

連翹金貝煎의 *Escherichia coli*에 대한 시험관내 항균력 평가

대구한의대학교 한의과대학 부인과교실
한상겸, 김동철

ABSTRACT

In Vitro Antibacterial Effects of *Yeonkyokeumpae-jeon* against *Escherichia coli*

Sang-Kyum Han, Dong-Chul Kim

Dept. of Korean Obstetric & Gynecology, College of Korean Medicine,
Deagu Haany University

Objectives: The object of this study was to observe the in vitro antibacterial effects of *Yeonkyokeumpae-jeon* (YKKPJ) have been used for treating various gynecological diseases including mastitis in Korea, and individual six kinds of herbal composition aqueous extracts - *Forsythiae Fructus* (FF), *Milletiae Caulis* (MC), *Lonicerae Flos* (LF), *Fritillaria Thunbergii Bulb* (FT), *Taraxci Herba* (TH) and *Prunellae Spica* (PS) against *E. coli*.

Methods: Antibacterial activities against *E. coli* of YKKPJ, FF, MC, LF, FT, TH and PS aqueous extracts were detected using standard agar microdilution methods. In addition, the effects on the bacterial growth curve were also monitored at MIC and MIC×2 levels. The effects on the intracellular killing and bacterial invasion of individual test materials were also observed using Raw 264.7 and MCF-7. The results were compared with ciprofloxacin, a second generation of quinolone antibiotics in the present study.

Results: MIC of YKKPJ, FF, MC, LF, FT, TH, PS aqueous extracts against *E. coli* were detected as 0.039±0.013 mg/ml, 0.064±0.033 mg/ml, 0.108±0.053 mg/ml, 0.078±0.027 mg/ml, 16.250±8.385 mg/ml, 15.625±9.375 mg/ml, 0.254±0.131 mg/ml, respectively. YKKPJ, FF, MC, LF, FT, TH, PS aqueous extracts showed antibacterial effects against *E. coli*, except for FT and TH, which were showed negligible antibacterial effects, respectively. In addition, ciprofloxacin with YKKPJ, FF, MC, LF and PS aqueous extracts also showed marked dosage-dependent inhibition of bacterial growth, and favorable inhibitory effects on the both bacterial invasion and intracellular killing assays using MCF-7 and Raw 264.7 cells were detected in this experiment.

Conclusions: The results obtained in this study suggest that traditional polyherbal formula YKKPJ aqueous extracts showed more favorable antibacterial activities as compared to individual six kinds of herbal composition aqueous extracts. The antibacterial effects of YKKPJ against *E. coli* considered as results of complicated synergic effects of their six kinds of herbal components rather than simple antibacterial effects of single herbal components. It means, YKKPJ aqueous extracts may show potent anti-infectious effects against *E. coli* for mastitis.

Key Words: *Yeonkyokeumpae-jeon*, *Escherichia coli*, Mastitis, Ciprofloxacin, Raw 264.7, MCF-7

I. 서 론

유방염은 여성의 가슴부위 염증으로 정의되며 특히 산모에서는 발열과 함께 감기와 같은 증상을 동반한다. 근래에는 수유기의 유방염의 치료가 비교적 신속하고 용이하게 이루어짐으로써 수유기 농양의 빈도가 현격히 감소하여 전체 농양의 10% 이하이다. 하지만 유방염은 수유기 여성의 10% 정도에서 발생하는 비교적 흔한 질환으로 여전히 산모에 있어서 중요한 관심사 중의 하나라고 할 수 있다^{1,2)}.

유방염의 증상은 국소증상으로 단측 유방의 경도 증가, 발진, 불쾌감과 함께 전신증상으로 38.5°C 이상의 발열감, 피로, 몸살 및 두통이 동반된다³⁾. *Staphylococcus aureus*는 유방염의 가장 흔한 원인균으로 지목되어 왔다^{1,4)}. *S. aureus* 이외에도 드물게 *Candida albicans*, group A beta-hemolytic *Streptococcus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* 및 *Mycobacterium tuberculosis* 등 다양한 균에 의해 유방염이 유발될 수 있는데^{1,5)}, 여러 종류의 균들 중에서도 *E. coli*는 급성적으로 심한 유방염을 일으키며 특히 유방 상피세포 내 침투율이 상당히 좋아 재발을 반복하는 고질적인 유방염을 일으킨다^{6,7)}. 그리고 균이 사멸된 후에도 균체의 지방다당체가 숙주의 급격한 면역반응을 유발하여 심한 염증반응을 초래한다⁸⁾. Ciprofloxacin은 2세대 퀴놀론계 항생제중 가장 대표적인 약물로 유방염에도 빈용 처방되는 항생제이나 최근에는 퀴놀론계 항생제의 주요 표적인 gyrase와 topoisomerase의 변형을 통한 내성 균주가 출현하고 있다^{9,10)}. 따라서 항생제의 사용을 줄이고 효과가 우수한 대

체 약물 특히 천연물을 이용한 치료제의 개발이 필요할 것으로 생각된다.

한의학에서 유방염은 乳房에 癰腫膿瘡하는 질환으로 乳癰이라고 한다. 乳癰의 원인은 肝鬱胃熱, 感染邪毒으로 疏肝清胃, 托裏透膿의 치법으로 치료한다¹¹⁾.

連翹金貝煎은 明代의 張介賓이 저술한 《景岳全書》에 최초로 수록된 처방으로, 유방에 생긴 癰腫 및 乳癌에 熱毒이 심한 경우 사용한다고 하였다¹²⁾. 連翹金貝煎을 구성하고 있는 6종의 약재 중 蒲公英을 제외한 連翹¹³⁾, 紅藤¹⁴⁾, 金銀花¹⁵⁾, 貝母¹⁶⁾ 및 夏枯草¹⁷⁾에 대해서는 항균효과가 잘 알려져 있으나, 連翹金貝煎 자체의 항균 효과에 관한 실험적 연구는 찾아 볼 수 없었다.

본 연구에서는 *E. coli* ATCC 25922 세균주를 이용하여 표준액체배지희석법¹⁸⁾으로 최소저지농도(MIC)를 측정하고 시간대별 균 생장곡선¹⁹⁾에 미치는 영향을 관찰하여 유방염치료에 사용되어온 連翹金貝煎과 개별 구성 약재 각각의 *E. coli*에 대한 항균력을 평가하였으며, 탐식세포 내 사멸효과²⁰⁾ 및 상피세포 내 *E. coli* 침투율²¹⁾을 각각 murine macrophage 세포주인 Raw 264.7 세포와 사람 유방암상피세포 유래인 MCF-7 세포를 이용하여 평가하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재 료

1) 약재 및 균주

본 실험에 사용된 약재는 대원약업사(Daegu, Korea)에서 매입한 것을 현미경하에서 관능검사를 통하여 선정하여 사용하였으며, *E. coli* ATCC 25922는 American

Type Culture Collection Center(Manassas, VA, USA)에서 동결건조 상태로 구입하여 사용하였다.

2) 시약 및 기기

배지 및 시약으로 사용된 Brain-heart Infusion(BHI), Muller Hinton(MH) agar 및 broth, Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)/F12 medium, 말 혈청(heat inactivated horse serum), RPMI 1640 배지는 Difco(Detroit, MI, USA)에서, agar는 Junsei(Tokyo, Japan)에서 각각 구입하였고, 대조약물인 ciprofloxacin hydrochloride hydrate는 Hangzhou Tacon Co.(Hangzhou, China)에서 구입하여 사용하였다. 또한 96 well-plate는 Greiner(Frickenhausen, Germany)에서 구입하였으며, 이외 시약은 Aldrich-Sigma(St. Louise, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2. 방 법

1) 실험액 제조

본 실험에 사용된 連翹金貝煎 1첩 분량의 조성은 다음과 같다(Table 1). 선정된 약재 0.5첩 분량(56.25 g)을 취하여 정제수 600 ml로 가열·추출한 후(60°C, 3시간, 3번), 흡인·여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator(Eyela N-1110, Tokyo, Japan)로 감압·농축하여 점조성의 추출물을 얻은

다음 programmable freeze dryer(Operon FDB-5503, Kimpo, Korea)를 사용하여 동결건조시켜 갈색의 연교금패전 물 추출물(YKKPJ) 8.04 g(수율: 14.29%)을 얻어 실험에 사용하였다. 또한 각각 50 g의 連翹, 紅藤, 金銀花, 貝母, 蒲公英 및 夏枯草를 취하여, 정제수 500 ml로 가열·추출한 후(60°C, 3시간, 3번), 흡인·여과한 여과액을 rotary vacuum evaporator로 감압·농축하여 점조성의 추출물을 얻은 다음 programmable freeze dryer를 사용하여 동결건조시켜, 연갈색의 연교 물 추출물(FF) 6.27 g(수율: 12.53%), 적갈색의 홍등 물 추출물(MC) 5.51 g(수율: 11.02%), 연갈색의 금은화 물 추출물(LF) 4.91 g(수율: 9.82%), 연갈색의 패모 물 추출물(FT) 5.08 g(수율: 10.16%), 진갈색의 포공영 물 추출물(TH) 6.36 g(수율: 12.72%) 및 진갈색의 하고초 물 추출물(PS) 5.03 g(수율: 10.06%)를 얻어 실험에 사용하였다. 준비한 YKKPJ, FF, MC, LF, FT, TH 및 PS는 -20°C의 냉장고에 보관한 후 실험에 사용하였으며, 구입한 ciprofloxacin은 4°C의 냉장고에 보관한 후 사용하였다. YKKPJ, FF, MC, LF, FT, TH 및 PS는 사용한 용매인 멸균증류수에 25 mg/ml의 농도까지 비교적 잘 용해되었고 ciprofloxacin은 1.000 µg/ml까지 비교적 잘 용해되었다.

Table 1. Composition of *Yeonkyokeumpae-jeon* Used in This Study

Korean	Herbs	Scientific names	Amounts (g)
連翹	<i>Forsythiae Fructus</i>	<i>Forsythia suspensa</i> (Thunb.) Vahl	37.50
紅藤	<i>Millettiae Caulis</i>	<i>Millettia reticulata</i> Benth.	30.00
金銀花	<i>Lonicerae Flos</i>	<i>Lonicera japonica</i> Thunb.	11.25
貝母	<i>Fritillaria Thunbergii Bulb</i>	<i>Fritillaria thunbergii</i> Miq.	11.25
蒲公英	<i>Taraxci Herba</i>	<i>Taraxacum platycarpum</i> H. Dahlsi	11.25
夏枯草	<i>Prunellae Spica</i>	<i>Prunella vulgaris</i> var. <i>lilacina</i> Nakai	11.25
	Total	6 types	112.50

2) 균주, 세포주 및 배지

*E. coli*는 modified BHI 배지에 녹인 후 modified BHI agar에 2~3회 계대·배양한 후 사용하였다. 또한 사람 유방암상피세포 유래인 MCF-7 세포 및 murine macrophage 세포주인 Raw 264.7 세포는 각각 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 실험에 사용한 MCF-7 세포는 10% FBS가 첨가된 RPMI 1640를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 계대·배양하여 유지하였으며, Raw 264.7 세포는 DMEM에 10% FBS, 100 U/ml penicillin 및 100 µg/ml streptomycin을 혼합한 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 실험과정의 모든 세포는 80~90%의 confluence에서 실험하였고, 20 passages를 넘기지 않은 세포만 선정하여 실험에 사용하였다.

3) 생균수의 측정

정확한 흡광도(Optical Density: OD)와 세균수의 상관관계를 알아보기 위하여, 정량평판법(Quantitative Plating Methods, Standard Plate Count)을 이용하여 균수를 측정하였다²²⁾. *E. coli*를 spectrophotometer (Milton Roy Spectronic 20D; Milton Roy Company, Ivyland, PA, USA)를 이용하여 600 nm(OD600)에서의 흡광도를 0.5 Mcfarland standard와 같은 탁도로 조정 한 다음, 균액을 10, 100, 1000 및 10000 배로 단계희석하여 균의 농도가 1×10⁴ CFU/ml이 되도록 만들어 MH agar에 접종하여, 37°C, 10% CO₂ 조건에서 24시간 배양한 다음 조직배양접시에 형성된 집락수를 희석된 순서대로 OD와 비교하였다. 0.5 Mcfarland standard 탁도는 1.175% barium chloride dihydrate(BaCl₂·2H₂O) 0.05 ml와 1% sulfuric acid(H₂SO₄)

9.95 ml를 혼합하여 준비하였다²³⁾.

4) 항균활성도(MIC) 측정

YKKPJ, FF, MC, LF, FT, TH 및 PS의 *E. coli*에 대한 최소저지농도를 표준 액체배지희석법¹⁸⁾을 이용하여 측정하였다. 각각의 단일추출물과 YKKPJ를 25 mg/ml의 농도로 멸균증류수에 용해시킨 다음 계단식으로 배수희석하여 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.563, 0.782, 0.391, 0.195, 0.098, 0.049, 0.025 및 0 mg/ml의 총 12종류의 농도를 준비하였다. 이후 각각 멸균된 96 well plate에 100 µl씩 분주한 다음, 여기에 *E. coli*의 단일집락을 MH broth배지에 접종한 지 48시간 후 OD600을 spectrophotometer로 측정하여, 1.5×10⁶ 세포가 들어가도록 준비한 cell suspension 100 µl를 분주하였다. 이후 37°C에서 48시간 배양하였다. Ciprofloxacin 역시 1.000 µg/ml의 농도로 멸균증류수에 용해시킨 다음 계단식으로 배수 희석하여 1.000, 0.500, 0.250, 0.125, 0.063, 0.031, 0.016, 0.008, 0.004 및 0 µg/ml의 총 10종류의 농도로 준비하고, 동일한 방법으로 bacteria suspension(1.5×10⁶ CFU/ml)을 첨가한 다음 48시간 동안 37°C에 배양하였다. MIC는 각각의 growth control well(시료를 첨가하지 않고 균만 배양한 well)과 시료가 함유된 well의 *E. coli*의 성장을 육안적으로 비교 관찰하여 균의 생장억제가 나타나는 최소농도로 결정하였다¹⁸⁾. 모든 실험은 5회 반복하였다.

5) 시간대별 *E. coli* 생장곡선

각각 동결건조 추출물의 균 생장 저해능을 평가하기 위해 Janssen 등의 방법¹⁹⁾에 따라 MH broth배지에 *E. coli*를 접종한 후 OD600을 spectrophotometer로 측정하여 Mcfarland 0.5 standard(1.5×10⁸ CFU/ml)로 각 균의 탁도를 조절한 다음

100배 희석하였다. 각각 MIC 및 MIC×2 농도의 YKKPJ(0.039 및 0.078 mg/ml), FF(0.064 및 0.128 mg/ml), MC(0.108 및 0.216 mg/ml), LF(0.078 및 0.156 mg/ml), FT(16.250 및 32.500 mg/ml), TH(15.625 및 31.250 mg/ml) 및 PS(0.254 및 0.508 mg/ml)와 ciprofloxacin(0.01 및 0.02 µg/ml)을 준비한 세포현탁액과 혼합한 다음 37°C에 배양하면서 24, 48, 72, 96 및 120시간마다 OD를 측정하여, 시료를 첨가하지 않은 각각의 대조군에서의 균의 성장과 실험군에서의 균 성장억제를 비교하였다. 모든 실험은 5회 반복하였다.

6) 세포 내 세균 사멸효과

*E. coli*에 대한 세포 내 세균 사멸효과는 Cuffini 등의 방법²¹⁾에 따라 murine macrophage 세포주인 Raw 264.7 세포를 이용하여 평가하였다. 즉, 24-well plate에 Raw 264.7 세포(106 cells/well)를 배양한 4%의 heat-inactivated adult horse serum를 포함한 DMEM/F12 배지 1 ml을 분주한 다음 2×10^7 CFU의 *E. coli*를 첨가하고, 37°C, 5% CO₂ 조건하에 30분간 배양하여 탐식을 촉진시켰다. 이후 1/2 MIC 농도의 YKKPJ(0.020 mg/ml), FF(0.032 mg/ml), MC(0.054 mg/ml), LF(0.039 mg/ml), FT(8.125 mg/ml), TH(7.813 mg/ml) 및 PS(0.127 mg/ml)와 ciprofloxacin(0.007 µg/ml)을 각각 첨가하고, 37°C, 5% CO₂ 조건하에 6시간 배양한 다음 세포만 수집하여 PBS로 세척한 다음, 5 mg/ml의 lysostaphin을 처리하여 세포막 또는 세포 밖에 부착된 세균을 사멸시키고 Raw 264.7 세포들을 멸균증류수로 용해시킨 다음 생균수를 각각 측정하였다. 본 실험에서는 추출물을 처리하지 않은 배양 well을 대조군으로 사용하여 세포 내 세

균 사멸 효과를 평가하였다.

7) 상피세포 내 세균 침투저해효과

*E. coli*의 상피세포 내 침투저해효과를 Almeida 등의 방법²⁰⁾에 따라 유방암상피세포 유래인 MCF-7 세포를 이용하여 평가하였다. 즉, 24-well plate에 MCF-7 세포를 37°C, 5% CO₂ 조건하에 5%의 FBS 및 1% 항진균제(penicillin, streptomycin 및 amphotericin B)가 포함된 DMEM/F12 배지에 사용 전 20시간 동안 배양하고, 사용 시 배양한 MCF-7 세포(2×10^4 cells)를 멸균 PBS로 3회 반복 세척한 다음 2×10^9 CFU/ml의 *E. coli*가 포함된 DMEM/F12 배지 1 ml을 첨가하고 1/2 MIC 농도의 YKKPJ(0.020 mg/ml), FF(0.032 mg/ml), MC(0.054 mg/ml), LF(0.039 mg/ml), FT(8.125 mg/ml), TH(7.813 mg/ml) 및 PS(0.127 mg/ml)와 ciprofloxacin(0.007 µg/ml)을 각각 첨가한 다음, 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 1시간 배양하고 상층액을 제거하였다. 이후 멸균 PBS로 3회 반복 세척한 다음 5 mg/ml의 lysostaphin을 첨가하고 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 2시간 배양하여 세포의 세균을 제거하였다. 처리가 완료된 MCF-7 세포를 다시 멸균 PBS로 3회 반복 세척한 다음 0.25% trypsin 처리를 하여 부유시키고, 0.025%의 Triton X-100이 포함된 멸균증류수로 세포를 용해시킨 다음 생균수를 측정하였다. 본 실험에서는 5회 반복실험을 실시하였으며, 추출물을 처리하지 않은 배양 well을 대조군으로 사용하여 상피세포 내 침투저해 효과를 평가하였다.

8) 통계처리

모든 수치는 5회 반복실험의 평균±표준편차로 표시하였으며, 균 성장 곡선, 세포 내 세균 사멸효과 및 상피세포 내 세균

침투저해효과에 미치는 영향은 다중비교 검증을 이용하여 통계처리를 실시하였고, 분산동질성을 Levene test를 실시하여 검증하였다²⁴⁾. 등분산일 경우, one way ANOVA test를 실시한 다음 LSD test로 사후 검증을 실시하여 군 간의 유의성을 측정하였다. 비등분산일 경우, 비모수 검증인 Kruskal-Wallis H test를 실시하여 유의성이 인정된 경우에는 MW test를 실시하여 군 간의 유의성을 검증하였다. 모든 통계처리는 SPSS for Windows(Release 14.0K, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하였으며, p-value가 0.05 이하인 경우 통계적 유의성을 인정하였다²⁵⁾. 후보물질의 효과를 보다 명확하게 하기 위하여 처리군과 비처리 대조군과의 percent change를 아래의 공식을 이용하여 측정하였다.

EQUATION. Percentage changes as compared control(%) = ((Data of test material treated groups - Data of control) / Data of control) × 100

III. 결 과

1. 항균활성도(MIC)

YKKPJ, FF, MC, LF, FT, TH 및 PS의 *E. coli*에 대한 MIC를 표준액체배지희석법으로 평가한 결과 MIC는 각각 0.039±0.013(0.025~0.049), 0.064±0.033(0.025~0.098), 0.108±0.053(0.049~0.195), 0.078±0.027(0.049~0.098), 16.250±8.385(6.250~25.000), 15.625±9.375(3.125~25.000) 및 0.254±0.131(0.098~0.391) mg/ml로 관찰되었고, ciprofloxacin의 MIC는 0.013±0.011(0.004~0.031) µg/ml로 관찰되었다(Table 2).

Table 2. MIC against *E. coli* Detected in This Study by Agar Microdilution Method

Test materials	MIC	Ranges
Ciprofloxacin (µg/ml)	0.013±0.011	0.004 ~ 0.031
YKKPJ* (mg/ml)	0.039±0.013	0.025 ~ 0.049
FF† (mg/ml)	0.064±0.033	0.025 ~ 0.098
MC‡ (mg/ml)	0.108±0.053	0.049 ~ 0.195
LF§ (mg/ml)	0.078±0.027	0.049 ~ 0.098
FT (mg/ml)	16.250±8.385	6.250 ~ 25.00
TH¶ (mg/ml)	15.625±9.375	3.125 ~ 25.00
PS** (mg/ml)	0.254±0.131	0.098 ~ 0.391

* : *Yeonkyokeumpae-jeon* aqueous extracts

† : *Forsythiae Fructus* aqueous extracts

‡ : *Millettiae Caulis* aqueous extracts

§ : *Lonicerae Flos* aqueous extracts

|| : *Fritillaria Thunbergii Bulb* aqueous extracts

¶ : *Taraxci Herba* aqueous extracts

** : *Prunellae Spica* aqueous extracts

2. 시간대별 *E. coli*의 생장곡선에 미치는 영향

1) Ciprofloxacin의 효과

배양 24시간 후부터 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 용량 의존적인 군 수의 감소가 인정되었다(Fig. 1).

Ciprofloxacin MIC 농도(0.01 µg/ml) 처리군의 생균수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 대조군에 비해 각각 -57.14, -59.84, -59.14, -42.26 및 -36.80%의 변화를 나타내었다.

Ciprofloxacin MIC×2 농도(0.02 µg/ml) 처리군의 생균수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 대조군에 비해 각각 -76.57, -79.52, -79.64, -74.45 및 -66.17%의 변화

를 나타내었다.

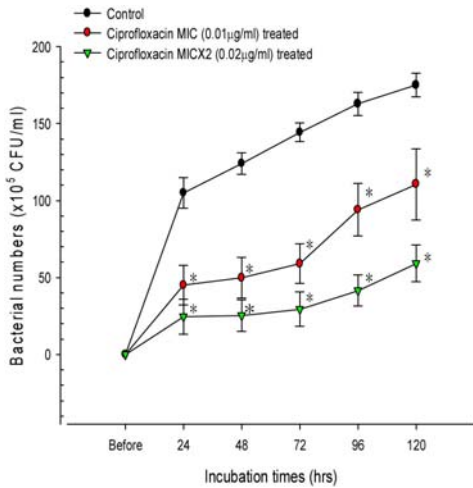


Fig. 1. Effects of ciprofloxacin on the growth of *E. coli* with incubation times. * : p<0.01 as compared with control by LSD test.

2) YKKPJ의 효과

배양 24시간 후부터 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 용량 의존적인 생균수의 감소가 인정되었다(Fig. 2).

YKKPJ의 MIC 농도(0.039 mg/ml) 처리군의 생균수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 대조군에 비해 각각 -36.17, -36.76, -32.28, -34.33 및 -32.76%의 변화를 나타내었다.

YKKPJ의 MIC×2 농도(0.078 mg/ml) 처리군의 생균수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 대조군에 비해 각각 -58.14, -58.01, -52.94, -48.88 및 -41.64%의 변화를 나타내었다.

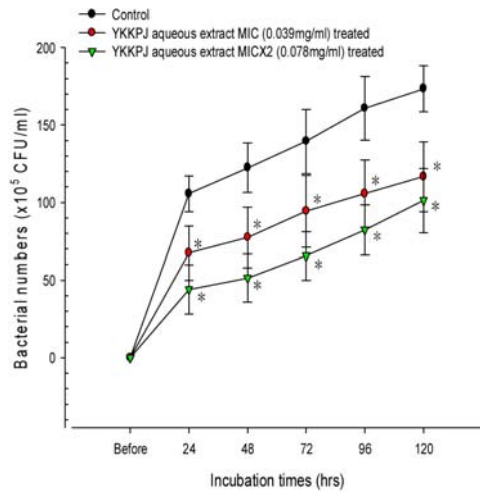


Fig. 2. Effects of *Yeonkyokeumpae-jeon* aqueous extracts on the growth of *E. coli* with incubation times. * : p<0.01 as compared with control by LSD test

3) FF의 효과

배양 24시간 후부터 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 용량 의존적인 생균수의 감소가 인정되었다(Fig. 3).

FF의 MIC 농도(0.064 mg/ml) 처리군의 생균수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 대조군에 비해 각각 -41.90, -46.69, -43.35, -44.30 및 -33.26%의 변화를 나타내었다.

FF의 MIC×2 농도(0.128 mg/ml) 처리군의 생균수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 대조군에 비해 각각 -51.40, -55.68, -55.26, -51.82 및 -44.87%의 변화를 나타내었다.

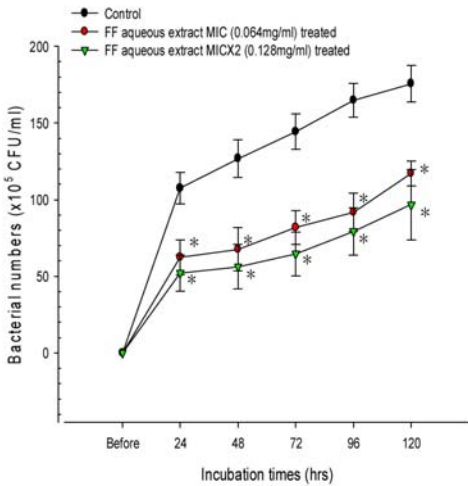


Fig. 3. Effects of *Forsythiae Fructus* aqueous extracts on the growth of *E. coli* with incubation times.

* : $p < 0.01$ as compared with control by LSD test

4) MC의 효과

배양 24시간 후부터 대조군에 비해 유의성 있는($p < 0.01$) 용량 의존적인 생균수의 감소가 인정되었다(Fig. 4).

MC의 MIC 농도(0.108 mg/ml) 처리군의 생균수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 대조군에 비해 각각 -47.19, -48.06, -49.26, -48.18 및 -39.35%의 변화를 나타내었다.

MC의 MIC $\times 2$ 농도(0.216 mg/ml) 처리군의 생균수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 대조군에 비해 각각 -54.87, -55.52, -55.06, -52.41 및 -49.33%의 변화를 나타내었다.

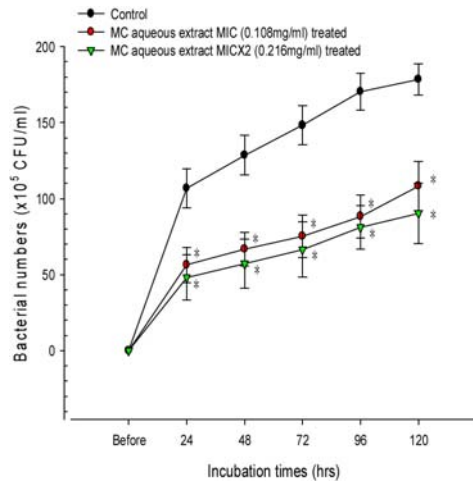


Fig. 4. Effects of *Millettiae Caulis* aqueous extracts on the growth of *E. coli* with incubation times.

* : $p < 0.01$ as compared with control by LSD test

5) LF의 효과

배양 24시간 후부터 대조군에 비해 유의성 있는($p < 0.01$) 용량 의존적인 생균수의 감소가 인정되었다(Fig. 5).

LF의 MIC 농도(0.078 mg/ml) 처리군의 생균수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 대조군에 비해 각각 -44.00, -44.62, -44.22, -39.93 및 -34.89%의 변화를 나타내었다.

LF의 MIC $\times 2$ 농도(0.156 mg/ml) 처리군의 생균수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 대조군에 비해 각각 -59.45, -57.75, -59.01, -55.07 및 -51.73%의 변화를 나타내었다.

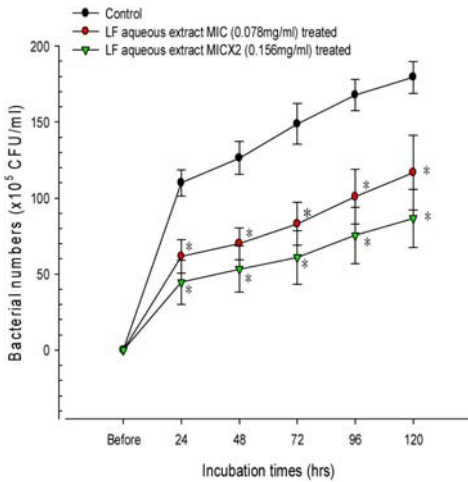


Fig. 5. Effects of *Lonicerae Flos* aqueous extracts on the growth of *E. coli* with incubation times.

* : p<0.01 as compared with control by LSD test

6) FT의 효과

배양 24시간 및 48시간 후에 국한되어, 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 생균수의 감소가 각각 인정되었으나, 배양 72, 96 및 120시간에서는 대조군에 비해 유의성 있는 생균수의 변화는 인정되지 않았다(Fig. 6).

FT의 MIC 농도(16.250 mg/ml) 처리군의 생균수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 대조군에 비해 각각 -24.29, -22.80, -15.75, -4.96 및 -2.83%의 변화를 나타내었다.

FT의 MIC×2 농도(32.500 mg/ml) 처리군의 생균수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 대조군에 비해 각각 -24.67, -24.37, -14.67, -7.50 및 -4.19%의 변화를 나타내었다.

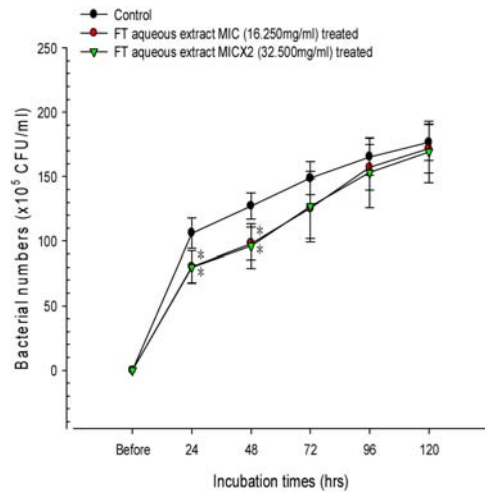


Fig. 6. Effects of *Fritillaria Thunbergii Bulb* aqueous extracts on the growth of *E. coli* with incubation times.

* : p<0.01 as compared with control by LSD test

7) TH의 효과

배양 24시간 및 48시간 후에 국한되어, 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01 또는 p<0.05) 생균수의 감소가 각각 인정되었으나, 배양 72, 96 및 120시간에서는 대조군에 비해 유의성 있는 생균수의 변화는 인정되지 않았다(Fig. 7).

TH의 MIC 농도(15.625 mg/ml) 처리군의 생균수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 대조군에 비해 각각 -16.89, -23.11, -11.82, -7.40 및 -1.40%의 변화를 나타내었다.

TH의 MIC×2 농도(31.250 mg/ml) 처리군의 생균수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 대조군에 비해 각각 -21.25, -24.30, -10.91, -7.06 및 -1.29%의 변화를 나타내었다.

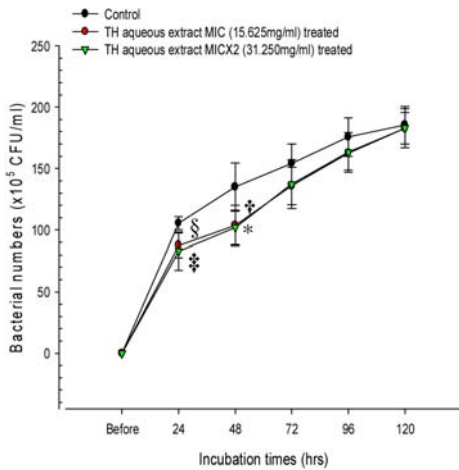


Fig. 7. Effects of *Taraxci Herba* aqueous extracts on the growth of *E. coli* with incubation times. (* : p<0.01, † : p<0.05) as compared with control by LSD test (‡ : p<0.01, § : p<0.05) as compared with control by MW test

8) PS의 효과

배양 24시간 후부터 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 용량 의존적인 생균수의 감소가 각각 인정되었다(Fig. 8).

PS의 MIC 농도(0.254 mg/ml) 처리군의 생균수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 대조군에 비해 각각 -44.44, -47.39, -43.79, -39.02 및 -30.67%의 변화를 나타내었다.

PS의 MIC×2 농도(0.508 mg/ml) 처리군의 생균수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 대조군에 비해 각각 -57.41, -59.05, -59.55, -53.34 및 -46.11%의 변화를 나타내었다.

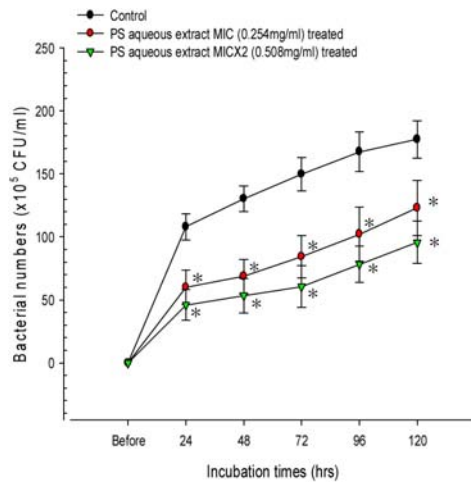


Fig. 8. Effects of *Prunellae Spica* aqueous extracts on the growth of *E. coli* with incubation times. * : p<0.01 as compared with control by LSD test

3. 세포 내 세균 사멸효과

Raw 264.7 세포를 이용한 세포 내 *E. coli*에 대한 사멸효과를 평가한 결과, 1/2 MIC 농도의 YKKPJ(0.020 mg/ml), FF(0.032 mg/ml), MC(0.054 mg/ml), LF(0.039 mg/ml) 및 PS(0.127 mg/ml)는 대조군에 비해 유의성 있는 탐식세포 내 생균수의 감소를 YKKPJ, FF, LF, MC 및 PS 순으로 각각 나타내었고, 1/2 MIC 농도의 ciprofloxacin 처리군에서도 대조군에 비해 유의성 있는 탐식세포 내 생균수의 감소를 나타내었으나, 1/2 MIC 농도의 FT(8.125 mg/ml) 및 TH(7.813 mg/ml)는 대조군에 비해 유의성 있는 탐식세포 내 생균수의 감소를 나타내지 않았다(Fig. 9).

Raw 264.7 세포 내 생균수는 1/2 MIC 농도의 ciprofloxacin(0.007 µg/ml) 및 YKKPJ(0.020 mg/ml), FF(0.032 mg/ml), MC(0.054 mg/ml), LF(0.039 mg/ml), FT(8.125 mg/ml), TH(7.813 mg/ml)와 PS(0.127 mg/ml) 처리군에서 대조군에 비

해 각각 -84.41, -77.45, -66.20, -40.34, -58.87, -6.58, -1.75 및 -30.99%의 변화를 나타내었다.

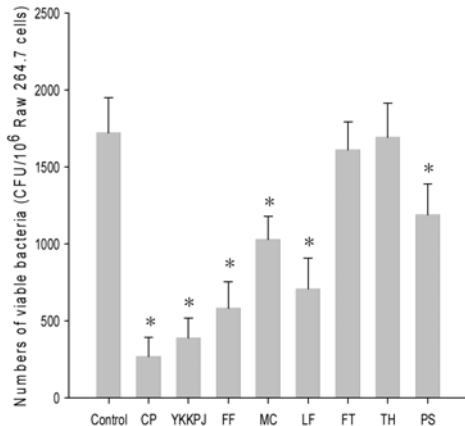


Fig. 9. Results of intracellular killing assay against *E. coli* on murine macrophage Raw 264.7 cells.

* : p<0.01 as compared with control by LSD test

CP : Ciprofloxacin

YKKPJ : *Yeonkyokeumpae-jeon* aqueous extracts

FF : *Forsythiae Fructus* aqueous extracts

MC : *Milletiae Caulis* aqueous extracts

LF : *Lonicerae Flos* aqueous extracts

FT : *Fritillaria Thunbergii Bulb* aqueous extracts

TH : *Taraxci Herba* aqueous extracts

PS : *Prunellae Spica* aqueous extracts

4. 상피세포 내 세균 침투저해효과

사람 유방상피암 유래의 MCF-7 세포를 이용하여, *E. coli*의 상피세포 침투저해효과를 평가한 결과, 1/2 MIC 농도의 YKKPJ(0.020 mg/ml), FF(0.032 mg/ml), MC(0.054 mg/ml), LF(0.039 mg/ml) 및 PS(0.127 mg/ml)는 대조군에 비해 유의성 있는 상피세포 내 세균수의 감소를 나타내었고, 1/2 MIC 농도의 ciprofloxacin 처리군에서도 대조군에 비해 유의성 있는 상피세포 내 세균수의 감소를 나타내었으나, 1/2 MIC 농도의 FT(8.125 mg/ml)

및 TH(7.813 mg/ml)는 대조군에 비해 유의성 있는 상피세포 내 세균수의 감소를 나타내지 않았다(Fig. 10).

MCF-7 세포 내 세균수는 1/2 MIC 농도의 ciprofloxacin(0.007 µg/ml) 및 YKKPJ(0.020 mg/ml), FF(0.032 mg/ml), MC(0.054 mg/ml), LF(0.039 mg/ml), FT(8.125 mg/ml), TH(7.813 mg/ml)와 PS(0.127 mg/ml) 처리군에서 대조군에 비해 각각 -81.12, -74.13, -64.05, -43.05, -49.84, -3.61, -0.32 및 -32.56%의 변화를 나타내었다.

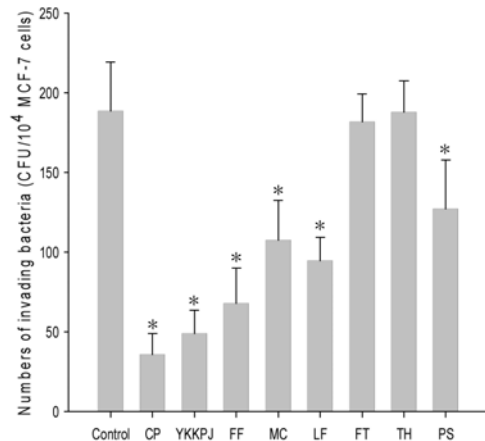


Fig. 10. Results of bacterial invasion assay against *E. coli* on human breast carcinoma MCF-7 cells.

* : p<0.01 as compared with control by MW test

CP : Ciprofloxacin

YKKPJ : *Yeonkyokeumpae-jeon* aqueous extracts

FF : *Forsythiae Fructus* aqueous extracts

MC : *Milletiae Caulis* aqueous extracts

LF : *Lonicerae Flos* aqueous extracts

FT : *Fritillaria Thunbergii Bulb* aqueous extracts

TH : *Taraxci Herba* aqueous extracts

PS : *Prunellae Spica* aqueous extracts

IV. 고 찰

유방염은 유방질환 중 가장 높은 빈도

를 나타내고 있으나, 산모의 의식향상과 항생제의 사용으로 그 빈도가 점차적으로 줄어들고 있다. 하지만 일부 연구에서는 산모의 33%에서 유방염이 발견되었으며²⁶⁾ 946명의 수유를 실시하는 산모 중 9.5%의 유방염 유병률이 인정되는 등²⁷⁾ 유방염의 유병률은 수유방법과 수유 시기 등에 따라 매우 다양하게 관찰된다.

유방염의 가장 흔한 원인균으로는 *Staphylococcus aureus*가 지목되어 왔다^{1,4)}. *S. aureus* 이외에도 다양한 균에 의해 유방염이 유발될 수 있다^{1,5)}. 여러 종류의 균들 중에서도 *E. coli*는 Gram 음성의 간균으로 급성의 심한 유방염을 일으키는 원인균으로 주목받아 왔다⁶⁾. 유방 상피세포 내 침투율이 상당히 좋아 재발을 반복하는 고질적인 유방염을 일으키기도 한다^{6,7)}. 균이 사멸된 뒤에도 균체의 지방 다당체가 숙주의 급격한 면역반응을 유발하여 심한 염증반응을 초래하기도 하여 항생제 치료 이외에도 염증을 제어할 새로운 치료제의 개발이 시급한 실정이다^{7,8)}.

유방염의 치료에 다양한 항생제가 사용되어 왔으나 이중 β -lactam계 항균제는 β -lactamase라는 효소를 생산하여 내성을 나타내기 시작하였다²⁸⁾. 이후 β -lactam계 항균제를 대체하기 위해 강력한 항균력을 나타내는 퀴놀론계 항생제가 개발되었고 특히, ciprofloxacin은 1980년대 말에 개발된 2세대 퀴놀론 항생제로 조직 침투성이 좋으며 퀴놀론 항생제 중 가장 광범위한 항균력을 나타내는 것으로 알려져 있고 그 약효에 있어서 탁월하고 광범위하여 현재 세계 각국에서 매우 유력한 항생제가 되었으며²⁹⁾, 다양한 균주에 대해 우수한 항균력이 이미 잘 알려져 있다³⁰⁾. 또한 ciprofloxacin은 탐식세포에

매우 빨리 흡수되어 고질적인 문제인 탐식세포 내 병원균의 사멸 능력 역시 현재 개발된 항생제 중 가장 강력한 것으로 알려져 있고 상피세포 등 세포내 침투성 역시 매우 우수한 것으로 알려져 있으나³¹⁾, 비교적 독성이 강한 항생제로 그 사용 및 사용량이 제한 받고 있다. 즉, 아급성 심장독성³²⁾, 광독성을 포함한 피부발적과 신장독성³³⁾, 미성숙 동물에서의 연골독성³⁴⁾ 및 건조염과 건과열³⁵⁾ 등의 독성이 초래되며 내성균의 출현^{9,10)} 역시 우려되어 사용량의 조절이 필요하므로 부작용이 적은 새로운 천연물을 이용한 대체 치료제의 개발이 필요할 것으로 생각된다.

한의학에서 乳房이 癰腫膿瘡하는 질환을 乳癰이라고 하여 유방염으로 볼 수 있으며 內癰와 外癰으로 나누어진다. 乳癰은 수유기에 乳汁蓄積으로 인해 생기는 外吹乳癰, 임신 중에 胎氣旺盛으로 上衝하여 발생하는 內吹乳癰, 남녀노소 불문하고 肝氣鬱滯와 陰陽之熱이 합하여 乳絡을 阻塞시켜 壅積하여 발생하는 非授乳期 乳癰으로 분류할 수 있다¹¹⁾.

乳癰의 원인에 대하여 《東醫寶鑑》에서는 “厚味로 濕熱之痰이 膈間에 停蓄하고 乳가 滯하여 서로 搏하여 생긴다”고 하였고 또 “兒의 口氣가 吹噓하여 생긴다”고 하였으며, “怒氣가 激滯하여 생긴다”고 하여 授乳期の 산모에게 잘 생길 수 있다고 하였다³⁶⁾.

連翹金貝煎은 明代의 張介賓이 저술한 《景岳全書》에 최초로 수록된 처방으로, 유방염을 포함한 부인과 질환에 사용되어 온 처방이다. “腫痛勢甚, 熱毒有餘者, 宜以連翹金貝煎, 先治之甚妙”라 하여 連翹金貝煎은 熱毒이 심한 경우에 사용하는 처방이다¹²⁾. 連翹金貝煎은 連翹, 紅藤, 金

銀花, 貝母, 蒲公英 및 夏枯草의 6종의 약재로 구성된 복합처방으로, 이들을 구성하고 있는 6종의 약재 중 蒲公英을 제외한 連翹¹³⁾, 紅藤¹⁴⁾, 金銀花¹⁵⁾, 貝母¹⁶⁾ 및 夏枯草¹⁷⁾의 다양한 항균효과가 잘 알려져 있으나 連翹金貝煎 자체의 항균효과 등 실험적 연구는 찾아 볼 수 없었다. 따라서 본 연구에서는 *E. coli* 세균주를 이용하여 표준액체배지희석법¹⁸⁾으로 최소저지농도를 측정하고 시간대별 균성장곡선¹⁹⁾에 미치는 영향을 평가하여, 유방염을 포함한 부인과 질환에 사용되어온 連翹金貝煎과 개별 구성약재 각각의 *E. coli*에 대한 항균력을 평가하였으며, 탐식세포 내 사멸효과²⁰⁾ 및 상피세포 내 *E. coli* 침투율²¹⁾을 각각 murine macrophage 세포주인 Raw 264.7 세포와 사람 유방암상피세포 유래인 MCF-7 세포를 이용하여 평가하였다.

표준액체배지희석법에 의한 MIC의 측정은 세균 및 다양한 감염증에 대한 후보물질의 항균활성을 측정하는 가장 기본적인 방법이다^{18,22)}. *E. coli*에 대한 ciprofloxacin의 MIC는 대략 0.01 µg/ml로 알려져 있으며³⁷⁾ 본 실험의 결과에서도 0.013±0.011 (0.004~0.031) µg/ml로 관찰되어 이전의 연구와 유사한 항균활성이 표준액체배지희석법에 의해 인정되었다. 본 실험의 결과, *E. coli*에 대한 YKKPJ, FF, MC, LF, FT, TH 및 PS의 MIC는 0.039±0.013 (0.025~0.049), 0.064±0.033(0.025~0.098), 0.108±0.053(0.049~0.195), 0.078±0.027(0.049~0.098), 16.250±8.385(6.250~25.000), 15.625±9.375(3.125~25.000) 및 0.254±0.131(0.098~0.391) mg/ml로 관찰되어 극히 미약한 항균효과를 나타낸 FT와 TH를 제외하고 YKKPJ, FF, LF, MC 및 PS 순으로 *E. coli*에 대한 항균력을 나타내었다. 한편 貝

母의 경우, 다양한 병원균에 비교적 우수한 항균활성이 인정되는 것으로 알려져 있으나 유독 *E. coli*에 대해서는 별 다른 항균활성을 나타내지 않는 것으로 알려져 있고 본 실험의 결과에서도 FT의 MIC가 16.250±8.385(6.250~25.000) mg/ml이 인정되어, *E. coli*에 대해 극히 미약한 항균효과를 나타내는 것으로 관찰되었다.

시간대별 균 성장곡선에 미치는 영향 역시 세균 및 다양한 감염증에 대한 후보물질의 항균활성을 측정하는 가장 기본적인 방법이다²²⁾. 본 실험의 결과 ciprofloxacin은 배양24시간 후부터 대조군에 비해 유의성 있는 용량의존적인 시간대별 균 성장억제를 나타내었고 48, 72, 96 및 120 시간 후에도 대조군에 비해 유의성 있는 시간대별 균 성장억제를 MIC 및 MIC×2에서 각각 나타내었다. YKKPJ, FF, MC, LF 및 PS에서도 배양 24시간 후부터 대조군에 비해 유의성 있는 용량의존적인 시간대별 균 성장억제를 나타내었고 48, 72, 96 및 120시간 후에도 대조군에 비해 유의성 있는 시간대별 균 성장억제를 MIC 및 MIC×2에서 각각 나타내었다. FT 및 TH는 배양 24 및 48시간에만 국한되어 대조군에 비해 유의성 있는 균 성장억제를 나타내었으나 72, 96 및 120시간에서는 대조군에 비해 유의성 있는 생균수의 변화는 인정되지 않았다.

호중구와 같은 다형핵백혈구 및 탐식세포에 의한 탐식작용은 혈청 중 보체와 같은 다양한 성분에 의해 탐식작용이 촉진되어 탐식한 병원균을 파괴한다³⁸⁾. 일부 병원균에서는 이러한 탐식세포의 작용에 대항하기 위해 탐식작용 자체를 피하거나 탐식세포 내에서 생존하는 방향으로 변화해 왔으므로 고질적인 감염성질환을 치료

하기 위해서는 탐식세포 내 생존 병원균의 제어가 필수적이다³¹⁾. 본 실험에서 Raw 264.7 세포를 이용한 세포내 *E. coli*에 대한 사멸효과를 평가한 결과, 1/2 MIC 농도의 ciprofloxacin 처리군에서는 대조군에 비해 유의성 있는 탐식세포 내 생존수의 감소를 나타내었고 1/2 MIC 농도의 YKKPJ, FF, MC, LF 및 PS 처리군에서도 대조군에 비해 유의성 있는 탐식세포 내 생존수의 감소를 YKKPJ, FF, LF, MC 및 PS 순으로 각각 나타내었으나 1/2 MIC 농도의 FT 및 TH는 대조군에 유의성 있는 탐식세포 내 생존수의 감소를 나타내지 않았다.

대부분의 감염성 세균은 세포 표면의 부착 단백질과 상호작용하여 상피세포에 침투하며³⁹⁾, 특히 fibronectin-binding proteins을 통해 상피세포내로 침투되는 것으로 알려져 있다⁴⁰⁾. *E. coli* 역시 유방 상피세포 내 부착 및 침투성이 상당히 우수하여 숙주의 면역반응을 회피하여 macrophage와 같은 탐식세포에 의해 제거되지 않아 급성의 심한 유방염을 일으킨다^{6,7)}. 따라서 *E. coli*에 의해 유발되는 세균성유방염을 제어하기 위해서는 반드시 상피세포 내 세균 침투를 억제해야 하며 이를 통해 보다 명확한 항균력을 평가할 수 있다^{6,7)}. 본 실험의 결과 1/2 MIC 농도의 ciprofloxacin은 우수한 상피세포 내 *E. coli* 침투율 억제효과를 나타내었다. YKKPJ, FF, LF, MC 및 PS도 상피세포 내 *E. coli* 침투율 억제효과가 YKKPJ, FF, LF, MC 및 PS 순으로 사람 유방암상피세포 유래인 MCF-7 세포에서 관찰되었다. FT 및 TH에서는 의미 있는 상피세포 내 *E. coli* 침투율 억제효과가 인정되지 않았다.

이상의 결과에서, 극히 미약한 항균효과를 나타낸 FT와 TH를 제외하고, YKKPJ,

FF, LF, MC 및 PS 순으로 *E. coli*에 대한 항균력, 상피세포 내 *E. coli* 침투율 억제 및 탐식세포 내 사멸 증가효과를 나타내었다. 특히 복합 방제인 連翹金貝煎이 개별약제보다 우수한 항균력이 인정되어 실제 임상에서 유방염 치료에 連翹金貝煎이 우수한 결과를 나타낼 것으로 기대된다. 連翹金貝煎의 항균활성은 구성 개별약제 자체의 항균력뿐만 아니라 이들 구성약제의 복합적인 상호 작용 등을 통해 더 우수한 항균활성을 나타내는 것으로 판단되나 구성약제 각각 수많은 생리활성 물질을 함유하고 있어 향후 구성약제의 상호작용에 의한 항균활성의 변화 및 항균력을 나타내는 생리활성 화학성분의 검색을 수행해야 할 것이다.

V. 결 론

YKKPJ와 구성 단미제인 FF, MC, LF, FT, TH 및 PS를 이용하여 *E. coli*에 대한 항균력을 알아보기 위하여 각각 MIC를 측정하고, MIC 및 MIC×2에서 시간대별 균 성장곡선에 미치는 영향을 살펴보았다. 그리고 Raw 264.7 세포를 이용한 탐식세포 내 사멸효과와 MCF-7 세포를 사용하여 상피세포 내 침투율 억제효과를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. *E. coli*에 대한 YKKPJ와 구성 단미제인 FF, MC, LF, FT, TH 및 PS의 MIC를 평가한 결과 극히 미약한 항균효과를 나타낸 TH와 FT를 제외하고, YKKPJ, FF, LF, MC 및 PS 순으로 항균력을 나타내었다.
2. 시간대별 균 성장곡선에 미치는 영향

- 역시 본 실험의 결과, YKKPJ, FF, MC, LF 및 PS는 MIC 및 MIC×2에서 각각 용량 의존적인 시간대별 균 성장억제를 나타내었으나, FT 및 TH는 배양 24 및 48시간에만 국한되어 균 성장억제를 나타내었다.
3. Raw 264.7 세포를 이용한 세포 내 *E. coli*에 대한 사멸효과를 평가한 결과, YKKPJ, FF, LF, MC 및 PS 순으로 대조군에 비해 유의성 있는 탐식세포 내 생균수의 감소를 각각 나타내었고, FT 및 TH는 대조군에 비해 유의성 있는 탐식세포 내 생균수의 감소를 나타내지 않았다.
 4. MCF-7 세포를 이용하여 상피세포 내 *E. coli* 침투율 억제효과를 관찰한 결과 YKKPJ, FF, LF, MC 및 PS 순으로 상피세포 내 *E. coli* 침투율 억제효과를 나타내었고, FT 및 TH에서는 의미 있는 상피세포 내 *E. coli* 침투율 억제효과가 인정되지 않았다.
- Received : January 28, 2015
 Revised : February 01, 2015
 Accepted : February 07, 2015
- ### 참고문헌
1. Spencer JP. Management of mastitis in breastfeeding women. *Am Fam Physician*. 2008;78:727-31.
 2. Korean Breast Cancer Society. *The Breast*. Seoul:Ilchokak. 1999:47-8.
 3. Wambach KA. Lactation mastitis: a descriptive study of the experience. *J Hum Lact*. 2003;19:24-34.
 4. Chen CY, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections may not impede the success of ultrasound-guided drainage of puerperal breast abscesses. *J Am Coll Surg*. 2010;210:148-54.
 5. Lawrence RA, Lawrence RM. Management of the mother-infant nursing couple. In: *Breastfeeding: A Guide for the Medical Profession*. 6th ed. St. Louis: Mosby. 2005:255-316.
 6. Zhu W, et al. β -Glucan modulates the lipopolysaccharide-induced innate immune response in rat mammary epithelial cells. *Int Immunopharmacol*. 2013;15:457-65.
 7. Dogan B, et al. Phylogroup and IpfA influence epithelial invasion by mastitis associated *Escherichia coli*. *Vet Microbiol*. 2012;159:163-70.
 8. Burvenich C, et al. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet Res*. 2003;34:521-64.
 9. Ackermann G, et al. Resistant to moxifloxacin in toxigenic *Clostridium difficile* isolates is associated with mutations in *gyrA*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45:2348-53.
 10. 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;7:257-61.
 11. Korean Medical Obstetrics and Gynecology compilation committee. *Korean Medical Obstetrics and Gynecology II*. Seoul: Jungdam. 2007:446-9.

12. Gae Bin J. Gyungakjeonseol. Seoul: Dongwonmunhwasa. 2004:560.
13. Qu H, et al. Isoforsythiaside, an antioxidant and antibacterial phenylethanoid glycoside isolated from *Forsythia suspensa*. Bioorg Chem. 2012;40:87-91.
14. Hwang JT, et al. Isolation and identification of antifungal compounds from *Spatholobus suberectus* Dunn. Journal of the Korean Society of Pesticide Science. 2012;16:209-16.
15. Xiong J, et al. Screening and identification of the antibacterial bioactive compounds from *Lonicera japonica* Thunb. leaves. Food Chem. 2013;138:327-33.
16. Shin YK, et al. Evaluation of Antimicrobial, Antithrombin, and Antioxidant Activity of *Fritillaria thunbergii* Miquel. Journal of Life Science. 2009;19:1245-50.
17. Oh C, et al. Inhibition of HIV-1 infection by aqueous extracts of *Prunella vulgaris* L. Virol J. 2011;8:188.
18. Pfaller MA, et al. Multicenter evaluation of four methods of yeast inoculum preparation. J Clin Microbiol. 1988;26:1437-41.
19. Janssen AM, et al. Antimicrobial activity of essential oils: a 1976-86 literature review. Aspects of the test methods. Planta Med. 1987;53:395-8.
20. Almeida RA, et al. *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. J Dairy Sci. 1996;79:1021-6.
21. Cuffini AM, et al. Enhanced *Staphylococcus aureus* susceptibility to immuno-defense induced by sub-inhibitory and bactericidal concentration of imipenem. J Antimicrob Chemotherp. 1993;31:559-68.
22. Pfaller MA, et al. Standardized susceptibility testing of fluconazole: an international collaborative study. Antimicrob Agents Chemother. 1992;36:1805-9.
23. Tenover FC, et al. Characterization of staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin and other glycopeptides. J Clin Microbiol. 1998;36:1020-7.
24. Levene A. Pathological factors influencing excision of tumours in the head and neck. Part I. Clin Otolary. 1981;6:145-51.
25. Ludbrook J. Update: microcomputer statistics packages. A personal view. Clin Exp Pharmacol Physiol. 1997;24:294-6.
26. Kim OY. Epidemiological Study of Suppurative disease of the breast in Korean women. Annals of Surgical Treatment and Research. 1973;15:11-8.
27. Foxman B, et al. Lactation mastitis: occurrence and medical management among 946 breastfeeding women in the United States. Am J Epidemiol. 2002;155:103-14.
28. Okamoto R, et al. Detection of genes regulating beta-lactamase production in *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 1996;40:2550-4.
29. Appelbaum PC, Hunter PA. The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. Int J Antimicrob Agents. 2000;16:5-15.
30. Gillespie SH, et al. A comparison of

- the bactericidal activity of quinolone antibiotics in a *Mycobacterium fortuitum* model. J Med Microbiol. 2001;50:565-70.
31. 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;47:2283-92.
32. Pispirigos K, Chrysanthopoulos K. Evaluation of cardiac subacute toxicity of ciprofloxacin in rats using serum biochemical parameters. Arzneimittelforschung. 2001;51:582-7.
33. Pons R, Escutia B. Ciprofloxacin-induced vasculitis with cutaneous and renal involvement. Nefrologia. 2001;21:209-12.
34. Egerbacher M, et al. Effects of enrofloxacin and ciprofloxacin hydrochloride on canine and equine chondrocytes in culture. Am J Vet Res. 2001;62:704-8.
35. Williams RJ III, et al. The effect of ciprofloxacin on tendon, paratenon, and capsular fibroblast metabolism. Am J Sports Med. 2000;28:364-9.
36. Heo J. Dongeuibogam. Seoul:Hanmi Medical Publishing. 2008:384.
37. Zimmer SH, et al. Comparative pharmacodynamics of the new fluoroquinolone ABT492 and ciprofloxacin with *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* in an in vitro dynamic model. Int J Antimicrob Agents. 2004;24:173-7.
38. Sordillo LM, et al. Immunology of the mammary gland. In: Proceedings of the Symposium on Bovine Immunology. J Dairy Sci. 1997;80:1851-65.
39. 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;63:174-229.
40. Dziewanowska K, et al. Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalisation of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. Infect Immunol. 1999;67:4673-8.
-