

MRSA에 대한 작약감초탕과 항생제 병용투여의 항균활성에 관한 연구

강담희¹ · 강옥화¹ · 채희성² · 권동렬^{1*}

¹원광대학교 한약학과, 원광한약연구소

²미시시피대학교 약학대학, 국립 천연물 연구 센터

A Study on the Antibacterial Activity of Combined Administration of Jakyakgamcho-tang and Antibiotics Against MRSA

Dam Hee Kang¹, Ok Hwa Kang¹, Hee-Sung Chae², and Dong Yeul Kwon^{1*}

¹Department of Oriental Pharmacy, Wonkwang University College of Pharmacy and Wonkwang Oriental Medicines Research Institute, Wonkwang University, Iksan, Jeonbuk 54538, Korea

²National Center for Natural Products Research, School of Pharmacy, The University of Mississippi, Oxford, MS 38677, 10 USA

Abstract – MRSA is *Staphylococcus aureus* resistant to β -lactam antibiotics, and is a worldwide infectious disease. Even with the discovery of new antibiotics, resistance develops rapidly, so new alternatives are needed. Jakyakgamcho-tang (JGT) is a combination of Jakyak and Gamcho, and has been mainly used as an antispasmodic and analgesic in oriental medicine. This study was conducted to find out whether there is an effect on MRSA in relation to the anti-inflammatory effect of JGT and the antibacterial effect of Jakyak and Gamcho found in previous studies. In this study, in order to investigate the antibacterial activity of JGT and the combined effect of existing antibiotics, after extracting JGT with 70% EtoH, the disc diffusion method, minimum inhibitory concentration (MIC), drug combination effect (FICI), and time-kill analysis (Time-kill assay), metabolic inhibition, Western blot and qRT-PCR analysis were used to confirm the antibacterial activity mechanism of MRSA of JGT. As a result of the experiment, all of MRSA showed antibacterial activity in JGT's disc diffusion method, and the MIC was 250 -1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. When existing antibiotics and JGT were combined with drugs, most had synergy or partial synergy. In addition, it was confirmed that the degree of bacterial growth was suppressed over time when simultaneous administration for 24 hours. JGT showed a synergistic effect when administered together with the ATPase-inhibitor DCCD, suggesting that it affected the inhibition of ATPase. As a result of observing the expression of PBP2a, and hla protein in the JGT-treated group and the untreated control group through western blot, it was confirmed that the protein expression of the JGT-treated group was significantly suppressed, and the expression levels of *mecA*, *mecR1* and *hla* genes were also suppressed during JGT treatment. was observed by qRT-PCR. Combining the results of the experiment, it can be seen that JGT has antibacterial activity in MRSA, and when combined with existing antibiotics, the effect was increased compared to treatment with the drug alone. This suggests that JGT can be an alternative to treatment for antibiotic resistance of MRSA.

Keywords – Jakyakgamcho-tang, MRSA, Antibacterial activity, Resistance, Synergy effect

황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)은 1 μm 크기를 가진 포도상구균과에 속하는 그람양성균이다. 황금색을 띄며 균이 모여있는 모습이 포도송이를 닮아 붙여진 이름이다.¹⁾ *S. aureus*는 건강한 사람도 보유하고 있는 병원체로 신체에서 분포하는 곳은 주로 피부, 비강 점막 및 모공이다. *S. aureus*는 인간 사회에서 감염을 일으키는 주된

원인 중 하나인데, 일반적으로 특별한 증상이 없이 공생하고 있다가 상처 부위를 통해 체내로 들어오게 되면서 문제를 일으킨다.^{2,3)} 체내로 들어온 *S. aureus*는 α -hemolysin (hla), staphylococcal enterotoxins (SEs)과 같은 세포외독소 만들어 낸다.^{4,5)} 특히, hla는 숙주 세포를 사멸시키거나 혈액에 침습하여 가벼운 피부 감염부터 괴사, 폐렴, 심내막염 등과 같은 심각한 질병을 야기하여 사망에 도달하게 만들기도 한다.^{6,7)}

*교신저자(E-mail): chaeheesung83@gmail.com
(Tel): +82-63-850-6802

재료 및 방법

실험재료 – 본 실험에서 사용된 작약감초탕(JGT)의 약재인 작약(芍藥)과 감초(甘草)는 대학 한약국(Iksan, Korea)에서 구입한 후, 전문가의 감정(권동렬 교수, 원광대)을 거쳐 후 사용하였으며, 표준품은 원광대학교 한약학과 본초학교실에 보관하고 있다(WK-22-007). 작약 15 g과 감초 15 g을 EtOH 500 mL로 3회 추출하고 감압 농축 후 동결건조 과정을 거쳐 약 12.3 g을 얻었다.

균주 및 배양 – 본 실험에서 사용된 MSSA, MRSA 균주는 ATCC 25923, ATCC 33591로 American Type Culture Collection(Manassas, VA, USA)에서 구입하였으며, CCARM 3090, CCARM 3091, CCARM 3095와 CCARM 3102는 Culture Collection of Antimicrobial Resistant Microbes(National Research Resource Bank, Seoul, Korea)에서 구입하였으며, DPS-1과 DPS-2의 경우 임상 균주로 원광대학교 병원 성형외과(Iksan, Korea)에서 MRSA 보균자로부터 채취하였다.

디스크 확산법(Disc diffusion method) – Petri-dish에 고압 멸균시킨 MHA 혹은 BHIA를 각각 붓고 균희 후 균주를 고르게 도말 하였다. 모든 균주는 37 °C incubator에서 24시간 배양하였으며, 0.5 McFarland standard 탁도 기준으로 희석하여 Petri-dish에 도말하였을 때 final bacterial concentration이 1.5×10^6 CFU/mL이 되도록 하였다. 멸균된 Paper disc(6 mm)에 JGT 100, 200, 400 µg를 각 20 µL씩 주입하여 완전히 흡수시킨 후 균주가 도말된 petri-dish에 놓는다. 그 후, 37 °C incubator에서 24시간 배양시켜 paper disc(6 mm) 주위에 형성된 inhibition zone의 직경을 측정하였다.

최소억제농도(Minimum inhibitory concentration, MIC) – MIC는 액체 배지를 미량씩 희석하는 방법으로 측정하였다. 96-well plate에 JGT의 농도별로 실험하였으며, JGT의 initial concentration의 Final concentration이 1,000-250 µg/mL가 되도록 MHB 혹은 BHIB를 추가하여 serial two-fold dilutions 하였다. OXA의 initial concentration은 1,000 µg/mL이다. 여기에 균주는 0.5 McFarland standard 탁도 기준으로 희석하여 final bacterial concentration이 1.5×10^6 CFU/well이 되도록 하고 10µL씩 접종하였다. 그 후, 37 °C incubator에서 24시간 배양시켰다. 판독을 용이하게 하기 위하여 MTT 시약을 첨가하여 37 °C incubator에서 30분간 배양 후 색상의 변화가 없는 약물의 농도를 측정하였다.

약물병용효과(Fractional inhibitory concentration index, FICI) – JGT와 β -lactam계 항생제인 GEN, AMI, AMO, CEFO, CEFT 및 CHL의 약물병용효과는 checkerboard method에 따라 측정하였다. 96-well plate에 1 대 1 비율로 약물 처리하였으며, 항생제 10 µL에 MHB를 추가하여 serial two-fold dilutions 하였다. 다음으로, JGT는 각 well당

10 µL씩 접종하였다. 여기에 균주는 0.5 McFarland standard 탁도 기준으로 희석하여 final bacterial concentration이 1.5×10^6 CFU/well이 되도록 하여 10µL씩 접종하였다. 그 후, 37 °C incubator에서 24시간 배양시켰다. MTT 시약을 첨가하여 37 °C incubator에서 30분간 배양 후 약물병용효과를 측정하였다. 약물병용효과(FICI)의 산출 방법은 아래와 같다.

$$FICI = FIC_A + FIC_B = A/MIC_A + B/MIC_B$$

(MIC_A: 약물A의 MIC, MIC_B: 약물B의 MIC,

A: 약물B를 병용한 약물A의 농도, B: 약물A를 병용한 약물B의 농도)

FICI < 0.5, synergy; $0.5 \leq FICI < 0.75$, partial synergy;

$0.75 \leq FICI < 1.0$, additive effect; $1.0 \leq FICI < 4.0$, no synergy;

FICI > 4.0, antagonism.

타임킬 분석법(Time-kill curve assay) – JGT와 AMI의 병용에 따른 균의 성장 정도를 알아보기 위해 타임킬 분석법을 시행하였다. 타임킬 분석법은 0시간, 4시간, 8시간, 16시간 및 24시간 총 5번의 간격을 두고 균 성장곡선을 측정하였다. 실험은 5가지 투여군으로 MHB에 균만 접종한 Control, JGT 1/2MIC와 AMI 1/2MIC 단독 투여 군, JGT 1/2MIC와 AMI 1/2MIC 병용투여 군, JGT 3/4MIC와 AMI 1/2MIC 병용투여 군으로 나누어 진행하였다. Final bacterial concentration이 1.5×10^6 CFU/well 되도록 균을 접종하였으며, 37 °C incubator에서 24시간 배양한 후 MHB로 희석하였다. 다음으로 약물이 없는 MHA plate에 도말한 후 생존 가능한 Colony를 계산하였다. 약물 처리했을 때 균의 농도(CFU/mL)가 log₁₀ CFU/mL 이하가 될 경우 살균된다는 것을 의미한다.

Metabolic inhibition – JGT와 ATPase-inhibitor인 DCCD를 투여하여 ATCC 33591에서 대사를 어느 정도 억제할 수 있는지 알아보기 위하여 checkerboard method에 따라 측정하였다. 96-well plate에 1 대 1 비율로 약물 처리하였으며, 항생제 10 µL에 MHB 혹은 BHIB를 추가하여 serial two-fold dilutions 하였다. 다음으로, JGT는 각 well당 10 µL씩 접종하였다. Final bacterial concentration이 1.5×10^6 CFU/well 되도록 균을 접종한 후 37 °C incubator에서 24시간 배양한다. 결과는 OD 600 nm에서 판독하였다.

Western blot 분석법 – JGT가 MRSA에 대한 단백질 억제 정도를 확인하기 위하여 western blot 분석을 실시하였다. ATCC 33591의 단백질을 추출하기 위해 ATCC 33591을 MHB에 희석하여 OD600 값을 0.5로 맞춘 후, 1/8, 1/4, 1/2 MIC 농도의 JGT를 각각 처리한다. 37 °C incubator에서 30분간 배양한 다음 원심분리(13,000 rpm, 1분) 한다. SMART™ Bacterial Protein Extraction Solution(iNtRON Biotechnology Inc.; Seongnam, Korea)을 사용해 충분히 1시간 동안 ice에서 용해한 후 10분 동안 vortexing 이후 원심분리(13,000 rpm,

10분) 하여 단백질을 추출한다. 이어서 단백질 정량 프로토콜에 따라 추출된 단백질 시료를 정량하고 정량화된 시료를 SDS 겔로 전기영동한다. 전기영동 한 겔은 polyvinylidene difluoride(PVDF, Millipore, Bedford, MA, USA) membrane으로 15V로 1시간 동안 이송한다. Membrane은 1시간 동안 5% skim milk로 차단하고 4 °C에서 1차 항체를 밤새 부착하였다. 그 후 TBST에서 여러 번 세척한 후 2차 항체를 실온에서 1시간 동안 부착하였다. 세척된 membrane은 Atto ECL plus(Tokyo, Japan)을 사용하여 단백질을 검출하였다. ImageQuant LAS 4000 Mini Biomolecular Imager(GE Healthcare, UK)를 사용하여 밴드를 분석하였다.

Quantitative RT-PCR 분석법 – JGT의 mRNA의 발현 억제 정도를 확인하기 위하여 qRT-PCR 분석을 시행하였다. E.Z.N.A.[®] bacterial RNA Kit(OMEGA Bio-Tek, Norcross GA, USA)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 Total RNA를 추출한 후, QuantiTect[®] Reverse Transcription Kit (Qiagen, Seoul, Korea)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. Power SYBR[®]Green PCR master mix(Applied Biosystems, Massachusetts, USA)를 사용하여 나온 결과물은 Step One Plus Real-Time RT-PCR System(Applied Biosystems, France)으로 값을 확인 후, 16S의 발현량을 표준으로 상대 발현량을 확인하였다.

투과 전자 현미경(TEM) – MRSA 균주 ATCC 33591에 JGT를 1/2 MIC, 2 MIC로 처리하였을 때 형태학적 변화를 알아보기 위해 TEM 분석을 실시하였다. MRSA가 Mid-logarithmic phase에 도달할 때까지 37 °C incubator에서 배양하였다. 배양한 MRSA는 MHB로 희석하였으며 1/2 MIC, 2 MIC로 30분간 약물 처리 후 원심분리(13,000 rpm, 10분) 하였다. 상등액을 제거 후 모인 pellet을 세척하고 2% paraformaldehyde와 2% glutaraldehyde로 4 °C에서 2시간 동안 1차 고정하였다. 다음으로 0.05 M Sodium cacodylate buffer(pH 7.2)로 4 °C에서 10분 세척한 후 1% OsO₄로 1.5 시간 동안 2차 고정하였다. 실온에서 2번 멸균 증류수로 세척한 후 0.5% uranyl acetate로 4 °C에서 30분간 en bloc staining 하고 농도별 EtOH로 탈수 시켰다. 마지막으로 100% propylene oxide와 Embed 812 resin mixture (1:1 2시간, 1:3 24시간, 0:1 2시간)를 사용하여 침윤시킨다. 만들어진 시료는 60 °C에서 48시간 동안 중합하고, ultramicrotome으로 절단한다. 그 후, 2% uranyl acetate과 Reynold's lead citate로 각 7분간 staining 하였다. Energy-filtering transmission electron microscope(LIBRA 120; Carl Zeiss GmbH, Oberkochen, Germany)을 사용하여 120kV에서 시료를 관찰하였다. 전자 현미경에 부착된 4k × 4k slow-scan charge-coupled device camera(Ultrascan 4000 SP; Gatan, Pleasanton, CA, USA)를 사용하여 전송된 전자신호를 기록하였다.

통계분석 – 모든 실험은 3회 이상 반복으로 이루어졌으며,

실험 결과는 각 항목에 따라 평균±표준편차(SEM)를 구하여 그 유의성은 student's t-test(SPSS, ver.19) 분석법을 이용하여 신뢰수준 95%($p < 0.05$)에서 통계적 유의차를 평가하였다.

결 과

JGT의 항균 활성 – JGT의 MSSA, MRSA 균주에 대한 항균 활성을 확인하기 위해 디스크 확산법을 실시하였다. 균주 8개에 대해 JGT 100, 200, 400 µg을 처리 하였을 때 모든 균주에서 inhibition zone을 확인하였으며, inhibition zone은 농도 의존적으로 증가함을 알 수 있다. 특히, DPS-1, DPS-2 균주에서는 JGT 400 µg 처리했을 때 inhibition zone이 14 mm 정도로 유의미한 효과가 나타났으며, 8개 균주 모두 대한 약물 감수성이 있음을 알 수 있다(Table I).

JGT와 Oxacillin(OXA)의 MIC 값 – JGT의 MSSA, MRSA 균주의 성장 억제에 필요한 최소한의 농도를 알아보기 위해 MIC를 측정하였다. 균주 8개에 대해 JGT의 MIC는 250-1000 µg/mL로 나타났다. ATCC 25923, ATCC 33591, DPS-2, CCARM 3091에서는 MIC가 250 µg/mL로 적은 농도로도 효과가 나타났다. 특히, CCARM 3091의 경우 OXA의

Table I. Antimicrobial activity (as the inhibition zone diameter) of JGT against MSSA and MRSA (mm)

Strains	JGT (µg)		
	400	200	100
ATCC 25923	12	9	8
ATCC 33591	12	10	9
DPS-1	14	10	8
DPS-2	14	12	10
CCARM 3090	10	9	8
CCARM 3091	10	10	8
CCARM 3095	9	8	7
CCARM 3102	8	7	6

Table II. MIC values of JGT and OXA against MSSA and MRSA

Strains	MIC (µg/mL)	
	JGT	OXA
ATCC 25923	250	0.9
ATCC 33591	250	125
DPS-1	500	62.5
DPS-2	250	0.9
CCARM 3090	500	250
CCARM 3091	250	1000
CCARM 3095	1000	500
CCARM 3102	1000	250

MIC는 1000 µg/mL인데, JGT의 MIC는 250 µg/mL로 OXA 보다 효과가 높았다(Table II).

JGT와 항생제의 병용효과 - JGT와 GEN, AMI, AMO, AMO, CEFO, CEFT 및 CHL 6개의 β-lactam계 항생제의 병용효과를 측정한 결과, 표준균주(ATCC 33591)에서는 JGT와 GEN, AMI, AMO를 각각 병용투여 했을 때 synergy 효과(FICI < 0.5)가 있지만, JGT와 CEFO, CEFT, CHL을 각각 병용투여 했을 때는 효과가 없었다(FICI > 1). JGT와 AMI를 병용투여 했을 때 FICI 값이 0.24로 낮은 농도로도 synergy 효과를 나타내었다(Table II).

임상균주(DPS-1)에서는 모두 단독투여 보다 병용투여 했을 때 효과가 좋을 수 있다. JGT와 항생제 GEN, AMI, CHL를 각각 병용투여 했을 때 synergy 효과(FICI < 0.5)가 나타났다. 특히, JGT와 AMI의 병용투여 같은 경우에는 FICI 값이 0.18로 낮은 농도로도 synergy 효과를 나타내었다(Table IV).

JGT 처리에 따른 ATCC 33591과 DPS-1 균주의 생장 곡선 - FICI 값을 기반으로, 표준균주(ATCC 33591)와 임상균주(DPS-1)에 대한 JGT와 AMI의 시너지 효과가 특정 배양시간(0, 4, 8, 16 및 24시간)에 따라 균의 성장을 얼마나 억제하는지 로그식에 대입하여 측정하였다. JGT 1/2MIC, AMI 1/2MIC 단독투여는 약물을 투여하지 않은 control과 대조하였을 때 균의 성장을 미비하게 억제하였으나 시간이 지날수록 효과가 떨어져 24시간이 되었을 때 억제 효과가 거의 없음을 알 수 있다. 그러나, JGT 3/4MIC와 AMI 1/2MIC를 병용하였을 때 두 균주 모두 8시간이 지나면서 균의 성장을 현저하게 억제하였다. 특히, 표준균주 ATCC33591은 24시간이 지났을 때 살균되었음을 알 수 있다(Fig. 1, 2).

JGT와 ATPase-inhibitor의 대사 억제 - JGT가 MRSA

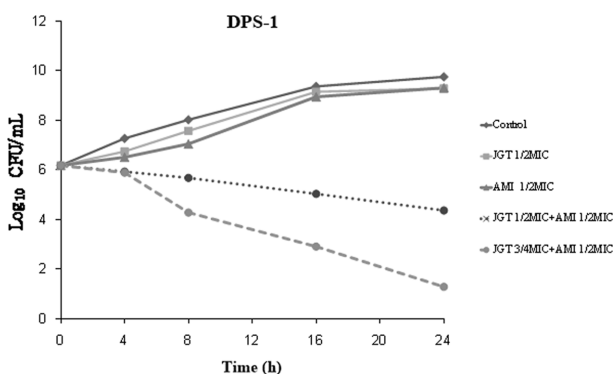


Fig. 1. Bacterial viability at sub-inhibitory concentrations of JGT and AMI against DPS-1. Time-kill curve of sub-inhibitory concentration of JGT alone, AMI alone and their combinations (JGT + AMI) against MRSA DPS-1. The untreated was the control. The data are triplicate determinations and the data are represented as the mean ± SD.

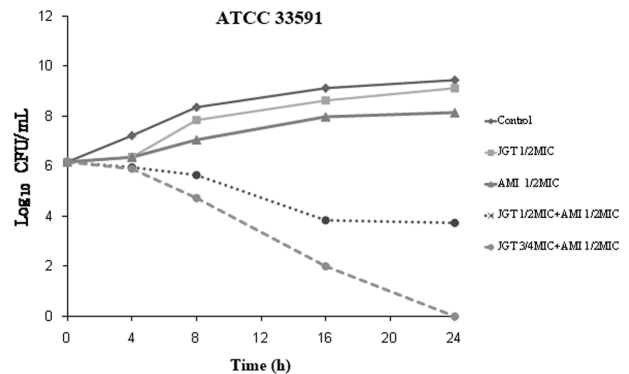


Fig. 2. Bacterial viability at sub-inhibitory concentrations of JGT and AMI against ATCC 33591. Time-kill curve of sub-inhibitory concentrations of JGT alone, AMI alone and their combinations (JGT + AMI) against MRSA ATCC 33591. The untreated was the control. The data are triplicate determinations and the data are represented as the mean ± SD.

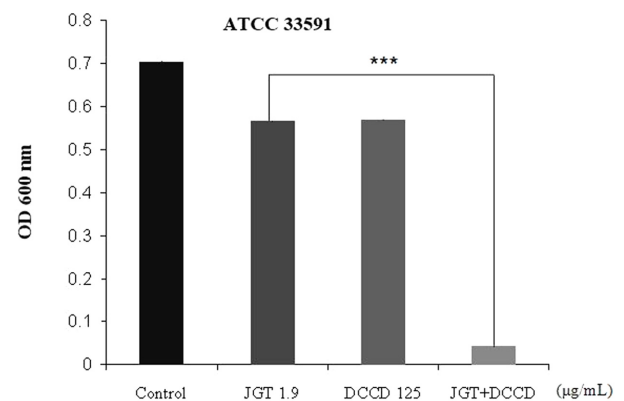


Fig. 3. Inhibition of metabolism in ATCC 33591 of JGT and ATPase-inhibitor. Bacterial viability was determined by absorbance at 600 nm after incubation for 24 hours with JGT concentrations of 1.9 µg/mL, DCCD 125 µg/mL and their combinations (JGT + DCCD). The data are triplicate determinations and the data are represented as the mean ± SD. ****p* < 0.001 as compared with the JGT 1.9.

에서 갖는 대사 억제 정도와 ATPase-inhibitor인 DCCD와 병용하였을 때의 상승효과를 알아보기 위해 실험하였다. 그 결과, JGT 1.9 µg/mL와 DCCD 125 µg/mL를 단독 투여했을 때 control에 비해 균의 대사가 억제되었다. 그러나 JGT와 DCCD를 병용투여하였을 때는 MRSA의 대사가 현저하게 억제되는 것을 확인할 수 있다(Fig. 3).

JGT가 S. aureus의 hla 단백질 발현에 미치는 효과 - JGT가 S. aureus의 hla 단백질 발현에 미치는 효과를 알아보기 위해 Western blot 분석을 수행하였다. 실험 결과에 따르면 control과 비교하였을 때 1/4MIC, 1/2MIC에서 hla 단백질 발현량이 농도 의존적으로 감소하였다. 특히 1/2 MIC

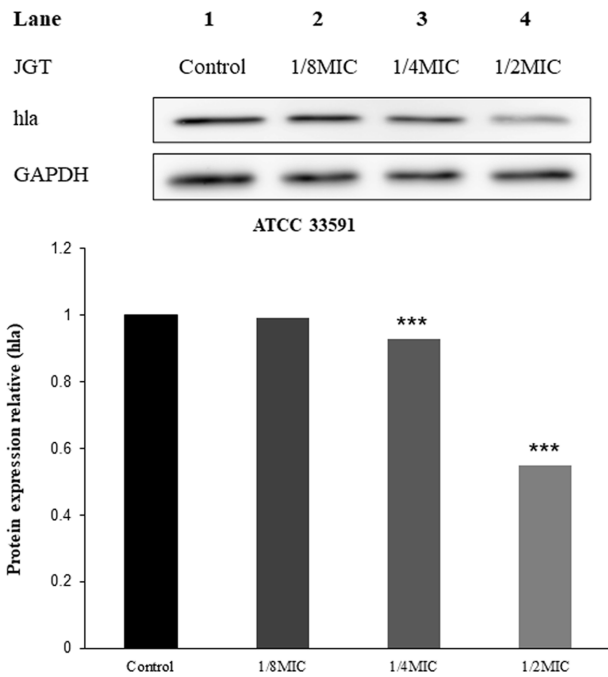


Fig. 4. The *hla* representation of various MICs of JGT in ATCC 33591. Effect of JGT on *hla* protein expression in ATCC 33591 and the intensities of western blot protein bands were quantified using image J. *** $p < 0.001$ as compared with the Control.

에서는 *hla* 발현이 현저하게 억제된 것을 확인할 수 있다 (Fig. 4).

JGT가 *hla* 유전자의 mRNA 발현에 미치는 효과 - JGT가 *S. aureus*의 *hla* 유전자 mRNA 발현에 미치는 효과를 알아보기 위해 qRT-PCR 분석을 수행하였다. 실험 결과에 따

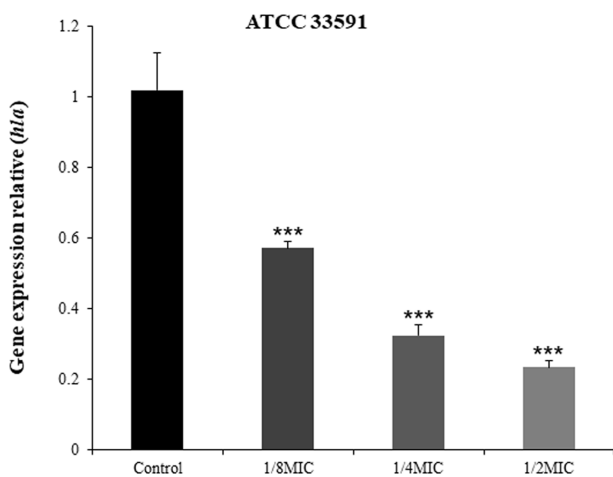


Fig. 5. The *hla* gene representation of various MICs of JGT in ATCC 33591. Effect of JGT on *hla* gene mRNA in ATCC 33591. The data are triplicate determinations and the data are represented as the mean \pm SD. *** $p < 0.001$ as compared with the Control.

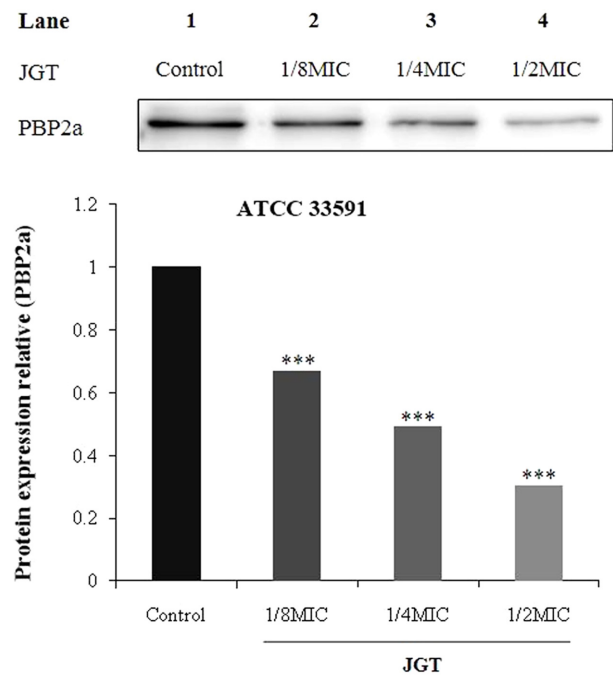


Fig. 6. The PBP2a representation of various MICs of JGT in ATCC 33591. Effect of JGT on PBP2a protein expression in MRSA ATCC 33591 and the intensities of western blot protein bands were quantified using image J. *** $p < 0.001$ as compared with the Control.

르면 control과 비교하였을 때 1/8MIC, 1/4MIC, 1/2MIC에서 *hla* 단백질 발현량이 농도 의존적으로 감소하였다. 특히 1/2MIC에서는 *hla* 발현이 현저하게 억제된 것을 확인할 수 있다(Fig. 5).

JGT가 PBP2a 단백질 발현에 미치는 효과 - JGT가 MRSA의 β -lactam계 항생제 내성에 관여하는 단백질인 PBP2a에 미치는 영향을 보기 위해 Western blot을 수행하였다. 실험은 control, 1/8MIC, 1/4MIC 및 1/2MIC JGT로 구성되었다. 1/8MIC, 1/4MIC 및 1/2MIC JGT에서 모두 PBP2a 단백질 발현이 현저하게 감소되었다. JGT의 용량이 높아질수록 단백질 발현량이 더욱 적어졌는데, 이러한 결과는 JGT를 투여했을 때 PBP2a 단백질 발현량을 농도 의존적으로 감소시킨다는 것을 나타낸다(Fig. 6).

JGT가 *mec* 유전자의 mRNA 발현에 미치는 효과 - JGT가 항생제 내성을 갖도록 하는 PBP2a 생산을 촉발하는 operon인 *mecA*, *mecR1*에 미치는 영향을 알아보기 위하여 qRT-PCR을 수행하였다. Fig. 7을 보면, JGT는 *mecA*, *mecR1* 유전자를 현저하게 감소시킨다는 것을 알 수 있다. JGT의 용량이 높아질수록 유전자 발현량이 더욱 적어졌는데, 이러한 결과는 JGT를 투여했을 때 *mec* operon 발현량을 농도 의존적으로 감소시킨다는 것을 나타낸다(Fig. 7).

JGT에 의한 MRSA의 형태적 변화 - JGT를 ATCC

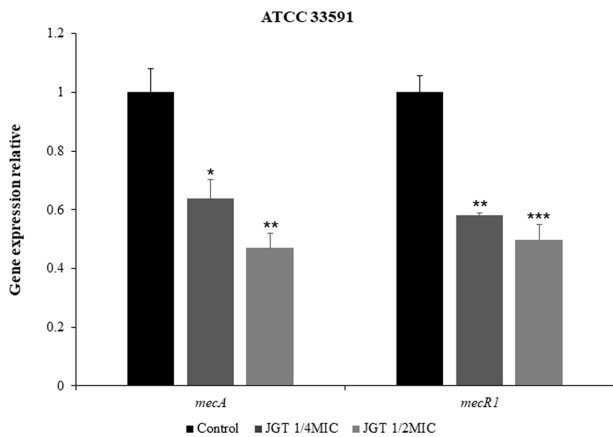


Fig. 7. The *mec* operon representation of various MICs of JGT in ATCC 33591. Effect of JGT on *mec* operon mRNA in MRSA ATCC 33591. The data are triplicate determinations and the data are represented as the mean \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ as compared with the control.

33591 균주에 처리했을 때, 균주의 형태학적 변화를 알아보기 위하여 TEM으로 관찰하였다. Fig. 7에 보이는 바와 같이 JGT를 처리하지 않은 control의 경우 세포벽과 세포질이 온전하게 보존되어 있다. 반면에, 1/2MIC 처리 균을 보면 세포벽이 control에 비하여 파괴되었으며, MIC로 처리하였을 경우 세포벽이 붕괴되기 시작하였다. 마지막으로 2MIC 처리 균에서 균주의 세포벽이 붕괴되어 세포질이 방출되는 것을 관찰할 수 있다(Fig. 8).

고 찰

MRSA는 메티실린을 포함한 β -lactam계 항생제에 내성을 가지는 그람 양성균이다.^{8,9)} 또한, MRSA는 병원 감염 뿐만 아니라 지역 사회 감염으로 번져있어 감염률이 증가하였다.¹⁰⁾ *S. aureus*는 숙주 세포에 해를 끼치는 세포 독성 물질을 분

비하는데, *hla*가 그 중 하나이다. *hla*는 β -barrel pore-forming toxin으로 혈소판 및 다양한 세포와 지질 이중층에 결합한 후 Ca^{2+} 유입 및 혈소판 응집을 유도하고 결국 혈소판 용해까지 일으킨다,^{11,12)} 이처럼 혈관에 침입한 *hla*는 폐렴, 패혈증, 심내막염과 같은 원인이 된다.

MRSA가 심각한 문제로 이어지는 이유는 MRSA가 끊임 없이 변화하고 서로 다른 항생제에 대해서도 많은 내성을 획득하기 때문이다. β -lactam계 항생제 내성은 그람 양성균이 생성하는 β -lactamase가 β -lactam amide를 가수분해하며 생긴다.¹³⁾ SCC*mec*에 존재하는 이동성 유전자의 일부인 *mecA*는 메티실린 내성을 유발하는 결정인자이며, *mecA*의 유전자 산물인 PBP2a는 PBPs에 비해 β -lactam계 항생제에 대한 낮은 친화도로 peptidoglycan 생합성 및 세포벽 형성을 촉진하여 항생제에 저항하였다.¹⁴⁾ 항생제에 내성을 가진 MRSA를 치료하기 위해서는 새로운 항생제의 개발이나 대체 약물이 필요한데, 자연에서 얻는 천연물 중 약용 효과가 있는 식물을 사용하는 한약이 훌륭한 대안책이 될 수 있다. 작약감초탕(JGT)은 작약과 감초의 배합으로 이루어진 한약으로, 근육경련을 치료하거나 통증에 쓰인다. 구성 성분인 작약과 감초 모두 항균 및 항염증 작용이 있음을 이전 연구를 통해 확인하였다.¹⁵⁻¹⁷⁾

Disc 확산법을 통해 JGT가 MSSA와 MRSA 균주에 대해 항균 활성을 가지는지 확인하였다. Table I을 보면, JGT는 8개의 균주에 대해 6-14 mm의 inhibition zone이 나타났으며, 농도가 높아질수록 넓은 inhibition zone을 가졌다. 이후 8개의 균주에서 성장을 억제할 수 있는 최소한의 농도가 어느 정도인지 확인하기 위해 MIC를 측정하였다. Table II를 보면, JGT의 MIC는 250-1,000 μ g/mL, OXA는 0.9-1,000 μ g/mL로 나타났다. CCARM 3091의 경우 JGT의 MIC는 250 μ g/mL, OXA의 MIC는 1,000 μ g/mL으로 JGT의 MIC 값이 더 좋았다. 그러나, 대부분의 JGT의 MIC 값이 OXA의 MIC 값보다 높아 JGT와 OXA를 포함 6개의 기존 항생제를 병용하였을 때 항생제의 용량을 얼마나 줄일 수 있는지를 중

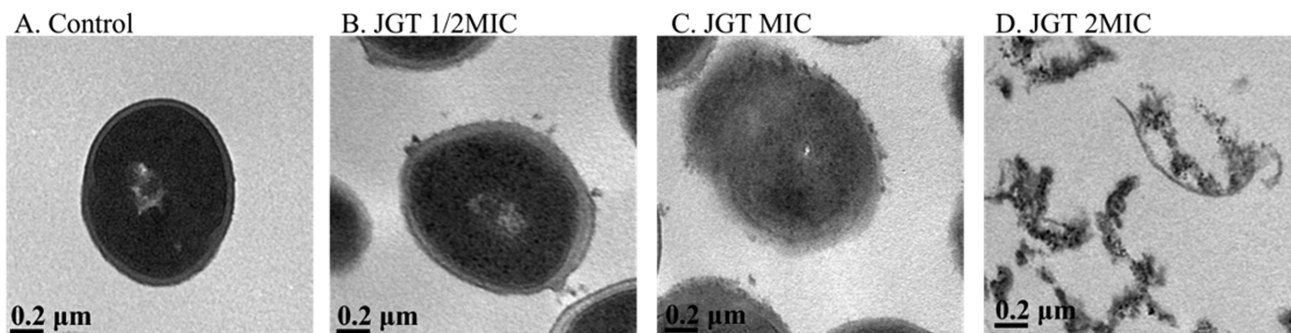


Fig. 8. TEM images of ATCC 33591 following exposure to JGT. (A) Untreated control ATCC 33591. (B) ATCC 33591 treated with 1/2MIC of JGT (125 μ g/mL). (C) ATCC 33591 treated with MIC of JGT (250 μ g/mL). (D) ATCC 33591 treated with MIC of JGT (500 μ g/mL).

Table III. Minimum inhibitory concentration (MIC) and fractional inhibitory concentration index (FICI) of JGT and six β -lactam antibiotics against ATCC 33591

Agent	MIC ($\mu\text{g/mL}$)		Fold	FICI	Outcome
	Alone	Combination			
JGT	250	62.5	4	0.37	Synergy
GEN	7.8	0.9	8		
JGT	250	31.25	8	0.24	Synergy
AMI	62.5	7.8	8		
JGT	250	62.5	4	0.5	Partial synergy
AMO	250	62.5	4		
JGT	250	125	2	1	No effect
CEFO	31.25	15.6	2		
JGT	250	125	2	1	No effect
CEFT	125	62.5	2		
JGT	250	125	2	1	No effect
CHL	125	62.5	2		

Table IV. Minimum inhibitory concentration (MIC) and fractional inhibitory concentration index (FICI) of JGT and six β -lactam antibiotics against DPS-1

Agent	MIC ($\mu\text{g/mL}$)		Fold	FICI	Outcome
	Alone	Combination			
JGT	500	62.5	8	0.25	Synergy
GEN	125	15.6	8		
JGT	500	31.25	16	0.18	Synergy
AMI	62.5	7.8	8		
JGT	500	31.25	16	0.563	Partial synergy
AMO	62.5	31.25	2		
JGT	500	250	2	0.625	Partial synergy
CEFO	31.25	3.9	8		
JGT	500	31.25	16	0.563	Partial synergy
CEFT	250	125	2		
JGT	500	125	4	0.5	Partial synergy
CHL	250	62.5	4		

점으로 알아보았다. 그 결과, 표준균주(ATCC 33591)의 경우 synergy 혹은 no effect 효과가 나타났는데, no effect의 경우 MIC가 2배 감소하였으나 시너지 효과에서는 단독투여균과 별 차이가 없었다(Table III). 임상균주(DPS-1)에서는 FICI 값은 0.18-0.625로 모두 synergy 및 partial synergy 효과가 나타났(Table IV). JGT와 항생제 병용시 대부분 시너지 효과가 나타난 것으로 보아 항생제를 단독 투여했을 때 보다 MRSA에 대한 민감성을 회복하여 적은 사용량으로도 항균 효과를 보인다는 것을 알 수 있다. Fig. 5를 보면 control과 비교하였을 때 1/8MIC에서는 효과가 보이지 않았

던 반면, 1/4MIC, 1/2MIC에서는 hla의 단백질 발현이 분명하게 억제되었다. *mecA*와 *mecR1* 모두 발현량 눈에 띄게 억제 되었으며, western blot과 qRT-PCR의 결과를 종합했을 때 JGT의 MRSA 억제 기전은 *mecR1*을 억제하여 *mecA* 전사를 억제시키고, PBP2a의 생산을 억제에 β -lactam계 항생제에 친화적인 PBPs와 정상적으로 합성 할 수 있도록 하는 것으로 추측할 수 있다. JGT가 세포벽과 세포질을 형태학적으로 어떻게 변화시키는지 TEM을 통해 확인하였다. 형태학적 관찰은 항균제 활성의 기본적인 메커니즘 이해를 견고하게 하였다.

결 론

위에서 서술한 내용을 종합하면, 본 연구에서는 JGT가 MRSA에 대한 항균 활성을 가지며, 기존의 항생제와 병용 처리시 효과가 상승한다는 것을 확인하였다. 이를 통해 JGT는 기존 항생제와 병용시 MRSA를 극복할 수 있는 대안책이 될 수 있음을 시사한다.

사 사

이 논문은 원광대학교의 지원을 받아 수행된 연구(This research was supported by the Wonkwang University in 2023)로 이에 감사드립니다.

인용문헌

- Lakhundi, S. and Zhang, K. (2018) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular characterization, evolution, and epidemiology. *Clin. Microbiol. Rev.* **31**: e00020-18.
- Gould, D. and Chamberlaine, A. (1995) *Staphylococcus aureus*: a review of the literature. *J. Clin. Nurs.* **4**: 5-12.
- Löffler, B. and Tuchscher, L. (2021) *Staphylococcus aureus* toxins: Promoter or handicap during infection? *Toxins (Basel)* **13**: 287.
- Zheng, D., Chen, Y., Wan, S., Jiang, J., Chen, S., Zheng, C., Zhou, H., Xu, G., Zhang, H. and Xu, H. (2021) Polycyclic polyprenylated acylphloroglucinol congeners from *Garcinia yunnanensis* Hu with inhibitory effect on α -hemolysin production in *Staphylococcus aureus*. *Bioorg. Chem.* **114**: 105074.
- Li, Q. Q., Luo, J., Liu, X. Q., Kang, O. H. and Kwon, D. Y. (2021) Eleutheroside K isolated from *Acanthopanax henryi* (Oliv.) Harms inhibits the expression of virulence-related exoproteins in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Curr. Microbiol.* **78**: 3980-3988.
- Yu, H., Liu, J., Wang, L., Guan, S., Jin, Y., Zheng, J., Xiang, H., Wang, D. and Liu, D. (2022) 3-Dehydrokievitone combats methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection by reducing alpha-hemolysin expression. *Front. Microbiol.* **13**: 969215.
- Rungelrath, V. and DeLeo, F. R. (2021) *Staphylococcus aureus*, antibiotic resistance, and the interaction with human neutrophils. *Antioxid. Redox. Signal.* **34**: 452-470.
- Li, Q. Q., Kang, O. H. and Kwon, D. Y. (2021) Study on demethoxycurcumin as a promising approach to reverse methicillin-resistance of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Mol. Sci.* **22**: 3778.
- Zhou, T., Li, Z., Kang, O. H., Mun, S. H., Seo, Y. S., Kong, R., Shin, D. W., Liu, X. Q. and Kwon, D. Y. (2017) Antimicrobial activity and synergism of ursolic acid 3-O- α -L-arabinopyranoside with oxacillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Mol. Med.* **40**: 1285-1293.
- Lakhundi, S. and Zhang, K. (2018) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular characterization, evolution, and epidemiology. *Clin. Microbiol. Rev.* **31**: e00020-18.
- Xiong, X., Tian, S., Yang, P., Lebreton, F., Bao, H., Sheng, K., Yin, L., Chen, P., Zhang, J., Qi, W., Ruan, J., Wu, H., Chen, H., Breault, D. T., Wu, H., Earl, A. M., Gilmore, M. S., Abraham, J. and Dong, M. (2022) Emerging enterococcus pore-forming toxins with MHC/HLA-I as receptors. *Cell* **185**: 1157-1171.e22.
- Jahn, K., Handtke, S., Palankar, R., Kohler, T. P., Wesche, J., Wolff, M., Bayer, J., Wolz, C., Greinacher, A. and Hamerschmidt, S. (2022) α -Hemolysin of *Staphylococcus aureus* impairs thrombus formation. *J. Thromb. Haemost.* **20**: 1464-1475.
- Tooke, C. L., Hinchliffe, P., Bragginton, E. C., Colenso, C. K., Hirvonen, V. H. A., Takebayashi, Y. and Spencer, J. (2019) β -Lactamases and β -lactamase inhibitors in the 21st century. *J. Mol. Biol.* **431**: 3472-3500.
- Neil, J. R., Verma, A., Kronewitter, S. R., McGee, W. M., Mullen, C., Viirtola, M., Kotovuori, A., Friedrich, H., Finell, J., Rannisto, J., Syka, J. E. P., Stephenson, J. L. Jr. (2021) Rapid MRSA detection via tandem mass spectrometry of the intact 80 kDa PBP2a resistance protein. *Sci Rep.* **11**: 18309.
- Chen, C. M., Chen, W. L., Hung, C. T., Lin, T. H., Lee, M. C., Chen, I. C., Lin, C. H., Chao, C. Y., Wu, Y. R., Chang, K. H., Hsieh-Li, H. M., Lee-Chen, G. J. and Tang, S. G. (2019) A formulated Chinese medicine, reduces aggregation and exerts neuroprotection in spinocerebellar ataxia type 17 (SCA17) cell and mouse models. *Aging (Albany NY)* **11**: 986-1007.
- Asl, M. N. and Hosseinzadeh, H. (2008) Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza* sp. and its bioactive compounds. *Phytother. Res.* **22**: 709-724.
- Zhou, T., Deng, X. and Qiu, J. (2012) Antimicrobial activity of licochalcone E against *Staphylococcus aureus* and its impact on the production of staphylococcal alpha-toxin. *J. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 800-805.

(2023. 5. 21 접수; 2023. 6. 12 심사;
2023. 6. 19 게재확정)