

## 일부 殺蟲解毒類 한약의 *Staphylococcus aureus*에 대한 시험관 내 항균 및 항염 효과

대구한의대학교 부인과교실  
장세란, 김동철

### ABSTRACT

#### In Vitro Anti-bacterial and Anti-inflammatory Effects of Six Types of Herb Aqueous Extracts

Se-Ran Jang, Dong-Chul Kim

Dept. of gynecology, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University

**Objectives:** The object of this study was to observe the in vitro anti-bacterial and anti-inflammatory effects of six single aqueous herbal extracts-Quisqualis Fructus (QuF), Meliae Cortex (MeC), Arecae Semen (ArS), Crassirhizomae Rhizoma (CrR), Ulmi Pasta Semen(UIS), Torreyae Semen(ToS)- against *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and Lipopolysaccharide(LPS)-activated Raw 264.7 cells.

**Methods:** Anti-bacterial activities against *S. aureus* of aqueous extracts of QuF, MeC, ArS, CrR, UIS and ToS were detected using standard agar microdilution methods. In addition, the effects on the cell viability, prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), nitric oxide (NO), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin (IL)-1 $\beta$  and IL-6 productions of LPS activated Raw 264.7 cells were detected. The anti-bacterial and anti-inflammatory effects were respectively compared with lincomycin and piroxicam.

**Results:** Minimal Inhibition Concentration (MIC) of aqueous extracts of QuF, MeC, ArS, CrR, UIS and ToS against *S. aureus* was respectively detected 5.625 $\pm$ 4.075 (3.125 ~ 12.500), 0.332 $\pm$ 0.273 (0.098 ~ 0.782), 1.094 $\pm$ 0.428 (0.782 ~ 1.563), 2.969 $\pm$ 2.096 (0.782 ~ 6.250), 9.375 $\pm$ 4.419 (3.125 ~ 12.500) $>$ 25 mg/ml. MIC of lincomycin was detected as 0.469 $\pm$ 0.297 (0.195 ~ 0.782)  $\mu$ g/ml at same conditions. In addition, ED<sub>50</sub> against LPS-induced cell viabilities and cytokine releases of QuF, MeC, ArS, CrR, UIS and ToS was as follows - Cell viability: 66.370, 2.908, 1.747, 259.553, 18.150 and 34.160 mg/ml; NO production: 389.486, 0.294, 0.138, 523.060, 45.363 and 49.327 mg/ml; PGE<sub>2</sub> production: 114.271, 0.223, 0.046, 243.078, 8.829 and 28.947 mg/ml; TNF- $\alpha$  production: 406.288, 0.343, 0.123, 9404.227, 125.406 and 140.775 mg/ml; IL-1 $\beta$  production: 117.178, 0.135, 0.019, 237.451, 7.923 and 19.418 mg/ml; IL-6 production: 31.261, 0.105, 0.055, 128.434, 2.290 and 3.745 mg/ml. ED<sub>50</sub> of piroxicam against LPS-induced cell viabilities, NO, PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 were detected as 35.179, 6.552, 1.162, 7.273, 7.101 and 5.044  $\mu$ g/ml, respectively at same conditions.

**Conclusions:** All six single aqueous herbal extracts showed anti-bacterial effects against *S. aureus*, in the order of MeC, ArS, CrR, QuF and UIS aqueous extracts except for ToS; they did not showed any anti-bacterial effects (MIC $>$ 25 mg/ml). They also showed anti-inflammatory effects against LPS-activated Raw 264.7 cells in the order of ArS, MeC, UIS, ToS, QuF and CrR aqueous extracts. It means that the ArS and MeC will be showed favorable potent anti-bacterial and related anti-inflammatory effects.

**Key Words:** Quisqualis Fructus, Meliae Cortex, Arecae Semen, Crassirhizomae Rhizoma, Ulmi pasta Semen, Torreyae Semen, *Staphylococcus Aureus*

## I. 서론

유방염은 젖이 나오는 관의 구멍 또는 도중의 어느 곳이 막혀서 젖이 고이기 때문에 생기며, 오래 경과하여 세균 감염이 발생하면 급성 화농성 유방염으로 진행한다<sup>1)</sup>. 화농성 유방염의 주된 원인균은 *Staphylococcus aureus*(*S. aureus*)로 대부분 유아의 코나 상기도에 서식하던 Staphylococci가 유두의 열구 혹은 찰과 부위로 들어가서 발생한다<sup>2)</sup>. 치료를 위하여  $\beta$ -lactam계를 비롯한 다양한 항생제가 사용되어 왔지만 내성을 가진 균들이 나타나기 시작하였고, 이를 보완하기 위해 개발된 다른 항균제에도 내성균이 증가하고 있기 때문에 항생제의 사용을 줄이면서 효과가 우수한 대체 약물 혹은 천연물 유래의 치료제 개발이 시급한 실정이다<sup>2-5)</sup>.

한의학에서는 유방의 紅腫熱痛과 전신의 惡寒發熱 증상을 수반하는 유선조직의 화농성 질환을 乳癰이라고 하는데, 未潰와 已潰를 구분해서 치료하며, 鬱癰期에는 肝鬱胃熱, 熱毒內盛을 변별하여 瓜蒌牛蒡湯, 加味芷貝散, 托裏消毒飲, 仙方活命飲과 같은 처방을 사용한다<sup>6)</sup>. 지금까지 유방염에 대한 실험 연구로는 乳癰에 다용되어 사용된 加味芷貝散<sup>7)</sup>, 透膿散과 瓜蒌牛蒡湯에 대한 연구<sup>8)</sup>가 있었으며, 白頭翁, 敗醬草, 地榆, 槐花, 苦蔘과 같은 清熱, 涼血 작용이 있는 단미제를 사용한 연구<sup>9)</sup>가 있었으나, 使君子, 苦楝皮, 檳榔, 貫衆, 蕪荑, 梔자에 대한 연구는 아직 접하지 못하였다. 使君子, 苦楝皮, 檳榔, 貫衆, 蕪荑, 梔子は 殺蟲解毒劑에 속하는 약재로, 지금까지 이들의 항균 및 항염 효과가 입증되어 왔으므로

유방염의 원인균인 *S. aureus*에 대하여 유효한 항균 효과를 나타낼 것으로 생각되어 본 연구를 계획하였다.

본 연구에서는 *S. aureus*를 이용하여 표준 액체배지 희석법<sup>10)</sup>으로 최소 저지농도(Minimal Inhibition Concentration (MIC))를 측정하여 使君子, 苦楝皮, 檳榔, 貫衆, 蕪荑 및 梔子 물 추출물의 항균력을 평가하였으며, 각각의 물 추출물의 항균력은 lincomycin과 비교하였다. 또한 항염 및 염증 관련 cytokine의 발현에 대한 연구를 수행하기 위하여 LPS로 활성화된 murine macrophage 세포주인 Raw 264.7 세포를 이용하여 세포 생존율, prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>), nitric oxide (NO), tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), interleukin(IL)-1 $\beta$  및 IL-6 분비에 미치는 영향을 각각 평가하였으며, 각각의 물 추출물의 항염 효과는 piroxicam과 비교하였다. 이에 저자는 *S. aureus*에 대한 이 여섯 가지 약재의 항균 및 항염 효과에 대한 분석을 통하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

使君子, 苦楝皮, 檳榔, 貫衆, 蕪荑 및 梔子は 제천한방약초(제천, 한국)에서 매입한 것을 현미경 하에서 관능 검사를 통하여 선정하여 사용하였으며, 배지 및 시약으로 사용된 Brain-heart Infusion(BHI), Muller Hinton agar(MH) agar 또는 broth, Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)은 Difco(MI, USA)에서 각각 구입하였고, methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT), Lipopolysaccharide(LPS)(from *Escherichia coli* 0111:B4), 대조 약물인

lincomycin hydrochloride 및 piroxicam은 Aldrich-Sigma(MO, USA)에서 각각 구입하여 사용하였다. 또한 96 well-plate는 Greiner(Germany)에서 구입하였으며, PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6의 ELISA Kit는 Pierce endogen(Rockford, IL, USA)에서 구입하여 사용하였고, 이외 시약은 Aldrich-Sigma(MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

### 1. 시료(물 추출물)의 준비

본 실험에 사용된 모든 약재 각 100 g을 취하여, 정제수 1000 ml로 80°C에서 3시간 동안 3번 가열 추출한 후, 흡인 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator (Buchi Rotavapor R144, Buchi Labortechnik AG, Switzerland)로 감압, 농축하여 각각

점조성의 추출물을 얻은 다음 programmable freeze dryer(Labconco Freezone1, Labconco Corp. MO, USA)를 사용하여 동결 건조시켜 갈색, 적갈색 또는 연갈색의 使君子, 苦楝皮, 檳榔, 貫衆, 蕪荑 및 榧子 물 추출물을 각각 수율 15.32%, 18.95%, 17.29%, 13.16%, 17.22% 및 15.06%을 얻어 실험에 사용하였으며, 각각의 특성은 Table 1과 같다. 준비한 각각의 동결 건조 추출물은 -20°C의 냉장고에 보관 후 실험에 사용하였으며, 구입한 lincomycin 및 piroxicam은 4°C의 냉장고에 보관한 후 사용하였다. 모든 동결 건조 추출물은 사용한 용매인 증류수에 25 mg/ml의 농도까지 용해되었고, lincomycin 및 piroxicam은 25 및 100  $\mu$ g/ml까지 용해되었다.

Table 1. Characteristics of Individual Herbal Extracts Used in This Study

Korean name	Herbs	Scientific name	Yields (%)
使君子	Quisqualis Fructus	<i>Quisqualis indica</i> Linne	15.32
苦楝皮	Meliae Cortex	<i>Melia azedarach</i> Linne var. japonica Makino	18.95
檳榔	Arecae Semen	<i>Areca catechu</i> Linne	17.29
貫衆	Crassirhizomae Rhizoma	<i>Dryopteris crassirhizoma</i> Nakai	13.16
蕪荑	Ulmi Pasta Semen	<i>Ulmus macrocarpa</i> Hance	17.22
榧子	Torreyae Semen	<i>Torreya nucifera</i> Siebold et Zuccarini	15.06

### 2. 균주, 세포주 및 배지

*S. aureus*는 American Type Culture Collection Center(VA, USA)에서 동결 건조 상태로 구입하여 BHI 배지에 녹인 후 BHI agar에 2~3회 계대 배양한 후 사용하였으며, MH agar 또는 broth에서 유지시켰다. 또한 murine macrophage 세포주인 Raw 264.7 세포는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, 한국)에서 구입하여 사용하였다. 실험에 사용한 Raw 264.7 세포는 DMEM에 10% FBS, 100 U/ml

penicillin 및 100  $\mu$ g/ml streptomycin을 혼합한 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 실험 과정의 모든 세포는 80~90%의 confluence에서 실험하였고, 20 passages를 넘기지 않은 세포만 사용하였다.

### 3. 생균 수의 측정

비교적 정확한 흡광도(OD)와 세균 수의 상관관계를 알아보기 위하여 정량 평판법을 이용하여 균 수를 측정하였다<sup>12,13)</sup>.

*S. aureus*를 spectrophotometer(Milton Roy Spectronic 20D; Milton Roy Company, PA, USA)를 이용하여 600 nm(OD<sub>600</sub>)에서의 흡광도를 0.5 Mcfarland standard와 같은 탁도로 조정 한 다음, 균액을 10, 100, 1000 및 10000배로 단계 희석하여 균의 농도가 1×10<sup>4</sup> CFU/ml이 되도록 만들어 MH agar에 접종하여 37℃, 10% CO<sub>2</sub> 조건에서 24시간 배양한 다음, 조직 배양 접시에 형성된 집락 수를 희석된 순서대로 OD와 비교하였다. 0.5 Mcfarland standard 탁도는 1.175% barium chloride dihydrate (BaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O) 0.05 ml과 1% sulfuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 9.95 ml을 혼합하여 준비하였다<sup>11)</sup>.

#### 4. 항균 활성도 측정

使君子, 苦楝皮, 檳榔, 貫衆, 蕪荑 및 榧子 추출물의 *S. aureus*에 대한 MIC를 표준 액체배지 희석법<sup>10)</sup>을 이용하여 측정하였다. 즉 각각의 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 10가지 농도를 준비하고, 각각 멸균된 96 well plate에 100 µl씩 분주하였다. 여기에 *S. aureus*의 단일 집락을 MH broth 배지에 접종한 지 48시간 후 OD<sub>600</sub>을 spectrophotometer로 측정하여 1.5×10<sup>6</sup> cell이 들어가도록 준비한 cell suspension 100 µl를 분주하였다. 이후 37℃에서 48시간 배양하였다. Lincomycin 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 10가지 농도를 준비하고, 동일한 방법으로 bacteria suspension(1.5×10<sup>6</sup> CFU/ml)을 첨가한 다

음 48시간동안 37℃에 배양하였다. MIC는 각각의 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. 세포 생존율 측정

Raw 264.7 cell을 96 well plate에 5×10<sup>4</sup> cells/well로 분주한 다음 使君子, 苦楝皮, 檳榔, 貫衆, 蕪荑 및 榧子 추출물을 각각 농도 별로 처리하여 세포의 생존율을 구하였다. 즉 각각의 물 추출물을 10 mg/ml의 농도로 멸균 증류수에 용해시킨 다음 계단식으로 배수 희석하여 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 및 0 mg/ml의 총 6가지 농도를 준비하고, piroxicam 역시 100, 10, 5, 2.5, 1.25 및 0 µg/ml 농도의 총 6가지 농도를 준비하여, 각각 세포에 처리한 후에 37℃, 5% CO<sub>2</sub>의 환경이 유지되는 배양기에서 배양하였다. 각각의 물 추출물 처리 1시간 후, 1 µg/ml 농도의 LPS를 다시 첨가한 다음 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 하에서 24시간 배양한 후, 생존 세포에 0.1 mg/ml 농도의 MTT 용액 50 µl를 첨가하고 4시간 배양한 후, 배지를 제거하고 생성된 formazan crystals을 DMSO에 녹여 Automatic ELISA microplate reader(Huntsville, AL, USA)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 무처리 대조군에 대한 ratio로 세포 생존율을 측정하였으며, 5회 반복 실험을 거쳐 산출된 평균 수치를 이용하여 세포의 생존율 감소를 50% 억제하는 50% effective dosage(ED<sub>50</sub>)를 산출하였다.

#### 6. NO 생성량 측정

Raw 264.7 세포주로부터 생성된 NO의

양은 세포 배양액 중에 존재하는  $\text{NO}_2^-$ 의 형태로 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. 즉 세포 배양 상등액 50  $\mu\text{l}$ 와 Griess 시약(1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid+1%  $\alpha$ -naphthylamide in  $\text{H}_2\text{O}$ ) 50  $\mu\text{l}$ 를 96 well plates에 혼합하고 암실에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 Automatic ELISA microplate reader로 흡광도를 측정하였다.  $\text{NO}_2^-$ 의 농도는 sodium nitrate를 희석하여 흡광도를 측정하여 표준 곡선을 얻었다. 실험 결과는 무처리 대조군에 대한 ratio로 NO 생성량의 변화를 표시하였으며, 5회 반복 실험을 거쳐 산출된 평균 수치를 이용하여 각각의 물 추출물이 NO 생성량을 50% 억제하는  $\text{ED}_{50}$ 를 산출하였다.

### 7. $\text{PGE}_2$ 생성량 측정

$\text{PGE}_2$  생성량을 측정하기 위하여 6 well plate에 cells  $5 \times 10^5$  CFU/ml을 분주하고, 使君子, 苦楝皮, 檳榔, 貫衆, 蕪荑 및 榧子 추출물을 각각 농도 별로 처리한 다음, 1시간 후에 LPS 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리하였다. LPS 처치 24시간 후 배지를 수거하여  $\text{PGE}_2$  ELISA Kit(Pierce endogen, Rockford, IL, USA)를 이용하여 측정하였다. 실험 결과는 무처리 대조군에 대한 ratio로  $\text{PGE}_2$  생성량의 변화를 표시하였으며, 5회 반복 실험을 거쳐 산출된 평균 수치를 이용하여 물 추출물 각각의  $\text{ED}_{50}$ 를 산출하였다.

### 8. Cytokine 생성량 측정

TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6 생성량을 측정하기 위하여 6 well plate에 cells  $5 \times 10^5$  CFU/ml을 분주하고, 使君子, 苦楝皮, 檳榔, 貫衆, 蕪荑 및 榧子 추출물을 각각

농도 별로 처리한 다음, 1시간 후에 LPS 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리하였다. LPS 처치 12시간 후 배지를 수거하고, 각각의 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6 ELISA Kit를 이용하여 함량을 측정하였다. 실험 결과는 무처리 대조군에 대한 ratio로 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6 생성량의 변화를 표시하였으며, 5회 반복 실험을 거쳐 산출된 평균 수치를 이용하여 각각의 cytokine에 대한 증가를 50% 억제하는  $\text{ED}_{50}$ 를 산출하였다.

### 9. 통계 처리

모든 수치는 5회 반복 실험의 평균 $\pm$ 표준편차로 표시하였으며, 세포 생존율, NO,  $\text{PGE}_2$  및 Cytokine 생성량에 미치는 효과는 다중 비교 검증을 이용하여 통계 처리를 실시하였다. 즉 분산 동질성을 Levene test를 실시하여 검증하고, 등분산일 경우 one way ANOVA test를 실시한 다음 least-significant differences(LSD) test로 사후 검증을 실시하여 군 간의 유의성을 측정하였고, 비등분산일 경우에는 비모수 검증인 Kruskal-Wallis H test를 실시하여 유의성이 인정된 경우에는 Mann-Whitney U(MW) test를 실시하여 군 간의 유의성을 검증하였다. 모든 통계 처리는 SPSS for Windows(Release 14.0K, SPSS Inc., USA)를 이용하였으며,  $p$ -value가 0.05 이하인 경우 통계적 유의성을 인정하였다. 또한  $\text{ED}_{50}$ 는 Probit 방법을 이용하여 SPSS for Windows(Release 14.0K, SPSS Inc., USA)를 이용하여 산출하였고, 후보 물질의 효과를 보다 명확히 하기 위하여 처리군과 비처리 대조군과의 percent change를 다음의 공식을 이용하여 측정하였다.

EQUATION. Percentage Changes as

Compared with LPS Control (%)  
 = {(Data of test material treated groups  
 -Data of LPS control)/Data of LPS  
 control} × 100

MIC는 각각 5.625±4.075(3.125~12.500),  
 0.332±0.273(0.098~0.782), 1.094±0.428(0.782  
 ~1.563), 2.969±2.096(0.782~6.250), 9.375±  
 4.419(3.125~12.500) 및 >25 mg/ml로 관  
 찰되어, 苦楝皮, 檳榔, 貫衆, 使君子, 蕪荑  
 물 추출물 순으로 *S. aureus*에 대한 항균  
 력을 나타내었으나 榧子 물 추출물은 *S.*  
*aureus*에 대해 유의한 항균력을 나타내지  
 않는 것으로 관찰되었다. 한편 lincomycin  
 의 MIC는 0.469±0.297(0.195~0.782) µg/ml  
 로 관찰되었다(Table 2).

### III. 결 과

#### 1. 항균 활성도(MIC)

使君子, 苦楝皮, 檳榔, 貫衆, 蕪荑 및  
 榧子 물 추출물의 *S. aureus*에 대한 MIC  
 를 표준 액체배지 희석법으로 평가한 결과,

Table 2. MIC against *S. aureus* Detected in This Study by Agar Microdilution Method

Test materials	MIC	Ranges
Quisqualis Fructus (mg/ml)	5.625±4.075	3.125 ~ 12.500
Meliae Cortex (mg/ml)	0.332±0.273	0.098 ~ 0.782
Arecae Semen (mg/ml)	1.094±0.428	0.782 ~ 1.563
Crassirhizomae Rhizoma (mg/ml)	2.969±2.096	0.782 ~ 6.250
Ulmi Pasta Semen (mg/ml)	9.375±4.419	3.125 ~ 12.500
Torreyae Semen (mg/ml)	> 25	> 25
Lincomycin (µg/ml)	0.469±0.297	0.195 ~ 0.782

#### 2. 세포 생존율의 변화

使君子, 苦楝皮, 檳榔, 貫衆, 蕪荑, 榧  
 子 물 추출물, piroxicam 처리군에서는  
 LPS 단독 처리군에 비해 유의성 있는  
 (p<0.01 또는 p<0.05) 세포 생존율의 증  
 가가 각각 1 mg/ml, 0.01 mg/ml, 0.01  
 mg/ml, 1mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.1 mg/ml,  
 5 µg/ml부터 인정되기 시작하였고, LPS  
 처리에 의한 세포 생존률 감소에 대한  
 ED<sub>50</sub>는 각각 66.370 mg/ml, 2.908 mg/ml,  
 1.747 mg/ml, 259.553 mg/ml, 18.150 mg/ml,  
 34.160 mg/ml, 35.179 µg/ml로 산출되었다.

LPS 단독 처리군에서는 무처리 대조  
 군에 비해 使君子, 苦楝皮, 檳榔, 貫衆,  
 蕪荑, 榧子, piroxicam 각각 -40.60%, -40.80%,  
 -41.00%, -41.60%, -41.00%, -40.60%, -40.40%

의 세포 생존율을 나타내었다.

使君子 물 추출물 0.001, 0.01, 0.1, 1 및  
 10 mg/ml 농도 처리군에서는 LPS 단독  
 처리군에 비해 각각 2.36, 9.43, 18.86, 24.58  
 및 37.04%, 苦楝皮 물 추출물에서는 1.01,  
 20.27, 34.12, 45.27 및 51.69%, 檳榔 물  
 추출물에서는 -1.36, 26.10, 39.66, 48.14  
 및 56.61%, 貫衆 물 추출물에서는 5.14,  
 8.90, 19.18, 23.63 및 32.88%, 蕪荑 물 추  
 출물에서는 1.36, 8.81, 19.32, 37.29 및  
 38.64%, 榧子 물 추출물에서는 -2.69, 14.14,  
 21.55, 28.96 및 45.12%의 변화를 나타내었  
 다. 마지막으로 piroxicam 1.25, 2.5, 5, 10 및  
 100 µg/ml 농도 처리군에서는 LPS 단독  
 처리군에 비해 각각 3.02, 12.75, 30.20, 47.65  
 및 56.04%의 변화를 나타내었다(Fig. 1).

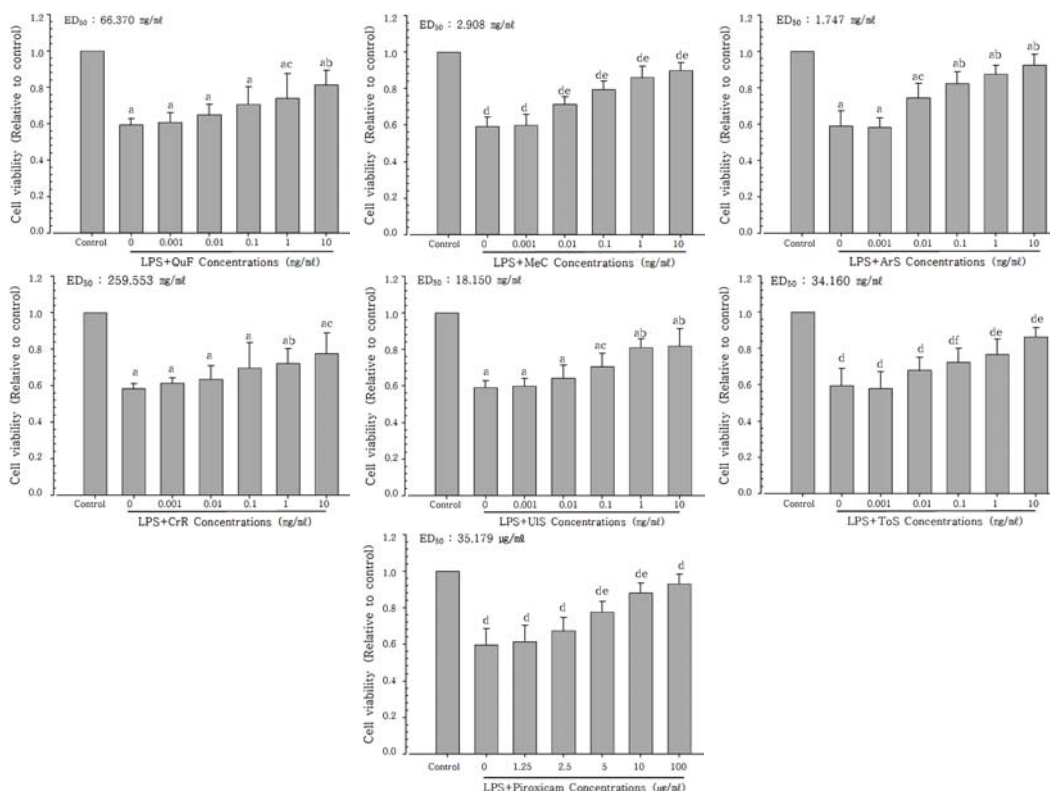


Fig. 1. Effects of Quisqualis Fructus, Meliae Cortex, Arecae Semen, Crassirhizomae Rhizoma, Ulmi Pasta Semen, Torreyae Semen Aqueous Extracts and Piroxicam on the Cell Viability in LPS Stimulated Raw 264.7 Cells.

a :  $p < 0.01$  as compared with control by MW test  
 b :  $p < 0.01$  and c :  $p < 0.05$  as compared with LPS (1 µg/ml) treated control by MW test  
 d :  $p < 0.01$  as compared with control by LSD test  
 e :  $p < 0.01$  and f :  $p < 0.05$  as compared with LPS (1 µg/ml) treated control by LSD test

### 3. NO 생성량의 변화

使君子, 苦楝皮, 檳榔, 貫衆, 蕪荑, 榧子 물 추출물, piroxicam 처리군에서는 LPS 단독 처리군에 비해 유의성 있는( $p < 0.01$  또는  $p < 0.05$ ) NO 생성량의 감소가 각각 0.1 mg/ml, 0.01 mg/ml, 0.001 mg/ml, 1 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.1 mg/ml, 1.25 µg/ml 부터 인정되기 시작하였고, LPS 처리에 의한 NO 생성량의 증가에 대한 ED<sub>50</sub>는 각각 389.486 mg/ml, 0.294 mg/ml, 0.138 mg/ml, 523.060 mg/ml, 45.363 mg/ml, 49.327 mg/ml, 6.552 µg/ml 로 산출되었다.

LPS 단독 처리군에서는 무처리 대조

군에 비해 使君子, 苦楝皮, 檳榔, 貫衆, 蕪荑, 榧子, piroxicam 각각 425.60%, 446.40%, 428.20%, 434.40%, 433.40%, 415.20%, 425.80%의 NO 생성량의 변화가 인정되었다.

使君子 물 추출물 0.001, 0.01, 0.1, 1 및 10 mg/ml 농도 처리군에서는 LPS 단독 처리군에 비해 각각 -6.09, -6.85, -16.44, -21.73 및 -32.46%, 苦楝皮 물 추출물에서는 -19.33, -34.41, -41.29, -58.60 및 -68.67%, 檳榔 물 추출물에서는 -19.65, -34.72, -47.48, -64.03 및 -74.93%, 貫衆 물 추출물에서는 -1.12, -7.07, -16.39, -17.70 및 -27.13%, 蕪荑 물 추출물에서는 -11.47, -21.86, -25.65,

-30.15 및 -46.01%, 梔子 물 추출물에서는 -8.54, -11.02, -21.70, -25.62 및 -44.45%의 변화를 나타내었다. 마지막으로 piroxicam 1.25, 2.5, 5, 10 및 100 µg/ml 농도 처리

군에서는 LPS 단독 처리군에 비해 각각 -25.03, -30.81, -46.06, -69.49 및 -79.16%의 변화를 나타내었다(Fig. 2).

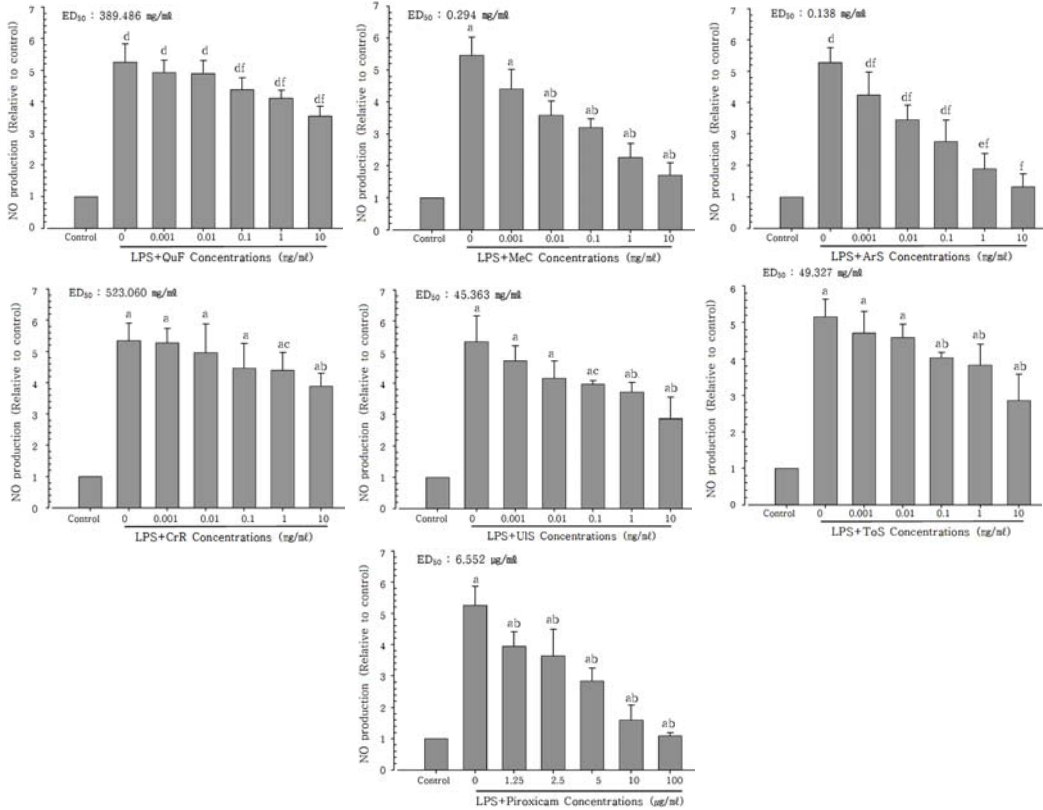


Fig. 2. Effects of Quisqualis Fructus, Meliae Cortex, Arecae Semen, Crassirhizomae Rhizoma, Ulmi Pasta Semen, Torreyae Semen Aqueous Extracts and Piroxicam on the NO Production in LPS Stimulated Raw 264.7 Cells.

a : p<0.01 as compared with control by MW test  
 b : p<0.01 and c : p<0.05 as compared with LPS (1 µg/ml) treated control by MW test  
 d : p<0.01 and e : p<0.05 as compared with control by LSD test  
 f : p<0.01 as compared with LPS (1 µg/ml) treated control by LSD test

#### 4. PGE<sub>2</sub> 생성량의 변화

使君子, 苦楝皮, 檳榔, 貫衆, 蕪荑, 梔子 물 추출물, piroxicam 처리군에서는 LPS 단독 처리군에 비해 유의성 있는(p<0.01 또는 p<0.05) PGE<sub>2</sub> 생성량의 감소가 각각 0.1 mg/ml, 0.001 mg/ml, 0.001 mg/ml, 1 mg/ml, 0.01 mg/ml, 0.1 mg/ml, 1.25 µg/ml 부터 인정되기 시작하였고, LPS 처리에

의한 PGE<sub>2</sub> 생성량의 증가에 대한 ED<sub>50</sub>는 각각 114.271 mg/ml, 0.223 mg/ml, 0.046 mg/ml, 243.078 mg/ml, 8.829 mg/ml, 28.947 mg/ml, 1.162 µg/ml로 산출되었다.

LPS 단독 처리군에서는 무처리 대조군에 비해 使君子, 苦楝皮, 檳榔, 貫衆, 蕪荑, 梔子, piroxicam 각각 39425.00%, 39247.00%, 39734.40%, 39487.60%, 39684.00%, 39416.40%,



39534.00%의 PGE<sub>2</sub> 생성량의 변화가 인정되었다.

使君子 물 추출물 0.001, 0.01, 0.1, 1 및 10 mg/ml 농도 처리군에서는 LPS 단독 처리군에 비해 각각 -3.95, -6.80, -16.61, -26.05 및 -33.63%, 苦楝皮 물 추출물에서는 -19.66, -38.73, -50.86, -59.67 및 -63.19%, 檳榔 물 추출물에서는 -25.22, -46.13, -58.02, -66.98 및 -73.21%, 貫衆 물 추출물에서

는 -0.14, -4.74, -7.88, -16.74 및 -26.94%, 蕪荑 물 추출물에서는 -7.44, -17.94, -21.18, -40.19 및 -49.53%, 榧子 물 추출물에서는 -6.60, -11.37, -19.66, -33.84 및 -42.05%의 변화를 나타내었다. 마지막으로 piroxicam 1.25, 2.5, 5, 10 및 100 µg/ml 농도 처리군에서는 LPS 단독 처리군에 비해 각각 -41.94, -59.07, -69.96, -77.87 및 -82.52%의 변화를 나타내었다(Fig. 3).

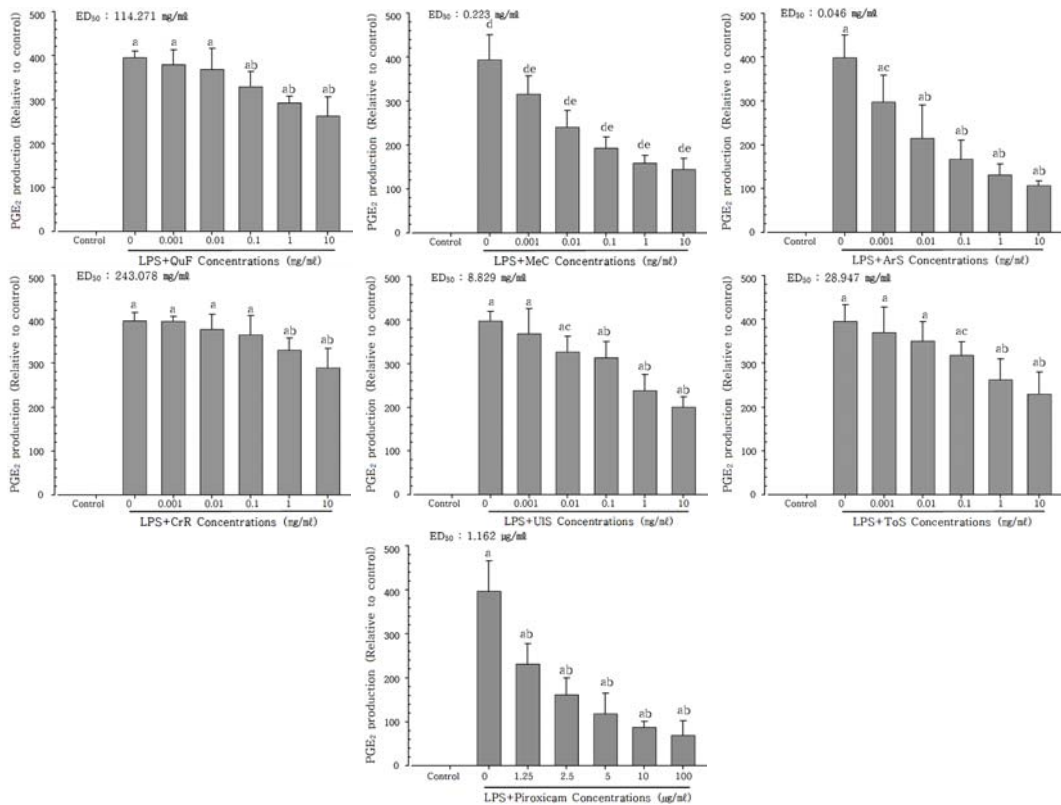


Fig. 3. Effects of Quisqualis Fructus, Meliae Cortex, Arecae Semen, Crassirhizomae Rhizoma, Ulmi Pasta Semen, Torreyae Semen Aqueous Extracts and Piroxicam on the PGE<sub>2</sub> Production in LPS Stimulated Raw 264.7 Cells.

a : p<0.01 as compared with control by MW test  
 b : p<0.01 and c : p<0.05 as compared with LPS (1 µg/ml) treated control by MW test  
 d : p<0.01 as compared with control by LSD test  
 e : p<0.01 as compared with LPS (1 µg/ml) treated control by LSD test

### 5. TNF-α 생성량의 변화

使君子, 苦楝皮, 檳榔, 貫衆, 蕪荑, 榧子 물 추출물, piroxicam 처리군에서는 LPS

단독 처리군에 비해 유의성 있는(p<0.01 또는 p<0.05) TNF-α 생성량의 감소가 각각 10 mg/ml, 0.001 mg/ml, 0.001 mg/ml,

0.1 mg/ml, 0.1 mg/ml, 1 mg/ml, 1.25 µg/ml 부터 인정되기 시작하였고, LPS 처리에 의한 TNF-α 생성량의 증가에 대한 ED<sub>50</sub>는 각각 406.288 mg/ml, 0.343 mg/ml, 0.123 mg/ml, 9404.227 mg/ml, 125.406 mg/ml, 140.775 mg/ml, 7.273 µg/ml로 산출되었다.

LPS 단독 처리군에서는 무처리 대조군에 비해 使君子, 苦楝皮, 檳榔, 貫衆, 蕪荑 櫃子, piroxicam 각각 1464.80%, 1468.80%, 1446.80%, 1456.20%, 1462.40%, 1446.20%, 1460.60%의 TNF-α 생성량의 변화가 인정되었다. 使君子 물 추출물 0.001, 0.01, 0.1, 1 및 10 mg/ml 농도 처리군에서는 LPS 단독 처리

군에 비해 각각 -3.73, -3.51, -10.49, -12.45 및 -32.18%, 苦楝皮 물 추출물에서는 -13.46, -25.92, -41.85, -51.10 및 -78.30%, 檳榔 물 추출물에서는 -25.39, -32.74, -44.62, -59.32 및 -81.38%, 貫衆 물 추출물에서는 -5.33, -3.86, -9.92, -11.89 및 -24.75%, 蕪荑 물 추출물에서는 -6.66, -7.81, -13.79, -20.11 및 -40.28%, 櫃子 물 추출물에서는 -5.95, -7.14, -11.15, -16.26 및 -40.91%의 변화를 나타내었다. 마지막으로 piroxicam 1.25, 2.5, 5, 10 및 100 µg/ml 농도 처리군에서는 LPS 단독 처리군에 비해 각각 -29.19, -42.21, -50.07, -55.63 및 -69.88%의 변화를 나타내었다(Fig. 4).

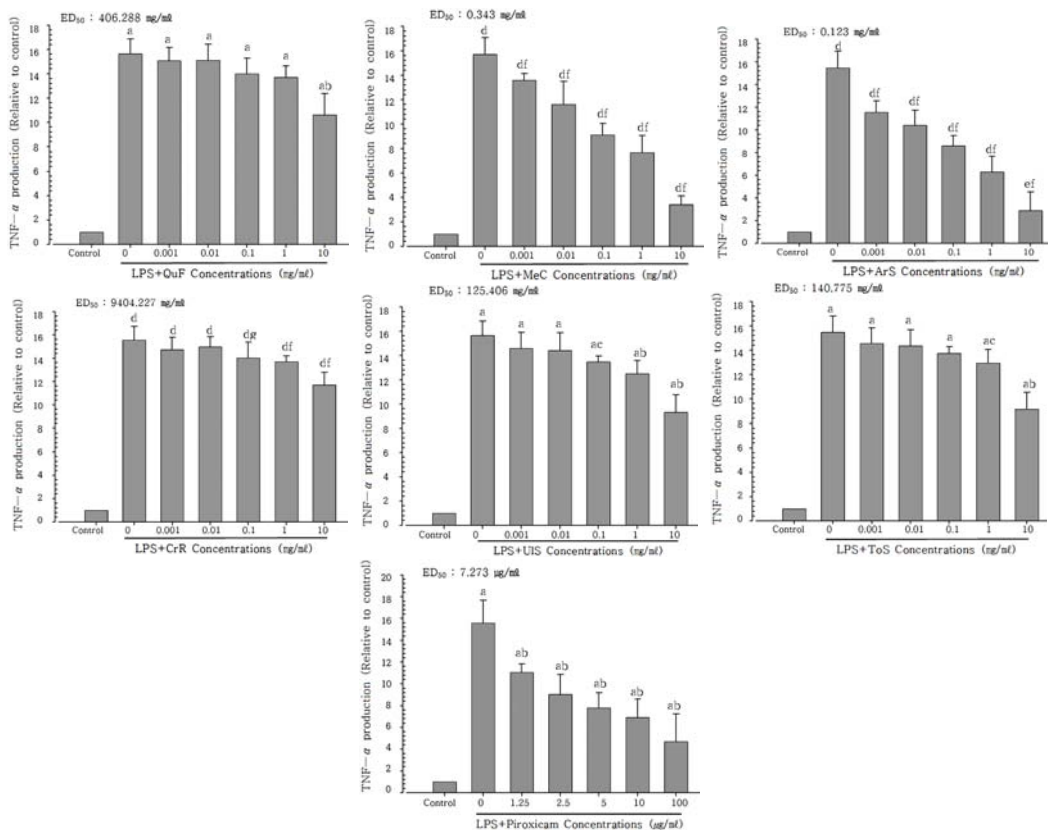


Fig. 4. Effects of *Quisqualis Fructus*, *Meliae Cortex*, *Arecae Semen*, *Crassirhizomae Rhizoma*, *Ulmi Pasta Semen*, *Torreyae Semen Aqueous Extracts* and Piroxicam on the TNF-α Production in LPS Stimulated Raw 264.7 Cells.

a : p<0.01 as compared with control by MW test  
 b : p<0.01 and c : p<0.05 as compared with LPS (1 µg/ml) treated control by MW test  
 d : p<0.01 and e : p<0.05 as compared with control by LSD test  
 f : p<0.01 and g : p<0.05 as compared with LPS (1 µg/ml) treated control by LSD test

### 6. IL-1 $\beta$ 생성량의 변화

使君子, 苦楝皮, 檳榔, 貫衆, 蕪荑, 榧子 물 추출물, piroxicam 처리군에서는 LPS 단독 처리군에 비해 유의성 있는( $p < 0.01$  또는  $p < 0.05$ ) IL-1 $\beta$  생성량의 감소가 각각 1 mg/ml, 0.001 mg/ml, 0.001 mg/ml, 1 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.1 mg/ml, 1.25  $\mu$ g/ml 부터 인정되기 시작하였고, LPS 처리에 의한 IL-1 $\beta$  생성량의 증가에 대한 ED<sub>50</sub>는 각각 117.178 mg/ml, 0.135 mg/ml, 0.019 mg/ml, 237.451 mg/ml, 7.923 mg/ml, 19.418 mg/ml, 7.101  $\mu$ g/ml로 산출되었다.

LPS 단독 처리군에서는 무처리 대조군에 비해 使君子, 苦楝皮, 檳榔, 貫衆, 蕪荑, 榧子, piroxicam 각각 358.20%, 362.80%, 357.80%, 364.00%, 363.80%, 359.60%, 365.60%

의 IL-1 $\beta$  생성량의 변화가 인정되었다. 使君子 물 추출물 0.001, 0.01, 0.1, 1 및 10 mg/ml 농도 처리군에서는 LPS 단독 처리군에 비해 각각 -6.81, -7.20, -12.66, -20.73 및 -40.33%, 苦楝皮 물 추출물에서는 -22.34, -34.49, -50.86, -62.62 및 -71.91%, 檳榔 물 추출물에서는 -34.47, -46.88, -59.90, -71.38 및 -73.04%, 貫衆 물 추출물에서는 -8.28, -8.02, -14.22, -23.45 및 -36.85%, 蕪荑 물 추출물에서는 -4.79, -9.14, -17.51, -32.60 및 -53.99%, 榧子 물 추출물에서는 -2.61, -6.40, -15.19, -26.46 및 -45.52%의 변화를 나타내었다. 마지막으로 piroxicam 1.25, 2.5, 5, 10 및 100  $\mu$ g/ml 농도 처리군에서는 LPS 단독 처리군에 비해 각각 -27.06, -37.97, -44.97, -61.38 및 -75.39%의 변화를 나타내었다(Fig. 5).

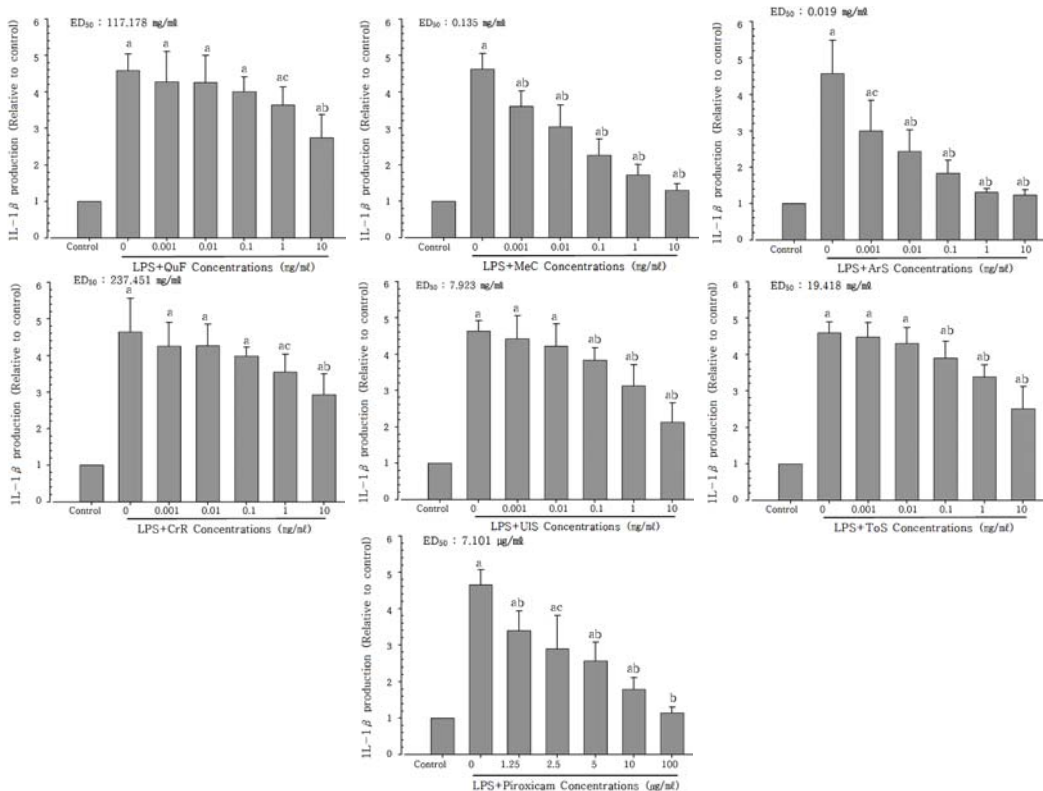


Fig. 5. Effects of Quisqualis Fructus, Meliae Cortex, Arecae Semen, Crassirhizomae Rhizoma, Ulmi Pasta Semen, Torreyae Semen Aqueous Extracts and Piroxicam on the IL-1 $\beta$  Production in LPS Stimulated Raw 264.7 Cells.

a :  $p < 0.01$  as compared with control by MW test  
 b :  $p < 0.01$  and c :  $p < 0.05$  as compared with LPS (1  $\mu$ g/ml) treated control by MW test

### 7. IL-6 생성량의 변화

使君子, 苦楝皮, 檳榔, 貫衆, 蕪荑, 榧子 물 추출물, piroxicam 처리군에서는 LPS 단독 처리군에 비해 유의성 있는( $p < 0.01$  또는  $p < 0.05$ ) IL-6 생성량의 감소가 각각 0.1 mg/ml, 0.001 mg/ml, 0.1 mg/ml, 1 mg/ml, 0.01 mg/ml, 0.1 mg/ml, 2.5  $\mu$ g/ml 부터 인정되기 시작하였고, LPS 처리에 의한 IL-6 생성량의 증가에 대한 ED<sub>50</sub>는 각각 31.261 mg/ml, 0.105 mg/ml, 0.055 mg/ml, 128.434 mg/ml, 2.290 mg/ml, 3.745 mg/ml, 5.044  $\mu$ g/ml로 산출되었다.

LPS 단독 처리군에서는 무처리 대조군에 비해 使君子, 苦楝皮, 檳榔, 貫衆, 蕪荑, 榧子, piroxicam 각각 2380.00%, 2392.60%, 2387.20%, 2365.60%, 2378.80%, 2360.00%, 2385.60%

의 IL-6 생성량의 변화가 인정되었다.

使君子 물 추출물 0.001, 0.01, 0.1, 1 및 10 mg/ml 농도 처리군에서는 LPS 단독 처리군에 비해 각각 -3.24, -10.56, -11.19, -24.67 및 -45.06%, 苦楝皮 물 추출물에서는 -22.96, -30.37, -50.74, -63.14 및 -81.06%, 檳榔 물 추출물에서는 -26.32, -34.83, -52.28, -68.17 및 -86.60%, 貫衆 물 추출물에서는 -3.08, -9.94, -9.73, -18.71 및 -38.06%, 蕪荑 물 추출물에서는 -5.74, -14.71, -22.43, -49.48 및 -58.92%, 榧子 물 추출물에서는 -8.76, -6.37, -20.25, -44.27 및 -57.49%의 변화를 나타내었다. 마지막으로 piroxicam 1.25, 2.5, 5, 10 및 100  $\mu$ g/ml 농도 처리군에서는 LPS 단독 처리군에 비해 각각 -28.36, -39.39, -51.52, -63.08 및 -84.32%의 변화를 나타내었다(Fig. 6).

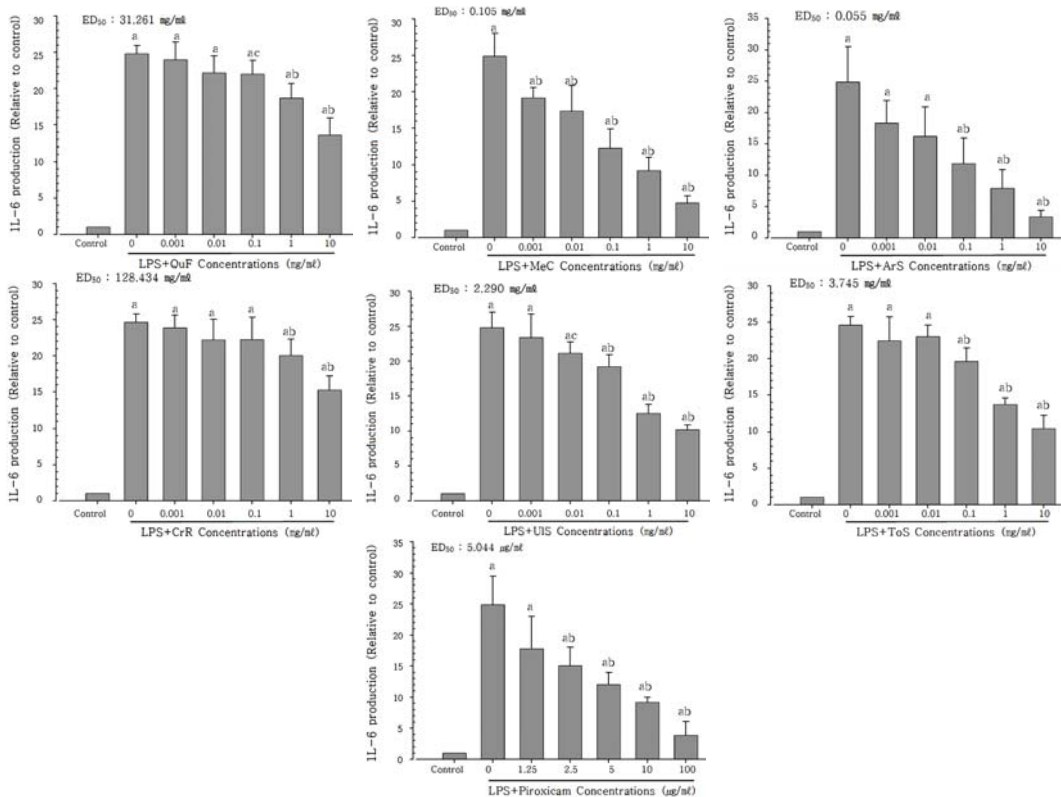


Fig. 6. Effects of Quisqualis Fructus, Meliae Cortex, Arecae Semen, Crassirhizomae Rhizoma, Ulmi Pasta Semen, Torreyae Semen Aqueous Extracts and Piroxicam on the IL-6 Production in LPS Stimulated Raw 264.7 Cells.

a :  $p < 0.01$  as compared with control by MW test

b :  $p < 0.01$  and c :  $p < 0.05$  as compared with LPS (1  $\mu$ g/ml) treated control by MW test

## IV. 고찰

유방염은 유방의 피부, 한선, 유선 및 지방층에 발생하는 염증성 질환과 기타의 특수한 염증성 질환들을 포함하는 질환으로, 주된 원인균은 *S. aureus*이며 18~50세의 여성에게 흔히 발생한다<sup>12)</sup>. 유방염의 약 10%는 농양을 형성하는 화농성 유방염이나 유방 농양으로 진행하며 이때에는 절개하여 배농시키는데 배농이 완전하지 않으면 패혈증을 유발할 수 있으며, 드물게瘡口不斂으로 인해乳漏가 생성되기도 하므로 적절한 처치와 치료가 필요하다<sup>6)</sup>.

유방염을 비롯한 여러 감염성 질환의 치료를 위하여 새로운 항생제가 계속해서 개발되어 왔으나 penicillin의 부적절한 사용은 내성균주의 출현을 야기시켰으며<sup>13)</sup>, *S. aureus*는 methicillin과 모든  $\beta$ -lactams에 내성을 가진 methicillin resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA)로 진화하게 되어 vancomycin teicoplanin을 제외한 대부분의 항생제에 내성을 가지게 되었다<sup>14,15)</sup>. 또한 MRSA에 의해 생기는 질병에 vancomycin을 사용한 결과 최후의 항생제라고 이야기되고 있는 vancomycin에 내성을 가진 vancomycin sensitive *Staphylococcus aureus*(VSSA) 또는 vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*(VRSA)의 출현이 보고되고 있으므로 항생제의 사용을 줄이면서 효과가 우수한 대체 약물 혹은 천연물 유래의 치료제 개발이 시급한 실정이다.

한의학에서는乳房이紅腫熱痛하는 질환을 '乳癰'이라 하는데, 축적된乳汁이胃熱이나外感之邪와相搏하여熱盛肉腐

하여 점차乳癰을 형성한다고 보았으며,膿未盛한 초기에는活血敗毒, 風熱解散하여疏散爲主로 하고,膿已盛시에는穿之排膿하며,潰한 뒤에不斂時에는內托排膿한다<sup>6,16)</sup>. 본 연구에 사용된使君子, 苦楝皮, 檳榔, 貫衆, 蕪荑 및 榧子 각각의 항균<sup>17-20)</sup>, 항염<sup>21-27)</sup>, 항감염<sup>28-34)</sup>, 면역 조절<sup>35-39)</sup>, 항산화<sup>40-49)</sup> 효과가 여러 연구를 통해 증명되어 왔으며, 이들은殺蟲解毒劑에 해당하는 약재로 유방염의 주 원인균인 *S. aureus*에 항균력을 나타내는지 알아보기 위하여 본 연구를 계획하였다.

*S. aureus*에 대한 MIC를 표준 액체배지 희석법<sup>10)</sup>으로 측정하여 항균 효과를 평가하였으며, LPS로 활성화된 murine macrophage 세포주인 Raw 264.7 세포를 이용하여 세포 생존율, PGE<sub>2</sub>, NO, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6 분비에 미치는 영향을 각각 평가하여 항균력은 *S. aureus*의 대표적인 항생제인 lincomycin과 비교하였고, 항염 효과는 piroxicam과 각각 비교하였다.

*S. aureus*에 대한 lincomycin의 MIC는 대략 1.56  $\mu$ g/ml로 알려져 있는데<sup>50)</sup>, 본 실험의 결과에서도 0.469 $\pm$ 0.297(0.195~0.782)  $\mu$ g/ml로 관찰되어 이전의 연구와 유사한 항균 활성이 인정되었다. 또한 piroxicam의 LPS 처리에 의한 Raw 264.7 세포의 생존율, NO, PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6 생성량 증가 억제에 대한 ED<sub>50</sub> 또한 각각 35.179, 6.552, 1.162, 7.273, 7.101 및 5.044  $\mu$ g/ml로 관찰되어, 5.30  $\mu$ g/ml 전후에서 비교적 강력한 항염 효과를 나타낸다는 이전의 보고<sup>51)</sup>와 유사한 항염 효과가 인정되었다.

표준 액체배지 희석법에 의한 MIC 측정은 세균 및 다양한 감염증에 대한 후

보 물질의 항균 활성을 측정하는 가장 기본적인 방법이다<sup>10,52,53</sup>). 본 실험의 결과 使君子, 苦楝皮, 檳榔, 貫衆, 蕪荑 및 梔子 물 추출물의 *S. aureus*에 대한 MIC는 5.625±4.075(3.125~12.500), 0.332±0.273(0.098~0.782), 1.094±0.428(0.782~1.563), 2.969±2.096(0.782~6.250), 9.375±4.419(3.125~12.500) 및 >25 mg/ml로 苦楝皮, 檳榔, 貫衆, 使君子, 蕪荑 물 추출물 순으로 *S. aureus*에 대한 항균력을 나타내었으며, 梔子 물 추출물은 *S. aureus*에 대해 유의한 항균력을 나타내지 않는 것으로 관찰되었다.

대식 세포가 이물질에 대응할 때 분비되는 여러 종류의 cytokine은 염증 반응을 매개하지만 과도한 분비는 숙주에 치명적인 결과를 초래할 수도 있으므로 대식 세포의 생존을 유지하면서 과도한 염증 반응을 매개하는 여러 가지 cytokine의 적절한 제어가 필수적이다. 본 실험의 결과 使君子, 苦楝皮, 檳榔, 貫衆, 蕪荑 및 梔子 물 추출물의 LPS 처리 Raw 264.7 세포 생존율에 대한 ED<sub>50</sub>가 각각 66.370, 2.908, 1.747, 259.553, 18.150 및 34.160 mg/ml로 관찰되어, 檳榔, 苦楝皮, 蕪荑, 梔子, 使君子, 貫衆의 순으로 대식 세포 보호 효과를 나타내며, 특히 檳榔, 苦楝皮의 효과가 우수한 것으로 판단된다.

NO는 생리적 조건 하에서 혈관 긴장을 완화시켜주고, 호중 백혈구와 혈소판이 내피에 응집, 부착하는 것을 억제하는 등 유익한 기능을 가지고 있다<sup>54</sup>). 하지만 급성 염증 반응 시 과도하게 생성된 NO는 조직 손상의 원인이 될 수 있으며, 숙주 세포의 파괴, shock에 의한 혈관 확장과 염증 반응 유발에 의한 조직의 상해를 초래할 수 있으므로 NO의

적절한 제어가 필수적이다<sup>55</sup>). 본 실험의 결과 使君子, 苦楝皮, 檳榔, 貫衆, 蕪荑 및 梔子 물 추출물의 LPS 처리에 의한 Raw 264.7 세포의 NO 생성량 증가 억제에 대한 ED<sub>50</sub>가 각각 389.486, 0.294, 0.138, 523.060, 45.363 및 49.327 mg/ml로 관찰되어 檳榔, 苦楝皮, 蕪荑, 梔子, 使君子, 貫衆의 순으로 과도한 대식 세포의 NO 생산 억제 효과, 즉 항산화 효과를 나타내며, 특히 檳榔, 苦楝皮의 효과가 우수한 것으로 판단된다.

PGE<sub>2</sub> 역시 NO와 유사하게 손상된 조직에서 통증과 발열에 관여하는 대표적인 염증 매개 물질로, 과량의 PGE<sub>2</sub>는 과잉의 면역 반응을 일으켜 각종 염증성 질환을 유발한다<sup>56</sup>). 따라서 PGE<sub>2</sub> 생성 억제는 염증과 통증을 완화시키므로 염증성 질환의 치료에 매우 유용한 것으로 알려져 있다<sup>56,57</sup>). 본 실험의 결과 使君子, 苦楝皮, 檳榔, 貫衆, 蕪荑 및 梔子 물 추출물의 LPS 처리에 의한 Raw 264.7 세포의 PGE<sub>2</sub> 생성량 증가 억제에 대한 ED<sub>50</sub>가 각각 114.271, 0.223, 0.046, 243.078, 8.829 및 28.947 mg/ml로 관찰되어, 檳榔, 苦楝皮, 蕪荑, 梔子, 使君子, 貫衆의 순으로 과도한 대식 세포의 PGE<sub>2</sub> 생산 억제 효과, 즉 항염 효과를 나타내며, 특히 檳榔, 苦楝皮의 효과가 우수한 것으로 판단된다.

TNF-α는 전 염증성 cytokine으로서 활성화된 호중성 백혈구와 대식 세포에 의해 생산되며, 다양한 염증성 질환 및 자가 면역 질환에 있어서 염증의 개시 및 유지에 핵심적 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>58,59</sup>). 또한 염증관련 cytokine 중 IL-1β는 LPS 독성의 mediator로 알려진 전염증성 cytokine으로 생물학적 기

능은 TNF- $\alpha$ 와 유사하며 이들 두 cytokine 들은 여러 형태의 실험에서 상호 상가 효과를 나타낸다<sup>60)</sup>. IL-6는 전염증성 cytokine 중의 하나로 간장의 Kupper cell과 monocytes 및 macrophage에서 생산되며, 림프구를 활성화시켜 항체 생산을 증가시키고, 염증 반응의 정도를 나타내는 지표가 된다<sup>58,61)</sup>. 본 실험의 결과 使君子, 苦楝皮, 檳榔, 貫衆, 蕪荑 및 榧子 물 추출물의 LPS 처리에 의한 Raw 264.7 세포의 TNF- $\alpha$  생성량 증가 억제에 대한 ED<sub>50</sub>가 각각 406.288, 0.343, 0.123, 9404.227, 125.406 및 140.775 mg/ml, IL-1 $\beta$  생성량 증가 억제에 대한 ED<sub>50</sub>가 각각 117.178, 0.135, 0.019, 237.451, 7.923 및 19.418 mg/ml, IL-6 생성량 증가 억제에 대한 ED<sub>50</sub>가 각각 31.261, 0.105, 0.055, 128.434, 2.290 및 3.745 mg/ml로 관찰되어, 檳榔, 苦楝皮, 蕪荑, 榧子, 使君子, 貫衆의 순으로 세포 보호, 항염 또는 항산화 효과를 나타내었고, 그 중 檳榔과 苦楝皮가 비교적 우수한 항균 및 항염 효과를 나타내었다.

이상의 결과에서 苦楝皮, 檳榔, 貫衆, 使君子, 蕪荑 물 추출물 순으로 *S. aureus*에 대한 항균력을 나타내었으며 榧子 물 추출물은 *S. aureus*에 대해 유의한 항균력을 나타내지 않는 것으로 관찰되었다. 또한 檳榔, 苦楝皮, 蕪荑, 榧子, 使君子, 貫衆의 순으로 세포 보호, 항염 또는 항산화 효과를 나타내었다. Lincomycin과 piroxiam의 심각한 부작용과 내성균 등장으로 새로운 치료제의 개발이 필요한 시점에서 殺蟲解毒劑에 속하는 한약재를 활용하여 *S. aureus*에 대한 항균 및 항염력을 살펴본 본 연구 결과, 이들의 효력은 lincomycin과 piroxicam에 미치지 못하지만 *S. aureus*에 대한 항균력과 항염

효과가 입증되어 이들을 활용하여 유방염의 치료에 활용할 수 있을 것으로 기대된다. 특히 여섯 약재 중 檳榔, 苦楝皮가 비교적 우수한 항염 효과를 나타내어 이들을 활용한 여러 연구가 필요할 것으로 판단되며, 유방염 뿐만 아니라 다른 감염성 염증 질환에서도 비교적 우수한 효과를 나타낼 것으로 기대된다.

## V. 결 론

使君子, 苦楝皮, 檳榔, 貫衆, 蕪荑 및 榧子 물 추출물의 *S. aureus*에 대한 항균력을 표준액체배지 희석법으로 평가하였으며, LPS로 활성화된 murine macrophage 세포주인 Raw 264.7 세포를 이용하여 항염 효과를 평가한 결과는 다음과 같다.

1. *S. aureus*에 대한 使君子, 苦楝皮, 檳榔, 貫衆, 蕪荑 및 榧子 물 추출물의 MIC는 5.625 $\pm$ 4.075(3.125~12.500), 0.332 $\pm$ 0.273(0.098~0.782), 1.094 $\pm$ 0.428(0.782~1.563), 2.969 $\pm$ 2.096(0.782~6.250), 9.375 $\pm$ 4.419(3.125~12.500) 및 >25 mg/ml로 관찰되었다.
2. 使君子, 苦楝皮, 檳榔, 貫衆, 蕪荑 및 榧子 물 추출물의 LPS 처리 Raw 264.7 세포 생존율에 대한 ED<sub>50</sub>는 66.370, 2.908, 1.747, 259.553, 18.150 및 34.160 mg/ml로 관찰되었다.
3. 使君子, 苦楝皮, 檳榔, 貫衆, 蕪荑 및 榧子 물 추출물의 LPS 처리에 의한 Raw 264.7 세포의 NO 생성량 증가 억제에 대한 ED<sub>50</sub>는 389.486, 0.294, 0.138, 523.060, 45.363 및 49.327 mg/ml로 관찰되었다.

4. 使君子, 苦楝皮, 檳榔, 貫衆, 燕蕒 및 榧子 물 추출물의 LPS 처리에 의한 Raw 264.7 세포의 PGE<sub>2</sub> 생성량 증가 억제에 대한 ED<sub>50</sub>는 114.271, 0.223, 0.046, 243.078, 8.829 및 28.947 mg/ml로 관찰되었다.
5. 使君子, 苦楝皮, 檳榔, 貫衆, 燕蕒 및 榧子 물 추출물의 LPS 처리에 의한 Raw 264.7 세포의 TNF- $\alpha$  생성량 증가 억제에 대한 ED<sub>50</sub>는 406.288, 0.343, 0.123, 9404.227, 125.406 및 140.775 mg/ml로 관찰되었다.
6. 使君子, 苦楝皮, 檳榔, 貫衆, 燕蕒 및 榧子 물 추출물의 LPS 처리에 의한 Raw 264.7 세포의 IL-1 $\beta$  생성량 증가 억제에 대한 ED<sub>50</sub>는 117.178, 0.135, 0.019, 237.451, 7.923 및 19.418 mg/ml로 관찰되었다.
7. 使君子, 苦楝皮, 檳榔, 貫衆, 燕蕒 및 榧子 물 추출물의 LPS 처리에 의한 Raw 264.7 세포의 IL-6 생성량 증가 억제에 대한 ED<sub>50</sub>는 31.261, 0.105, 0.055, 128.434, 2.290 및 3.745 mg/ml로 관찰되었다.

이상의 결과에서 榧子 물 추출물은 *S. aureus*에 대해 항균력을 나타내지 않았으며, 나머지 약재들은 苦楝皮, 檳榔, 貫衆, 使君子, 燕蕒 물 추출물 순으로 *S. aureus*에 대한 항균력을 나타내었다. 또한 檳榔, 苦楝皮, 燕蕒, 榧子, 使君子, 貫衆의 순으로 세포 보호, 항염, 항산화 효과를 나타내었고, 그 중 檳榔, 苦楝皮가 비교적 우수한 항균 및 항염 효과를 나타내었다.

- 투 고 일 : 2014년 1월 21일
- 심 사 일 : 2014년 2월 4일
- 게재확정일 : 2014년 2월 10일

## 참고문헌

1. 중앙과학기술통보사. 동의학가정백과. 서울:푸른산. 1990:398-400.
2. Lyon BR, Skurray R. Antimicrobial resistance of staphylococcus aureus: genetic basis. Microbiol Rev. 1987; 51(1):88-134.
3. Okamoto R, Okubo T, Inoue M. Detection of genes regulating beta-lactamase production in Enterococcus faecalis and Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother. 1996; 40(11):2550-4.
4. Thomson-Carter FM, Carter PE, Pennington TH. Differentiation of staphylococcal species and strains by ribosomal RNA gene restriction patterns. J Gen Microbiol. 1989;135(7):2093-7.
5. Bachoual R, et al. Single or double mutational alterations of gyrA associated with fluoroquinolone resistance in Campylobacter jejuni and Campylobacter coli. Microb Drug Resist. 2001;7(3):257-61.
6. 대한한방부인과학회. 한방여성의학(하). 서울:의성당. 2012:816-20.
7. 권지명, 김동철. 加味芷貝散의 포도상구균 감염 유방염에 대한 항균활성 및 항염효과. 대한한방부인과학회지. 2013; 26(1):1-24.



8. 장세란, 박영선, 김동철. 透膿散 및 瓜 蘘牛蒡湯의 *Staphylococcus aureus*에 대한 *in vitro* 항균력 평가. 대한한방부인과학회지. 2012;25(3):27-39.
9. 박은영, 김동철. 5종 단미제의 *Staphylococcus aureus*에 대한 *in vitro* 항균력 평가. 대한한방부인과학회지. 2013;26(1):25-40.
10. Pfaller MA, et al. Multicenter evaluation of four methods of yeast inoculum preparation. *J Clin Microbiol.* 1988; 26(8):1437-41.
11. Tenover FC, et al. Characterization of staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin and other glycopeptides. *J Clin Microbiol.* 1998;36(4):1020-7.
12. 정상철. 핵심유방학개론. 서울:고려의학. 1998:14-7.
13. Alanis AJ. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era?. *Arch Med Res.* 2005;36(6):697-705.
14. Foster TJ. The *Staphylococcus aureus* "superbug". *J Clin Invest.* 2004;114(12):1693-6.
15. Lowry FD. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med.* 1998;339(8):520-32.
16. 武之望. 濟陰綱目. 台北:旅風出版社. 1977:557.
17. Lalithakumari H, Sirsi M. Antibacterial and antifungal activities of *Areca catechu* Linn. *Indian J Exp Biol.* 1965;3:66-7.
18. de Miranda CM, et al. The effect of areca nut on salivary and selected oral microorganisms. *Int Dent J.* 1996;46(4):350-6.
19. Kwon DY, et al. Antibacterial effect of *Dryopteris crassirhizoma* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia.* 2007;78(6):430-3.
20. Lee HB, Kim JC, Lee SM. Antibacterial activity of two phloroglucinols, flavaspidic acids AB and PB, from *Dryopteris crassirhizoma*. *Arch Pharm Res.* 2009; 32(5):655-9.
21. Lee BG, et al. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in Raw 264. 7 macrophages by two beta-carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*. *Eur J Pharmacol.* 2000;406(3):301-9.
22. Lee JH, et al. *Meliae cortex* extract exhibits anti-allergic activity through the inhibition of Syk kinase in mast cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007; 220(3):227-34.
23. Bhandare AM, et al. Potential analgesic, anti-inflammatory and antioxidant activities of hydroalcoholic extract of *Areca catechu* L. nut. *Food Chem Toxicol.* 2010;48(12):3412-7.
24. Huang PL, Chi CW, Liu TY. Effects of *Areca catechu* L. containing procyanidins on cyclooxygenase-2 expression *in vitro* and *in vivo*. *Food Chem Toxicol.* 2010;48(1):306-13.
25. Ye G, et al. *Ulmus macrocarpa hance* for the treatment of ulcerative colitis—a report of 36 cases. *J Tradit Chin Med.* 1990;10(2):97-8.
26. Kim HJ, et al. Nitric oxide and prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis inhibitory activities of diarylheptanoids from the barks of *Alnus japonica* steudel.

- Arch Pharm Res. 2005;28(2):177-9.
27. Kim SH, et al. Hepatoprotective dibenzylbutyrolactone lignans of *Torreya nucifera* against CCl<sub>4</sub>-induced toxicity in primary cultured rat hepatocytes. *Biol Pharm Bull.* 2003; 26(8):1202-5.
28. Saleem R, et al. Antibacterial effect of *Melia azedarach* flowers on rabbits. *Phytother Res.* 2002;16(8):762-4.
29. Nathan SS, et al. Efficacy of *Melia azedarach* L. extract on the malarial vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). *Bioresour Technol.* 2006;97(11):1316-23.
30. Carpinella MC, Ferrayoli CG, Palacios SM. Antifungal synergistic effect of scopoletin, a hydroxycoumarin isolated from *Melia azedarach* L. fruits. *J Agric Food Chem.* 2005;53(8):2922-7.
31. Petrera E, Coto CE. Therapeutic effect of meliacine, an antiviral derived from *Melia azedarach* L., in mice genital herpetic infection. *Phytother Res.* 2009;23(12):1771-7.
32. Eichem AC, et al. Microbial decomposition of elm and oak leaves in a karst aquifer. *Appl Environ Microbiol.* 1993; 59(11):3592-6.
33. Youn HJ, Noh JW. Screening of the anticoccidial effects of herb extracts against *Eimeria tenella*. *Vet Parasitol.* 2001;96(4):257-63.
34. Youn HJ, et al. Anti-protozoal efficacy of medicinal herb extracts against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*. *Vet Parasitol.* 2003;116(1):7-14.
35. Benencia F, et al. Effect of *Melia azedarach* L. leaf extracts on human complement and polymorphonuclear leukocytes. *J Ethnopharmacol.* 1994; 41(1-2):53-7.
36. Courrèges MC, et al. In vitro antiphagocytic effect of *Melia azedarach* leaf extracts on mouse peritoneal exudate cells. *J Ethnopharmacol.* 1994;43(2):135-40.
37. Wang CC, et al. Areca nut extract suppresses T-cell activation and interferon- $\gamma$  production via the induction of oxidative stress. *Food Chem Toxicol.* 2007;45(8):1410-8.
38. Chang LY, et al. Areca nut extracts increased expression of inflammatory cytokines, tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6 and interleukin-8, in peripheral blood mononuclear cells. *J Periodontal Res.* 2009;44(2):175-83.
39. Wang CC, et al. Areca-nut extract modulates antigen-specific immunity and augments inflammation in ovalbumin-sensitized mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2011;33(2):315-22.
40. Kaneria M, et al. Determination of antibacterial and antioxidant potential of some medicinal plants from saurashtra region, India. *Indian J Pharm Sci.* 2009;71(4):406-12.
41. Rajeswary H, et al. Hepatoprotective action of ethanolic extracts of *Melia azedarach* Linn. and *Piper longum* Linn and their combination on CCl<sub>4</sub> induced hepatotoxicity in rats. *Indian*

- J Exp Biol. 2011;49(4):276-81.
42. Singh A, Rao AR. Modulatory influence of areca nut on antioxidant 2(3)-tert-butyl-4-hydroxy anisole-induced hepatic detoxification system and antioxidant defence mechanism in mice. *Cancer Lett.* 1995;91(1):107-14.
  43. Wu PF, et al. A characterization of the antioxidant enzyme activity and reproductive toxicity in male rats following sub-chronic exposure to areca nut extracts. *J Hazard Mater.* 2010;178(1-3):541-6.
  44. Min BS, et al. Kaempferol acetylramnosides from the rhizome of *Dryopteris crassirhizoma* and their inhibitory effects on three different activities of human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2001;49(5):546-50.
  45. Lee SM, et al. Antioxidant activity of two phloroglucinol derivatives from *Dryopteris crassirhizoma*. *Biol Pharm Bull.* 2003;26(9):1354-6.
  46. Song SE, et al. Inhibitory effect of procyanidin oligomer from elm cortex on the matrix metalloproteinases and proteases of periodontopathogens. *J Periodontal Res.* 2003;38(3):282-9.
  47. Oh KS, et al. Antihypertensive, vasorelaxant, and antioxidant effect of root bark of *Ulmus macrocarpa*. *Biol Pharm Bull.* 2008;31(11):2090-6.
  48. Lee WS, et al. Antioxidant activities of abietane diterpenoids isolated from *Torreya nucifera* leaves. *J Agric Food Chem.* 2006;54(15):5369-74.
  49. Ryu YB, et al. Biflavonoids from *Torreya nucifera* displaying SARS-CoV 3CL(pro) inhibition. *Bioorg Med Chem.* 2010;18(22):7940-7.
  50. Shadomy S, Bruce JL, Kannan MM. Effect of inoculum size on in vitro susceptibility testing with lincomycin. *Appl Microbiol.* 1968;16(11):1663-8.
  51. Chen Y, et al. CpG DNA induces cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin production. *Int Immunol.* 2001;13(8):1013-20.
  52. Pfaller MA, et al. Standardized susceptibility testing of fluconazole: an international collaborative study. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992;36(9):1805-9.
  53. Pfaller MA, et al. Collaborative investigation of variables in susceptibility testing of yeasts. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990;34(9):1648-54.
  54. Hobbs AJ, Higgs A, Moncada S. Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999;39:191-220.
  55. Korhonen R, et al. Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2005;4(4):471-9.
  56. Kuo CL, Chi CW, Liu TY. The anti-inflammatory potential of berberine in vitro and in vivo. *Cancer Lett.* 2004;203(2):127-37.
  57. Kim KW, et al. *Polygonum cuspidatum*, compared with baicalin and berberine, inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 gene expressions in Raw 264.7 macrophages. *Vascul*

- Pharmacol. 2007;47(2-3):99-107.
58. Delgado AV, McManus AT, Chambers JP. Production of tumor necrosis factor -alpha, interleukin 1-beta, interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. *Neuropeptides*. 2003;37(6):355-61.
59. Lee AK, et al. Inhibition of lipopolysaccharide -inducible nitric oxide synthase, TNF-alpha and COX-2 expression by saquinone effects on I-kappaBalpha phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. *Br J Pharmacol*. 2003;139(1):11-20.
60. Mathiak G, et al. Caspase-1-inhibitor ac-YVAD-cmk reduces LPS-lethality in rats without affecting haematology or cytokine responses. *Br J Pharmacol*. 2000;131(3):383-6.
61. Fernández-Martínez E, et al. Immunomodulatory effects of thalidomide analogs on LPS-induced plasma and hepatic cytokines in the rat. *Biochem Pharmacol*. 2004;68(7):1321-9.