drye(PVTFD10A; Ilshin Lab., Seoul, Korea), spectrophotometer(Milton Roy Spectronic 20D; Milton Roy Company, PA, USA)을 사용하였으며, 이외 시약은 Aldrich-Sigma (MO, USA)에서 구입하여 사용 하였다.

2. 방 법

1) 실험액 제조

본 실험에 사용된 完帶湯 1첩 분량 142.4 g을 취하여, 각 정제수 1424 ml로

가열 추출 하였다(Table 1). 흡인 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator로 감압·농축하여 점조성의 추출물을 얻은 다음 programmable freeze dryer를 사용하여 동결 건조시켜, 진갈색의 完帶湯 물 추출물 30.42 g(수율: 21.36%)을 얻어 실험에 사용하였다. 준비한 각각의 完帶湯 물 추출물은 -20℃의 냉장고에 보관 후 실험에 사용하였으며, 구입한 Clindamycin은 4℃의 냉장고에 보관한 후 사용하였다. 完帶湯 물 추출물은 사용한 용매인 증류수에 25 mg/ml의 농도까지 비교적 잘 용해되었고, Clindamycin은 0.128 µg/ml까지 비교적 잘 용해되었다.

Table 1. Composition of Wandae-tang(WDT) Extracts Used in This Study

藥物名	學 名	重量(g)
白朮(土炒)	<i>Atractylodes macrocephala</i> Koidzumi	40
山藥(炒)	<i>Dioscorea batatas</i> Decaisne	40
人 蔘	<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer	8
白芍(酒炒)	<i>Paeonia lactiflora var. hortensis</i> Makino	20
車前子(酒炒)	<i>Plantago asiatica</i> L.	12
蒼 朮	<i>Atractylodes chinensis</i> Koidzumi	12
甘 草	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fischer	4
陳 皮	<i>Citrus unshiu</i> Markovich	2
荊 芥	<i>Schizonepeta tenuifolia</i> RIQUET var. <i>japonica</i> KITAGAWA	2
柴 胡	<i>Bupleurum falcatum</i> L.	2.4
Total	10 types	142.4

2) 균주 및 배지

Gardnerella vaginalis ATCC14018을 modified BHI 배지에 녹인 후 modified BHI agar에 2~3회 계대배양한 후 사용 하였다. Modified BHI media는 김 등⁸⁾의 방법에 따라, 3.7%의 BHI powder와 20%말의 혈청을 포함하며, 10% NaOH로 최종 pH를 7.4로 설정하였다. 이때

열처리된 말의 혈청은 BHI 용액과 별도로 멸균하여 혼합하였다. Modified BHI agar는 상기한 Modified BHI media 이외에 1.5% agar를 추가하여 제조한 후 87×15 mm의 조직배양접시에 평판배지로 만들어 사용 직전까지 냉장 보관 후 사용하였다.

3) 균수의 측정

정확한 흡광도(OD)와 세균수의 상관 관계를 알아보기 위하여, 정량 평판법(Quantitative Plating Methods, Standard Plate Count)을 이용하여 균수를 측정하였다¹³⁻⁴⁾. *Gardnerella vaginalis* ATCC14018을 spectrophotometer를 이용하여, 600 nm에서의 흡광도를 0.5 Mcfarland standard와 같은 탁도로 조정된 다음, 균액을 10, 100, 1000 및 10000배로 단계 희석하여 균의 농도가 1×10^4 CFU/ml이 되도록 만들어 modified BHI agar에 접종하여, 37°C, 10% CO₂조건에서 24시간 배양한 다음 조직배양접시에 형성된 집락 수를 희석된 순서대로 OD와 비교하였다. 0.5 Mcfarland standard 탁도는 1.175% barium chloride dihydrate(BaCl₂·2H₂O) 0.05 ml과 1% sulfuric acid(H₂SO₄) 9.95 ml을 혼합하여 준비하였다¹⁵⁾.

4) 항균 활성도 측정

完帶湯 물 추출물의 *Gardnerella vaginalis*에 대한 Minimal Inhibitory Concentration (MIC)를 표준 액체배지 희석법¹⁶⁾을 이용하여 측정하였다. 즉, 完帶湯 물 추출물을 25 mg/ml의 농도로 멸균증류수에 용해시킨 다음 계단식으로 배수 희석하여, 12.5, 6.25, 3.125, 1.563, 0.782, 0.391, 0.195, 0.098 및 0 mg/ml의 총 10가지 농도를 준비하였다. 각각 멸균된 96 well plate에 100 μ l씩 분주한 다음, 여기에 *Gardnerella vaginalis*의 단일집락을 modified BHI 액체배지에 접종한 지 48시간 후 OD600을 spectrophotometer로 측정하여, 2×10^6 cell이 들어가도록 준비한 cell suspension 100 μ l를 분주 하였다. 이후 37°C, 10% CO₂ 조건에서 48시간 배양하였다.

Clindamycin 역시 0.128 μ g/ml의 농도

로 멸균증류수에 용해시킨 다음 계단식으로 배수 희석하여, 0.064, 0.032, 0.016, 0.008, 0.004, 0.002, 0.001, 0.0005 및 0 μ g/ml의 총 10가지 농도를 준비하고, 동일한 방법으로 cell suspension(2×10^6 cell)을 첨가한 다음 48시간 동안 37°C, 10% CO₂ 조건하에 배양하였다. Pfaller 등¹⁶⁾의 방법에 따라, MIC는 각각의 growth control well과 시료가 함유된 well의 *Gardnerella vaginalis*의 성장을 육안적으로 비교 관찰하여, 균의 성장 억제가 나타나는 최소 농도로 결정하였다. 모든 실험은 5회 반복하였다.

5) 시간별 *Gardnerella vaginalis* 생장 곡선

각각 단일 물질의 균 생장 저해능을 평가하기 위해, Janssen 등¹⁷⁾의 방법에 따라, Modified BHI 액체 배지에 *Gardnerella vaginalis*를 접종 한 후, OD600을 spectrophotometer로 측정하여, Mcfarland 0.5 standard(1.5×10^8 CFU/ml)로 각 균의 탁도를 조절한 다음 100배 희석 하였다.

完帶湯(1.719 및 3.438 mg/ml) 물 추출물 및 Clindamycin(0.01 및 0.02 μ g/ml)을 각각 MIC 및 MIC \times 2 농도로 준비한 cell suspension과 혼합한 다음 37°C, 10% CO₂조건하에 배양하면서 24, 48, 72, 96 및 120 시간 마다 OD를 측정하여, 시료를 첨가하지 않은 각각의 대조군과 실험군에서의 균 생장 억제를 비교하였다. 모든 실험은 5회 반복하였다.

Clindamycin과 完帶湯 물 추출물의 균 생장에 미치는 병용효과를 평가하기 위해, 동일한 방법으로 준비된 cell suspension에 Clindamycin MIC(0.01 μ g/ml), 完帶湯 물 추출물 MIC(1.719 mg/ml), Clindamycin MIC(0.01 μ g/ml)+完帶湯 물 추출물 MIC

(1.719 mg/ml), Clindamycin 1/2 MIC(0.005 $\mu\text{g}/\text{ml}$)+完帶湯 물 추출물 MIC(1.719 mg/ml) 및 Clindamycin 1/4 MIC(0.0025 $\mu\text{g}/\text{ml}$)+完帶湯 물 추출물 MIC(1.719 mg/ml) 농도를 첨가하였다. 그 후, 37°C, 10% CO₂조건하에 배양하면서 24, 48, 72, 96 및 120 시간마다 OD를 측정하여, 시료를 첨가하지 않은 각각의 대조군과 실험군에서의 균 성장 억제를 비교하였다. 모든 실험은 5회 반복하였다.

6) Checkerboard Microtiter Assay

Checkerboard microtiter assay법¹⁸⁻⁹⁾을 이용해 完帶湯 물 추출물과 Clindamycin의 병용에 따른 효과를 관찰하였다. Checkerboard 검사는 96 well microtiter plate에 modified BHI 배지에 혼합된 균액 140 μl 와 시험할 두 가지 물질을 30 μl 씩 각각 첨가하였다. 균액은 0.5 McFarland 탁도의 균액을 희석하여, 최종 농도가 2×10^6 CFU/ml이 되게 하였다. 각 항균제 농도는 MIC의 0.06배에서 4배 정도 범위에서 2배씩 희석하여(10단계 배수 희석), 96 well plate에 직각으로 분주하여, 100가지의 다양한 농도 조합이 이루어지도록 하였다. 이후 37°C, 10% CO₂ 조건하에 48시간 배양한 후 각 well의 균 생장을 육안적으로 판독하였다. 병합효과는 Isenberg 등¹⁸⁾과 윤 등¹⁹⁾의 방법들에 따라, Fractional inhibitory concentration(FIC) index를 다음과 같이 계산하여 평가하였다.

$$\text{FIC A} = (\text{MIC of Drug A in combination}) / (\text{MIC of Drug A alone})$$

$$\text{FIC B} = (\text{MIC of Drug B in combination}) / (\text{MIC of Drug B alone})$$

$$\text{FIC index} = \text{FIC A} + \text{FIC B}$$

[Drug A = Clindamycin; Drug B =

WDT extracts]

판독은 FIC index 0.5 이하일 경우 상승, 0.5 에서 1 사이일 경우 부분상승, 1에서 4 사이일 경우 무관, 4 이상일 경우 길항으로 해석하였다^{18,19)}. 모든 실험은 5회 반복하였다.

7) 통계처리

모든 수치는 5회 반복실험의 평균±표준편차로 표시하였으며, 균 성장 곡선에 미치는 영향은 다중비교검증을 이용하여 통계처리를 실시하였고, 분산 동질성을 Levene test를 실시하여 검증 하였다. 등분산일 경우, one way ANOVA test를 실시한 다음 least-significant differences test로 사후 검증을 실시하여 군 간의 유의성을 측정하였다. 비등분산일 경우에는 비모수 검증인 Kruskal-Wallis H test를 실시하여 유의성이 인정된 경우에는, Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank Sum W를 실시하여 군간의 유의성을 검증하였다. 모든 통계처리는 SPSS for Windows (Release 14.0K, SPSS Inc., USA)를 이용하였으며, p-value가 0.05 이하인 경우 통계적 유의성을 인정하였다.

III. 결 과

1. 항균 활성도(MIC)

Clindamycin과 完帶湯 물 추출물의 Gardnerella vaginalis에 대한 MIC를 표준 액체배지 희석법으로 평가한 결과 完帶湯 물 추출물의 MIC는 1.719 ± 0.856 mg/ml로 관찰되었고, Clindamycin의 MIC는 0.01 ± 0.006 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 관찰되었다(Table 2).

Table 2. Minimal Inhibition Concentration (MIC) against Gardnerella Vaginalis Detected in This Study by Agar Microdilution Method

Test Materials	MIC	Ranges
WDT Extracts (mg/ml)	1.719±0.856	0.782~3.125
Clindamycin (µg/ml)	0.010±0.006	0.004~0.016

2. 시간별 Gardnerella vaginalis 생장 곡선

1) 完帶湯 물 추출물의 효과

대조군의 균 수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 각각 109.60±9.58, 129.80±4.15, 141.40±5.77, 148.40±7.27 및 156.20±5.02×10⁵ CFU/ml로 각각 관찰되었다.

完帶湯 물 추출물 MIC 농도 처리군의 균 수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 각각 90.20±9.86, 98.40±10.57, 116.00±6.24, 126.80±5.22 및 135.00±5.24×10⁵ CFU/ml로 각각 관찰되었다.

完帶湯 물 추출물 MIC×2 농도 처리군의 균 수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 각각 75.20±9.81, 84.60±10.88, 94.40±13.56, 101.40±11.74 및 108.80±12.46×10⁵ CFU/ml로 각각 관찰되었다.

배양 24시간 후부터 完帶湯 물 추출물 단독 처리군에서 대조군에 비해 용량 의존적으로 유의성 있는 균의 감소가 나타났다(p<0.01)(Fig. 1).

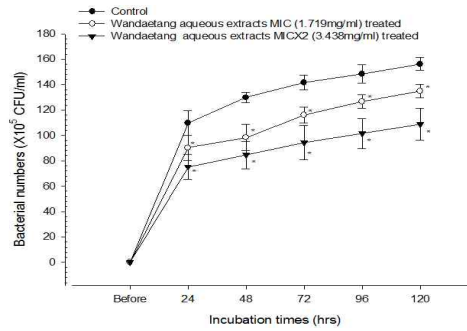


Fig. 1. Effects of WDT Extracts on the Growth of Gardnerella Vaginalis with Incubation Times(* ; p<0.01)

2) Clindamycin의 효과

대조군의 균 수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 각각 106.80±13.05, 121.00±10.32, 132.60±12.10, 141.40±10.24 및 151.00±13.10 ×10⁵ CFU/ml로 각각 관찰되었다.

Clindamycin MIC 농도 처리군의 균 수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 각각 65.40±4.51, 73.40±14.33, 83.20±12.34, 91.40±14.71 및 98.40±16.95 ×10⁵ CFU/ml로 각각 관찰되었다.

Clindamycin MIC×2 농도 처리군의 균 수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 각각 58.80±5.12, 63.80±5.89, 71.20±10.50, 80.00±12.86 및 85.40±12.68 ×10⁵ CFU/ml로 각각 관찰되었다.

배양 24시간 후부터 Clindamycin 단독 처리군에서 대조군에 비해 용량 의존적으로 유의성 있는 균의 감소가 나타났다(p<0.01)(Fig. 2).

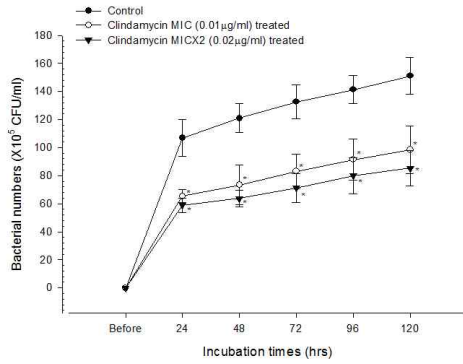


Fig. 2. Effects of Clindamycin on the Growth of Gardnerella Vaginalis with Incubation Times(* ; p<0.01)

3) Clindamycin과 完帶湯 물 추출물의 병용 효과

대조군의 균 수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 각각 108.60±7.70, 123.80±5.93, 137.40±6.50, 144.60±7.92 및 154.40±8.44 ×10⁵ CFU/ml로 각각 관찰되었다.

Clindamycin 단독 MIC 농도 처리군의 균 수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 각각 64.60±9.56, 72.20±9.36, 82.20±11.95, 88.60±15.73 및 95.00±13.80 ×10⁵ CFU/ml로 각각 관찰되었다.

完帶湯 물 추출물 단독 MIC 농도 처리군의 균 수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 각각 90.00±9.41, 97.60±10.16, 109.80±12.64, 121.40±11.82 및 130.40±9.61 ×10⁵ CFU/ml로 각각 관찰되었다.

Clindamycin MIC+完帶湯 물 추출물 MIC 농도 처리군의 균 수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 각각 38.40±6.50, 40.60±6.27, 45.20±9.47, 51.80±11.43 및 55.60±11.39 ×10⁵ CFU/ml로 각각 관찰되었다.

Clindamycin 1/2 MIC+完帶湯 물 추출물 MIC 농도 처리군의 균 수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 각각 46.00±7.52,

52.40±9.07, 57.20±9.73, 68.00±8.00 및 73.20±6.57 ×10⁵ CFU/ml로 각각 관찰되었다.

Clindamycin 1/4 MIC+完帶湯 물 추출물 MIC 농도 처리군의 균 수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 각각 60.40±8.08, 67.80±7.01, 77.00±4.85, 80.00±4.85 및 86.60±3.78 ×10⁵ CFU/ml로 각각 관찰되었다.

배양 24시간 후부터 Clindamycin MIC 농도 처리군, 完帶湯 물 추출물 MIC 농도 처리군, Clindamycin MIC+完帶湯 물 추출물 MIC 농도 처리군, Clindamycin 1/2 MIC+完帶湯 물 추출물 MIC 농도 처리군 및 Clindamycin 1/4 MIC+完帶湯 물 추출물 MIC 농도 처리군에서 대조군에 비해 용량 의존적으로 유의성 있는 균의 감소가 나타났다.(p<0.01).

한편 시간대별 균 성장 억제 효과에서 Clindamycin 1/2 MIC+完帶湯 물 추출물 MIC 농도 처리군 및 Clindamycin 1/4 MIC+完帶湯 물 추출물 MIC 농도 처리군에서 Clindamycin 단독 처리군에 비해 현저한 억제효과 각각 인정되었다 (p<0.01)(Fig. 3).

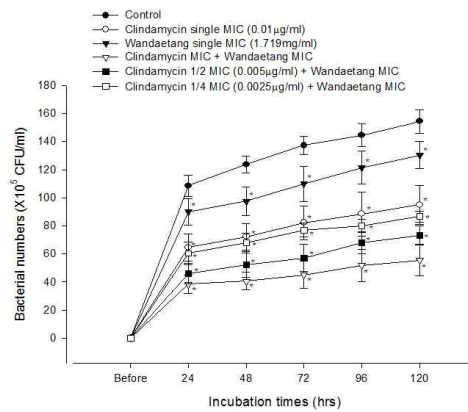


Fig. 3. Effects of WDT Extracts and Clindamycin Combination on the Growth of Gardnerella Vaginalis with Incubation Times(* ; p<0.01)

3. Checkerboard Microtiter Assay에 의한 병용효과

Checkerboard microtiter assay 법을 이용하여 完帶湯 물 추출물과 Clindamycin의 병용에 따른 효과를 관찰하였다.

Gardnerella vaginalis에 대하여 Clindamycin의 MIC는 단독 처리 시 0.0104±0.0054 µg/ml에서 完帶湯 물 추출물과 병용 처

리 시, 0.0016±0.0015 µg/ml로 감소하였다. 또한 完帶湯 물 추출물 단독 처리 시 MIC가 1.563±0.957 mg/ml에서 Clindamycin과 병용 시 0.195±0.120 mg/ml로 감소하는 것으로 관찰되었다.

따라서 FIC index는 0.294±0.052(0.250~0.375)로 나와 상승작용이 있는 것으로 관찰되었다(Table 3).

Table 3. Activity of Clindamycin and WDT Extracts Combination on Gardnerella Vaginalis by Checkerboard Method

Test materials	Single treatment		Combination treatment		FIC index	
	MIC	Range	MIC	Range	FIC	Range
WDT extract (mg/ml)	1.563± 0.957	0.782~ 3.125	0.195± 0.120	0.098~ 0.391	0.294± 0.052	0.250~ 0.375
Clindamycin (µg/ml)	0.0104± 0.0054	0.0040~ 0.0160	0.0016± 0.0015	0.0005~ 0.0040		

IV. 고 찰

가임기 여성에서 발생하는 질염 중 가장 흔한 것은 세균성 질염으로, 세균성 질염의 주된 원인균은 Gardnerella vaginalis이다. 이것에 감염되면 혐기성균의 농도는 정상 여성에 비해 100~1000배 더 높아지며, 질 내 산도 유지를 담당하는 유산균은 상대적으로 감소하여 질 내 정상 미생물의 재형성이 어려워 재발이 자주 일어나게 된다²⁰⁾. Gardnerella vaginalis는 정상적인 여성에서는 40% 정도에서 발견되지만 세균성 질증 환자에서는 98% 이상 발견되는 균으로, 특유의 악취를 내는 질 분비물의 증가를 특징으로 한다. 근래에 이 균에 의해 발생하는 세균성질증이 조산, 양막염 등 다른 산부인과 질환과 밀접한 관련이 있음이 밝혀지

면서 학계의 관심이 더 높아지고 있는 실정이다⁶⁾.

한의학에서 帶下는 여성생식기 분비물의 총칭으로, 생리적으로는 膻外口까지流出되어 외음부를 濕潤하게 하나, 성기의 병변을 의미하는 병리적인 帶下는 대부분 그 양이 증가하게 된다. 발현되는 증상에 근거할 때 帶下는 질 분비물의 증가, 소양감, 작열감, 외음부 불쾌감, 악취 및 성교통 등을 주 증상으로 하는 질염과 관련된다²¹⁾. 帶下의 병기는 주로 濕熱, 濕毒, 脾虛 및 腎陽虛, 腎陰虛 등으로 분류되며 치료처방으로는 龍膽瀉肝湯, 芩柏樗根丸, 完帶湯, 知柏地黃湯, 內補丸, 鹿角兔絲子丸 등을 사용한다²⁰⁾.

이 중 完帶湯은 《傳青主婦科·女科上卷帶下¹⁰⁾》에 수록되어 있으며, 白朮, 山藥, 人參, 白芍, 車前子, 蒼朮, 甘草, 陳皮,

荊芥 및 柴胡의 총 10 가지의 약재로 구성되어 있고, 補中建脾하여 化濕止帶하는 효능이 있는 대표적인 固崩止帶劑로 각종 여성 질환에 이용되어 왔다¹¹⁾. 完帶湯의 방제학적 특성을 살펴보면 人蔘·甘草는 補脾益氣하고, 白朮·蒼朮·山藥은 健脾燥濕하며, 車前子는 利水除濕하며 荊芥는 血分에 入하여 祛風勝濕한다²²⁾. 이처럼 完帶湯은 補하는 가운데 疏散함이 있고, 消하는 가운데 升陽하는 작용이 있어 脾虛帶下에 사용하는 처방으로¹¹⁾ 세균성 질염에 적용할 수 있을 것으로 사료된다.

현재 세균성 질증에 대한 외용약이 많이 알려져 있으나, 국부적인 pH의 역할을 포함하여, 질 내 정상 세균총의 교란 등과 같은 복합적인 문제로 인하여 어떠한 약제도 이 세균의 항균치료를 위한 완벽한 치료제로 작용하지 못하고 있으며²³⁻⁴⁾, 특히 세균성 질증의 외용약으로 많이 사용되고 있는 Clindamycin에 대해 Gardnerella vaginalis를 포함한 다양한 내성균주의 출현이 문제시되고 있어²⁵⁻⁷⁾, 항생제의 과남용을 방지하고 효력을 높일 수 있는 방법의 개발이 시급한 실정이다.

근래에 들어 천연물과 항생제의 병용시 현저한 상승효과가 초래되는 것으로 알려져 있으며²⁸⁻³²⁾ 이에 본 연구는 세균성 질증의 치료에 다용되나 부작용이 비교적 높은 항생제인 Clindamycin³³⁾과 完帶湯의 병용시 항생제의 항균력에 미치는 영향을 알아보고자 계획되었다.

따라서 본 연구에서는 Gardnerella vaginalis ATCC14018 세균주를 이용하여, 표준액체배지희석법¹⁶⁾으로 MIC를 측정하고, 시간대별 균 성장 곡선¹⁷⁾에 미치는 영향을

평가하여, 完帶湯 물 추출물의 Gardnerella vaginalis에 대한 항균력을 평가하였으며, Clindamycin과 完帶湯 물 추출물의 병용효과를 Checkerboard microtiter assay¹⁸⁻⁹⁾ 및 Clindamycin(MIC, 1/2MIC, 1/4MIC)에 完帶湯 물 추출물의 MIC를 첨가한 병용물의 시간대별 균 성장 곡선에 미치는 영향을 이용하여 각각 평가하였다.

MIC는 세균에 대한 항생제의 최소 저해 농도로서, 세균의 성장을 막는데 필요한 최소한의 농도를 찾는 방법이며, 가장 기본적인 방법으로는 표준 액체배지 희석법에 의한 MIC 측정이 있다^{8,13-4,16,19)}. 본 실험결과 Gardnerella vaginalis에 대한 Clindamycin의 MIC는 10% CO₂조건 하에서 0.010±0.006(0.004~0.016) µg/ml로 관찰되어, 이전의 연구들^{32,34-5)}과 유사한 항균활성이 인정되었다. 또한 完帶湯 물 추출물의 MIC는 1.719±0.856(0.782~3.125) mg/ml로 관찰되어, Gardnerella vaginalis에 대한 항균활성을 나타내었다. 권 등³²⁾의 연구결과에서 Gardnerella vaginalis에 대한 淸帶湯 물 추출물의 MIC가 3.906±2.344(0.782~6.250) mg/ml 라는 점을 비교해 볼 때 Gardnerella vaginalis에 대한 최소 저해농도는 淸帶湯보다 完帶湯이 더 낮은 것으로 나타났다.

균 성장곡선은 세균 및 다양한 감염증에 대한 후보물질의 항균활성을 측정하는 가장 기본적인 방법으로^{17,36)}, 본 실험의 결과 Clindamycin과 完帶湯 물 추출물은 MIC 및 MIC×2에서 각각 처리 용량 의존적인 시간대별 균 성장 억제를 나타내었고, Clindamycin과 完帶湯 물 추출물 병용 처리군에서 각각의 단독 처리군에 비해 현저히 우수한 시간대별 균 성장 억제 효과가 인정되어, Clindamycin

의 사용량을 1/4 이상 줄일 수 있을 것으로 기대된다.

Checkerboard microtiter assay 법을 이용한 FIC index는 약물의 병용에 따른 항균력을 평가하는 가장 일반적인 방법으로¹⁸⁻⁹⁾, 본 실험으로 完帶湯 물 추출물과 Clindamycin의 병용에 따른 효과를 각각 관찰하였다. 그 결과 FIC index는 $0.294 \pm 0.052 (0.250 \sim 0.375)$ 로 산출되어, 完帶湯 물 추출물과 Clindamycin은 Gardnerella vaginalis에 대해 서로 상승작용이 있는 것으로 나타났다. 권 등³²⁾의 연구결과 淸帶湯 물 추출물과 Clindamycin의 병용에 따른 FIC index는 $0.775 \pm 0.285 (0.500 \sim 1.250)$ 로 산출되어 부분상승 작용이 있는 것으로 나타났으나, 完帶湯는 상승작용이 있는 것으로 나타나 完帶湯이 보다 우수한 결과를 보여준 것으로 사료된다.

본 연구에 사용된 完帶湯을 구성하고 있는 10가지 약제 중, 白朮³⁷⁾, 山藥³⁸⁾, 人參³⁹⁾, 白芍藥^{8,40)}, 蒼朮⁴¹⁾, 甘草^{8,42-4)}, 陳皮⁴⁵⁾ 및 荊芥⁴⁶⁾의 항균효과는 이미 보고되었다. 따라서 본 실험의 결과 인정된 完帶湯의 항균효과는 이들 구성 약제 자체 또는 복합적인 상승작용에 의해 일어나는 것으로 판단되나, 구성 약제 각각 수많은 생리활성 물질을 함유하고 있어^{8,11)}, 향후 개별 약제에서의 항균력과 함께 항균력을 나타내는 생리활성 화학성분의 검색을 수행해야 할 것으로 판단된다.

이상의 결과에서 完帶湯 물 추출물은 비교적 우수한 Gardnerella vaginalis에 대한 항균력을 나타내었고, Clindamycin과 完帶湯 복합 물 추출물은 각각의 단독 처리군에 비해 현저히 우수한 시간대별 균 성장 억제 효과가 인정되었다. 또한 Checkerboard microtiter assay 법을

이용한 결과, Clindamycin과 完帶湯 물 추출물의 병용은 상승작용이 있는 것으로 관찰되어, 完帶湯과 병용 시 Clindamycin의 사용량을 1/4 이상 줄일 수 있을 것으로 기대된다.

V. 결 론

完帶湯 물 추출물의 Gardnerella vaginalis에 대한 항균력과 Clindamycin과의 병용효과를 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 完帶湯 물 추출물은 Gardnerella vaginalis에 대한 항균력을 나타내었으며, 처리용량 의존적인 시간대별 균 성장 억제를 나타내었다.
2. 完帶湯 물 추출물은 Clindamycin 과 병용 시 각각의 단독 처리군보다 더 우수한 시간대별 균 성장 억제를 나타내었다.
3. 完帶湯 물 추출물과 Clindamycin 병용 시 FIC index가 $0.294 \pm 0.052 (0.250 \sim 0.375)$ 로 산출되어 상승작용이 있는 것으로 관찰되었다.

□ 투 고 일 : 2012년 1월 26일

□ 심 사 일 : 2012년 2월 1일

□ 게재확정일 : 2012년 2월 7일

참고문헌

1. Abraham Rubin. Vaginitis in Manual of clinical problems in OBGY. Boston: Little, Brown and Company. 1990:285.
2. Aroutcheva AA et al. Gardnerella

- vaginalis isolated from patients with bacterial vaginosis and from patients with healthy vaginal ecosystems. Clin Infect Dis. 2001;33(7):1022-7.
3. Eschenbach DA et al. Diagnosis and clinical manifestations of bacterial vaginosis. Am J Obstet Gynecol. 1988; 158(4):819-28.
 4. 이정규. Gardnerella vaginalis의 성장 조건과 Biotypes. 대한산부인과학회지. 1993;36(6):837-46.
 5. 대한산부인과학회. 부인과학. 서울:칼빈서적. 1997:256-62.
 6. Leitivh H, Bodner-Adler B. Bacterial vaginosis as a risk factor for Preterm delivery; meta-analysis. Am J Obstet Gynecol. 2003;189(1):139-47.
 7. Hashemi FB et al. Activation of human immunodeficiency virus type 1 expression by Gardnerella vaginalis. J Infect Dis. 1999;179(4):924-30.
 8. 김연희, 이홍식. Gardnerella vaginalis에 대한 한약재의 항균활성. 한국미생물·생명공학회지. 2006;34(1):70-3.
 9. 장경호, 이동녕, 김형준. Gardnerella vaginalis에 대한 목단피, 소목, 어성초, 연교, 하교초, 현삼의 항균효과. 동의생리병리학회지. 2005;9(4):1016-21.
 10. 傅山. 傅青主女科. 上海:人民出版社. 1978:1-6.
 11. 국윤범 등. 방제학. 서울:영림사. 2008: 373-5.
 12. 송석호 등. 완대탕이 이노, 소염 및 항균에 미치는 영향. 경희한의대논문집. 1989;12(1):337-47.
 13. Pfaller MA et al. Collaborative investigation of variables in susceptibility testing of yeasts. Antimicrob Agents Chemother. 1990;34(9):1648-54.
 14. Pfaller MA et al. Standardized susceptibility testing of fluconazole: an international collaborative study. Antimicrob Agents Chemother. 1992; 36(9):1805-9.
 15. Tenover FC et al. Characterization of staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin and other glycopeptides. J Clin Microbiol. 1998;36(4):1020-7.
 16. Pfaller MA et al. Multicenter evaluation of four methods of yeast inoculum preparation. J Clin Microbiol. 1988; 26(8):1437-41.
 17. Janssen AM, Scheffer JJ, Baerheim Svendsen A. Antimicrobial activity of essential oils: a 1976-1986 literature review. Aspects of the test methods. Planta Med. 1987;53(5):395-8.
 18. Isenberg HD. Synergism testing: Broth microdilution checkerboard and broth macrodilution methods. In: Clin Microbiol procedure manual. Washington, DC: American Society for Microbiology. 1992:1-28.
 19. 윤정숙, 문희원, 이미애. 다제내성 Pseudomonas aeruginosa 균주의 항균제 병합효과. 대한임상미생물학회지. 2006;9(1):1-6.
 20. 한의부인과학 교재편찬위원회. 한의부인과학. 서울:도서출판 정담. 2002: 260-302.
 21. 송병기. 한방부인과학. 서울:행림출판사. 1994:220-39.
 22. 上海中醫學院編. 婦產科學. 香港:商務印書館. 1997:92-9.

23. Bannatyne RM, Smith AM. Recurrent bacterial vaginosis and metronidazole resistance in *Gardnerella vaginalis*. *Sex Transm Infect.* 1998;74(6):455-6.
24. Hay PE. Therapy of bacterial vaginosis. *J Antimicrob Chemother.* 1998;41(1):6-9.
25. Pigrau C et al. Osteomyelitis of the jaw: resistance to clindamycin in patients with prior antibiotics exposure. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2009;28(4):317-23.
26. Mongkolrattanothai K et al. Epidemiology of community-onset *Staphylococcus aureus* infections in pediatric patients: an experience at a Children's Hospital in central Illinois. *BMC Infect Dis.* 2009;9:112.
27. Ajantha GS et al. Phenotypic detection of inducible clindamycin resistance among *Staphylococcus aureus* isolates by using the lower limit of recommended inter-disk distance. *Indian J Pathol Microbiol.* 2008;51(3):376-8.
28. Braga LC et al. Synergic interaction between pomegranate extract and antibiotics against *Staphylococcus aureus*. *Can J Microbiol.* 2005;51(7):541-7.
29. Choi JG et al. In vitro activity of methyl gallate isolated from *Galla rhois* alone and in combination with ciprofloxacin against clinical isolates of salmonella. *J Microbiol Biotechnol.* 2008;18(11):1848-52.
30. Shahverdi AR et al. Galbanic acid from *Ferulaszowitsiana* enhanced the antibacterial activity of penicillin G and cephalixin against *Staphylococcus aureus*. *Biol Pharm Bull.* 2007;30(9):1805-7.
31. 성현아, 박영선, 김동철. 蛇床子洗方の *Gardnerella vaginalis* 에 대한 시험관 내 항균력 및 Metronidazole과 병용효과. *대한한방부인과학회지.* 2010;23(2):20-37.
32. 권지명, 김동철. 淸帶湯의 *Gardnerella vaginalis* 에 대한 시험관내 항균력 및 Clindamycin과의 병용효과. *대한한방부인과학회지.* 2011;24(2):1-12.
33. Thomas C, Stevenson M, Riley TV. Antibiotics and hospital-acquired *Clostridium difficile*-associated diarrhoea: a systematic review. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51(6):1339-50.
34. Altrichter T, Heizmann WR. *Gardnerella vaginalis*: transport, microscopy, testing resistance. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 1994;54(11):606-11.
35. Muli F, Struthers JK. Use of a continuous-culture biofilm system to study the antimicrobial susceptibilities of *Gardnerella vaginalis* and *Lactobacillus acidophilus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42(6):1428-32.
36. Frimodt-Møller N. Correlation of in vitro activity and pharmacokinetic parameters with effect in vivo for antibiotics. Observations from experimental pneumococcus infection. *Dan Med Bull.* 1988;35(5):422-37.
37. 최은영 등. 백출 추출물의 세포독성과 항균효과검색. *동의병리학회지.* 2002;16(2):348-52.
38. Kum EJ et al. Antifungal Activity

- of Phenanthrene Derivatives from Aerial Bulbils of *Dioscorea batatas* Decne. *J Life Sci.* 2006;16(4):647-52.
39. Bae EA et al. In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of panaxytriol isolated from ginseng. *Arch Pharm Res.* 2001; 24(4):297-9.
40. 한영실, 전희정, 황재선. 백작약으로부터 식품부패 미생물에 대한 항균성 물질의 분리 및 동정. *한국조리과학회지.* 2000;16(5):67-74.
41. 박부길 등. 식품부패 및 병원성미생물에 대한 천연약용식물 추출물의 항균효과. *한국식품과학회지.* 1998;30(4): 957-63.
42. Fukai T et al. Antimicrobial activity of licorice flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia.* 2002;73(6):536-9.
43. He J et al. Antibacterial compounds from *Glycyrrhiza uralensis*. *J Nat Prod.* 2006;69(1):121-4.
44. Yang C et al. Determination of glycyrrhizic acid in different decoctions of sanaotang by HPLC and comparison with antifungal effects in vitro. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2007;32(11):1031-4.
45. 정희경 등. Phytobiotic 소재 선발을 위한 약용식물 추출물의 항산화 및 항균 활성. *한국식품영양과학회지.* 2007; 36(10):1235-40.
46. 윤양식 등. 한약재 추출물에 의한 *Helicobacter pylori*의 성장 및 Urease 활성 억제. *한국생물공학회지.* 2004; 19(3):187-91.