

패혈증 치료제 개발을 위한 항백이 포함된 생약혼합제제 ABHC의 항균 효능

이기만^{1,3} · 이금선² · 김유리¹ · 박준우¹ · 부경준¹ · 임동술¹ · 강태진^{1*}
¹삼육대학교 약학과, ²삼육대학교 상담심리학과, ³주아이진 부설연구소

Antibacterial Activity of Herbal Complex ABHC for Development of Novel Therapeutic Agent Against Sepsis

Lee, Ki Man^{1,3}, Geum Seon Lee², Yu Ri Kim¹, Jun Woo Park¹, Kyung-Jun Boo¹,
Dongsool Yim¹, and Tae Jin Kang^{1*}

¹Department of Pharmacy, Sahmyook University, Seoul 01795, Korea.

²Department of Counseling Psychology, Sahmyook University, Seoul 01795, Korea

³R&D Center, EYEGENE Inc., Goyang 10551, Korea

Abstract – Sepsis, an infectious disease, is a life-threatening condition that arises when the response to infection causes injury to tissues and organs. The purpose of this study was to demonstrate whether ABHC-1 and ABHC-2, two functional extracts from herbal complex, have an anti-bacterial effect against *Escherichia coli* in vivo, in vitro experimental model. ABHC-1 and ABHC-2 showed the antibacterial activity against the bacteria by paper disc method. The minimum inhibitory concentration (MIC) was measured using alamar blue reagent. The MIC was shown at 60 µg/ml from ABHC-1 and 500 µg/ml from ABHC-2 against *E. coli*. We next examined the effect of ABHCs on the production of inflammatory cytokine, such as tumor necrosis factor-α (TNF-α), which is related to the induction of inflammation, in RAW 264.7 cell. ABHC-1 and ABHC-2 increased TNF-α production of RAW 264.7 cell in a dose-dependent manner while two extract decreased TNF-α production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 cell in a dose-dependent manner. At a dose of 1×10^8 *E. coli* i.p., non-treated mice were succumbed, while most of mice treated with ABHC-1 were survived. Therefore, our results suggest that ABHC-1 has anti-bacterial activity and can be a novel therapeutic agent against infectious diseases.

Keywords – Herbal complex, Sepsis, Antibacterial activity, Tumor necrosis factor-α, Infection

패혈증(sepsis)은 혈액이나 조직 내에 세균을 비롯한 병원성 미생물이 침범하여 번식하면서 생산된 독소에 의해 전신에 감염증을 일으키는 질병으로 특히, 중환자실에서 치료 중인 환자에게 감염되는 것이 가장 흔한 형태이다.^{1,2)} 최근 새로운 항생제 등의 개발로 인하여 패혈증과 같은 질병이 감소할 것으로 예상되었으나 항생제 내성균주가 출현하고 화학치료, 면역억제, HIV 감염에 따른 면역력 저하 환자의 수적 증가에 의해 패혈증 증후군의 수가 지속적으로 증가하고 있는 상황이다.^{3,4)} 이러한 패혈증 증후군의 환자들은 발열, 저체온, 빈맥, 저산소증, 핏뇨 등을 동반하고 결국은 패혈성쇼크(septic shock) 상태로 진행되어 사망률이 50%에 이른다.^{2,5)}

패혈성 쇼크(내독소 쇼크, endotoxic shock)를 가장 빈번하게 일으키는 원인은 내독소를 생산하는 그람 음성균이며, 그람 양성균과 진균에 의한 감염으로도 발생할 수 있다. 패혈성 쇼크를 발생시키는 대표적인 그람 음성균으로는 *Escherichia coli*를 비롯하여 *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa* 등이 있으며, 그람 양성균으로는 *Staphylococcus aureus*와 *Enterococcus cloacae* 그리고 진균은 *Candida parapsilosis*와 *C. albicans*가 대표적이다.^{6,7)}

Lipopolysaccharide(LPS)는 그람 음성균의 세포벽에 존재하는 내독소 성분으로 사람 몸에 침입 후 최초로 면역반응을 유발한다. LPS는 혈장 내에서 LPS 결합 단백질에 부착하거나 CD14를 가진 세포 표면 수용체인 toll like receptor-4(TLR-4)와 결합하고 세포 내 신호전달 과정을 거쳐 tumor

*교신저자(E-mail): kangtj@syu.ac.kr
(Tel): 82-2-3399-1608

necrosis factor- α (TNF- α)와 interleukin-1 β (IL-1 β)와 사이토카인의 생성을 자극하고 또 다른 염증성 사이토카인(IL-6, IL-8, IL-12)의 발생을 촉진시킨다.^{8,9)} 이러한 일련의 연쇄반응 과정을 통해 사람 몸으로 침입한 패혈증 원인균들은 제거되지만, 지속적으로 유입되는 높은 농도의 LPS는 패혈증 증후군을 초래한다. 현재 전 세계적으로 패혈증 치료제는 없으며, 패혈증 치료제 개발을 위해 국내외에서 패혈증의 작용기전 및 연쇄반응에 관여하는 전사 인자 등에 관한 연구가 진행되고 있으나 이에 대한 연구실적은 미비한 실정이다.¹⁰⁻¹²⁾

본 연구에서는 패혈증을 유발하는 원인균인 *E. coli*에 대한 생약복합추출물 ABHC-1과 ABHC-2의 항균활성을 확인 보고 생약복합제가 초기 사이토카인인 TNF- α 생성량에 미치는 영향에 대하여 연구하였다. 또한 *E. coli*에 감염된 동물모델을 이용하여 생약복합제가 *in vivo* 상에서도 치료 효과가 있는지 검증하여 패혈증 치료제로서의 가능성을 확인하였다.

재료 및 방법

실험 재료. 본 실험에서 사용한 약제들은 경동시장에서 구입하였으며 삼육대학교 약학과 임동술 교수의 감정 후 사용하였으며 그 표본은 삼육대학교 약학대학 천연물학 연구실에 보관하였다(SYUNPL1805). 황백, 황련, 백급, 승마, 방풍, 호장근, 천련자(Table I)를 각각 60°C 건조기 또는 상온에서 완전히 건조시켜 분말형태로 만들었다. 이들 재료 중 황백 60~120 g, 황련 60~120 g, 승마 60~120 g, 방풍 30~60 g, 백급 30~60 g 범위에서 2가지 비율에 따라 섞고 최종 무게의 10배에 해당하는 70% ethanol을 첨가하였다. 이후 각각 60°C에서 4시간씩 3회 가온 추출한 후 여과하여 추출액을 얻었고, 감압농축 후 240 g의 농축물을 얻었으며 이들을 건조하여 각각 ABHC-1과 ABHC-2로 명명하였다. 농도별로 희석하면서 실험에 사용하였으며 사용 전 ABHC-1과 ABHC-2는 4°C 냉장고에서 보관하였다.

사용 균주 및 배양. 본 실험에 사용한 균주 *Escherichia coli* KACC 25922는 국립농업유전자원센터(KACC)에서 분

양 받아 사용하였다. Ampoule상태로 분양된 균주를 각각 멸균수에 현탁한 후 LB agar 고체배지에 접종하고 37°C에서 24시간 배양하여 single colony를 확인하였다. 이후 single colony를 LB broth 액체배지에서 증식하여 실험에 사용하였다. 균 보존은 20% 글리세롤(Sigma-aldrich Korea)을 이용하여 -70°C 초저온냉동고에 동결 보존하였으며 실험 하루 전 증식시켜 사용하였다.

항균 활성. 항균 활성은 paper disc법을 이용하여 측정하였다. 배양된 세균을 LB agar 배지에 1×10^6 CFUs/ml로 되도록 한 후 고체배지 위에 100 μ l씩 도말하였다. Paper disc (Advantec, 8 mm)에 동일하게 희석시킨 ABHC-1과 ABHC-2를 각각 흡수시키고, 실온에서 1시간 확산시킨 후 세균이 도말된 배지 상에 고정시켜 37°C에서 배양하였다. 24시간 후 paper disc 주위의 억제영역(inhibition zone) 생성 여부로 항균활성을 확인하였다. 최소성장억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC)는 alamar blue(Invitrogen) 지시약을 이용하여 측정하였다. 96 well plate에 LB broth를 100 μ l씩 넣은 후 ABHC-1 및 ABHC-2를 각각 첫 번째 well에 100 μ l씩 첨가하였다. 이후 100 μ l씩 단계적으로 희석하여 농도별로 희석된 모든 well에 증식된 세균을 100 μ l씩 넣어 최종 volume을 200 μ l로 고정하였다. 이를 37°C에서 24시간 배양한 후 alamar blue 시약을 20 μ l씩 넣어 1시간 다시 배양하고 발색여부로 최소성장억제농도를 확인하였다.

TNF- α 생성량 측정. TNF- α 생성 측정은 mouse의 대식세포주인 RAW 264.7 세포를 사용하여 측정하였다. 세포 배양에는 10% Fetal Bovine Serum(FBS, HyClone)와 1% Penicillin/Streptomycin(P/S, Sigma)를 포함하는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM, HyClone) 배지를 사용하였으며 37°C의 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 12 well에 RAW 264.7 세포를 1×10^6 cells/well이 되도록 1 ml씩 분주하고 24시간 배양하였다. 이후 LPS가 첨가된 배지와 첨가되지 않은 새로운 배지로 교체하면서 ABHC-1과 ABHC-2를 각각 농도별(0, 12.5, 25, 50, 100, 200 μ g/ml)로 처리한 후 24시간 다시 배양하였다. 이후 배양된 상등액과 ELISA kit(BD)를 사용하여 TNF- α 생성량을 측정하였다.

Table I. List of a herbal medicine used for experiment

Common name	Scientific name
Phellodendri Cortex	<i>Phellodendron amurense</i> Rupr.
Coptidis Rhizoma	<i>Coptis japonica</i> Makino
Bletillae Rhizoma	<i>Bletilla striata</i> (Thunb.) Reichb. F.
Cimicifugae Rhizoma	<i>Cimicifuga heracleifolia</i> Kom.
Saposhnikoviae Radix	<i>Saposhnikovia divaricata</i> Schischkin
Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix	<i>Polygonum cuspidatum</i> Sieb. et Zucc.
Meliae Fructus	<i>Melia toosendan</i> Siebold et Zuccarini, <i>Melia azedarach</i> Linné

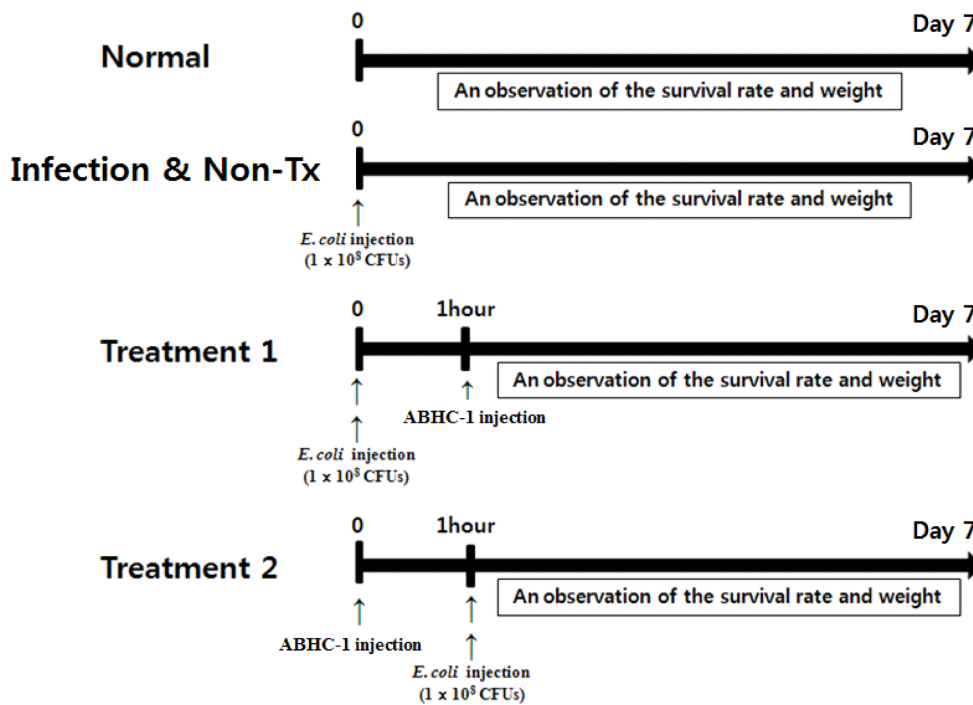


Fig. 1. Schematic diagram of animal experimental models. Mice were infected i.p. with *E. coli* and treated with 50, 100 and 200 mg/kg of ABHC-1 by i.p. injection in two methods (Treatment 1 and 2), and then the survival rates and weights of mice were examined for 7 days.

실험동물. 실험동물로 사용한 웅성 ICR 마우스(4주령, 18~20 g)는 대한바이오팅크(Eumseong, Korea)에서 공급받아 삼육대학교 의명신경과학연구소의 동물실의 clean cage 에서 7일간 안정화시켜 사용하였으며, 온도(23±2°C), 습도 (55±10%) 및 명암주기(12시간)는 자동으로 조절되도록 하였다. 마우스의 음용수와 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였고 삼육대학교 동물실험윤리규정을 따랐다.

세균감염 동물모델 확립 및 시료 처리. 안정화 기간이 지난 마우스의 복강에 실험 하루 전날 증식시킨 *E. coli*를 각각 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 CFU 농도로 주사하여 감염을 유발하였고 24시간 간격으로 마우스의 생존율을 측정하였다. 이후 동물실험군을 정상군, 세균 감염군, ABHC-1 시료 처치군으로 분류하였고, 시료 처치를 다음과 같은 2 가지 방법으로 수행하였다(Fig. 1).

- 1) 시료처리 1 실험군: 1×10^8 CFUs의 *E. coli*를 마우스에 복강 주사하고 1시간 후 ABHC-1을 주입하였다(Treatment 1).
- 2) 시료처리 2 실험군: 다양한 농도의 ABHC-1을 복강 주입한 다음 1시간 후 1×10^8 CFUs의 *E. coli*를 주사하였다(Treatment 2).

ABHC-1은 PBS에 희석하여 각각 50, 100, 200 mg/kg 씩 복강에 주입하였다. 마우스의 생존율과 체중 변화는 24시간 간격으로 측정하였다.

결 과

항균활성. Paper disc법을 이용하여 측정된 항균활성 결과, ABHC-1과 ABHC-2 모두 *E. coli*에 대한 항균 효능을 보여주었으며, 세균 증식의 억제영역 크기는 ABHC-1과 ABHC-2가 각각 17.9 mm와 16.3 mm로 나타나서 ABHC-1이 ABHC-2보다 더 높은 항균활성을 갖고 있음을 확인하였다. Alamar blue 지시약의 발색여부로 확인한 최소성장억제 농도 측정 결과는 ABHC-1과 ABHC-2에서 각각 60 µg/ml 과 500 µg/ml으로 나타나 ABHC-1이 ABHC-2보다 낮은 농도에서 세균의 증식을 억제하는 것을 알 수 있었다(Fig. 2, Table II). 이상의 결과들은 ABHC-1이 ABHC-2보다 더 좋은 항균 효능을 갖고 있음을 보여준다.

TNF-α 생성량 측정. TNF-α는 미생물 감염 시 대식세포를 포함한 염증세포에서 생성, 분비되어 염증을 유발함으로써 생체를 방어하는 중요한 염증매개인자로서, 그 생성량이 과도한 경우는 오히려 조직 또는 장기 손상으로 생명에 위협이 될 수 있다. 따라서 본 연구에서는 생약혼합물인 ABHC의 염증 조절 효능을 확인하기 위해 세포실험을 통해 단독 처리 시 TNF-α 생성에 미치는 효과와 LPS로 활성화된 세포에서의 TNF-α 생성에 미치는 ABHC의 영향을 연구하였다. 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포를 배양 후 배양액에 최종 농도가 12.5~200 µg/ml이 되도록 조절된 ABHC-

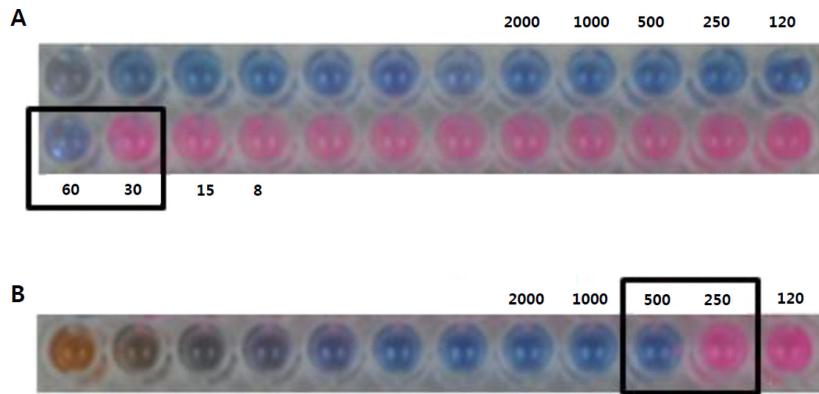


Fig. 2. The MIC of herbal complex against *Escherchia coli* (unit: µg/ml). The plate was incubated at 37°C for one day in dark conditions. A, ABHC-1; B, ABHC-2.

Table II. Inhibition zone and minimum inhibitory concentration of ABHCs against *E. coli*

Agents	Inhibition zone (mm)	MIC (µg/mL)
ABHC-1	17.9	60
ABHC-2	16.3	500

1과 ABHC-2를 각각 첨가 후 세포배양액에서의 TNF-α 생성량을 측정하였다. 그 결과, TNF-α의 생성량은 LPS를 처리하지 않았을 경우 추출물의 농도 의존적으로 유의성 있게 증가한 반면, LPS를 처리하였을 경우 오히려 농도 의존적으로 생성량이 감소하였다(Fig. 3). 이는 생약혼합물이 초기 염증을 유발하여 생체를 방어함과 동시에 과도한 염증으로 인한 조직의 손상을 억제하는 효과를 보여주는 결과이다.

마우스의 감염 유도 및 ABHC-1의 효능. 이전 실험에서 ABHC-2보다 ABHC-1의 항균효과가 더 우수한 것으로 입증되어 동물실험에서는 ABHC-1을 이용하여 연구를 진행하였다. 증식시킨 *E. coli*를 각각 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 CFUs의 농도로 마우스 복강에 주입하여 세균 감염을 유도하였다. 5×10^8 과 1×10^9 CFUs의 농도에서는 마우스가 각각 1일과 2일 만에 모두 치사하였고 1×10^7 과 5×10^7 CFUs의 농도에서는 관찰기간 동안 모든 마우스가 생존하였다(Fig. 4A). 1×10^8 CFUs의 *E. coli*가 주입된 마우스에서는 3일 만에 50%의 생존율을 보여 이 세균수를 LD₅₀로 정하고 세균감염을 유도한 마우스에 대한 ABHC-1의 항균 효능을 관찰하기 위하여 이 농도의 *E. coli* 이용하였다. *E. coli*를 먼저 주입하고 ABHC-1을 처리한 경우(시료처치 1 실험군)에서는 ABHC-1의 농도에 관계없이 모든 마우스가 생존하였으며(Fig. 4B), ABHC-1을 먼저 처리하고 *E. coli*를 주입한 경우(시료처치 2 실험군)에서는 ABHC-1이 50 mg/kg 주입 시 80%의 마우스가 생존한 반면, 100, 200 mg/kg

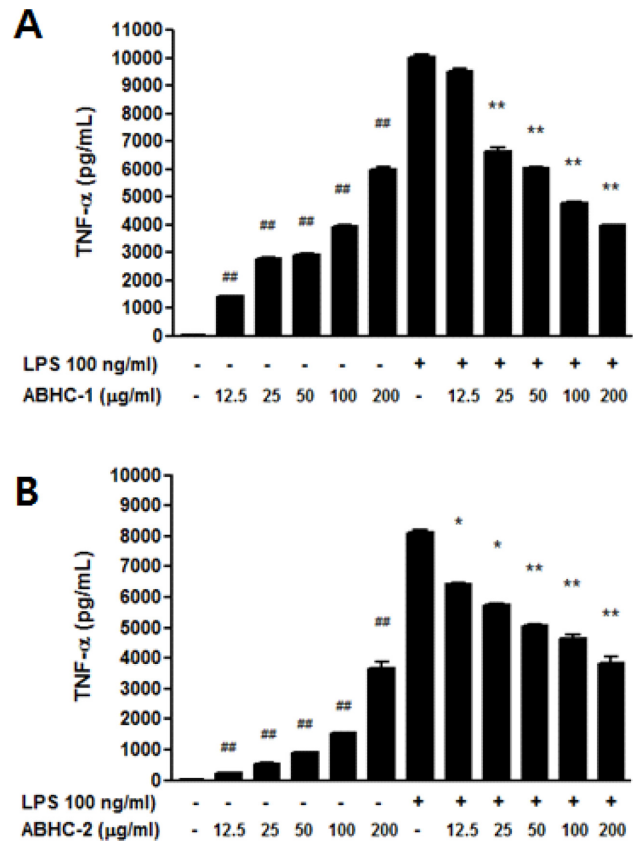


Fig. 3. The effect of ABHCs on TNF-α production in RAW 264.7 cell. RAW 264.7 cells were treated with 12.5 to 200 µg/ml of ABHCs. ##p<0.01 versus control and **p<0.01, *p<0.05 versus LPS alone based on Student's t-test.

에서는 모든 마우스가 생존하였다(Fig. 4C). 마우스의 체중 변화에 있어 *E. coli*를 주입한 대부분의 그룹에서 1일~2일 사이에 체중이 급격히 감소하여 3일 이후에 점차 회복하는 양상이 관찰되었다(Data not shown).

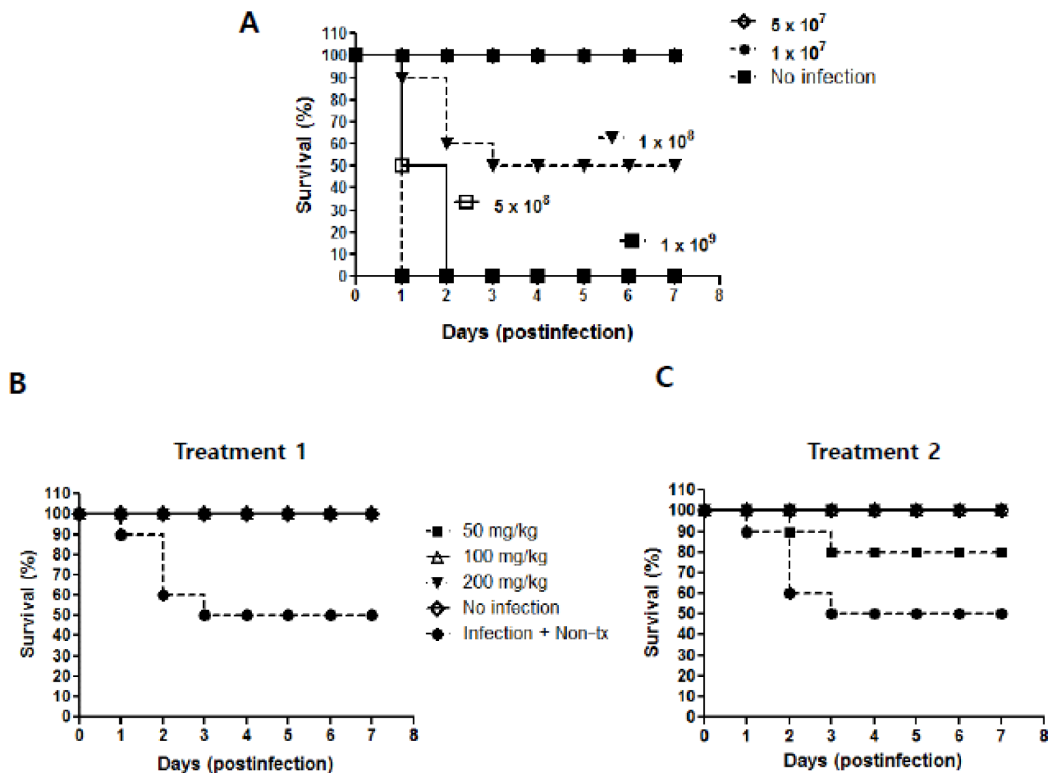


Fig. 4. Survival rates of mouse in animal model infected with *E. coli*. (A) Mice were challenged with *E. coli* at different concentrations (unit: CFUs) and the survival rates of the mice were observed for 7 days. [B-C] Effect of ABHC-1 on the survival rate of mouse infected with *E. coli*. (B) Mice were challenged with *E. coli* and treated with ABHC-1 at dose-dependent manner and the survival rate of mice was measured for 7 days. (C) Mice were treated with ABHC-1 and after 1 h the mice were injected with *E. coli*, and the survival rate of mice was measured for 7 days.

고찰

1940년대 penicillin의 발견과 이후 새로운 항생물질의 발견으로 많은 감염병은 퇴치될 것으로 예상했었다.¹³⁾ 하지만 항생제 오남용으로 인하여 항생제에 대한 저항성을 가지는 세균들이 나타나기 시작하였고 사용 중인 대부분의 항생제에 내성을 가지는 균주가 무서운 속도로 증가하고 있어 인류를 위협하고 있다.^{3,4)} 이러한 증가 속도는 항생제를 개발하는 속도를 앞지르고 있고, 항생제에 대한 부작용도 심각하여 이에 대한 대책이 매우 시급한 실정이다. 따라서 많은 연구자들이 합성 항생제를 대신할 수 있는 대체물로 독성과 부작용이 거의 없는 천연물에 눈을 돌리고 있다.^{14,15)} 이에 본 연구에서는 황백, 황련이 포함된 7종의 생약복합추출물을 이용하여 여러 가지 감염성 질병 중 인체 내 미생물 감염으로 인해 발생하는 패혈증의 원인 세균의 억제 여부와 염증 매개인자인 TNF- α 가 생약복합제에 의해 어떠한 영향을 받는지 확인하였다. 또한 세균에 감염된 마우스를 이용하여 *in vivo* 상에서도 병원성 세균 감염에 대한 치료 효과가 있는지 검토하였다.

*E. coli*에 대한 생약복합제의 항균활성은 본 실험에서 사용한 ABHC-1과 ABHC-2에서 모두 확인되었다. 이미 황백, 황련 등을 이용한 항균활성 연구에서 사용된 모든 세균에 대하여 항균효능이 있었다고 보고되었고,¹⁶⁾ 음식물 변패 세균에 대한 백급과 승마의 항균활성,¹⁷⁾ 방풍을 이용한 한약탕재¹⁸⁾ 및 호장근,¹⁹⁾ 천련자²⁰⁾ 등에서 각각 항균효능이 보고되었다. 또한 식품원료로서 사용할 수 있는 생약 추출물의 대부분에서 항균활성이 존재한다고 보고되었다.²¹⁾ 생약 중 항균활성을 나타내는 성분은 지방산을 포함하여 flavonoid, terpenoid, alkaloid, phenol성 물질과 같은 2차 대사산물이라고 알려져 있는데 특히 phenol성 물질에서 항균작용이 있는 성분이 많아 이를 이용한 항산화 연구 또한 병행되어야 할 것으로 판단된다.²²⁾

MIC 측정에 사용한 alamar blue 시약은 청색을 띄는데 환원이 되면 적색이 나타난다. 일반적으로 세포가 증식을 하면 세포 안에서는 다양한 효소활성이 나타나게 되고 이들 중 세포질(cytoplasm)내에 존재하는 효소들은 alamar blue를 환원시킬 수 있다. 따라서 항균활성이 있는 실험군에서는 청색이 나타나게 되며 항균활성이 없는 well에서는 적색

이 나타나게 된다.^{23,24)} 이러한 특성을 이용한 MIC 측정 결과 생약복합추출물 ABHC-1과 ABHC-2 모두 비교적 낮은 농도에서 MIC가 관찰되었다. 특히 ABHC-1은 60 µg/ml에서 *E. coli*의 생육을 억제하여 60 µg/ml에서 균 증식 억제 효과를 보인 ABHC-2에 비하여 우수한 MIC를 보여주었다. 따라서 ABHC-1이 더 강력한 항균효능이 있는 것으로 보인다.

병원체가 들어오면 우리 몸은 즉각적으로 반응하여 대식세포, 호중구 등의 탐식세포는 병원체를 섭취, 분해하는 탐식작용을 수행한다. 탐식작용에는 clathrin-coated pit에 존재하는 수용체가 관여하고 다양한 신호 전달과정을 거쳐 항원을 제거하는데 이 과정에서 활성화된 탐식세포는 다른 세포들을 활성화시키는 사이토카인을 분비한다.²³⁾ 가장 먼저 분비되는 사이토카인에는 TNF-α와 IL-1β가 있는데, 이 중 본 실험에서 측정된 TNF-α는 말초혈관상피의 투과성을 증대시키고 세포나 수용성 분자들의 혈관으로부터 조직으로의 이동을 증진시키는 효과가 있다.²⁴⁾ 따라서 세포 내에서 TNF-α의 생성량이 증가한다면 감염성 미생물과 같은 항원 침입 시 매우 효과적인 반응을 일으킬 수 있다. 그러나 과도한 염증반응으로 이러한 사이토카인의 분비량이 많아진다면 오히려 조직손상 등으로 인체는 상해를 입을 수 있다. 따라서 LPS와 같은 염증 유도물질 처리 시에 TNF-α의 생성량을 감소시킨다면 항염증 효능도 있어서 염증을 조절하는데 효과적일 수 있다. RAW 264.7 세포에 ABHC-1과 ABHC-2를 농도별로 처리하여 측정된 TNF-α의 생성량은 추출물의 농도가 증가할수록 높아지는 경향이 나타났고 LPS 처리 시 NO와 TNF-α의 생성량은 농도 의존적으로 감소하였다. 따라서 실험에서 사용한 생약복합제는 체내에서 TNF-α 생성을 촉진시켜 항원 제거에 매우 효과적으로 작용할 것으로 보이며 초기 병원성 미생물 감염 시 방어기전을 활성화시킬 뿐 아니라, 염증 후기에는 TNF-α 생성을 억제하여 항염증 반응이 유도되어 조직 손상이 발생하는 것을 효과적으로 차단할 수 있으리라 판단된다.

동물 실험은 ABHC-1과 ABHC-2 중 항균활성이 강력하게 측정된 ABHC-1을 이용하여 수행되었다. 실험에는 LD₅₀의 *E. coli* 농도를 이용하여 실시하였는데 *E. coli*를 실험동물인 ICR 마우스에 복강 주사하여 만든 감염 모델은 2가지 유형으로 구분하였다. 마우스에 *E. coli*를 먼저 주사하고 1시간 후 ABHC-1을 주입한 경우(Treatment 1)와 ABHC-1을 먼저 주입하고 *E. coli*를 1시간 후에 주사한 경우(Treatment 2) 이었는데 이는 ABHC-1이 패혈증 치료 효과뿐만 아니라 패혈증 예방 효과까지 검증하기 위함이었다. 두 유형 모두에서 실험에 사용된 ABHC-1의 용량에서 마우스가 대부분 생존하는 것으로 보아 ABHC-1은 패혈증 예방과 치료에 뛰어난 효능이 있을 것으로 보인다. 이러한 본 실험 결과를 토대로, 후속 연구를 통해 가장 좋은 항균, 항염

효능을 보이는 최적의 배합을 결정할 뿐 아니라 현재 사용 중인 치료제보다 더 좋은 효능을 보이는 지도 검증할 필요가 있다. 뿐만 아니라 패혈증을 유발하는 세균에 대한 항균활성이 존재하는 생약복합제의 다양한 성분 중 어떠한 성분에서 그 효과를 나타내는지에 대한 물질 분리 연구와 함께 안전성 및 구체적인 작용 기전에 대한 연구가 추후 실시되어야 할 것으로 판단된다. 그리고 생약의 생리활성 정도는 추출 방법과 혼합 정도, 생약 수확 시기 그리고 사용부위에 따라 고려되어야 할 것이며 이에 대한 기준이 마련되어야 할 것으로 생각된다.

결 론

패혈증은 병원성 미생물이 인체 내로 침입하여 사망에까지 이르게 하는 감염성 질병이다. 본 연구는 패혈증의 대표 원인균인 *Escherichia coli*를 대상으로 생약복합제 ABHC-1과 ABHC-2의 항균활성과 대식세포를 이용한 TNF-α 생성량에 대하여 살펴보았다. 또한 동물모델을 이용하여 *in vivo* 실험을 병행하였다. Paper disc법을 이용하여 측정된 항균활성은 생약복합제 ABHC-1과 ABHC-2 모두에서 존재하였다. Alamar blue 지시약을 사용하여 측정된 최소저해농도(MIC, minimum inhibitory concentration)는 ABHC-1에서 60 µg/ml, ABHC-2에서 500 µg/ml이었다. RAW 264.7 세포를 이용하여 측정된 TNF-α 생성량은 ABHC-1과 ABHC-2에서 모두 농도 의존적으로 증가하였으며 LPS 처리 시 TNF-α 생성량은 농도 의존적으로 억제되었다. 세균 감염 마우스 모델에서 ABHC-1의 효능검색 결과 모든 농도에서 대부분의 마우스가 생존하여 항균 효능에 의한 결과라 판단된다. 따라서 본 실험에 사용된 생약복합제는 패혈증을 억제하고 예방할 수 있을 것으로 보인다.

사 사

이 논문은 2018년도 삼육대학교 학술연구비 지원에 의하여 씌어 진 것임.

인용문헌

1. Delinger, R. P., Levy, M. M., Carlet, J. M., Bion, J., Parker, M. M. and Jaeschkel, R. (2008) Surviving sepsis campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit. Care Med.* **36**: 296-327.
2. Cross, D., Drury, R., Hill, J. and Pollard, A. J. (2019) Epigenetics in sepsis: understanding its role in endothelial dysfunction, immunosuppression, and potential therapeutics. *Front. Immunol.* **10**: 1363.

3. Cingolani, A., Antinori, A., Sanguinetti, M., Gillini, L., De Luca, A., Posteraro, B., Ardito, F., Fadda, G. and Ortona, L. (1999) Application of molecular methods for detection and transmission analysis of mycobacterium tuberculosis drug resistance in patients attending a reference hospital in Italy. *J. Infect. Dis.* **179**: 1025-1029.
4. Deotale, V., Mendiratta, D. K., Raut, U. and Narang, P. (2010) Inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples. *Ind. J. Med. Microbiol.* **28**: 124-126.
5. Varon, J. and Baron, R. M. (2019) A current appraisal of evidence for the approach to sepsis and septic shock. *Ther. Adv. Infect. Dis.* **6**: 2049936119856517
6. Choi, J. H. and Shin, W. S. (2000) Pathogenesis of sepsis and concepts of immunotherapy. *Infection* **32**: 148-157.
7. Oh, S. H. (1992) Pathological sepsis and septic shock. *J. Kor. Soc. Emerg. Med.* **7**: 67-71.
9. Doherty, G. J. and McMahon, H. T. (2009) Mechanisms of endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* **78**: 857-902.
8. Bradley, J. R. (2008) TNF-mediated inflammatory disease. *J. Pathol.* **214**: 149-160.
10. Choi, J. H., Moon, K. W., Kim, M. H., Lee, D. G., Park, Y. H., Kim, S. I., Kim, T. Y., Yoo, J. H., Kim, Y. R., Shin, W. S. and Kang, M. W. (1997) *In vitro* antibiotic-induced endotoxin release and correlation with TNF- α and IL-6. *J. Kor. Soc. Chemother.* **15**: 251-259.
11. Sung, J. S., Kim, D. Y., Kim, S. H., Byun, H. S., Hwang T. J. and Choi, Y. Y. (2006) Analysis of causative microorganisms and choice of antibiotics according to the onset of neonatal sepsis. *Kor. J. Pediatrics.* **43**: 623-629.
12. Sweeney, T. E., Suliman, H. B., Hollingsworth, J. W. Welty-Wolf, K. E. and Piantadosi, C. A. (2011) A toll-like receptor 2 pathway regulates the Ppargc1a/b metabolic co-activators in mice with *Staphylococcal aureus* sepsis. *PLoS One.* **6**: 1-12.
13. Lobanovska, M. and Pilla, G. (2017) Penicillin's discovery and antibiotic resistance: Lessons for the future? *Yale J. Biol. Med.* **90**: 135-145.
14. Martin, K. W. and Ernst, E. (2003) Herbal medicines for treatment of bacterial infections: a review of controlled clinical trials. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**: 241-246.
15. Zaidan, M. R., Noor Rain, A., Badrul, A. R., Adlin, A., Norazah, A. and Zakiah, I. (2005) In vitro screening of five local medicinal plants for antibacterial activity using disc diffusion method. *Trop. Biomed.* **22**: 165-170.
16. Son, D. H., Lee, S. I. and Chung, Y. G. (2001) Antioxidative of medicinal plants on pathogenic bacteria. *J. Kor. Soc. Hygienic Sci.* **7**: 103-108.
17. Ahn, E. S., Kim, M. S. and Shin, D. H. (1994) Screening of natural antimicrobial edible plant extract for Dooboo, Fish paste, Makkoli spoilage microorganism. *Kor. J. Food Sic. Technol.* **26**: 733-739.
18. Jo, H. C., Oh, E. Y. Lee, S. Y. and Seo, B. I. (2003) The antimicrobial activity of *Cheongsangbangpungtang* and its composition oriental medicines against *Staphylococcus aureus*. *Kor. J. Herbol.* **18**: 37-47.
19. Jung, H. K., Kim, Y. J., Park, B. K., Park, S. C., Jeong, Y. S. and Hong, J. H. (2007) Antioxidative and antimicrobial activities of medicinal plant extracts for screening phyto-biotic material. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **36**: 1235-1240.
20. Choi, I., Chang, H. S., Yun, Y. M. and Um, J. C. (2002) Antimicrobial activity of medicinal herbs against *Staphylococcus aureus* and *Salmonella gallinarum*. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 177-183.
21. Lee, Y. C., Oh, S. W. and Hong, H. D. (2002) Antimicrobial characteristics of edible medicinal herbs extracts. *Kor. J. Food Sic. Technol.* **34**: 700-709.
22. Liu, W. J. H. (2011) Traditional herbal medicine research methods. John Wiley & Sons, Inc. Singapore.
23. Al-Nasiry, S., Geusens, N., Hanssens, M., Luyten, C. and Pijnenborg, R. (2007) The use of alamar blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. *Hum. Reprod.* **22**: 1304-1309.
24. Kim, N. H., Mun, S. J., Kim, A. H., Min, J. H., Ahn, J. H., Ha, W. H. and Kim, B. I. (2011) The antimicrobial and anti-plaque effect of dentifrice containing baking soda and triclosan. *J. Kor. Acad. Oral Health* **35**: 10-17.

(2019. 8. 8 접수; 2019. 9. 4 심사; 2019. 9. 23 게재확정)