

## 透膿散 및 瓜蒌牛蒡湯의 *Staphylococcus aureus*에 대한 In Vitro 항균력 평가

대구한의대학교 한의과대학 부인과교실  
장세란, 박영선, 김동철

### ABSTRACT

#### In Vitro Antibacterial Effects of *Tunong-san* and *Kwaruwoobang-tang* Aqueous Extracts against *Staphylococcus aureus*

Se-Ran Jang, Young-Sun Park, Dong-Chul Kim  
Dept. of Oriental Obstetrics & Gynecology, College of Oriental Medicine,  
Daeguhaany University

**Objectives:** Recently *Ciprofloxacin*, used in the treatment of mastitis, showed many serious side effects. The object of this study was to recognize whether TNS and KWT can be used in the treatment of mastitis by observing the in vitro antibacterial effects of TNS and KWT aqueous herbal extracts against *S. aureus*.

**Methods:** Antibacterial activities of TNS and KWT aqueous extracts against *S. aureus* ATCC 25923 were detected using standard agar microdilution methods. In addition, the effects on the bacterial growth curve were monitored at MIC and MIC $\times$ 2 levels. The effects on the intracellular killing and bacterial invasion of individual test materials were also observed using Raw 264.6 and MCF-7. The results were compared with *Ciprofloxacin*, a second generation of quinolone antibiotics in the present study.

**Results:** MIC of aqueous extracts of TNS and KWT against *S. aureus* were detected as (0.313 $\pm$ 0.107) and (0.137 $\pm$ 0.053) mg/ml, respectively. MIC of *Ciprofloxacin* was detected as (0.469 $\pm$ 0.297)  $\mu$ g/ml at same conditions. In addition, TNS, KWT aqueous herbal extracts and *Ciprofloxacin* were also showed marked dosage-dependent inhibition of bacterial growth, and dramatical inhibitions on the both intracellular killing assays and bacterial invasion using Raw 264.6 and MCF-7 cells were detected.

**Conclusions:** The results obtained in this study suggest that TNS and KWT aqueous herbal extracts showed antibacterial effects against *S. aureus*, and they also showed dosage-dependent inhibitory effects on the bacterial growth. And they showed the significant intracellular killing and bacterial invasion effects. It means, KWT and TNS may show more potent anti-infectious effects against *S. aureus* in vivo.

**Key Words:** *Staphylococcus aureus*, Antibacterial Effects, Mastitis *Tunong-san*, *Kwaruwoobang-tang*, *Ciprofloxacin*

## I. 서 론

유선염 및 유방 농양은 유방을 덮고 있는 피부나 피지 낭종, 화농성 한선염과 같이 피하 구조물에 이차적으로 감염이 일어난 것으로, 간혹 신생아에서도 발생하지만 18~50세의 여성에서 흔히 발생하는 유방의 염증성 질환이다<sup>1)</sup>. 유방염은 과거에 비해 발병이 줄고 있지만 여성 유방의 양성 질환 중 섬유선종, 섬유낭종성 질환에 이어 세 번째로 빈발하는 질환이다<sup>2,3)</sup>. 또한 산모 및 신생아의 위생 조건이 개선되고 조기 항생제를 사용함으로써 유행성 유선염 및 유방 농양 발생의 빈도는 현저히 감소되었으나, 유방 농양은 여전히 전체 농양의 10% 정도 차지하고<sup>4)</sup> 산후에 다발하는 경향성이 있으므로 산모들에게는 중요한 관심사라고 할 수 있다<sup>2)</sup>.

유방염의 진단은 임상적인 문진으로 이루어지며, 주로 단측 유방의 국소적인 경도 증가, 발진, 38.5℃ 이상의 발열감, 볼케감과 함께 전신증상으로 피로, 몸살 및 두통이 동반될 때 유방염으로 진단한다<sup>5,6)</sup>. 유방염의 감염균으로는 *Staphylococcus aureus*(*S. aureus*)가 가장 많이 차지하며<sup>7)</sup>, 유방염의 치료를 위하여 지금까지 다양한 항생제가 사용되어 왔으나 내성균주의 지속적 출현이 문제시되고 있다<sup>7,8)</sup>. 비교적 근래에 개발되고 세포 침투성이 매우 우수하여 유방염에도 자주 처방되는 *Ciprofloxacin* 또한 내성 균주가 출현함으로 인하여<sup>9-11)</sup> 항생제의 사용을 줄이고 효과가 우수한 대체 약물, 특히 천연물 유래의 치료제 개발이 시급한 실정이다.

한의학에서 유방염은 '乳癰'으로 칭하는데, 乳癰은 유방에 작은 종기나 농양이 생긴 것으로 여성에게서 흔히 볼 수 있는 乳病의 하나이다<sup>12)</sup>. 透膿散(TNS)과 瓜蒌牛蒡湯(KWT)은 염증성, 감염성 질환에 흔히 사용되는 복합 처방으로 이들 처방은 유방염의 가장 대표적인 원인균인 *S. aureus*에 대해 유효한 항균 효과를 나타낼 것으로 생각되어 본 연구를 계획하였다.

본 연구에서는 *S. aureus*를 이용하여 TNS과 KWT 각각의 물 추출물의 *S. aureus*에 대한 항균력을 평가하였으며, 탐식 세포 내 사멸 효과 및 상피 세포 내 *S. aureus* 침투 억제 효과를 각각 murine macrophage 세포주인 Raw 264.6 세포와 사람 유방암 상피 세포 유래인 MCF-7을 이용하여 평가하여 효과를 관찰하였기에 보고하고자 한다.

## II. 재료 및 방법

본 실험에 사용된 모든 약제는 제천 한방 약초(제천, Korea)에서 매입한 것을 현미경 하에서 관능 검사를 통하여 선정하여 사용하였으며, *S. aureus*는 American Type Culture Collection Center (ATCC)(VA, USA)에서 동결 건조 상태로 구입하였다. 또한 Raw 264.6 세포 및 MCF-7 세포는 각각 한국 세포주 은행 (Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 배지 및 시약으로 사용된 Brain-Heart Infusion(BHI), Muller Hinton(MH) agar 또는 broth, DMEM/F12 medium, heat inactivated horse serum, Rosewell Park Memorial Institute medium(RPMI) 1640

배지는 Difco(MI, USA)에서 각각 구입하였으며, Fetal Bovine Serum(FBS)는 Invitrogen(NY, USA)에서 구입하였으며, 대조 약물인 *Ciprofloxacin* hydrochloride hydrate는 Hangzhou Tacon Co.(China)에서 구입하여 각각 사용하였다. 또한 96 well-plate는 Greiner(Germany)에서 구입하였고, 이외 대부분의 시약은 Aldrich-Sigma(MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

### 1. 시료의 준비

본 실험에 사용된 TNS 및 KWT 1첩 분량의 조성은 각각 다음과 같다(Table 1, 2). TNS 및 KWT를 구성하는 약제

각각 1첩 분량을 취하여 정제수 500 ml로 80℃에서 3시간 동안 3번 가열 추출한 후, 동결 건조시켜 총 5.54 g(수율 16.29%)의 연갈색 TNS 물 추출물과 총 8.00 g(수율 18.18%)의 갈색 KWT 물 추출물을 얻어 실험에 사용하였다. 준비한 각각의 동결 건조 추출물은 -20℃의 냉장고에 보관 후 실험에 사용하였으며, 구입한 *Ciprofloxacin*은 4℃의 냉장고에 보관한 후 사용하였다. 모든 동결 건조 추출물은 사용한 용매인 증류수에 25 mg/ml의 농도까지 비교적 잘 용해되었고, *Ciprofloxacin*은 25 µg/ml까지 비교적 잘 용해되었다.

Table 1. Composition of *Tunong-san* Used in This Study

Korean name	Herbs	Scientific Name	Amounts (g)
黃芪	Astragali Radix	<i>Astragalus membranaceus</i> Bunge	16
當歸	Angelicae Gigantis Radix	<i>Angelica gigas</i> Nakai	8
穿山甲	Manitis Squama	<i>Manis pentadactyla</i> Linn	4
皂角刺	Gleditsiae Spina	<i>Gleditsia sinensis</i> LAM	6
Total			34
			4 types

Table 2. Composition of *Kwaruwoobang-tang* Used in This Study

Korean Name	Herbs	Scientific Name	Amounts (g)
瓜蒌仁	Trichosanthes Semen	<i>Trichosanthes kirilowii</i> MAX	4
牛蒡子	Arctii Fructus	<i>Arctium lappa</i> L.	4
天花粉	Trichosanthes Radix	<i>Trichosanthes kirilowii</i> MAX	4
黃芩	Scutellariae Radix	<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi	4
梔子	Gardeniae Fructus	<i>Gardenia jasminoides</i> Ellis	4
連翹	Forsythiae Fructus	<i>Forsythia koreana</i> NAKAI	4
皂角刺	Gleditsiae Spina	<i>Gleditsia sinensis</i> LAM	4
金銀花	Lonicerae Flos	<i>Lonicera japonica</i> Thunb	4
甘草	Glycyrrhizae Radix	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> FISCH	4
陳皮	Citri Pericarpium	<i>Citrus unshiu</i> Markovich	4
青皮	Citri Reticulatae Viride Pericarpium	<i>Citrus unshiu</i> Markovich	2
柴胡	Bupleuri Radix	<i>Bupleurum falcatum</i> L	2
Total			44
			12 types

## 2. 균주 및 배지

동결 건조 상태에서 구입한 *S. aureus*를 BHI 배지에 녹인 후 BHI agar에 2~3회 계대 배양한 후 사용하였으며, MH agar 또는 broth에서 유지시켰다. 실험에 사용한 MCF-7 세포는 10% FBS가 첨가된 RPMI 1640를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 계대 배양하여 유지하였으며, Raw 264.6 세포는 DMEM에 10% FBS, 100 U/ml penicillin 및 100 µg/ml streptomycin을 혼합한 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 실험과정의 모든 cells은 80~90%의 confluence에서 실험하였고, 20 passages를 넘기지 않은 cell만 사용하였다.

## 3. 생균 수의 측정

정량 평판법을 이용하여 균수를 측정하였다. *S. aureus*를 spectrophotometer (Milton Roy Spectronic 20D; Milton Roy Company, PA, USA)를 이용하여 600 nm (OD600)에서의 흡광도를 0.5 Mcfarland standard와 같은 탁도로 조정된 다음 균액을 10, 100, 1000 및 10000배로 단계 희석하여 균의 농도가 1×10<sup>4</sup> CFU/ml이 되도록 만들어 MH agar에 접종하여 37°C, 10% CO<sub>2</sub> 조건에서 24시간 배양한 다음 조직 배양 접시에 형성된 집락 수를 희석된 순서대로 비교하였다. 0.5 Mcfarland standard 탁도는 1.175% BaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.05 ml과 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 9.95 ml을 혼합하여 준비하였다.

## 4. 항균 활성도(Minimum inhibitory concentration, MIC) 측정

TNS 및 KWT 추출물의 *S. aureus*에 대한 항균 활성도(MIC)를 표준 액체 배

지 희석법을 이용하여 측정하였다. 즉, TNS 및 KWT 물 추출물을 25 mg/ml의 농도로 멸균 증류수에 용해시킨 다음 계단식으로 배수 희석하여 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.563, 0.782, 0.391, 0.195, 0.098 및 0 mg/ml의 총 10종류의 농도로 준비하고, 각각 멸균된 96 well plate에 100 µl씩 분주한 다음 여기에 *S. aureus*의 단일 집락을 MH broth 배지에 접종한 지 48시간 후 OD600을 spectrophotometer로 측정하여, 1.5×10<sup>6</sup> cell이 들어가도록 준비한 cell suspension 100 µl를 분주하였다. 이후 37°C에서 48시간 배양하였다. Ciprofloxacin 역시 25 µg/ml의 농도로 멸균 증류수에 용해시킨 다음 계단식으로 배수 희석하여, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.563, 0.782, 0.391, 0.195, 0.098 및 0 µg/ml의 총 10종류의 농도로 준비하고, 동일한 방법으로 bacteria suspension (1.5×10<sup>6</sup> CFU/ml)을 첨가한 다음 48시간 동안 37°C에 배양하였다. Pfaller 등<sup>13)</sup>의 방법에 따라 MIC는 각각의 시료를 첨가하지 않고 균만 배양한 growth control well과 시료가 함유된 well의 *S. aureus*의 성장을 육안적으로 비교 관찰하여 균의 성장 억제가 나타나는 최소 농도로 결정하였다. 모든 실험은 5회 반복하였다.

## 5. 시간대별 *S. aureus* 생장곡선

각각 동결 건조 추출물의 균 생장 저해능을 평가하기 위해 Janssen의 방법<sup>14)</sup>에 따라 MH broth 액체 배지에 *S. aureus*를 접종한 후, OD600을 spectrophotometer로 측정하여, 0.5 Mcfarland standard (1.5×10<sup>8</sup> CFU/ml)로 각 균의 탁도를 조절한 다음 100배 희석하였다. TNS 물 추출물 (0.313 및 0.626 mg/ml), KWT 물 추출물

(0.137 및 0.274 mg/ml) 및 *Ciprofloxacin* (0.469 및 0.938  $\mu$ g/ml)을 각각 MIC 및 MIC $\times$ 2 농도로 준비한 cell suspension과 혼합한 다음 37 $^{\circ}$ C에 배양하면서 24, 48, 72, 96 및 120 시간마다 시료를 첨가하지 않은 각각의 대조군에서의 균의 성장과 실험군에서의 균 성장 억제를 비교하였고, 모든 실험은 5회 반복하였다.

### 6. 세포 내 세균 사멸 효과

*S. aureus*에 대한 세포 내 세균 사멸 효과는 Cuffini 등<sup>15)</sup>의 방법에 따라 Raw 264.6 세포를 이용하여 평가하였다. 즉, 24-well plate에 Raw 264.6 세포(106 cells/well)를 배양한 4%의 heat-inactivated adult horse serum을 포함한 DMEM/F12 배지 1 ml를 분주한 다음  $2\times 10^7$  CFU/ml의 *S. aureus*를 첨가하고, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에 30분간 배양하여 탐식을 촉진시켰다. 이후 Sub-MIC(MIC 1/2) 농도의 추출물을 각각 첨가하고, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에 6시간 배양한 다음 세포만 수집하여 Phosphate Buffered Saline(PBS)로 세척한 다음 5 mg/ml의 lysostaphin을 처리하여 세포막 또는 세포 밖에 부착된 세균을 사멸시키고, Raw 264.6 세포들을 멸균 증류수로 용해시킨 다음 생균 수를 각각 측정하였다. 본 실험에서는 추출물을 처리하지 않은 배양 well을 대조군으로 사용하여 세포 내 세균 사멸 효과를 평가하였다.

### 7. 상피 세포 내 세균 침투 저해 효과

*S. aureus*의 상피 세포 내 침투 저해 효과를 Almeida 등<sup>16)</sup> 및 Menzies and Kourteva<sup>17)</sup>의 방법에 따라 MCF-7 세포를 이용하여 평가하였다. 즉, 24-well plate

에 MCF-7 세포를 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에 5%의 FBS 및 1% 항진균제(penicillin, streptomycin 및 amphotericin B)가 포함된 DMEM/F12 배지에 사용 전 20시간 동안 배양하고, 사용시 배양한 MCF-7 세포( $2\times 10^4$  cells)를 멸균 PBS로 3회 반복 세척한 다음  $2.1\times 10^9$  CFU/ml의 *S. aureus*가 포함된 DMEM/F12 배지 1 ml를 첨가하고, Sub-MIC(MIC 1/2) 농도의 추출물을 각각 첨가한 다음 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 1시간 배양하고, 상층액을 제거하였다. 이후 멸균 PBS로 3회 반복 세척한 다음 5 mg/ml의 lysostaphin을 첨가하고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 2시간 배양하여 세포의 세균을 제거하였다. 처리가 완료된 MCF-7 세포를 다시 멸균 PBS로 3회 반복 세척한 다음 0.25% trypsin 처리를 하여 부유 시키고, 0.025%의 Triton X-100이 포함된 멸균 증류수로 세포를 용해시킨 다음 생균 수를 측정하였다. 본 실험에서는 5회 반복 실험을 실시하였으며, 추출물을 처리하지 않은 배양 well을 대조군으로 사용하여 상피 세포 내 침투 저해 효과를 평가하였다.

### 8. 통계 처리

모든 수치는 5회 반복 실험의 평균 $\pm$ 표준편차로 표시하였으며, 균 성장 곡선에 미치는 영향, 세포 내 세균 사멸 효과 및 상피 세포 내 세균 침투 저해 효과는 다중 비교 검증을 이용하여 통계 처리를 실시하였고, 분산 동질성을 Levene test를 실시하여 검증하였다. 등분산일 경우 one way ANOVA test를 실시한 다음 LSD test로 사후 검증을 실시하여 군 간의 유의성을 측정하였다. 비등분산일 경우에는 비모수 검증인 Kruskal-Wallis H

test를 실시하여 유의성이 인정된 경우에는 MW test를 실시하여 군간의 유의성을 검증하였다. 모든 통계 처리는 SPSS for Windows(Release 14.0K, SPSS Inc., USA)를 이용하였으며, p-value가 0.05 이하인 경우 통계적 유의성을 인정하였고, 추출물의 효과를 보다 명확히 하기 위하여 처리군과 비처리 대조군과의 percent change를 아래의 공식을 이용하여 측정하였다.

EQUATION. Percentage Changes as Compared Control (%)

$$= [((\text{Data of test material treated groups} - \text{Data of control}) / \text{Data of control})] \times 100$$

### III. 결 과

#### 1. 항균 활성도(MIC)

TNS 및 KWT 물 추출물의 *S. aureus*에 대한 MIC를 표준 액체 배지 희석법으로 평가한 결과 MIC는 각각  $0.313 \pm 0.107$  (0.195~0.391) 및  $0.137 \pm 0.053$  (0.098~0.195) mg/ml로 관찰되었다. 한편 *Ciprofloxacin*의 MIC는  $0.469 \pm 0.297$  (0.195~0.782)  $\mu\text{g/ml}$ 로 관찰되었다(Table 3).

Table 3. Minimal Inhibition Concentration (MIC) against *S. aureus* ATCC 25923 Detected in This Study by Agar Microdilution Method

Test Materials	MIC	Ranges
TNS	$(0.313 \pm 0.107)$ mg/ml	0.195 ~ 0.391
KWT	$(0.137 \pm 0.053)$ mg/ml	0.098 ~ 0.195
<i>Ciprofloxacin</i>	$(0.469 \pm 0.297)$ $\mu\text{g/ml}$	0.195 ~ 0.782

TNS : *Tunong-san*

#### 2. 시간대별 *S. aureus* 성장 곡선

##### 1) TNS 물 추출물의 시간대별 균 성장 곡선에 미치는 영향

TNS 물 추출물 MIC 농도(0.313 mg/ml) 처리군의 생균 수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 대조군에 비해 각각 -27.69, -27.19, -25.55, -25.34 및 -23.89%의 변화를 나타내었다.

TNS 물 추출물 MIC×2 농도(0.626 mg/ml) 처리군의 생균 수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 대조군에 비해 각각 -36.98, -37.84, -32.01, -32.66 및 -30.62%의 변화를 나타내었다.

배양 24시간 후부터 대조군에 비해 유의성 있는 처리 용량 의존적인 생균 수의 감소가 TNS 물 추출물 처리군에서 각각 인정되었다( $p < 0.01$ )(Fig. 1).

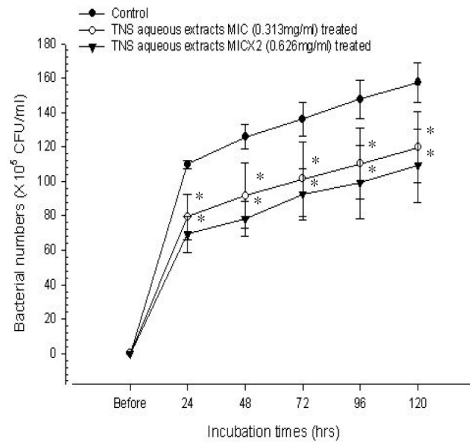


Fig. 1. Effects of *Tunong-san* Aqueous Extracts on the Growth of *S. aureus* ATCC 25923 with Incubation Times.

\* :  $p < 0.01$  as compared with control by one-way ANOVA and post hoc LSD test

TNS : *Tunong-san*

KWT : *Kwaruwoobang-tang*

2) KWT 물 추출물의 시간대별 균 생장 곡선에 미치는 영향

KWT 물 추출물 MIC 농도(0.137 mg/ml) 처리군의 생균 수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 대조군에 비해 각각 -30.63, -29.50, -26.89, -27.41 및 -25.64%의 변화를 나타내었다.

KWT 물 추출물 MIC×2 농도(0.274 mg/ml) 처리군의 생균 수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 대조군에 비해 각각 -45.94, -43.60, -44.87, -40.77 및 -41.33%의 변화를 나타내었다.

배양 24시간 후부터 대조군에 비해 유의성 있는 처리 용량 의존적인 생균 수의 감소가 KWT 물 추출물 처리군에서 각각 인정되었다(p<0.01)(Fig. 2).

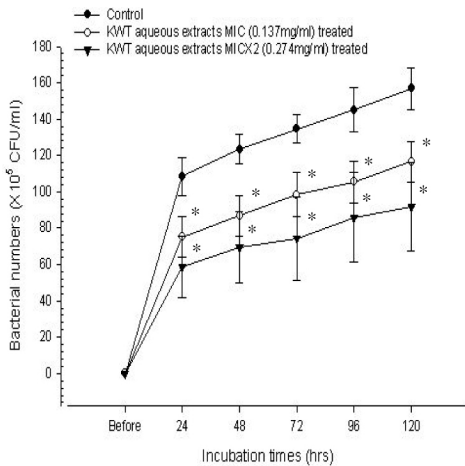


Fig. 2. Effects of *Kwaruwoobang-tang* Aqueous Extracts on the Growth of *S. aureus* ATCC 25923 with Incubation Times. \* : p<0.01 as compared with control by one-way ANOVA and post hoc LSD test  
KWT : *Kwaruwoobang-tang*

3) *Ciprofloxacin*의 시간대별 균 생장 곡선에 미치는 영향

*Ciprofloxacin* MIC 농도(0.469  $\mu$ g/ml)

처리군의 생균 수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 대조군에 비해 각각 -41.73, -46.35, -45.22, -42.15 및 -38.10%의 변화를 나타내었다.

*Ciprofloxacin* MIC×2 농도(0.938  $\mu$ g/ml) 처리군의 생균 수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 대조군에 비해 각각 -58.98, -62.21, -63.33, -62.50 및 -58.77%의 변화를 나타내었다.

배양 24시간 후부터 대조군에 비해 유의성 있는 처리 용량 의존적인 생균 수의 감소가 *Ciprofloxacin* 처리군에서 각각 인정되었다(p<0.01)(Fig. 3).

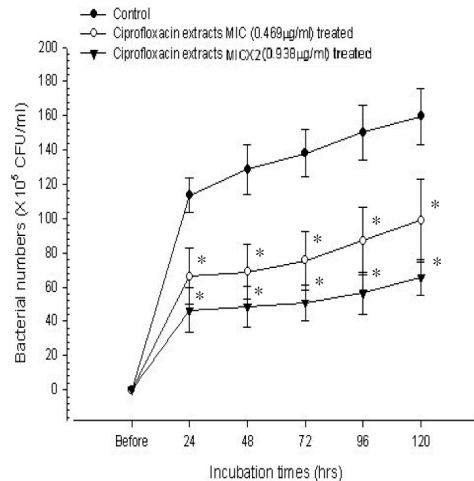


Fig. 3. Effects of *Ciprofloxacin* Aqueous Extracts on the Growth of *S. aureus* ATCC 25923 with Incubation Times. \* : p<0.01 as compared with control by one-way ANOVA and post hoc LSD test

3. 세포 내 세균 사멸 효과

Raw 264.7 cell 내 생균 수는 MIC 1/2 농도의 *Ciprofloxacin*(0.235  $\mu$ g/ml), TNS (0.157 mg/ml) 및 KWT(0.069 mg/ml) 물 추출물 처리군에서 매체 대조군에 비해 각각 -85.86, -57.02 및 -71.48%의 변화를 나타내었다.

Raw 264.7 cell을 이용한 세포 내 *S. aureus*에 대한 사멸 효과를 평가한 결과, sub-MIC(MIC 1/2) 농도의 TNS 및 KWT 물 추출물은 매체 처리 대조군에 비해 유의성 있는 탐식 세포 내 생균 수의 감소를 각각 나타내었다( $p < 0.01$ )(Fig. 4).

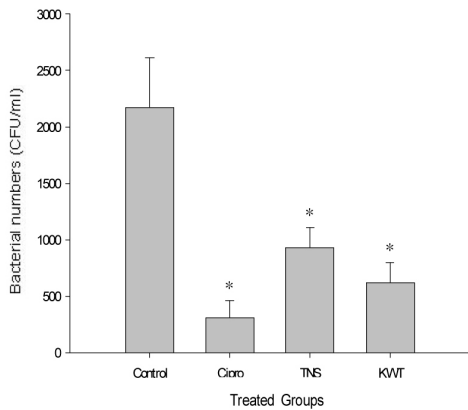


Fig. 4. Results of intracellular killing assay against *S. aureus* ATCC 25923 on murine macrophage Raw 264.7 cells.

\* :  $p < 0.01$  as compared with control by one-way ANOVA and post hoc LSD test

#### 4. 상피 세포 내 세균 침투 저해 효과

MCF-7 cell 내 생균 수는 MIC 1/2 농도의 Ciprofloxacin(0.235  $\mu\text{g/ml}$ ), TNS (0.157 mg/ml) 및 KWT(0.069 mg/ml) 물 추출물 처리군에서 매체 대조군에 비해 각각 -79.27, -48.97 및 -63.67%의 변화를 나타내었다.

MCF-7 cell을 이용하여, *S. aureus* 상피 세포 침투 저해 효과를 평가한 결과 sub-MIC(MIC 1/2) 농도의 TNS 및 KWT 물 추출물은 매체 처리 대조군에 비해 유의성 있는 상피세포 내 생균 수의 감소를 각각 나타내었다( $p < 0.01$ )(Fig. 5).

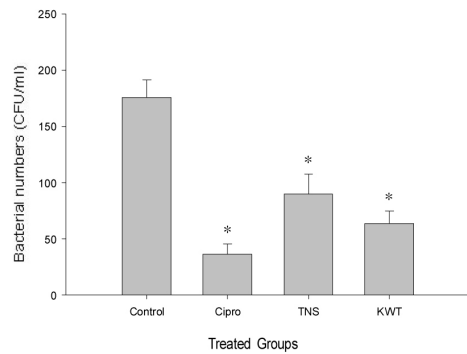


Fig. 5. Results of Bacterial Invasion Assay against *S. aureus* ATCC 25923 on Human Breast Carcinoma MCF-7 Cells.

\* :  $p < 0.01$  as compared with control by one-way ANOVA and post hoc LSD test

## IV. 고찰

유방염은 급만성 유선염, 유방 농양과 같이 유방 부위에 생기는 염증 질환을 말한다. 이는 수유 중에 흔히 발생하는 질환으로 수유를 하는 여성의 2.5%에서 33%까지도 보고되고 있으며<sup>18)</sup>, 수유 시작 후 6주간과 이유기에 흔히 발생하는 것으로 알려져 있다.

유방염의 원인은 유두에 균열이나 찰과상으로 세균 감염이 되고 과증식하여 유관을 막음으로써 염증을 일으키게 된다. 구개열, 구순열 등 구강 기형이 있는 영아나 설소대가 짧은 영아에게 수유하는 경우에도 유두 손상에 의한 유방 감염이 일어날 수 있다. 또한 유즙 분비가 원활치 않은 때에도 정체된 유즙에 의하여 유선염이 발생하게 되며<sup>19)</sup>, 유방염을 일으키는 주 원인균은 *S. aureus*인 것으로 알려져 있다<sup>7)</sup>.

유방염의 진단은 대개 임상 양상의 관찰로 이루어지는데, 유방염의 발생 시



유방이 붓고 아프며 피부가 빨갛게 변하고, 만지거나 옷에 닿기만 해도 통증을 호소하게 된다. 또한 오한, 발열, 38.5°C 이상의 고열을 동반할 수 있으며, 몸살 감기에 걸린 것과 같이 느낄 수 있다. 증상이 더 진행되어 통증이 있는 부위의 피부가 반짝이며 물이 고인 것처럼 출렁이는 감각이 있으면 농양으로 진행된 것으로 판단한다<sup>20)</sup>.

유방염의 치료법으로는 일반 요법, 물리 요법과 약물 요법, 외과적 처치가 있다. 일반 요법은 예방, 온수 찜질과 젖을 짜내는 방법 등이 있으며, 약물 요법은 항생제와 진통제를 투여하며, 외과적으로는 절개 배농술을 시행한다<sup>2)</sup>. 만약 초기 치료가 실패하여 深部에 농증이 형성된 경우는 봉와 조직염, 유방부 괴저, 유방 부위 농증, 다발성 유방 농증, 화농성 누관 등이 병발되기도 한다<sup>20)</sup>.

유방염의 항생제 중  $\beta$ -lactam계 항균제는 다른 항균제에 비하여 부작용이 적고, 안정성이 확보되어 오랜 기간 동안 유방염의 치료제로 사용되어 왔으나<sup>21)</sup>, *S. aureus*를 포함한 세균들이  $\beta$ -lactamase 효소를 생산하여 내성을 나타내고, penicillin이나 cephalosporine 등의 항생제에도 교차 내성을 나타내기 시작하면서<sup>8)</sup>,  $\beta$ -lactamase에 저항하는 methicillin, oxacillin, nafcillin 등의 항균제가 개발되었으나, 곧 이에 대한 내성균의 증가로<sup>7)</sup>, 퀴놀론계 항생제가 개발되어 다용되어 왔다. 이 중 *Ciprofloxacin*은 2세대 퀴놀론 항생제로, 조직 침투성이 좋고 가장 광범위한 항균력을 나타내는 것으로 알려져 있다<sup>22)</sup>. 그러나 *Ciprofloxacin*는 퀴놀론계 항생제의 주요 target인 gyrase와 topoisomerase의 변형을 통한 내성 균주가 출현하고

있으며<sup>9-11)</sup>, 아급성 심장 독성<sup>23)</sup>, 광독성을 포함한 피부 발적과 신장 독성<sup>24)</sup>, 미성숙 동물에서의 연골 독성<sup>25)</sup> 및 건초염과 건 파열<sup>26)</sup> 등의 독성이 초래되어 그 사용 및 사용량이 제한받고 있다. 따라서 유방염 치료를 위하여 이러한 항생제를 대신할 한약제의 개발이 시급한 실정이다.

한의학에서는 유방염을 '乳癰'으로 칭하며, 또한 '吹乳', '奶脹', '妬乳', '發乳', '乳毒' 등으로도 불린다. 乳癰은 乳房癰疽를 뜻하는 것으로, 그 발병 시기와 병인의 차이에 따라 수유기에 발생하는 外吹乳癰, 임신 중 발생하는 內吹乳癰, 남녀노소를 막론하고 肝經에 울체된 氣와 陽明經의 열이 결합하여 乳絡을 가로막아 발생하는 비수유기의 乳癰으로 나뉜다<sup>12)</sup>.

乳癰의 원인으로는 기름진 음식으로 인하여 濕熱의 痰厥이 가슴에 쌓였다가 고여 있는 젖과 서로 상박하여 발생하며, 또한 어린이의 더운 입김이 들어가서 생기기도 하고, 성년 기운이 급격하게 젖몸에 몰려서 생기기도 한다<sup>27)</sup>. 乳癰의 증상에 대해 陳<sup>28)</sup>은 “若乳房忽墮腫痛 結核色赤 數日之外 焮痛脹潰 稠膿湧出”이라 하였고, 葉<sup>29)</sup>은 “初期腫痛...肉色焮赤 其人表熱 或憎寒壯熱 頭痛煩渴”이라 하였다. 乳癰의 치료 방법으로는 膿未盛한 초기에는 活血敗毒, 風熱解散<sup>12)</sup>하거나 疏散爲主<sup>30)</sup>로 하고, 膿已盛시에는 穿之排膿<sup>12)</sup>하거나 刀鍼으로 排膿<sup>30)</sup>하며, 潰한 뒤에 不斂時에는 補氣血하면서 敗毒<sup>30)</sup>하거나 內托排膿<sup>12)</sup>한다.

본 실험에 사용된 透膿散은 《外科正宗<sup>31)</sup>》에 “癰疽 諸毒 內膿已成 不穿破者 宣服之則破”라고 수록된 이래, 후대의

가들에 의하여 “癰瘍膿已成熟 體虛不能自潰<sup>32)</sup>”, “正虛不能托毒 內已成膿 外不易潰 漫腫無頭 或癢脹熟痛<sup>33)</sup>”에 사용되어 주로 이미 화농하였거나, 氣血이 부족하여 화농되지 않거나 농이 있지만 속히潰破되지 않을 때 正氣를扶助하고 透膿托毒하여 毒邪를 外泄하여 內陷을 방지할 목적으로 사용되어 왔다.

瓜蒌牛蒡湯은 《醫宗金鑑<sup>34)</sup>》에 “成膿初期寒熱往來宜服瓜蒌牛蒡湯”, “產後肝鬱胃熱者乳癰 乳汁蓄積乳房脹大 硬結疼痛 拒按 皮色不變 或微紅腫 口渴寒熱往來 尿黃便結 舌紅黃苔 脈弦數”, “癰疽初期腫塊堅硬隱隱痛 皮色不變 舌紅脈滑數”라고 수록된 처방으로 腫塊堅硬하나 피부색이 변하지 않으며, 발열 증상이 있을 때 사용되어 왔다.

지금까지 乳癰에 대한 실험적 연구로 內消散<sup>35)</sup>, 瓜蒌牛蒡湯<sup>36)</sup>, 連翹湯<sup>37)</sup>, 加味消毒飲<sup>38)</sup>, 加味流氣飲<sup>39)</sup> 등의 소염 진통 작용에 대한 연구 보고들은 있으나 透膿散과 瓜蒌牛蒡湯의 탐식 세포 내 사멸 효과와 상피 세포 내 침투율 억제 효과에 대한 연구를 접하지 못하였다. 이에 저자는 여러 가지 부작용과 내성균의 발생되고 있는 *Ciprofloxacin*을 대체할 한약제 사용을 위하여 *S. aureus* ATCC 25923에 대한 TNS와 KWT의 MIC를 측정하고, TNS와 KWT이 MIC 및 MIC×2에서 시간대별 균 성장 곡선에 미치는 영향을 평가하여 TNS과 KWT의 *S. aureus*에 대한 항균력을 평가하였다. 또한 TNS와 KWT의 *S. aureus*에 대한 탐식 세포 내 사멸 효과 및 상피 세포 내 침투 억제 효과를 알아보기 위하여 각각 Raw 264.6 세포와 MCF-7 세포를 이용하여 평가하였다.

본 실험의 결과, *S. aureus*에 대한 TNS 및 KWT 물 추출물의 MIC는 각각  $0.313 \pm 0.107 (0.195 \sim 0.391)$  및  $0.137 \pm 0.053 (0.098 \sim 0.195)$  mg/ml로 관찰되었다. 한편 *Ciprofloxacin*의 MIC는  $0.469 \pm 0.297 (0.195 \sim 0.782)$   $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 관찰되어 Seral 등<sup>40)</sup>의 결과와 유사한 결과를 나타내어 본 실험 방법의 객관성을 증명할 수 있었다. 또한 *Ciprofloxacin* 및 TNS, KWT 물 추출물의 시간대별 성장 곡선을 살펴본 결과, MIC 및 MIC×2에서 각각 처리 용량의존적인 시간대별 균 성장 억제를 나타내는 것을 관찰되어 약물들의 효과가 용량 의존적인 결과를 나타냄을 확인하였다.

일부 병원균에서는 탐식 세포의 작용에 대항하기 위해, 탐식 작용 자체를 피하거나 탐식 세포 내에서 생존하여 다양한 항생제에 저항성을 나타내게 되므로, 고질적인 *S. aureus*에 대한 감염증을 치료하기 위해서는 탐식 세포 내에서 생존하는 병원균의 제어가 필수적이다<sup>40,41-3)</sup>. 본 실험에서 이러한 탐식 세포 내에 생존하는 *S. aureus*의 사멸을 통하여 실질적인 항균 작용을 나타낸다고 판단하여 TNS과 KWT 물 추출물의 Raw 264.6 세포 내 *S. aureus* 사멸 효과를 관찰하였다. 그 결과 TNS, KWT 모두 대조군에 비하여 유의성 있는 사멸 효과를 나타내어 *S. aureus*에 의한 유방염에 유용한 치유 효과를 나타낼 것으로 기대된다.

또한 *S. aureus*는 adhesion과 같은 부착 단백질을 통하여 상피 세포 부착함으로써 세포 내에 침투하므로 세균 침투를 막기 위해서는 *S. aureus*의 상피 세포 부착을 억제해야 한다<sup>16,17,43,44)</sup>. 따라서 본 실험에서는 TNS과 KWT의 *S. aureus*의

MCF-7 세포 내 침투 억제 효과를 살펴본 결과, TNS, KWT 모두 유의성 있는 침투 억제 효과가 인정되어 *S. aureus*에 의한 유방염에 유용한 치유 효과를 나타낼 것으로 기대된다.

이상의 결과에서 TNS와 KWT 물 추출물은 MIC 및 MIC×2에서 각각 처리 용량 의존적인 시간대별 *S. aureus*의 성장 억제를 나타내었고, 유의성 있는 탐식 세포 내 사멸 증가 효과 및 상피 세포 내 세균 침투율 억제 효과를 나타내었기에 in vivo에서의 유방염 치료 효과를 알아보기 위해서는 앞으로 더욱 심도 깊은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## V. 결 론

TNS과 KWT 물 추출물의 *S. aureus*에 대한 항균력을 알아보기 위하여 각각의 MIC를 측정하고, MIC 및 MIC×2에서의 시간대별 균 성장 곡선을 살펴보았다. 또한 Raw 264.6 세포와 MCF-7 세포를 사용하여 탐식 세포 내 사멸 효과 및 상피 세포 내 침투율 억제 효과를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 내렸다.

1. *S. aureus*에 대한 TNS 및 KWT 물 추출물은 각각 MIC(0.313±0.107) 및 (0.137±0.053) mg/ml에서 항균력을 나타내었다.
2. *Ciprofloxacin* 및 TNS과 KWT의 물 추출물은 MIC 및 MIC×2에서 각각 처리 용량 의존적인 시간대별 균 성장 억제를 나타내었다.
3. Raw 264.6 세포 내 *S. aureus* 사멸 효과는 TNS 및 KWT 모두 대조군에

비하여 유의성 있는 결과를 나타내었다.

4. MCF-7 세포에서 상피세포 내 *S. aureus* 침투율 억제 효과는 TNS 및 KWT 모두 대조군에 비하여 유의성 있는 결과를 나타내었다.

이상의 연구 결과에서 *Ciprofloxacin* 및 TNS, KWT 모두 처리 용량 의존적인 시간대별 균 성장 억제 효과를 나타내었으며, TNS와 KWT 모두 유의성 있는 탐식세포 내 사멸 효과와 상피세포 내 침투율 억제 효과를 나타내어 여러 가지 부작용을 나타내는 *Ciprofloxacin*을 대체하여 유방염의 치료제로서 연구 가능성이 있음을 확인하였다.

- 투 고 일 : 2012년 07월 25일
- 심 사 일 : 2012년 08월 08일
- 게재확정일 : 2012년 08월 16일

## 참고문헌

1. 정상설. 핵심유방학개론. 서울:고려의학. 1998:14-7.
2. 김옥영. 여성 유방질환의 임상통계학적 고찰. 한국생화물가학연구원논문총. 1989:14:91-7.
3. 노동영 등. 양성유방질환의 임상적 역학적 연구. 대한외과학회지. 1993;44(6): 797-808.
4. 한국유방암학회. 유방학. 서울:일조각. 1999:18-50.
5. Peters F, Flick-Filliés D. Hand disinfection to prevent puerperal mastitis. Lancet. 1991;338(8770):831.

6. Wambach KA. Lactation mastitis: a descriptive study of the experience. *J Hum Lact.* 2003;19(1):24-34.
7. Lyon BR, Skurray R. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. *Microbiol Rev.* 1987; 51(1):88-134.
8. Okamoto R et al. Detection of genes regulating beta-lactamase production in *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40(11):2550-4.
9. Ackermann G et al. Resistant to moxifloxacin in toxigenic *Clostridium difficile* isolates is associated with mutations in *gyrA*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(8):2348-53.
10. Akasaka T et al. Type II topoisomerase mutations in fluoroquinolone-resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in 1998 and 1999: role of target enzyme in mechanism of fluoroquinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(8):2263-8.
11. Bachoual R et al. Single or double mutation alterations of *gyrA* associated with fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Microb Drug Resist.* 2001;7(3): 257-61.
12. 한의부인과학 교재편찬위원회. 한방 여성의학 II. 서울:정담. 2007:446-9.
13. Pfaller MA et al. Multicenter evaluation of four methods of yeast inoculum preparation. *J Clin Microbiol.* 1988; 26(8):1437-41.
14. Janssen AM et al. Antimicrobial activity of essential oils: a 1976-1986 literature review. *Aspects of the test methods.* *Planta Med.* 1987;53(5): 395-8.
15. Cuffini AM et al. Enhanced *Staphylococcus aureus* susceptibility to immuno-defense induced by sub-inhibitory and bactericidal concentration of imipenem. *J Antimicrob Chemotherp.* 1993;31(4):559-68.
16. Almeida RA et al. *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. *J Dairy Sci.* 1996; 79(6):1021-6.
17. Menzies BE, Kourteva I. Internalisation of *Staphylococcus aureus* by endothelial cells induces apoptosis. *Infect Immunol.* 1998;66(12):5994-8.
18. 신혁재. 유선염의 최신지견. 의약정보. 2011;37(1):22-7.
19. 대한산부인과학회. 산과학. 4판. 서울: 군자출판사. 2007:490.
20. 배종국. 한방유방학. 서울:정담. 2005: 153-81.
21. Medeiros AA. Beta-lactamases. *Br Med Bull.* 1984;40(1):18-27.
22. Appelbaum PC, Hunter PA. The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. *Int J Antimicrob Agents.* 2000;16(1):5-15.
23. Pispirigos K, Chrysanthopoulos K. Evaluation of cardiac subacute toxicity of ciprofloxacin in rats using serum biochemical parameters. *Arzneimittelforschung.* 2001;51(7):582-7.
24. Pons R, Escutia B. Ciprofloxacin-induced vasculitis with cutaneous and renal involvement. *Nefrologia.* 2001;21(2):

- 209-12.
25. Egerbacher M et al. Effects of enrofloxacin and ciprofloxacin hydrochloride on canine and equine chondrocytes in culture. *Am J Vet Res.* 2001;62(5):704-8.
  26. Williams RJ 3rd et al. The effect of ciprofloxacin on tendon, paratenon, and capsular fibroblast metabolism. *Am J Sports Med.* 2000;28(3):364-9.
  27. 許浚. 東醫寶鑑. 하동:동의보감출판사. 2005:679-89.
  28. 陳自明. 婦人大全良方. 北京:人民衛生出版社. 1985:642-51.
  29. 葉天士. 葉天士女科. 서울:대성문화사. 1984:300-2.
  30. 武之望. 濟陰綱目. 台北:旅風出版社. 1977:557.
  31. 陳實功. 外科正宗. 北京:人民衛生出版社. 1983:1-21, 33.
  32. 中醫歷代名方集成. 上海:上海辭書出版社. 1994:1014-5.
  33. 許沛群 外. 方劑學. 北京:人民衛生出版社. 1995:595-6.
  34. 吳謙 等編. 醫宗金鑑. 北京:人民衛生出版社. 1982:1613, 1781.
  35. 박미형. 유옹에 활용되는 내소산의 진통 소염작용에 대한 연구. 대전대학교대학원. 1996.
  36. 김연희. 유옹에 활용되는 과루우방탕이 소염 진통 작용에 미치는 영향. 대전대학교대학원. 1992.
  37. 강동환. 투유에 활용되는 가미연교탕이 소염 진통 및 항균작용에 미치는 영향. 대전대학교대학원. 1992.
  38. 백성준. 유옹에 활용되는 가미소독음의 진통 소염작용에 대한 연구. 대한한방부인과학회지. 1997;10(1):51-61.
  39. 김정숙. 유옹에 활용되는 가감류기음에 대한 실험적 연구. 대전대학교 대학원. 1995.
  40. Seral C et al. Quantitative analysis of gentamicin, azithromycin, telithromycin, ciprofloxacin, moxifloxacin, and oritavancin (LY333328) activities against intracellular *Staphylococcus aureus* in mouse J774 macrophages. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(7):2283-92.
  41. Gresham HD et al. Survival of *Staphylococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection. *J Immunol.* 2000;164(7):3713-22.
  42. Maurin M, Raoult D. Use of aminoglycosides in treatment of infections due to intracellular bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(11):2977-86.
  43. Diarra MS et al. Lactoferrin against *Staphylococcus aureus* Mastitis. Lactoferrin alone or in combination with penicillin G on bovine polymorphonuclear function and mammary epithelial cells colonisation by *Staphylococcus aureus*. *Vet Immunol Immunopathol.* 2003;95(1-2):33-42.
  44. Navarre WW, Schneewind O. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1999;63(1):174-229.