

Methicillin resistant *staphylococcus aureus*에 대한 지유산의 항균활성

황 해 · 강옥화* · 권동렬*

원광대학교 약학대학 한약학과, 원광한약연구소

Antibacterial Activity of *JiYu-san* Against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Hae Hwang, Ok-Hwa Kang*, and Dong-Yeul Kwon*

Department of Oriental Pharmacy, College of Pharmacy, Wonkwang Oriental Medicines Research Institute,
Wonkwang University, Iksan, Jeonbuk 54538, Korea

Abstract – Methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a gram-positive bacterium, the most commonly isolated bacterial human pathogen. *JiYu-san* is one of the natural products used to treat diseases in the folk recipe. In this study, we investigated the antimicrobial activity of EtOH 70% extracts of *JiYu-san* (JYS) against MRSA. The antibacterial activity of JYS against MRSA strain was evaluated using minimum inhibitory concentration (MIC), checkerboard dilution test, and time-kill assay. The effect of JYS on the immune mechanism of MRSA was confirmed through cell membrane permeability tests and energy metabolism tests, and the antibacterial activity mechanism was performed using qRT-PCR and western blot. As a result, in the antibacterial test of JYS, the MIC was measured to be 1.9~1000 µg/mL, and synergistic or showed a partial synergistic effect. In addition, JYS showed antibacterial activity in a combination test with DCCD or TX-100. In a study on the mechanism of action of antibacterial activity, it was found that JYS suppressed MRSA resistance genes and proteins. These results suggest that JYS has antibacterial activity and provides great potential as a natural antibiotic by modulating the immune mechanism against MRSA.

Keywords – *JiYu-San* (JYS), Methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA), Antimicrobial, Overcoming resistance

메티실린 내성 황색포도상구균(MRSA : Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)은 유럽을 포함하여 전 세계적으로도 가장 문제가 되는 hospital-acquired infection 병원체이다.¹⁾ MRSA가 보고된 이후, 1980년대부터 변종 *S. aureus*인 MRSA에 대하여 glycopeptide계 약물인 vancomycin, teicoplanin, daptomycin 등 기존의 penicillin 계열과 다른 기전을 가지고 있는 abiotics를 1차로 사용하거나 새롭게 개발된 여러 항생제를 사용했으나 계속해서 내성을 가진 세균의 출현 비율이 나날이 증가하면서 임상 의학적으로 심각한 문제로 제기되고 있다.²⁾ MRSA는 황색포도상구균의 감염에 대하여 베타락탐(β -lactam)계열의 항생제를 비롯한 거의 모든 항생제에 내성이 있으므로 현재 거의 모든 항생제에는 치료가 되지 않으며, 감염 후 사망률이 높은 슈퍼박테리아

로 진화하였다.^{3,4)} 황색포도상구균과 같은 일부 세균은 화학 물질에 의한 내성이 증가하였으나 항생제의 적정 사용은 수술 후 감염 발생을 예방하고 감소시킨다고 알려져 있다.^{4,5)} 그러나 수술 부위 감염(surgical site infection; SSI)은 모든 병원감염환자의 14~16%로 3번째를 차지하고 있으며, 외상 및 수술환자에서 MRSA 감염은 재수술, 임상경과 악화, 재원 일수 연장 및 치료비 증가 등의 중요한 문제를 유발한다.^{5,6)} 따라서 효과적인 항생제의 개발과 함께 기존 항생제의 적절한 활용과 내성을 최소화하는 노력이 세계 각국에서 진행되고 있으며, 이와 관련하여 천연물에서 항균 활성을 가지거나 증강시키는 새로운 소재의 개발이 시급히 요구되고 있다.⁷⁾

전통적으로 오랜 시간 동안 사용해오면서 약효를 보였던 식물 또는 동물 등 천연물질 속에는 다양한 생리활성물질을 함유하고 있어 발전된 연구기법을 활용하여 새로운 의약품으로 개발하여 활용할 수 있는 경우가 많다. 최근에는

*교신저자(E-mail): kangokhwa@hanmail.net, sssimi@wku.ac.kr
(Tel): +82-63-850-6802

MRSA와 같은 세균의 내성 문제를 극복하기 위한 방법으로 천연물질 속에서 항균 작용 및 병원성 독소를 해독하는 효능을 가지는 물질을 찾아내 합성항생제와 병용 투여하여 상승효과를 가지는 적정량을 알아냄으로써, 합성항생제의 사용량을 줄여 내성 문제를 해결하려는 많은 연구가 이루어지고 있다.⁸⁻¹¹⁾ 특히, 다양한 기전을 가지고 있는 천연 생약을 조합하여 전통적으로 사용해온 한의학 처방 중에는 기존에 알고 있던 것보다 더 많은 생리활성작용이 인정되거나 많은 효능과 활용가치가 보고되고 있어 연구 가치가 매우 높은 자원으로 평가받고 있다.¹²⁾ 이번 연구에 사용된 지유산(地榆散)은 지유(地榆)와 권백(卷柏)의 구성 약재로 여러 해 동안 하혈하는 것을 치료한다고 동의보감(東醫寶鑑)에 전재되어 있다.¹³⁾ 지유(地榆)는 장미과(Rosaceae)에 속하는 다년생 식물인 오이풀(*Sanguisorba officinalis* Linné)과 장엽지유(*Sanguisorba officinalis* Linné var. *longifolia* (Bert.) Yü et Li)의 뿌리로 한방에서는 지혈제, 진통제, 수렴효과, 화상, 내인성 뇌출혈 치료제로 사용 되어 왔다.¹⁴⁾ 지유에서 분리된 사포닌 배당체, pomolic acid, 비타민A, triterpenoids, 탄닌과 관련 화합물인 phenolic acid, sanguisorbic acid dilactone 및 3가지 ellagitannins인 sanguins H-1, H-2, H-3를 함유하고 있으며, 이들에 대한 고혈압 억제, 통풍예방, 항산화 효과, 과민성 알레르기 예방, 항암, 항균효과, 지혈작용 등의 약리효과가 보고되었다.¹⁵⁻²²⁾ 권백(卷柏)은 부처손과(*Selaginellaceae*)로 부처손(*Selaginella tamariscina* Spring), 점상권백(*Selaginella pulvinata* Maxim.)의 전초를 약용부위로 사용하고 있으며, 한국을 포함하여 동아시아에서 혈액순환, 항암효과가 있다고 알려져 있지만 정확한 약리 작용이 밝혀져 있지 않다.²³⁾ 이러한 권백의 성분은 amentoflavone, hiokiflavone, isocryptomerin, sotetsuflavone cryptomerin B 등과 같은 biflavonoid 및 여러 페놀성 화합물들을 함유하는 것으로 보고되어 있다.²⁴⁾ 따라서 본 연구에서는 지유와 권백으로 구성된 지유산 에탄올 추출물(JYS)을 활용하여 MRSA에 대한 항균 활성이 있는지를 확인하는 한편, MRSA의 내성에 미치는 영향을 확인하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에 사용된 약재 지유는 장미과(Rosaceae)에 속하는 다년생 식물인 오이풀(*Sanguisorba officinalis* Linné)의 뿌리이고, 권백은 부처손과(*Selaginellaceae*)로 부처손(*Selaginella tamariscina* Spring)의 전초로 백제허브(Daejon, Korea)에서 구입하여 원광대학교 약학대학 권동렬 교수가 감정하여 사용하였다. 실험에서 시약은 Mueller-Hinton Broth, Mueller-Hinton Agar는 DifcoTM(Baltimore, MD, USA)에서 구입하여 사용하였고, Dimethyl sulfoxide (DMSO), Triton X-100(TX-100), Oxacillin, Ampicillin,

Gentamicin, Amikacin 및 Gentamicin, MTT[3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, 5 mg/mL]는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구매하여 실험에 사용하였다.

지유산 에탄올 추출물(JYS)의 제조 - 본 실험에 사용된 지유산 에탄올 추출물(JYS)은 지유와 권백을 각각 10 g씩 동량을 70% EtOH 500 mL를 가하여 항온수조(37°C)에서 2시간씩 2회 환류 추출을 실시한 후 여과지(Toyo No. 2, Advantec, Japan)로 여과하였다. 이 여과액을 회전감압농축기(EYELA, Rikakiki, Co., Tokyo, Japan)로 농축한 후, 동결 건조하여 건조분말 2.2 g(수득률 : 11%)을 얻었고, 4°C에서 보관하였다. 시약은 dsitilled water(D.W)에 녹여 실험에 사용하였다.

균주 배양 - 본 실험에 사용한 표준균주 ATCC 33591은 American Type Culture Collection(Manassas, VA, USA)에서 구입하였고, CCARM 3090, 3091, 3095, 3102는 서울여대 항생제 내성 균주은행(Culture Collection of Antimicrobial Resistant Microbes, CCARM, Korea)으로부터, 임상균주 DPS-1, DPS-2은 원광대학교 병원 성형외과(Department of plastic surgery, DPS)로부터 분양받아 실험에 사용하였다. 균주는 -80°C 냉동고에서 30% glycerol에 보관하다가, Mueller-Hinton agar(MHA)에 접종한 후 37°C 항온기(incubator)에서 24시간 배양하여 실험에 사용하였다.

Minimum inhibitory concentration(MIC, 최소억제농도) - Minimum inhibitory concentration(MIC)의 측정은 Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines에 따라 실시하였다. JYS를 농도별로 액체배지에 첨가하고, 여기에 탁도를 1.0×10^8 CFU/mL로 맞춘 균 10 μ L 접종해 최종적으로 1.0×10^6 CFU/mL이 되게 하였다. 다음으로 37°C Incubator에서 18시간 배양한 후에 MTT 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, 5 mg/mL] 사용하여 색이 변하지 않는 가장 낮은 농도를 측정하였다.

Fractional inhibitory concentration index(FICI, 약물 병용효과) - JYS과 상용 항생제와 병용처리 하였을 때 상승효과를 측정하기 위해 checkerboard dilution test를 실시하였다. 두 항균물질은 MHB를 보충하여 순차적으로 희석하였다. 접종원은 37°C incubator에서 24시간 배양 후에 사용하였고, 최종적으로 1.0×10^6 CFU/mL이 되게 하였다.

Fractional inhibitory concentration index(FICI)

$$= FICA + FICB = [A]/MIC [A] + [B] / MIC [B]$$

[A]는 병용 시에 JYS의 MIC이며, MIC [A]는 JYS를 단독으로 사용 시 MIC이다. [B]는 병용 시에 상용 항생제의 MIC이며, MIC [B]는 항생제를 단독으로 사용 시 MIC이다.

FICI는 ≤ 0.5 , synergy; 0.5-0.75, partial synergy; 0.76-1.0, additive effect; >1.0 -4.0, indifference; and >4.0 , antagonism을

따른다.

Membrane permeability inhibition – JYS의 membrane permeability 증진과 MRSA의 성장 억제를 알아보기 위해 *S. aureus*의 membrane permeability를 증진시키는 detergent인 TX-100 단독투여, JYS 단독투여, TX-100과 JYS의 병용투여를 비교하였다.

Metabolic inhibition – JYS의 energy 대사 연관성 유무를 알아보기 위하여, ATPase inhibitor로써 사용되는 *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimide(DCCD) 단독 투여와 JYS 단독 투여, DCCD와 JYS의 병용투여를 비교하였다.

RNA 분리 및 Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction(qRT-PCR) – MRSA 내성 관련 mRNA의 발현 정도를 보기 위하여 qRT-PCR 방법을 사용하였다. RNA를 추출하기 위해 균주를 MHB에 희석(OD 600 0.35~0.45)한다. 희석 후 여러 농도의 JYS를 처리 후 30분간 배양한 다음, 13,000 rpm에서 1분간 원심분리 후 균을 모아 easy-REDTM BYF Total RNA Extraction Kit(Intron, Daejon, Korea)를 제조사의 지시에 따라 사용하여 RNA를 추출 후 QuantiTect® Reverse Transcription Kit(QIAGEN, Hilden, Germany)를 이용하여 cDNA를 만들었다. 합성된 cDNA에 *mecA*, *blaR1*, *blaZ* and *mecR1*, *16s rRNA*의 primer(Table I)와 Power SYBR Green PCR Master Mix(Life technologies, CA, USA)를 섞어준 후, StepOnePlus realtime PCR system (Applied Biosystems, CA, USA)을 이용하여 qRT-PCR을 실시하였다.

Western blot 분석 – Protein을 추출하기 위해 균주를 MHB에 희석(OD600 0.35~0.45) 후, 항생제와 여러 농도의 JYS를 처리 후 20분간 배양한 다음, 13,000 rpm에서 1분간 원심분리 후 균을 모아, 350 μ L의 SMART™ Bacterial Protein Extraction Solution(Intron, Daejon, Korea)을 첨가하여 1분간 vortexing 후 13,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 취한다. 상층액의 단백질 농도는 bovine serum albumin

(BSA)를 표준화하여 Bio-Rad Protein Assay Kit(BD, CA, USA)를 사용하여 정량하였다. 20~30 μ L의 lysate를 8~12% mini gel SDS-PAGE로 변성 분리하여, 이를 polyvinylidene difluoride(PVDF) membrane(BIO-RAD, CA, USA)에 200 mA로 2시간 동안 transfer하였다. 그리고 membrane의 Blocking은 5% skim milk가 함유된 TBST(0.1% Tween 20 + TBS) 용액에서 상온에서 2시간 동안 실시하였다. 단백질의 발현양을 검토하기 위한 Anti-PBP2a(DPAB26604)(DiNonA, Seoul, Korea)를 TBS-T 용액에 희석하여 상온에서 2시간 반응시킨 후 TBST로 3회 세정하였다. HRP가 결합된 2차 항체를 1:2000으로 희석하여 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후, TBST로 3회 세정하여 ECL 기질(Amersham Biosciences, CA, UK)과 반응 후 ImageQuant LAS 4000 Mini Biomolecular Imager(GE Healthcare, USA)를 통해 확인하였다.

통계분석 – 모든 실험은 3회 이상 반복으로 이루어졌으며, 실험 결과는 각 항목에 따라 평균치±표준편차(SEM)를 구하여 그 유의성은 GraphPad Prism 분석법을 이용하여 신뢰 수준 95%($p < 0.05$)에서 통계적 유의차를 평가하였다.

결 과

JYS의 MRSA에 대한 항균활성 – MRSA에 대한 JYS의 항균활성을 실험한 결과 MRSA 표준균주인 ATCC 33591와 임상균주 CCARM 3090, 3091, 3095, 3102, DPS-1, 2에서 1.9~1,000 μ g/mL의 MIC 결과 값이 나타났다(Table II).

JYS와 항생제 병용투여에 의한 약물병용 효과 – JYS와 항생제의 synergy 효과를 확인하기 위해 checkerboard assay를 실시한 결과, JYS과 AMP 병용시에는 ATCC 33591, CCARM 3090, DPS-1에서 synergy를 보였고, DPS-2에 대해서는 patial synergy를 보였다. JYS과 OXA 병용시에는 ATCC 33591, DPS-2에서 synergy를 보였고, CCARM 30390, DPS-1에서 synergy를 보였다. GT 병용 투여 시에는 ATCC 33591, CCARM 3090, DPS-1, DPS-2에 모두에서 GT의 억제농도를 크게 감소시켜 synergy를 보였다. AMK 투여시에는 ATCC 33591, DPS-1에서 synergy를 보였고, CCARM 3090, DPS-2에서 patial synergy를 보였다(Table III). 또한, JYS와 항생제(AMP, OXA, GT, AMK)를 병용 투여 시 시간에 따른 MRSA의 성장곡선을 측정된 결과 표준균주인 ATCC 33591(Fig. 1)과 임상균주 DPS-1(Fig. 2)에서 시간이 지남에 따라 균의 생장이 억제되었다.

MRSA에 대한 JYS의 세포막 투과성과 에너지 대사에의 영향 – JYS가 MRSA의 세포막 투과성과 에너지 대사에 미치는 영향을 확인하기 위해 균에 막 투과성 증진제인 TX-100과 ATPase 억제제(DCCD)를 이용하여 실험하였다. 세포막 투과성 실험에서 JYS 단독의 OD 600 값(1/4 MIC)과 비교하여 1/4 MIC JYS 및 0.001% TX-100의 존재 하에서 현

Table I. Primer used in this experiment

Primer	Sequence
<i>mecA</i>	F 5'-GCAATCGCTAAAGAATAAG-3' R 5'-AATGGGACCAACATAACCTA-3'
<i>blaR1</i>	F 5'-ACAATGAAGTAGAAGCCGATAGAT-3' R 5'-GTCGGTCAAGTCCAAACA-3'
<i>blaZ</i>	F 5'-AGAGATTTGCCTATGCTTCA-3' R 5'-AGTATCTCCTCTTTATTATTT-3'
<i>mecR1</i>	F 5'-ACACGACTTCTTCGGTTAG-3' R 5'-GTACATTTGGGATTTCACT-3'
<i>16s rRNA</i>	F 5'-GTTATTAGGGAAGAACATATGTG-3' R 5'-CCACCTTCCTCCGGTTTGTCAACC-3'

Table II. The MIC of JYS against MRSA

Strains	MIC ($\mu\text{g/mL}$)				
	JYS	AMP	OXA	GT	AMK
ATCC 33591	62.5	62.5	125	1.9	31.3
CCARM 3090	125	31.3	125	125	62.5
CCARM 3091	125	31.3	1,000	62.5	31.3
CCARM 3095	62.5	15.6	250	62.5	62.5
CCARM 3102	62.5	15.6	125	1,000	62.5
DPS-1	125	31.3	500	125	31.3
DPS-2	62.5	500	1000	250	31.3

MIC; minimal inhibitory concentration; JYS, *JiYu-San*; MRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; MSSA, methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*; AMP, ampicillin; OXA, oxacillin; GT, gentamicin, AMK, amikacin. Values represent the average of three independent experiments.

Table III. The MIC value of antibiotic and synergistic effect of JYS combined with antibiotics

Antibiotics		AMP	OXA	GT	AMK
		MIC ($\mu\text{g/mL}$)	FICI	Outcome	MIC ($\mu\text{g/mL}$)
ATCC 33591	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	15.6	250	0.9	7.8
	FICI	0.5	0.5	0.5	0.5
	Outcome	Synergy	Synergy	Synergy	Synergy
CCARM 3090	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	7.8	62.5	7.8	7.8
	FICI	0.5	0.63	0.25	0.75
	Outcome	Synergy	Partial S.	Synergy	Partial S.
DPS-1	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	7.8	250	15.6	7.8
	FICI	0.5	0.75	0.5	0.5
	Outcome	Synergy	Partial S.	Synergy	Synergy
DPS-2	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	250	250	7.8	7.8
	FICI	0.75	0.38	0.38	0.75
	Outcome	Partial S.	Synergy	Synergy	Partial S.

JYS, *JiYu-San*; MIC; minimal inhibitory concentration; *S. aureus*, *Staphylococcus aureus*; AMP, Ampicillin; OXA, oxacillin; GT, gentamicin; AMK, amikacin. FICI, fractional inhibitory concentration index; Partial S., partial synergy. Index interpretation: <0.5 , synergy; $0.5-0.75$, partial synergy; $0.75-1$, additive effect; $1-4$, no effect; and >4 , antagonism. Values represent the average of three independent experiments. ATCC 33591 was obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). CCARM 3090 strains were provided by the Culture Collection of Antimicrobial Resistant Microbes (National Research Resource Bank, Seoul, Korea). The clinical MRSA isolates DPS-1 and DPS-2 were obtained from patients at the Wonkwang University Hospital (Jeonbuk, Korea).

탁액의 OD 600 값은 43.6% 감소했다(Fig. 3a). DCCD를 이용하여 실험에서는 MRSA는 단독으로 JYS(1/8 MIC) 또는 62.5 $\mu\text{g/mL}$ DCCD의 존재 하에서 생존 가능하였다. 그러나, JYS와 DCCD를 병용 투여 하였을 때는 MRSA 생장이 억제되어 53.7%의 생존을 감소가 나타났다(Fig. 3b).

PBP2a의 발현에서 JYS의 억제효과 - JYS가 MRSA의 내성을 유전자를 조절하는지 알아보기 위해, 내성 단백질인 PBP2a 발현을 확인하였다. 특히, MRSA는 β -lactam 항생제에 대해 강한 내성을 가지고 있으며, JYS와 병용 시 두 항생제의 항균활성에 필요한 최소농도가 감소하는 것을 확인하였다. 이는 JYS가 MRSA의 내성에 영향을 줄것이라 예측

하고, western blot을 수행하여 MRSA의 β -lactam 내성에 관여하는 protein인 PBP2a의 발현을 확인하였다. 그 결과, 표준균주인 ATCC 33591에 JYS 처리하였을 때, PBP2a의 발현이 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보였다(Fig. 4).

β -lactam resistance 관련 mRNA 발현에 대한 JYS의 효과 - JYS가 MRSA의 베타락탐 항생제의 내성에 관여하는 mRNA의 발현에 미치는 영향을 보기 위해 qRT-PCR을 실시한 결과, 각 PBP2a와 β -lactamase의 생성에 관여하는 mRNA인 *mecA*, *blaR1*, *blaZ*, *mecR1*의 발현이 JYS를 처리하였을 때 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

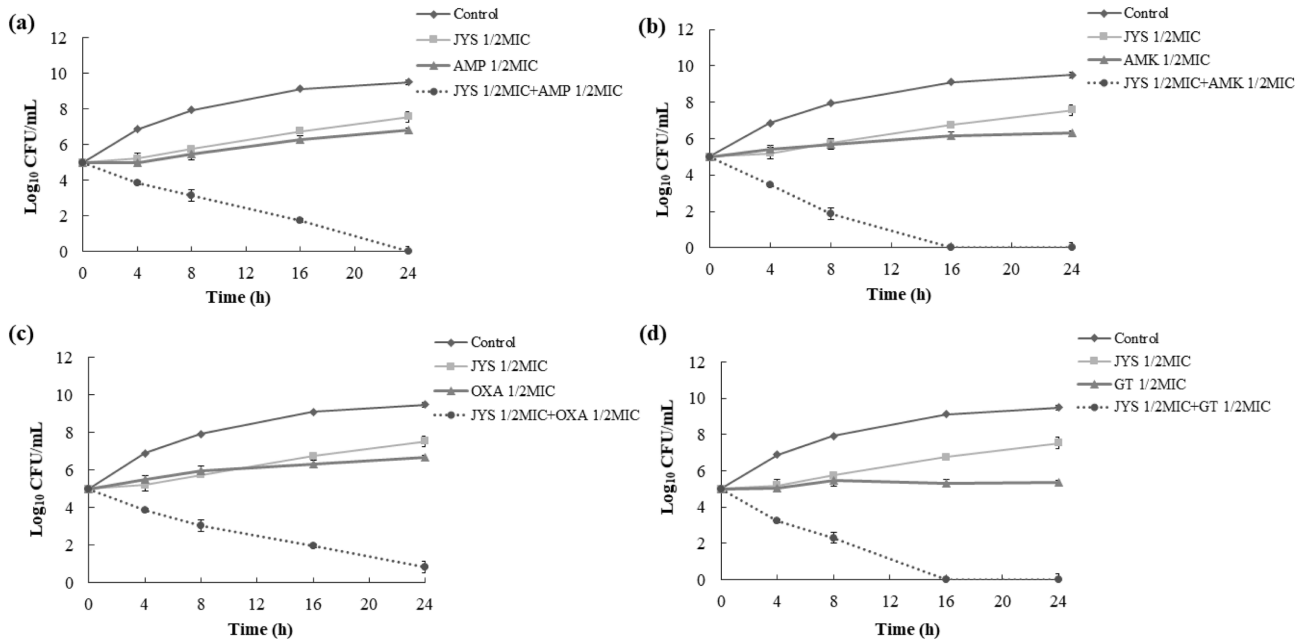


Fig. 1. Time-kill curves of the synergistic effect of JYS in combination with 4 conventional antibiotics at sub-inhibitory concentrations against MRSA (ATCC 33591). (a) AMP, Ampicillin; (b) OXA, oxacillin; (c) GT, gentamicin; (d) AMK, amikacin. JYS, *JiYu-san*; CFU, colony-forming units; MIC, minimum inhibitory concentration.

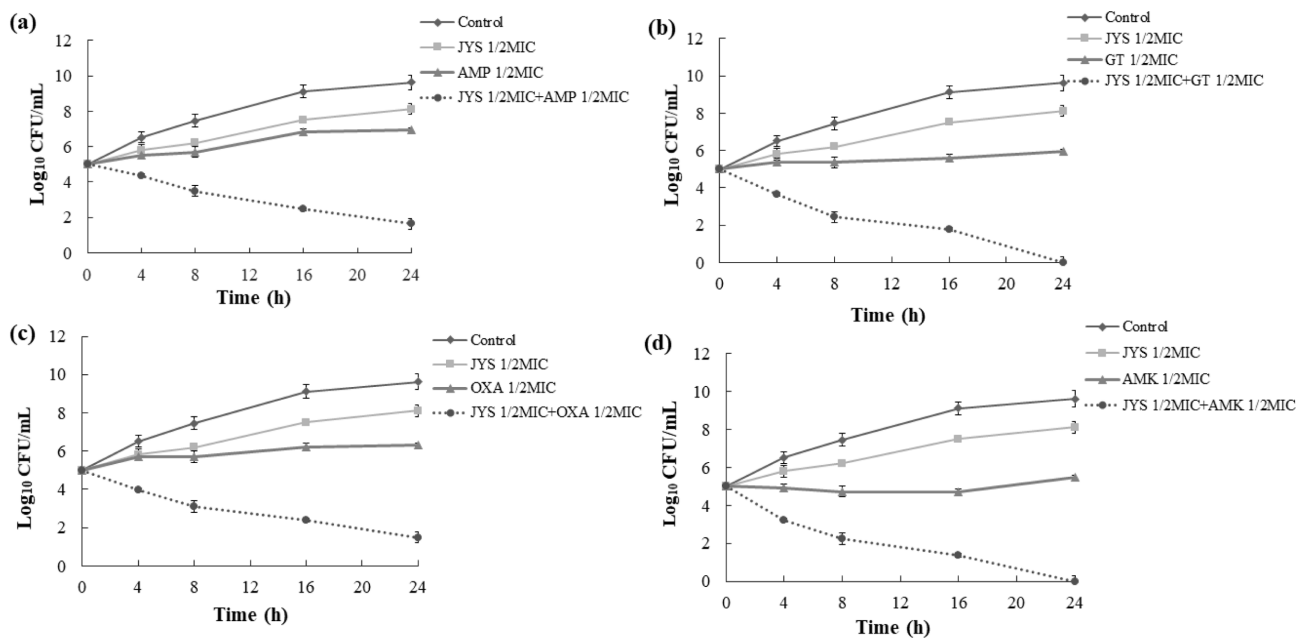


Fig. 2. Time-kill curves of the synergistic effect of JYS in combination with 4 conventional antibiotics at sub-inhibitory concentrations against MRSA (DPS-1). (a) AMP, Ampicillin; (b) OXA, oxacillin; (c) GT, gentamicin; (d) AMK, amikacin; JYS, *JiYu-san*; CFU, colony-forming units; MIC, minimum inhibitory concentration.

고찰

본 연구에서는 MRSA에 대한 지유산 에탄올추출물(JYS)의 항균활성과 항생제 내성 기전을 알아보는 실험을 실시 하

였다. 지유산(地榆散)은 지유(地榆)와 권백(卷柏)으로 구성된 처방으로 동의보감에 오래된 하혈에 효과가 있음이 명시되어있다.¹³⁾ 또한, 이전 연구에서는 지유에서 분리한 sanguisorbinin이 MRSA에 대한 항균활성과 항생제와 시

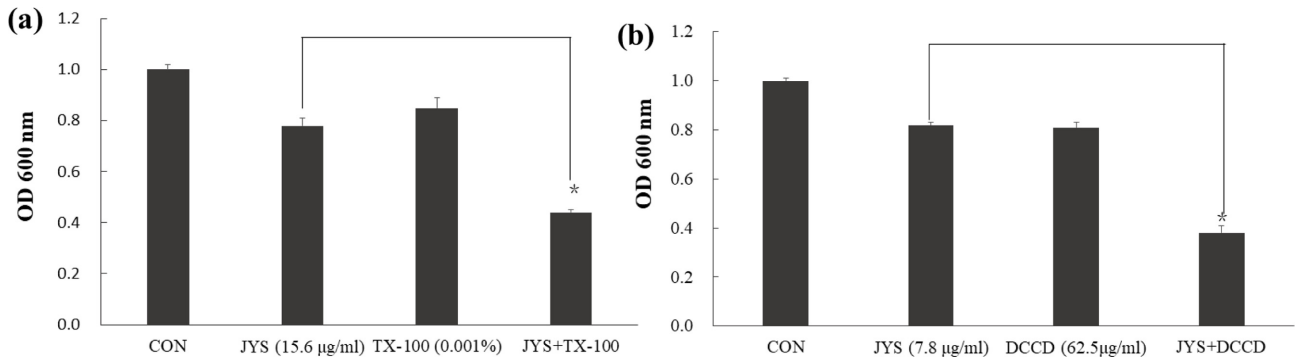


Fig. 3. The effect of membrane-permeabilizing agents and ATPase inhibitors on the susceptibility of MRSA (ATCC 33591) to JYS. Bacterial viability was determined by absorbance at 600 nm after incubation for 24 h with JYS concentrations of 15.6 µg/mL JYS in the presence of 0.001% TX-100 (a) and 7.8 µg/mL JYS in the presence of 62.5 µg DCCD (b). The data were presented as the mean ± standard deviation of the three independent experiments. *represents $p < 0.05$. CON, untreated control MRSA; DCCD, N,N'-dicyclohexylcarbodiimide; TX-100, Triton X-100; OD 600, optical density at 600 nm.

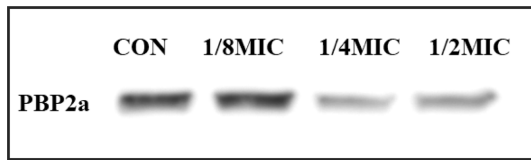


Fig. 4. Effect of JYS at sub-concentrations on the expression of penicillin-binding protein 2a (PBP2a) in MRSA (ATCC 33591). CON, the control was treated without TCA; PBP2a production after treatment with TCA at 1/8 MIC, 1/4 MIC, and 1/2 MIC, respectively.

너지 효과가 있음이 밝혀졌다.²⁵⁾ 따라서 세균감염을 일으키는 대표적인 그람양성균인 MRSA에 대한 JYS의 항균작용을 알아보기 위해 MIC를 측정하였다. 그 결과 MRSA 표준균주인 ATCC 33591와 임상균주인 CCARM 3090, 3091, 3095, 3102, DPS-1, 2에서 1.9~1,000 µg/mL의 MIC 결과가 나타났다(Table II). 이러한 결과는 JYS가 MRSA에 대하여 항균 활성이 있음을 확인한 결과이고, 이러한 항균 활성의 결과는 지유의 역할이 크다는 것을 짐작할 수 있었다. JYS와

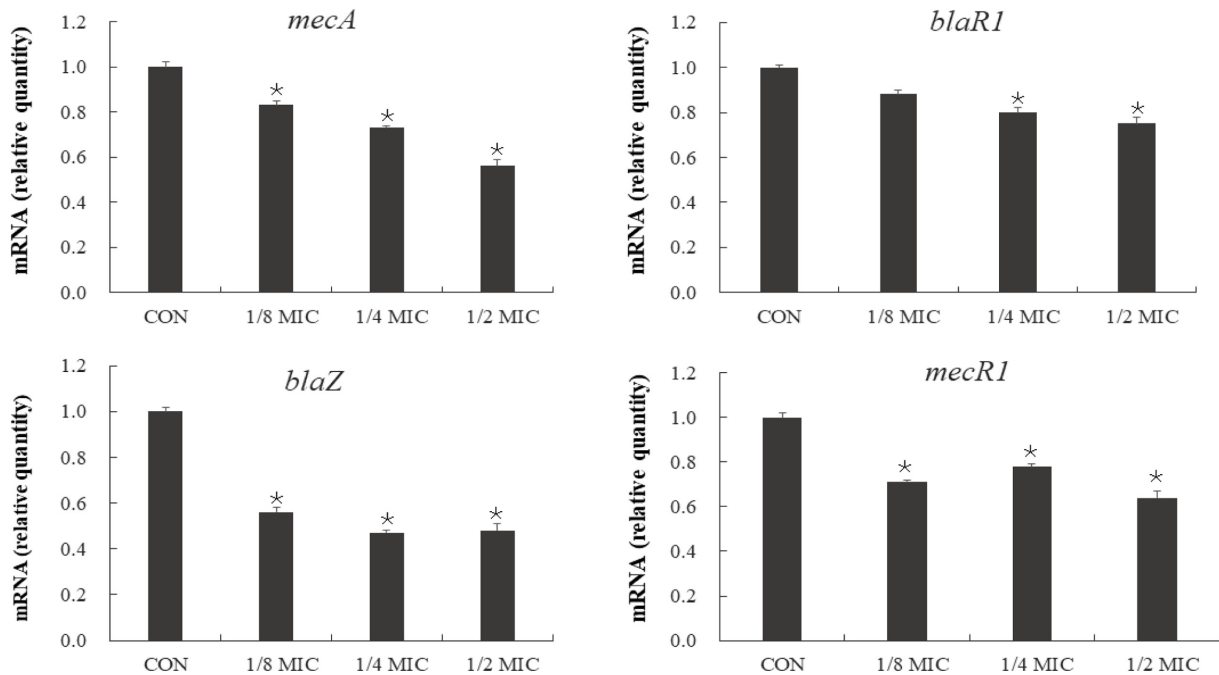


Fig. 5. The expression of *mecA*, *mecR1*, and *mecI* in MRSA (ATCC 33591) cultures in the presence of sub-concentrations of JYS. The relative gene expression of *mecA*, *mecR1*, and *mecI* was reduced in a dose-dependent manner. The data were presented as the mean ± standard deviation of the three independent experiments. *represents $p < 0.05$.

항생제와의 synergy 효과를 확인하기 위해 checkerboard assay를 실시한 결과에서는, AMP, OXA, GT, AMK 병용시에 ATCC 33591, CCARM 3090, DPS-1, DPS-2 모든 균주에서 synergy 또는 partial synergy를 보였다(Table III).

JYS와 항생제(AMP, OXA, GT, AMK)를 병용 투여 시 시간에 따른 MRSA의 성장곡선을 측정된 결과 표준균주인 ATCC 33591(Fig. 1)과 임상균주 DPS-1(Fig. 2)에서 시간이 지남에 따라 균의 생장이 억제되었다. 이 결과는 JYS가 MRSA의 내성을 극복하고 항생제가 항균활성을 나타내는데, 큰 영향을 준다는 것을 나타내는 것이다. JYS가 MRSA의 막 투과성에 미치는 영향을 확인하기 위해 균에 막 투과성 증진제인 TX-100과 JYS를 단독 또는 병용투여하여 항균 활성의 영향을 실험하였다. 그 결과 JYS 단독의 OD 600 값(1/4 MIC)과 비교하여 1/4 MIC JYS 및 0.001% TX-100의 존재 하에서 현탁액의 OD 600 값은 43.6% 감소했다(Fig. 3a). 이에 JYS와 세포막 투과에 영향을 주는 약물과 병용 시 상승효과를 보일 수 있다는 것을 알 수 있었다. Fig. 3b에서 MRSA균주에서 JYS가 에너지 대사에 영향을 주는 ATPase 억제제(DCCD)를 이용하여 실험하였다. 그 결과, MRSA는 단독으로 JYS(1/8 MIC) 또는 62.5 µg/mL DCCD의 존재 하에서 생존 가능하였다. 그러나, JYS와 DCCD를 병용 투여 하였을 때는 균 생장이 억제되어 53.7%의 생존을 감소가 나타났다. 이는 JYS가 ATPase inhibitor 역할을 하는 약물과도 좋은 시너지를 보일 수 있다는 것을 의미한다.

또한, PBP2a는 베타락탐계 항생제의 대표적인 내성 단백질 조절 인자로 PBP2a의 발현은 MRSA의 활성과 밀접히 연관되어 있다.^{26,27)} PBP2a의 발현은 MRSA의 세포외벽에 위치한 MecR1이 외부 독성 물질을 감지하여 세포 내에서의 신호전달 과정을 거쳐 staphylococcal chromosome cassette mec(SCCmec)에 위치한 mecA의 전사를 유도하며, mecA의 전사는 같은 SCCmec에 위치한 mecI의 전사에 의해 조절 된다.²⁸⁻³⁰⁾ 따라서 JYS가 MRSA의 내성을 유전자를 조절하는지 알아보기 위해, PBP2a 발현을 확인하였다. 특히, MRSA는 β-lactam 항생제에 대해 강한 내성을 가지고 있으며, JYS와 병용 시 두 항생제의 항균활성에 필요한 최소농도가 감소하는 것을 확인하였다. 이는 JYS가 MRSA의 내성에 영향을 줄 것이라 추측하고, western blot을 수행하여 MRSA의 β-lactam 내성에 관여하는 protein인 PBP2a의 발현을 확인하였다. 그 결과, 표준균주인 ATCC 33591에 JYS 처리하였을 때, PBP2a의 발현이 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보였다(Fig. 4). 이는 JYS가 MRSA의 β-lactam 항생제 내성에 중요한 인자인 PBP2a의 발현을 감소시키는 데에 영향을 주었고, 그로 인해 JYS와 β-lactam 항생제 사이에 synergy 효과가 나타났을 것으로 보인다. 내성과 관련된 PBP2a의 발현은 mecA 유전자에 의해 암호화되며, mecA 유전자의 발현은 mecI-mecR1 조절 시스템에 의해 조

절된다.^{31,32)} JYS의 낮은 농도로의 처리에서도 MRSA에 대한 항균작용을 나타냈다. 따라서 JYS가 MRSA의 베타락탐 항생제의 내성에 관여하는 mRNA의 발현에 미치는 영향을 보기 위해 qRT-PCR을 실시하였다. 그 결과, 각 PBP2a와 β-lactamase의 생성에 관여하는 mRNA인 mecA, blaR1, blaZ, mecRI의 발현이 JYS를 처리하였을 때 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5). 이는 JYS가 MRSA의 내성 관련 mRNA의 전사에 영향을 주었고, 그로 인해 PBP2a와 같은 주요 내성인자의 발현의 억제에 기여하였다는 것을 확인할 수 있었다. MRSA의 항생제 내성에 대한 JYS의 억제효과는 MRSA의 β-lactam 항생제에 대한 감수성을 증대시켰고, 이로 인해 β-lactam계 항생제의 항균활성을 증대시키는 효과를 가져왔을 것으로 사료 된다.

결 론

위 실험 결과를 종합할 때 JYS는 MRSA에 대하여 항균 활성을 가지고 있으며, 항생제인 AMP, OXA, GT, AMK와 병용 시 상승효과가 있음을 확인할 수 있었다. 이는 세포막 투과에 영향을 주는 약물 또는 ATPase inhibitor 역할을 하는 약물과 병용 시 좋은 시너지를 보일 수 있다는 것을 의미한다. 그리고 JYS와 β-lactam계 항생제와 상승효과가 나타나는 데에는 JYS가 MRSA의 항생제 내성 유전자를 억제함으로써 나타나는 것으로 사료 된다. 이는 JYS가 향후 MRSA의 감염증을 치료하는데 있어 유효한 후보물질이 될 수 있음을 시사한다.

사 사

이 논문은 한국연구재단의 이공분야기초연구사업(NRF-2021R111A1A01058728)과 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. 2020R1F1A1054227).

인용문헌

1. Livornese Jr, L. L., Dias, S., Samel, C., Romanowaki, B., Taylor, S., May, P., Pitsakis, P., Woods, G., Kaye, D., Levison, M. E. and Johnson, C. C. (1992) Hospital-acquired infection with vancomycin-resistant *enterococcus faecium* transmitted by electronic thermometers. *Ann. Intern. Med.* **15**: 112-116.
2. Holmes, Ne., Turnidge, J. D., Munckhof, W. J., Munckhof, W. J., Roinson, J. O., Korman, T. M., O'Sullivan, M. V., Anderson, T. L., Roberts, S. A., Warren, S. J. and Johnson, P. D. (2013) Vancomycin AUC/MIC ratio and 30-day mortality in patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Antimicrob. Agents Chemother.* **18**: 1654-1663.

3. Lee, J. W., Ji, Y. J., Yu, M. H., Im, H. G., Hwangbo, M. H. and Lee, I. S. (2005) Antimicrobial effect of extract of *Glycyrrhiza uralensis* on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **37**: 456-464.
4. Shin, I. S., Kang, O. H., Joung, D. K., Kang, H. J., Kim, J. E., Hwang, H. C., Kim, I. W. and Kwon, D. Y. (2013) Antibacterial effect of Sinhyowoldosan against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Kor. J. Herbology* **28**: 59-64.
5. Kim, K. H., Park, C. S., Chang, J. H., Kim, N. S., Lee, J. S., Choi, B. R., Lee, B. R., Lee, K. D., Kim, S. M. and Yeom, S. A. (2010) Association between prophylactic antibiotic use and surgical site infection based on quality assessment data in Korea. *J. Prev. Med. Public Health* **43**: 235-244.
6. Park, E. J., Chae, S. M., Kim, N. J., Song, J. H., Woo, J. H., Cheong, H. S. and Lee, E. K. (2007) Analysis of economic outcomes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) bacteremia using retrospective case-control study. *Korean J. Clin. Pharm.* **17**: 59-64.
7. Im, D. Y. and Lee, K. I. (2011) Antioxidative and antibacterial activity and tyrosinase inhibitory activity of the extract and fractions from *Taraxacum coreanum* Nakai. *Korean J. Medicinal Crop. Sci.* **19**: 238-245.
8. Kim, K. J., Yu, H. H., Cha, J. D., Deo, S. J., Choi, N. Y. and You, Y. O. (2005) Antibacterial activity of *Curcuma longa* L. against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytother. Res.* **19**: 599-604.
9. Saad, A., Fadli, M., Bouaziz, M., Benharref, A., Mezrioui, N. E. and Hassani, L. (2010) Anticandidal activity of the essential oils of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* and their synergism with amphotericin B and fluconazol. *Phytomedicine* **17**: 1057-1060.
10. Etefagh, K. A., Burns, J. T., Junio, H. A., Kaatz, G. W. and Cech, N. B. (2011) Goldenseal (*Hydrastis canadensis* L.) extracts synergistically enhance the antibacterial activity of berberine via efflux pump inhibition. *Planta Med.* **77**: 835-840.
11. Yoon, J. I., Bajpai, V. K. and Kang, S. C. (2011) Synergistic effect of nisin and cone essential oil of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu against *Listeria monocytogenes* in milk samples. *Food Chem. Toxicol.* **49**: 109-114.
12. Taleghani, A., Emami, S. A. and Tayarani-Najaran, Z. (2020). Artemisia: a promising plant for the treatment of cancer. *Bio-org. Med. Chem.* **28**: 115180.
13. 조현영, 김동일 외 10인 공저 (2005) 동의보감(東醫寶鑑) 내경 외형편, 여강출판사, p 181.
14. Son, K. J., Lee, S. A., Lee, G. D., Kim, Y. S., Jeon, J. G. and Chang, K. Y. (2004) Effects of crude *Sanguisorba officinalis* L. extract on the growth and the adherence to hydroxyapatite beads of mutans streptococci. *J. Korean Acad. Oral Health* **28**: 97-104.
15. Tanaka, T., Nonaka, G. and Nishioka, I. (1983) 7-O-Galloyl-(+)-catechin and 3-O-galloylprocyanidin B-3 from *Sanguisorba officinalis*. *Phytochemistry* **22**: 2575-2578.
16. Nonaka, G., Tanaka, T. and Nishioka, I. (1982) Tannins and related compounds. Part 3. A new phenolic acid, sanguisorbic acid dilactone and three new ellagitannins, sanguins H-1, H-2, and H-3, from *Sanguisorba officinalis*. *J. Chem. Soc. Perkin Translation* **4**: 1067-1777.
17. Ban, J. Y., Cho, So., Jeon, S. Y., Song, K. S., Bae, K. H. and Seong, Y. H. (2005) Protective effect of *Sanguisorba officinalis* L. root on amyloid β protein (25-35)-induced neuronal cell damage in cultured rat cortical neuron. *Korean J. Medicinal Crop. sci.* **13**: 219-448.
18. Goun, E. A., Petrichenko, V. M., Solodnikov, S. U., Suhinina, T. V., Kline, M. A., Cunningham, G., Nguyen, C. and Miles, H. (2002) Anticancer and antithrombin activity of Russian Plants. *J. Ethnopharmacol.* **81**: 337-342.
19. Hwang, S. Y., Kim, M. H., Kang, J. S. and Kim, B. S. (2014) Study of immunosuppressive activity and insulin secretion by treated *Sanguisorba officinalis*. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* **28**: 499-505.
20. Kim, S. H., Kim, D. K., Eom, D. O., Kim, S. Y., Kim, S. H. and Shin, T. Y. (2002) *Sanguisorba officinalis* inhibits immediate type allergic reactions. *Nat. Prod. Sci.* **8**: 177-182.
21. Kim, S. R., Won, J. H. and Kim, M. R. (2011) Antimicrobial activity against food hazardous microorganisms and antimutagenicity against Salmonella serotype Typhimurium TA100 of an ethanol extract from *Sanguisorba officinalis* L. *Korean J. Food Cook Sci.* **27**: 17-26.
22. Park, G. H., Lee, J.T. and An, B. J. (2012) Anti-microbial effect on *Streptococcus mutans* and anti-oxidant effect of the butanol fractions of *Sanguisorbae Radix*. *Kor. J. Herbology* **27**: 23-29.
23. Yang, S. F., Chu, S. C., Liu, S. J., Chen, Y. C., Chang, Y. Z. and Hsieh, Y. S. (2007) Antimetastatic activities of *Selaginella tamariscina* (Beauv.) on lung cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *J. Ethnopharmacol.* **110**: 483-489.
24. Shin, D. I. and Kim, J. (1991) Flavonoid constituents of *Selaginella tamariscina*, *Kor. J. Pharmacogn.* **22**: 207.
25. Wang, S., Luo, J., Liu, X. Q., Kang, O. H. and Kwon, D. Y. (2021) Antibacterial activity and synergy of antibiotics with sanguisorbigenin isolated from *Sanguisorba officinalis* L. against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lett. Appl. Microbiol.* **72**: 238-244.
26. Hui, J., Dong, P. T., Liang, L., Mandal, T., Li, J., Ulloa, E. R., Zhan, Y. and Jusuf, S. (2020) Photo-disassembly of membrane microdomains revives conventional antibiotics against MRSA. *Adv. Sci. (Weinh)*. **7**: 1903117.
27. Belluzo, B. S., Abriata, L. A. and Giannini, E. (2019) An experiment-informed signal transduction model for the role of the *Staphylococcus aureus* MecR1 protein in β -lactam resistance. *Sci. Rep.* **9**: 19558.
28. Moosavian, M., Dehkordi, P. B. and Hashemzadeh, M. (2020) Characterization of SCCmec, Spa types and multidrug

- resistant of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Ahvaz, Iran. *Infect. Drug Resist.* **13**: 1033-1044.
29. Kosowska-Shick, K., McGhee, P. L. and Appelbaum, P. C. (2010) Affinity of ceftaroline and other beta-lactams for penicillin-binding proteins from *staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**: 1670-1677.
30. Najjar-Peerayeh, S., Jazayeri Moghadas, A. and Behmanesh, M. (2014) Antibiotic susceptibility and mecA frequency in *Staphylococcus epidermidis*, isolated from intensive care unit patients. *Jundishapur J. Microbiol.* **7**: e11188.
31. Karauzum, H., Chen, G., Abaandou, L., Mahmoudieh, M., Boroun, A. R., Shulenin, S., Devi, V.S., Stavale, E., Warfield, K. L., Zeitlin, L., Roy, C. J., Sidhu, S. S. and Aman, M. J. (2012) Synthetic human monoclonal antibodies toward staphylococcal enterotoxin B (SEB) protective against toxic shock syndrome. *J. Biol. Chem.* **287**: 25203-25211.
32. Leng, B. F., Qiu, J. Z., Dai, X. H., Dong, J., Wang, J. F., Luo, M. J., Li, H. E., Niu, X. D., Zhang, Y., Ai, Y. X. and Deng, X. M. (2011) Allicin reduces the production of α -toxin by *Staphylococcus aureus*. *Molecules* **16**: 7958-7968.
- (2022. 5. 31 접수; 2022. 6. 16 심사;
2022. 6. 24 게재확정)