

立效散의 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*에 대한 항균활성에 관한 연구

윤재홍, 최연주, 정승현, 신길조
동국대학교 한의과대학 내과학교실

Antibacterial Effect of *Ipyo-san* against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*

Jae-hong Yoon, Yeun-ju Choi, Seung-hyun Jeong, Gil-cho Shin
Dept. of Oriental Internal Medicine, Dong-Guk University

ABSTRACT

Objectives : Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) has a cephalosporin and beta-lactam antibiotic-resistant strains. MRSA is one of the major pathogens causing hospital infection and the isolation ratio of MRSA has gradually increased. Consequently, increased resistance to antibiotics is causing serious problems in the world. Therefore, there is a need to develop alternative antimicrobial drugs for the treatment of infectious diseases.

Methods : The antibacterial activities of *Ipyo-san* were evaluated against 2 strains of MRSA and 1 standard Methicillin-susceptible *staphylococcus aureus* (MSSA) strain by using the disc diffusion method, minimal inhibitory concentrations (MIC) assay, colorimetric assay using MTT test, checkerboard dilution test and time-kill assay performed under dark.

Results : The MIC of *Ipyo-san* water extract against *S. aureus* strains ranged from 1000 to 2,000 µg/ml, so we confirmed that it had a strong antibacterial effect. Also, the combinations of *Ipyo-san* water extract and conventional antibiotics exhibited improved inhibition of MRSA with synergy effect. We suggest that *Ipyo-san* water extract against MRSA has antibacterial activity so it has potential as alternatives to antibiotic agents. For the combination test, we used Triton X-100 (TX) and DCCD for measurement of membrane permeability and inhibitor of ATPase. As a result, antimicrobial activity of *Ipyo-san* water extract was affected by the cell membrane.

Conclusions : We suggest that the *Ipyo-san* water extract lead the treatment of bacterial infection to solve the resistance and remaining side-effect problems that are the major weak points of traditional antibiotics.

Key words : *Ipyo-san*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), antibacterial effect, minimum inhibitory concentration (MIC), fractional inhibitory concentration index (FICI)

1. 緒 論

황색포도알균(*Staphylococcus aureus*)은 포도알균 균종 중 가장 독성이 강한 균으로 피부의 화농

· 교신저자: 신길조 경기도 성남시 분당구 수내3동 87-2번지
동국대학교 분당한방병원 1내과
TEL: 031-710-3710 FAX: 031-710-3780
E-mail: shingcho@naver.com

· 이 논문은 2013년도 동국대학교 대학원 한의학 박사학위 논문임.

성 감염, 기도 감염, 골수염을 유발하고 합병증으로 균혈증, 심내막염을 일으킨다¹. 그 중 메티실린에 내성을 갖고 있는 메티실린 내성 황색포도알균(Methicillin-resistant *staphylococcus aureus*, MRSA)은 1960년대 처음 발견된 이후 병원 및 지역사회 감염에서 높은 비중을 차지하고 있는데, β-lactam계 항생제 외에 cephalosporin, aminoglycoside, quinolone계 항생제에도 내성을 갖고 있어 MRSA 감염 환

자를 치료하는데 어려움을 겪고 있다^{1,2}.

MRSA 감염증을 치료하기 위해 천연물을 이용한 연구가 활발히 이루어지고 있는데, 단일 약재를 이용한 연구로는 黃芩의 MRSA 항균활성, 黃連의 MRSA 항균효과, 黃柏의 MRSA 항균활성, 蘇木의 MRSA 항균효과 및 항생제 감수성 증가에 대한 연구가 있고, 복합제로는 小陷胸湯을 이용한 MRSA 항균 효과 연구가 있다³⁻⁶.

立效散(*Ipyo-san*, IPS)은 黃連, 吳茱萸, 枳殼으로 구성된 처방으로 赤白의 膿血痢로 腹痛, 裏急後重을 치료하는데 사용된 처방으로, 구성약물 중 주약으로 사용되는 黃連의 주성분인 berberine은 MRSA에 대한 항균효과가 확인되었고, 吳茱萸, 枳殼은 항염증 효과가 보고되었다^{4,7-12}.

이에 저자는 한약물 기반 항균제 개발의 일환으로 黃連이 주약으로 들어있는 立效散을 이용해 methicillin에 내성이 있는 *Staphylococcus aureus*에 대하여 최소 억제 농도를 측정하고, 기존 항생제와 약물 병용 효과와 균의 억제 정도를 시간별로 측정하여 항균 효과를 확인하였으며, 세포막 투과성의 변형과 ATPase 억제 작용에 대하여 확인하고자 하였다.

II. 實 驗

1. 재 료

이 실험에 사용한 立效散은 《東醫寶鑑》 처방을 기준으로 하였으며, 사용된 약재는 黃連, 吳茱萸, 枳殼으로 동국대학교 분당한방병원에서 구입하여 감정하여 사용하였다⁷.

본 실험에 사용한 균주 MRSA(ATCC 33591)와 Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*(MSSA)(ATCC 25923)는 ATCC(American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)에서 구입하였고, DPS는 원광대학교 의과대학병원 내 MRSA 보관자로부터 채취한 것을 임상 균주로 사용하였다.

2. 방 법

1) 시료의 조제방법

立效散은 黃連 22.5 g, 吳茱萸 11.25 g, 枳殼 11.25 g을 500 ml의 증류수와 함께 냉각기가 장착된 전탕기에서 2시간 동안 전탕한 다음 여과하고 rotary evaporator로 감압 농축 후 동결 건조하여 4 g의 추출액을 얻어 4℃에서 보관하였고, 수득률은 8.89%였다(Table 1).

Table 1. The Composition of *Ipyo-san*.

Species	Part used	Pharmacognostic name	Weight (g)
<i>Coptis chinensis</i> FRANCH	Rhizomes	Coptidis Rhizoma (黃連)	22.50
<i>Evodia rutaecarpa</i> BENTHAM	Fruits	Evodiae Fructus (吳茱萸)	11.25
<i>Citrus aurantium</i> LINNE	Fruits	Aurantii Fructus Immaturus (枳殼)	11.25
Total			45.00

2) 균주 배양

각각의 균주들은 -70℃ deep freeze에서 10% glycerol에 보관하고, Mueller-hinton agar(MHA)에 접종하여 37℃ incubator에서 24시간 배양 후 0.5 McFarland 표준 탁도(1.5×10^8 CFU/ml)로 실험에 사용하였다.

3) 항균 저항성 검사¹³

MRSA 균주의 *mecA* gene의 검출은 PCR(Polymerase chain reaction) 증폭기에 의해 나타났다. PCR 반응은 MRSA Primer mix kit(Genotek Co., Korea)을 사용하여 시행하였다(Table 2).

Table 2. Determination of the *mecA* Gene of the *S. aureus* Strains Used in the Experiment.

<i>S. aureus</i> strain	Class	<i>mecA</i> gene	β -Lactamase activity	Antibiotic resistance pattern
ATCC 33591	MRSA	+	+	AM, OX
ATCC 25923	MSSA	-	-	-
Clinical isolates				
DPS	MRSA	+	+	AM, OX

+ : positive, - : negative, AM : ampicillin, OX : oxacillin, DPS : staphylococcal strains

4) 디스크 확산법에 의한 항균효과¹⁴

디스크 확산법을 통해 항균효과를 측정하였다. Mueller-hinton agar(MHA)를 고압 멸균하여 petri-dish에 균한 다음, 균 100 μ l를 골고루 도말하였다. 1.5×10^8 CFU/ml를 희석하여 MHA에 최종적으로 1.5×10^6 CFU/ml가 되게 하였다. 다음으로 멸균 된 paper disc(6 mm)에 IPS 500, 1,000, 2,000 μ g과 ampicillin 10 μ g을 주입하여 37 $^{\circ}$ C incubator에서 24 시간 배양시켜 paper disc의 직경을 포함한 주위에 형성된 inhibition zone의 직경을 측정하였다.

5) 최소억제농도 측정¹⁵

최소억제농도(Minimum inhibitory concentration, MIC)는 배지 미량 희석법을 통해 측정하였다. IPS를 액체배지에 농도별로 첨가하고, 여기에 탁도를 1.5×10^8 CFU/ml로 맞춘 균을 10 μ l 접종하여 최종적으로 1.5×10^6 CFU/ml가 되게 하였다. 다음으로 37 $^{\circ}$ C incubator에서 18시간 배양한 후에 육안으로 관찰하였을 때 미생물이 증식되지 않는 가장 낮은 IPS 농도를 MIC로 측정하였다.

6) 약물병용효과¹⁶

Checkerboard dilution test로 IPS와 상용 항생제인 ampicillin, oxacillin, gentamicin, ciprofloxacin, vancomycin을 병행처리 하였을 때 항생제 효능의 변화를 통해 MIC를 측정하였다. 두 항균물질은 MHB를 보충하여 순차적으로 희석하였다. 접종원은 37 $^{\circ}$ C incubator에서 24 시간 배양한 후에 사용하였으며, 최종적으로 1.5×10^6 CFU/ml가 되게 하였다. 각 약물의 MIC를 기반으로 약물병용효과(Fractional Inhibitory Concentration Index, FICI)

를 계산하였다.

7) 시간-살균 검사¹⁷

시간살균 검사는 IPS의 농도에 따른 박테리아의 성장을 4, 8, 16, 24시간 별로 그래프를 나타내었다. 박테리아는 24시간 배양된 균을 사용하였으며, 1.5×10^6 CFU/ml를 기준으로 하여 MHB를 100배씩 순차적으로 희석하였고, 100 μ l씩 도말하였다. control로써는 MHB에 균만을 배양하였다.

Colony counts는 37 $^{\circ}$ C incubator에서 24시간의 간격을 두고 30~300 colonies를 측정하였다.

8) 항균활성기전¹⁸

IPS의 항균활성이 membrane 투과성의 변형과 ATPase 억제에 어느 정도 연관성이 있는지 보기 위해 IPS에 1% Triton(Triton X-100)과 200 μ g DCCD를 병용하여 IPS $1/16 \sim 1/32$ MIC에서 항균활성을 측정하였다.

9) 통계분석

모든 실험은 Dunnett's t-test 분석법을 이용하여 신뢰수준 95%($p < 0.05$)에서 통계적 유의성을 검증하였다.

III. 結 果

1. 디스크 확산법에 의한 항균효과

Disc diffusion은 IPS 1,000~2,000 μ g에서 지름이 7~12 mm의 clear zone이 나왔다(Fig. 1-4).

1) MSSA(ATCC 25923)

MSSA(ATCC 25923)에서는 IPS 1,000~2,000 μ g에서 지름이 7~12 mm인 clear zone이 나왔으며,

농도 의존적으로 증가하였다(Fig. 1).

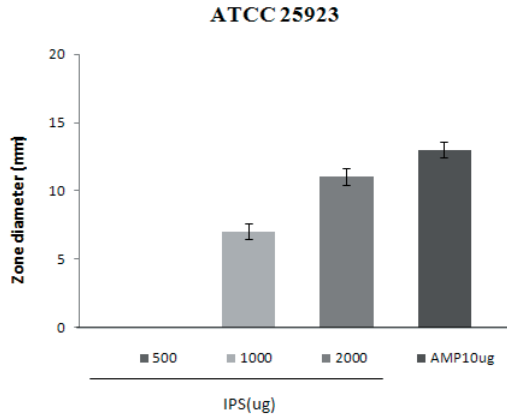


Fig. 1. Zone of inhibition against *S. aureus* ATCC 25923 (MSSA).

2) MRSA(ATCC 33591)

MRSA(ATCC 33591)에서는 IPS 1,000~2,000 µg에서 지름이 7~11 mm인 clear zone이 나왔으며, 농도 의존적으로 증가하였다(Fig. 2).

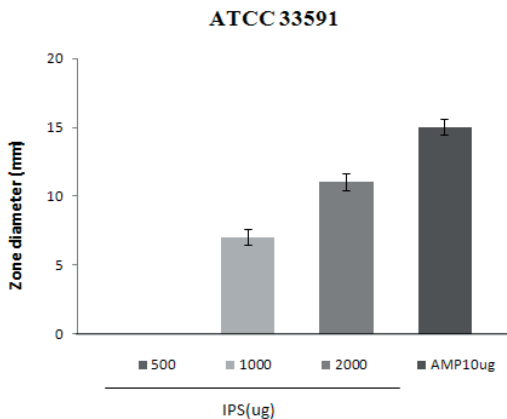


Fig. 2. Zone of inhibition against *S. aureus* ATCC 33591 (MRSA).

3) MRSA(DPS)

임상균주 DPS에서는 IPS 1,000~2,000 µg에서

지름이 7~10 mm인 clear zone이 나왔으며, 농도 의존적으로 증가하였다(Fig. 3).

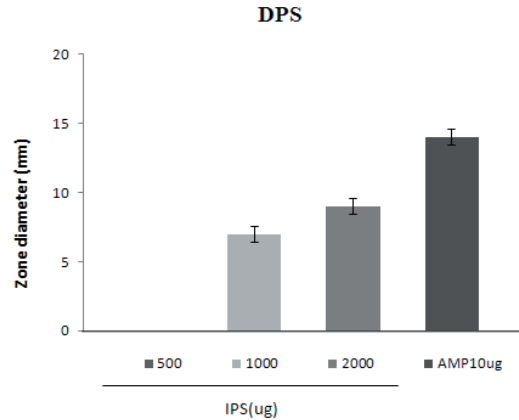


Fig. 3. Zone of inhibition against *S. aureus* DPS (clinical MRSA).

2. 최소억제농도 측정

IPS의 항균활성을 측정한 결과 *S. aureus* 표준균주에서는 최소억제농도가 1,000 µg이 나왔으며, MRSA 임상균주에서도 1,000 µg의 저해농도를 보였다(Table 3).

Table 3. Antibacterial Activity of IPS, Ampicillin, Oxacillin, Gentamicin, Ciprofloxacin and Vancomycin against 3 Strains of *S. aureus*.

<i>S. aureus</i> strain	Class	MIC (µg/ml)					
		AM	OX	GE	CP	VC	IPS
ATCC 25923	MSSA	15.63	125	15.63	125	3.9	1,000
ATCC 33591	MRSA	62.5	500	500	250	3.9	1,000
DPS	MRSA	62.5	500	250.0	250	3.9	1,000

AM : ampicillin, OX : oxacillin, GE : gentamicin
 CP : ciprofloxacin, VC : vancomycin, IPS : *Ipyo-san*
 DPS : staphylococcal strains

3. 약물병용 투여 시 항균효과

Table 4. Result of the Combined Effect of IPS and Antibacterial Agent against *S. aureus*.

<i>S. aureus</i> strain	MIC (µg/ml) IPS*		MIC (µg/ml) antibacterial agent		FICI [§]
	Alone	antibacterial agent concentration	Alone	IPS* concentration	
MSSA (ATCC 25923), AM [†]	1,000	500	15.63	7.81	1.0
MRSA (ATCC 33591), AM [†]	1,000	500	62.5	31.25	1.0
DPS [‡] , AM [†]	1,000	500	62.5	31.25	1.0
MSSA (ATCC 25923), OX [†]	1,000	500	125.0	15.63	0.625
MRSA (ATCC 33591), OX [†]	1,000	500	500.0	250.0	1.0
DPS [‡] , OX [†]	1,000	500	500.0	125.0	0.75
MSSA (ATCC 25923), GE [†]	1,000	125	15.63	1.95	0.25
MRSA (ATCC 33591), GE [†]	1,000	125	500.0	125.0	0.375
DPS [‡] , GE [†]	1,000	250	250.0	62.5	0.5
MSSA (ATCC 25923), CP [†]	1,000	125	125.0	15.63	0.25
MRSA (ATCC 33591), CP [†]	1,000	250	250.0	31.25	0.375
DPS [‡] , CP [†]	1,000	1,000	250.0	31.25	1.125
MSSA (ATCC 25923), VC [†]	1,000	500	3.9	1.95	1.0
MRSA (ATCC 33591), VC [†]	1,000	500	3.9	1.95	1.0
DPS [‡] , VC [†]	1,000	500	3.9	1.95	1.0

*IPS : *Ipyo-san* water extract, [†]AM : ampicillin, [‡]OX : oxacillin, [†]GE : gentamicin, [†]CP : ciprofloxacin, [†]VC : Vancomycin, [‡]DPS : staphylococcal strains, [§]FICI : fractional inhibitory concentration index

1) IPS와 Ampicillin

IPS와 ampicillin과의 약물병용효과를 본 결과 MSSA (ATCC 25923), MRSA(ATCC 33591), MRSA(DPS) 에서 약물을 병용하였을 때, 각각 IPS는 ½ MIC, ampicillin은 ½ MIC로 저해농도가 낮아졌고 FICI 는 1을 나타내었다(Table 4).

2) IPS와 Oxacillin

IPS와 oxacillin과의 약물병용효과를 본 결과 MSSA (ATCC 25923)에서 약물을 병용하였을 때 IPS는 ½ MIC, oxacillin은 ½ MIC로 저해농도가 낮아졌고, FICI는 0.625를 나타내었다. MRSA(ATCC 33591)에서는 IPS, oxacillin 각각 ½ MIC로 저해농도가 낮아졌고, FICI는 1을 나타내었다. MRSA(DPS)에서 IPS는 ½ MIC, oxacillin은 ¼ MIC로 저해농도가 낮아졌고 FICI는 0.75를 나타내었다(Table 4).

3) IPS와 Gentamicin

IPS와 gentamicin과의 약물병용효과를 본 결과

MSSA(ATCC 25923)에서는 약물을 병용하였을 때 IPS, gentamicin 각각 ½ MIC로 농도가 낮아졌고, FICI는 0.25를 나타내었다. MRSA(ATCC 33591)의 경우 IPS는 ½ MIC, gentamicin은 ¼ MIC로 FICI 는 0.375를 나타내었다. MRSA(DPS)에서는 각각 ¼ MIC로 FICI는 0.5를 나타내었다(Table 4).

4) IPS와 Ciprofloxacin

IPS와 ciprofloxacin과의 약물병용효과를 본 결과 MSSA(ATCC 25923)에서는 IPS, ciprofloxacin 각각 ½ MIC로 낮아졌고, FICI는 0.25를 나타내었다. MRSA(ATCC 33591)에서는 IPS, ciprofloxacin 각각 ¼, ½ MIC로 저해농도가 낮아졌고, FICI는 0.375를 나타내었다. MRSA(DPS)에서는 IPS는 변화가 없었고 ciprofloxacin은 ½ MIC로 낮아졌으며, FICI 는 1.125를 나타내었다(Table 4).

5) IPS와 Vancomycin

IPS와 Vancomycin과의 약물병용효과를 본 결과

MSSA(ATCC 25923), MRSA(ATCC 33591), MRSA (DPS) 모든 균주에서 IPS, vancomycin의 값이 병용 시에는 각각 1/2 MIC로 저해농도가 낮아졌고, FICI는 1을 나타내었다(Table 4).

4. 시간-살균 검사

MSSA 표준균주, MRSA의 표준균주 및 임상균주에 대한 IPS의 시간에 따른 항균활성을 측정하여 균의 성장정도를 그래프로 나타냈다(Fig. 4-9).

1) MSSA(ATCC 25923)

(1) IPS 1/2 MIC와 Oxacillin(OX) 1/2 MIC

S. aureus(ATCC 25923)에 대한 IPS와 OX의 FICI 값은 0.625로 IPS 1/2 MIC와 OX 1/2 MIC를 병용하였을 때, 시간이 지남에 따라 균이 급격하게 감소하다 16시간 이후에는 완전히 사멸하였다(Fig. 4).

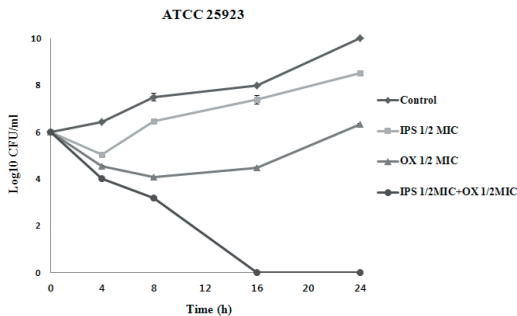


Fig. 4. Time-kill Curves of *S. aureus* (ATCC 25923) using IPS.

(2) IPS 1/2 MIC와 Gentamicin(GE) 1/2 MIC

IPS 1/2 MIC에서는 *S. aureus*(ATCC 25923)의 생장이 control과 비슷한 곡선이었으며, GE 1/2 MIC에서는 16시간까지 감소하다 다시 증가하는 양상을 보였으나 두 약물을 병용하였을 때 처음부터 현격한 균의 감소 추이를 보이다 24시간 이후에는 완전히 사멸하였다(Fig. 5).

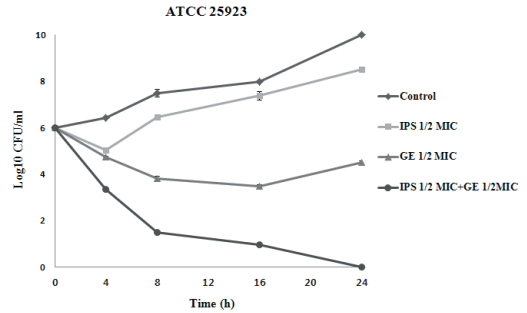


Fig. 5. Time-kill curves of *S. aureus* (ATCC 25923) using IPS.

(3) IPS 1/2 MIC와 Ciprofloxacin(CP) 1/2 MIC

IPS 1/2 MIC에서는 *S. aureus*(ATCC 25923)의 생장이 control과 비슷한 곡선을 보였다. CP 1/2 MIC에서는 8시간까지 감소하다 다시 증가하는 양상을 보였으나, 두 약물을 병용하였을 때 8시간 이후부터 현격한 균의 감소 추이를 보이며 24시간 이후에는 완전히 사멸하였다(Fig. 6).

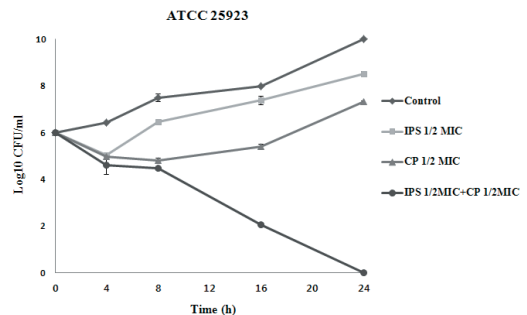


Fig. 6. Time-kill curves of *S. aureus* (ATCC 25923) using IPS.

2) MRSA(ATCC 33591)

(1) IPS 1/3 MIC와 Gentamicin(GE) 1/2 MIC

IPS 1/3 MIC와 GE 1/2 MIC를 병용하였을 때 *S. aureus*(ATCC 33591)의 생장이 점차 억제되어, 24시간 이후에는 완전히 사멸하였다(Fig. 7).

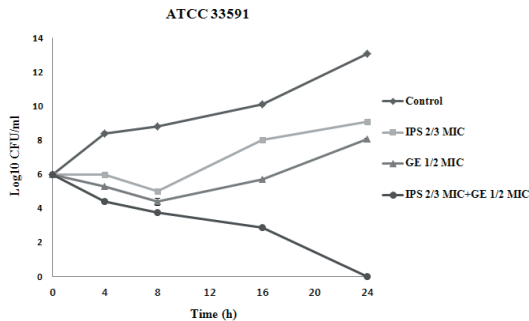


Fig. 7. Time-kill curves of *S. aureus* (ATCC 33591) using IPS.

5. 항균활성기전

1) 막 투과성 강화효과

Detergent를 사용하여 IPS의 membrane 투과성이 강화되는 효과를 보기위해 IPS 31.25 µg과 1% Triton-X(TX)를 병용하였을 때 IPS의 항균활성을 측정하였다. TX와 IPS를 함께 작용시켰을 때 대조군(1.13±0.02 nm)에 비해 0.15±0.00 nm로 *S. aureus* (ATCC 33591)의 생존력을 낮추는 결과를 얻었다 ($p<0.001$)(Fig. 8).

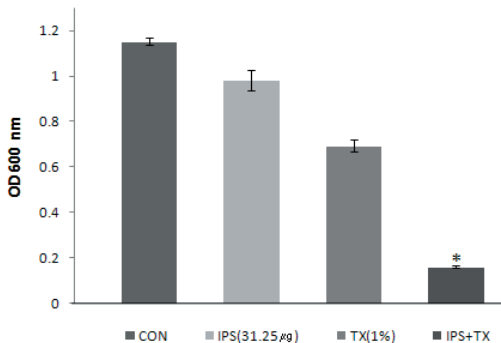


Fig. 8. Effect of membrane-permeabilizing agent Triton on the susceptibility of *S. aureus* (ATCC 33591) to IPS.

The viability of bacteria was determined by a spectrophotometer (optical density at 600 nm, OD600) after incubation of 24 hrs with 31.25 µg IPS and 1% TX(* $p<0.001$). The data are Mean ±S.D. for triple-independent experiments.

2) ATPase 억제

S. aureus(ATCC 33591)에 대한 억제정도를 본 결과, IPS 62.5 µg과 DCCD 200 µg을 병용하였을 때 대조군(1.13±0.02 nm)에 비해 0.32±0.01 nm로 세균의 생존력을 낮추는 결과를 얻었다($p<0.001$)(Fig. 9).

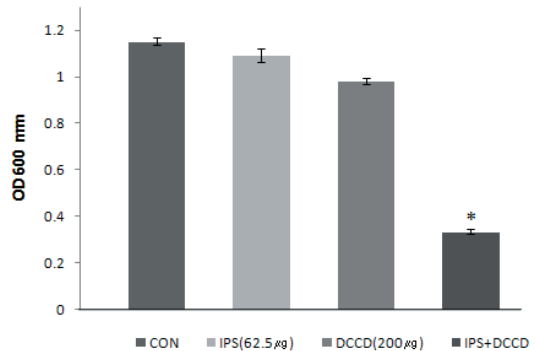


Fig. 9. Effect of ATPase-inhibitors agent DCCD on the susceptibility of *S. aureus* (ATCC 33591) to IPS.

The viability of bacteria was determined by a spectrophotometer (optical density at 600 nm, OD600) after incubation of 24 hrs with 62.5 µg IPS and DCCD 200 µg(* $p<0.001$). The data are Mean±S.D. for triple- independent experiments.

IV. 考 察

1940년 페니실린의 발견 이후 수많은 항생제가 개발되어 감염질환을 치료하는데 큰 공헌을 하였으나 70여년이 지난 현재 다양한 내성균이 출현하여 치명적인 결과를 초래하고 있다. MRSA 감염증은 MSSA 감염증에 비해 급성신부전, 심내막염 등의 발생빈도를 높이고 이환율, 사망률을 높이는데, MRSA는 시간이 지날수록 기존 항생제에 내성을 나타내는 변종이 늘어나 원내 및 지역 보건에 큰 위협이 되고 있다¹⁹⁻²¹. 새로운 항생제를 개발하는 데는 막대한 시간과 비용이 소요되어 최근에는 생약제제를 이용한 치료제 개발에 대한 연구가 이루어지고 있다. 黃芩과 黃柏 추출물의 MRSA 항균활성에 대

한연구, 蘇木의 MRSA 성장억제 및 항생제 감수성 증대 연구, 訶子를 이용한 MRSA 항균 활성에 대한 연구가 보고되었다^{3,5,22}.

立效散은 黃連, 吳茱萸, 枳殼으로 구성된 처방으로, 주약인 黃連은 味苦寒하고 熱氣를 다스려 目痛, 泣出, 腸澼, 腹痛下利를 다스린다^{7,23,24}. 吳茱萸는 味辛溫하고 溫中하여 下氣, 止痛, 除溼血痺, 殺蟲하는 효능을 갖고 있다^{23,24}. 枳殼은 味苦寒하고 胸痞, 食積, 下痢, 脫肛을 치료한다^{23,24}.

黃連에 함유된 berberine은 세균과 진균에 대한 강한 항균력과 함께 MRSA에도 강한 항균효능이 있음이 보고되었고, 黃連이 주요 구성약물이 되는 小陷胸湯을 이용한 연구에서도 MRSA 항균작용이 있음이 보고되었다^{4,6}. 吳茱萸와 枳殼을 이용하여 MRSA에 항균활성을 확인한 연구는 없었으나, 吳茱萸를 이용하여 항염증 효과를 확인한 연구가 있었고, 枳殼을 이용하여 항산화, 항염증 효과를 확인한 연구가 있었다^{10,12}. 이에 저자는 黃連이 주요 구성 약물이 되는 立效散을 이용하여 기존 MRSA 치료에 쓰이는 항생제(ampicillin, oxacillin, gentamycin, ciprofloxacin, vancomycin)와 항균효과를 비교하고 함께 사용하였을 경우 더 효과적인 항균효과가 나타나는지 알아보고자 하였다.

육안으로 항균활성이 있는지 항생제와 비교해보기 위해 Beta-lactam계 항생제인 ampicillin 10 µg과 IPS 500~2,000 µg으로 디스크 확산법을 시행한 결과, IPS 1,000~2,000 µg에서 표준균주 MSSA(ATCC 25923), 표준균주 MRSA(ATCC 33591), 임상균주 MRSA(DPS) 모두 7 mm 이상의 clear zone이 나타났고 면적은 농도 의존적으로 증가했으나, 모두 ampicillin 10 µg보다 항균효과는 적었다. 이를 토대로 구한 IPS의 MRSA에 대한 MIC(최소 억제 농도)는 1,000 µg 이었다.

Checkerboard dilution test 법을 이용한 FICI는 약물을 병용하였을 때 항균력을 측정할 수 있는 일반적인 방법으로, 화학 항균제 상호간 병용효과 외에 천연물과 화학합성물과의 병용효과 역시 알

아볼 수 있다²⁰. 계산하는 방법은 $FICI = FICA + FICB = [A]/MIC_A + [B]/MIC_B$ 인데, [A]는 병용한 A약물의 농도이며, MIC_A 는 A약물의 MIC이다. FICI가 0.5 미만은 synergy(상승), 0.5~0.75는 partial synergy(부분 상승), 0.75~1.0은 additive effect(부가효과)로 효과가 있는 것으로 판단하고, 1.0~4.0은 indifference(무관), 4.0 이상은 antagonism(길항)으로 효과가 없는 것으로 해석한다²⁶. 따라서 각 항균제와 IPS의 MIC를 구하고 이를 바탕으로 FICI를 구하였다. 실험 결과 표준균주 MSSA(ATCC 25923)에서는 GE, CP와 IPS를 병용하였을 때 FICI가 0.25로 synergy를 나타냈고, OX와 IPS를 병용하였을 때 FICI가 0.625로 partial synergy를 나타냈으며, AM, VC와 IPS를 병용하였을 때는 FICI가 1을 나타내었다. 표준균주 MRSA(ATCC 33591)에서는 GE, CP를 IPS와 병용하였을 때 FICI는 0.375로 synergy를 나타내었고, 나머지 항균제에서는 FICI가 1을 나타내었다. 임상균주 DPS에서는 GE와 IPS를 병용한 경우 FICI가 0.5로 가장 낮게 나타났고, OX와 IPS를 병용한 경우 FICI가 0.75로 나타났으며, 나머지 항균제에서는 FICI가 1 이상으로 확인되었다. VC의 경우 FICI가 모두 1로 확인되었는데, MRSA 항균활성이 뛰어나다고 알려진 VC의 FICI가 다른 항생제 보다 높게 측정되어 추후 확인할 필요가 있다고 사료된다.

FICI가 낮게 나온 실험군을 위주로 시간-살균 검사를 통하여 실제 약물을 병용할 경우 균주가 사멸하는지 관찰하였다. 표준균주 MSSA(ATCC 25923)에서는 FICI가 낮았던 OX, GE, CP ½ MIC와 IPS ½ MIC 병용하여 세균이 사멸하는 시간을 관찰하였는데, 각각 16시간, 24시간, 24시간 이후 사멸하였다. 표준균주 MRSA(ATCC 33591)에서는 FICI가 0.375로 확인된 GE, CP ½ MIC를 IPS ½ MIC와 병용하여 세균이 사멸하는 시간을 측정하였는데, 세균이 사멸하는 집단이 없어 IPS ¼ MIC와 GE, CP ½ MIC를 병용하여 세균이 사멸하는 시간을 측정하였다. 실험결과 GE와 병용한 경우

24시간 이후 세균이 사멸하였으나, CP와 병용한 경우 8시간까지 세균 생장이 억제되다 이후 증가하였다. 임상균주 MRSA(DPS)에서는 FICI가 가장 낮게 나타난 GE와 IPS를 병용하여 균주가 사멸되는 시간을 측정하였다. GE ½ MIC와 IPS ½ MIC를 병용하였을 때 균주가 사멸하지 않아 IPS를 ¾ MIC로 높여 GE ½ MIC와 병용하였는데, 역시 16시간까지는 세균 생장이 억제되었으나 사멸시키지 못하고 이후 증가하였다.

항생제 외에도 세포막에 작용하는 물질을 통해 세균의 활성을 억제하는 연구가 이루어지고 있는데, MRSA의 활성을 억제하는 물질로는 triton과 DCCD를 이용한 연구가 있다. Triton은 세균 용해 물질을 이용해 세균의 저항도에 영향을 주는 물질로, triton의 여러 가지 종류 중 X-100이 MRSA의 활성을 억제하는데 가장 효과적으로 작용한다²⁷. 기존 연구에서도 triton X-100을 단독으로 사용하는 경우에 비해 OX 등 항생제를 함께 사용했을 때 MRSA의 활성을 더욱 억제하는 결과가 나타났는데, 이번 실험에서도 IPS 31.25 µg과 TX를 병용했을 경우 0.15±0.00 nm로 대조군(1.13±0.02 nm)에 비해 유의성 있게 MRSA(ATCC 33591)의 활성을 억제하였다²⁸.

DCCD는 세포막의 에너지 전해를 억제하여 세포의 활성을 억제하는데, DCCD만으로 MRSA의 활성을 억제하는 연구결과도 있었다²⁹. 이번 실험 결과 DCCD 단독으로 작용할 경우(1.13±0.02 nm) 보다 IPS 62.5 µg과 함께 사용할 경우 0.32±0.01 nm로 유의하게 MRSA(ATCC 33591)의 활성을 억제시켰다.

실험 결과 黃連이 주약으로 구성된 有效散이 기존 항생제와 병용하였을 경우 적절한 항균 효과를 보이는 것을 알 수 있었다. 기존 小陷胸湯의 MRSA 항균효과에서도 확인할 수 있었듯이 黃連의 MRSA 항균작용이 큰 역할을 하는 것으로 생각된다. 더불어 神效越桃散을 이용한 MRSA 항균효과를 확인한 연구도 있었는데³⁰, 神效越桃散의 주요 구성약물인

梔子の 작용으로 MRSA 항균효과가 있는 것으로 생각되는 바, 淸熱약물로 분류되어 있는 다른 약재들을 이용하여 MRSA 항균효과를 연구한다면 유의성 있는 결과를 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

이상으로 IPS와 항생제를 병용하여 각 세균에 대한 항균효과를 알아보았다. 표준균주 MSSA(ATCC 25923), 표준균주 MRSA(ATCC 33591) 모두 IPS를 병용할 경우 기존 항생제를 절반만 사용하고도 균이 사멸되는 결과를 보였는데, 이는 항생제만 단독으로 사용했을 경우 쉽게 박멸되지 않는 세균을 보다 적은 양으로도 효과적으로 사멸시키는 것을 확인할 수 있었다. 또한 TX나 DCCD와 같이 기존 항생제가 아닌 물질과 병용했을 경우에도 유의한 항균효과를 보여주었는데, 향후 한약물 기반 항균제 개발을 위한 지속적인 연구가 필요하리라 사료된다.

V. 結 論

Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA)에 대해 IPS를 가지고 항균활성을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. IPS는 디스크 확산법을 본 결과, 1,000~2,000 µg의 농도에서 항균효과가 나타났고, *S. aureus*에 대한 MIC(최소억제농도)가 1,000 µg/ml이었다.
2. IPS와 항생제를 이용하여 *S. aureus*에 대해 시간별로 균의 생육곡선을 측정한 결과, MSSA(ATCC 25923)에서는 IPS ½ MIC + OX, IPS ½ MIC + GE, IPS ½ MIC + CP에서 균의 생육이 억제되다가 완전히 사멸하였다.
3. IPS와 항생제를 이용하여 *S. aureus*에 대해 시간별로 균의 생육곡선을 측정한 결과, MRSA(ATCC 33591)에서는 IPS ¾ MIC + GE에서 균이 완전히 사멸하였고, IPS ¾ MIC + CP에서는 8시간까지 생장을 억제하였다.
4. IPS와 항생제를 이용하여 *S. aureus*에 대해 시

간별로 균의 생육곡선을 측정한 결과, MRSA (DPS)에서는 IPS % MIC + GE에서 16시간 까지 생장을 억제하였다.

5. IPS 31.25 µg/ml에 1% Triton-X(TX)를 병용 하였을 때 MRSA(ATCC 33591)의 생존력이 유의하게 감소되었다.
6. IPS 62.5 µg/ml에 N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) 200 µg을 병용하였을 때 MRSA(ATCC 33591)의 생존력이 유의하게 감소되었다.

이상의 실험 결과로 보아 IPS는 MRSA에 대해 유효한 항균작용을 보였고, 항생제와의 병용 실험에서 partial synergy와 synergy effect를 확인할 수 있었다.

參考文獻

1. 김장수. 임상미생물학. 서울: 대한의학서적; 2003, p. 38-42.
2. Fridkin SK, Hageman JC, Morrison M, Sanza LT, Como-sabetti K, Jernigan JA, et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Disease in Three Communities. *N Engl J Med* 2005;352:1436-44.
3. 성인화. 黃芩과 黃柏 추출물의 MRSA와 *Candida*에 대한 항균활성. *대한미생물학회지* 2004;40(1):17-22.
4. 김기배, 이형탁, 구경희, 홍진우, 조수인. 黃連과 구성 생화합물의 약리작용에 대한 고찰. *대한한의학회지* 2012;33(3):16-183.
5. Kim KJ, Yu HH, Jeong SI, Cha JD, Kim SM, You YO. Inhibitory effect of *Caesalpinia sappan* on growth and invasion of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Ethnopharmacol* 2004;91(1):81-7.
6. 염대열, 백동기, 송용선. 小陷胸湯의 Methicillin 내성 *Staphylococcus aureus*에 대한 항균활성 연구. *동의생리병리학회지* 2012;26(6):886-93.
7. 許浚. 東醫寶鑑 -內景篇-. 1판. 서울: 신우문화사; 2003, p. 606.
8. 박경철, 배기상, 최선복, 조일주, 광태신, 이금산, 등. 급성체장염 마우스 모델에서 지실과 지각 추출물의 보호효과. *대한본초학회지* 2012;27(5):9-14.
9. 엄용대, 김대한, 정종길, 신민교, 송호준. 알레르기반응에 대한 枳實과 枳殼의 효과 비교 연구. *대한한의학회지* 2001;22(4):10-21.
10. 김성진, 박상균. 지각 약침액의 항산화 및 항염증 효과에 관한 연구. *경락경혈학회지* 2010;27(2):13-24.
11. 김대준, 노성수, 吳茱萸 물 추출물이 급성역류성 식도염에 미치는 효과. *대한본초학회지* 2012;27(1):51-8.
12. 윤현정, 허숙경, 이영태, 박원환, 박선동. 마우스 대식세포 및 사람 혈관 내피세포에서 오수유 (*Evodia officinalis* DODE) 메탄올 추출물의 항염증 효과. *대한본초학회지* 2008;23(1):29-38.
13. Lee YS, Kang OH, Choi JG, Oh YC, Chae HS, Kim JH, et al. Synergistic effects of the combination of galangin with gentamicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Microbiol* 2008;46:283-8.
14. Kwon DY, Kang OH, Choi JG, Lee YS, Oh YC, Chae HS, et al. Antibacterial effect of *Dryopteris crassirhizoma* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia* 2007;78:430-3.
15. Veljic M, Tarbuk M, Marin PD, Ciric A, Sokovic M, Marin M. Antimicrobial activity of methanol extracts of mosses from Serbia. *Pharm Biol* 2008;46:871-5.
16. Noble WC, Virani Z, Cree RG. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus*

- aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 1992;72:195-8.
17. Nascimento AM, Brandão MG, Oliveira GB, Fortes IC, Chartone-Souza E. Synergistic bactericidal activity of Eremanthus erythropappus oil or beta-bisabolene with ampicillin against *Staphylococcus aureus*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2007;92(1):95-100.
 18. Linnett PE, Beechey RB. Inhibitors of the ATP synthetase system. *Methods Enzymol* 1979;55:472-518.
 19. Blot SI, Vandewoude KH, Hoste EA, Colardyn FA. Outcome and attributable mortality in critically ill patients with bacteremia involving methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Arch Intern Med* 2002;162(19):2229-35.
 20. Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, Schwaber MJ, Karchmer AW, Carmeli Y. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2003;36(1):53-9.
 21. Chang FY, MacDonald BB, Peacock JE Jr, Musher DM, Triplett P, Mylotte JM, et al. A prospective multicenter study of *Staphylococcus aureus* bacteremia: incidence of endocarditis, risk factors for mortality, and clinical impact of methicillin resistance. *Medicine Baltimore* 2003;82(5):322-32.
 22. 이경인, 최철희, 김선민, 표병식. MRSA에 대한 울금 추출 및 분획물의 항균활성과 항생제 증강 효과. *생약학회지* 2010;41(1):38-42.
 23. 전국한의과대학 본초학교수. *本草學*. 서울: 영림사; 1998, p. 180-1, 337-8, 350-1.
 24. 吳普. *神農本草經*. 초판. 서울: 의성당; 2003, p. 79-80, 195-8.
 25. Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicro Chemo* 2003;52(1):1.
 26. Guadalupe MN, Blanca EL, Mariano VP, Fortino SS. In vitro activity effects of combinations of cephalothin, dicloxacillin, imipenem, vancomycin and amikacin against methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. strains. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2006;5:25.
 27. Junji S, Hitoshi K, Motoyuki S, Koji O, Katsuyuki K, Nobuo N, et al. Effects of various types of Triton X on the susceptibilities of methicillin-resistant staphylococci to oxacillin. *FEMS Microbiol Lett* 1997;153(2):327-31.
 28. Hitoshi K, Junji S, Motoyuki S, Yoichiro M, Hidekazu S. The effect of Triton X-100 on the in-vitro susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to oxacillin. *J Antimicrob Chemother* 1994;34(6):885-97.
 29. Jung HJ, Lee DG. Synergistic antibacterial effect between silybin and N,N'-dicyclohexylcarbodiimide in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *J Microbiol* 2008;46(4):462-7.
 30. 신인식, 강옥화, 정대기, 강희정, 김지은, 황형철, 등. 神效越桃散이 메티실린에 내성이 있는 *Staphylococcus aureus*에 대한 항균활성에 관한 연구. *대한본초학회지* 2013;28(1):59-64.