

메티실린-내성 포도상구균에 대하여 Brazilein 혼합에 따른 항생제 Hygromycin-b의 상승효과

이영섭* · 이대영* · 안태진* · 이정훈* · 안영섭* · 차선우* · 문수현*** · 강옥화** · 권동렬**† · 한신희*†

*농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부, **원광대학교 약학대학 한약학과, ***원광대학교 한의학전문대학원 BK21사업팀

Synergistic Effect of Brazilein in Combination with Hygromycin-b against *Staphylococcus aureus*

Young Seob Lee*, Dae Young Lee*, Tae Jin An*, Jeong Hoon Lee*, Young Sup Ahn*, Seon Woo Cha*, Su Hyun Mun***, Ok Hwa Kang**, Dong Yeul Kwon**† and Sin Hee Han*†

*Department of Herbal Crop Research, NIHHS, RDA, Eumseong 369-873, Korea.

**Department of Oriental Pharmacy, College of Pharmacy and Wonkwang-Oriental Medicines Research Institute, Institute of Biotechnology, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea.

***BK21 Plus Team, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea.

ABSTRACT : Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a substantial contributor to morbidity and mortality. In search of a natural products capable of inhibiting this multidrug resistant bacteria, we have investigated the antimicrobial activity of brazilein (BRZ) isolated from *Caesalpinia sappan* L. (Leguminosae) against 8 different strains of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). New antimicrobial activity was found using the minimum inhibitory concentrations (MICs), broth dilution as well as checkerboard method. Against the 8 strains, the minimum inhibitory concentrations of BRZ were in the range of 62.5-500 µg/mL. From those results we performed the checkerboard test to determine the synergism of BRZ in combination with Hygromycin-b (HgB) against 4 strains. The combined activity of BRZ and HgB against 4 strains resulted in a fractional inhibitory concentrations index (FICI) ranging from 0.18-0.5. The effect of BRZ with HgB was found to be synergistic. We found that BRZ reduced the MICs of HgB. BRZ and HgB could lead to the development of new combination antibiotics against MRSA infection.

Key Words : Antibacterial Effect, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, Brazilein, Hygromycin-b

서 언

자연계에 널리 분포되어 있는 황색포도상구균 (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)은 세계적으로 널리 알려진 식중독균 중의 하나이고, 황금색 색소를 생성하고 용혈성을 가지며 coagulase를 생성하는 종으로, 화농성질환이나 창상감염 등의 피부감염, 골관절염, 폐렴, 패혈증 등을 일으키는 병원성 높은 대표적인 유해세균으로 알려져 있다 (Kim *et al.*, 1993, 2010; Lee *et al.*, 2010). 이 균은 일반적으로 환경에 대한 저항성이 강하여 건강한 성인의 비강, 피부, 구강 등에서도 존재하고 동물의 상

처부위를 통한 전염이나 식품의 생산과정, 제조 공정 등의 여러 단계를 거치면서 식품 유통망을 타고 짧은 시간에 전국적으로 전파될 수 있으며, 전파된 *S. aureus*는 사람에게 전이되어 또 다른 매개체가 될 수 있다 (Lee *et al.*, 2010, 2013). 따라서 *S. aureus*와 같은 유해세균을 억제하기 위하여 사람과 동물의 질병 치료와 예방에 항생제를 사용하고 있으나, *S. aureus*에 의한 식중독 발생률은 노로 바이러스와 살모넬라, 병원성 대장균과 함께 꾸준히 높은 수치를 나타내고 있으며 매년 발생이 증가되고 있다 (Lee *et al.*, 2010). 더욱이 항생제 오·남용 등의 원인으로, 최근 미국이나 네덜란드 등의 국가

†Corresponding author: (Phone) +82-43-871-5545*, 82-63-850-6802** (E-mail) herbman@korea.kr*, sssimi@wku.ac.kr**

Received 2014 July 7 / 1st Revised 2014 July 22 / 2nd Revised 2014 August 23 / 3rd Revised 2014 September 17 / Accepted 2014 October 16

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

에서는 식품과 관련한 MRSA (methicillin-resistant *S. aureus*)의 오염이 보고되고 있으며 1996년에는 vancomycin에 대하여 저하된 감수성을 나타내는 *S. aureus*가 일본에서 발견된 이후, 여러 나라에서 vancomycin 내성 *S. aureus* (vancomycin-resistant *S. aureus*, VRSA)가 나타나기 시작하면서 슈퍼박테리아로 불리기 시작하였다 (Kang *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2013; Shin and Seong, 2006). MRSA와 VRSA 같은 슈퍼박테리아는 출현 이후 지역사회에 빠르게 증가되고 광범위하게 노출되어있어 그 심각성이 점차 높아지고 있으며, 일반 *S. aureus*와 달리 cephalosporin, ampicillin, nafcillin 등과 같은 β -lactam 계열 항생제를 비롯하여 aminoglycoside 및 macrolides 계열의 항생제에 대해서도 내성을 지니고 있는 균주로 발견되어 감염증 치료에 큰 어려움을 겪고 있는 실정이다.

오늘날, 우리나라는 인구 고령화와 웰빙 (Well-being)이라는 건강 지향적 트렌드가 자리하면서, 채식위주의 음식문화와 맛물려 가공하지 않는 신선식품으로의 이용이 증가되고 있으나 유통 및 저장과정에서 *S. aureus* 등의 유해 미생물 증식에 의해 발생하기 쉬운 오염을 억제하거나 식품으로 전파되는 유해 미생물의 내성 연구는 아직 미흡한 실정이며, 그 중 공중보건학 측면에서 *S. aureus*의 내성수준은 매우 심각한 문제로 보고되고 있다 (Kim *et al.*, 2006, 2010; Lee *et al.*, 2013).

최근에는 유통 및 저장 중 오염 및 품질저하를 방지하기 위하여 가열 처리나 레토르트 등의 물리적 방법과 식품보존제 등의 화학합성물질을 첨가하는 방법 등이 널리 이용되고 있으나, 영양성분 파괴, 품질저하 및 독소잔류 등의 건강에 대한 안전성 문제가 제기되고 있다. 따라서 *S. aureus*와 같은 유해 세균에 대한 새로운 항균물질의 개발이 시급히 요구되고 있으며, 전통적으로 감염질환의 치료에 사용되어 온 약용식물을 바탕으로 alkaloid, flavonoid, terpenoid, phenolic compound, quinone, volatile oil 등의 2차 대사산물 또는 그 유도체들이 후보물질로 활발히 진행되고 있다 (Kim *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2013).

소목 (*Caesalpinia sappan* L.)은 낙엽 관목의 콩과 (Leguminosae)에 속하는 약용식물로서 염료로도 이용되고 있으며, 소목추출물은 항통증, 항경련, 항산화, 면역조절, 항바이러스 효과 등이 보고되어 있다 (Eum *et al.*, 2013). 소목의 성분으로 brazilin, brazilein (BRZ), campesterol, stigmaterol, hematein, sappanin 등이 밝혀졌으며, 이중 brazilin은 neoflavonoid 구조를 가지고 있으며 산화 등에 의하여 brazilein이 되는 것으로 알려져 있다 (Eum *et al.*, 2013). Hygromycin-b (HgB)는 토양에서 발견되는 *Streptomyces hygrosopicus*에 의하여 생산되며 70S와 80S 리보솜을 억제하는 aminoglycoside계 항생제로 보고되어있다 (Pfister *et al.*, 2003).

따라서 본 연구에서는 소목의 성분 중 BRZ를 항균활성물질로 개발하기 위하여 HgB와의 혼합 능력을 구명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 연구재료

본 실험에 사용한 소목은 (*Caesalpinia sappan* L.)은 서울 경동시장에서 구매를 하였으며, 표본시료 (OMRL-091024)는 경희대학교 한방재료가공센터 연구실에 보관되어 있다. 포도상균의 배양에 Mueller-Hinton agar (MHA)와 Mueller-Hinton broth (MHB)를 Difco Laboratories사 (Baltimore, MD, USA)로부터 구입하여 사용하였으며, 원광대학교병원 (Iksan, Korea) 성형외과 환자들에서 분리한 MRSA 6주와 황색포도구균 표준균주 (ATCC 25923) 및 MRSA 표준균주 (ATCC 33591) (ATCC, Manassas, VA, USA) 각 1주를 사용하였다. 실험 전, 모든 포도상구균은 30% glycerol을 이용하여 -70°C 에 보관하였다가 실험 전 48시간 전에 37°C 에 배양하여 사용하였다.

2. 시약 및 기기

HgB는 Sigma-Aldrich사 (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였으며, column chromatography (C. C.)-용 silica gel (SiO_2)은 Kiesel gel 60 (Merck, Darmstadt, Germany), 그리고 octadecyl SiO_2 (ODS) gel은 LiChroprep RP-18 (Merck, Darmstadt, Germany)을 사용하였다. Thin layer chromatography (TLC)는 Kieselgel 60 F₂₅₄와 RP-18 F_{254S} (Merck, Darmstadt, Germany)를 사용하였고, 실험에 이용한 모든 시약은 특급시약을 사용하였다. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectrum은 Varian Inova AS 400 (Varian, Palo Alto, CA, USA)으로 측정하였다.

3. 추출 및 분획

건조 및 분쇄된 소목 5 kg을 80% MeOH 수용액 (20 L \times 3)으로 실온에서 24시간 3회 추출한 후 여과지로 여과하였다. 얻어진 추출물을 감압 농축하여 MeOH 추출물 (512 g)을 얻었다. MeOH 추출물은 H_2O (2 L)와 ethyl acetate (EtOAc, 2 L \times 3)로 분배 추출 및 감압 농축하여 EtOAc 분획 (35 g)을 얻었다.

4. EtOAc 분획으로부터 Brazilein의 분리

EtOAc 분획 (35 g)으로부터 SiO_2 c.c. (ϕ 6.5 \times 20 cm, CHCl_3 -MeOH- H_2O = 8 : 3 : 1 \rightarrow 15 : 30 : 1 \rightarrow 10 : 3 : 1 \rightarrow 7 : 3 : 1, 1.3 L, 각 3 L)를 실시하여 16개의 분획물 (E-1 ~ E-16)을 얻었다. 그 중에서 소분획 E-6 (3.8 g)을

SiO₂ c.c. (φ 4 × 15 cm, nCHCl₃-MeOH (7:1, 5.5 L)로 10개의 분획 (E-6-1~E-6-10)으로 나누었다고, 그 중 화합물 1 (E-6-5, 38 mg)를 분리하였다.

5. Brazilein (reddish-crystals)

EI/MS *m/z* 284 [M]⁺; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO, δ_H) 7.90 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-1), 6.65 (1H, dd, *J*=8.4, 2.4 Hz, H-2), 6.45 (1H, dd, *J*=2.4 Hz, H-4), 4.08 (1H, *J*=12.0 Hz, H-6a), 4.50 (1H, *J*=12.0 Hz, H-6b), 2.95 (2H, s, H-7), 6.40 (1H, s, H-8), 6.98 (1H, s, H-11).

6. Methicillin 내성유전자 검출

MRSA는 *S. aureus*가 항생제인 methicillin에 내성을 가지는 것이며, 유전체 중 Mobile genetic element A (*mecA*)라 불리는 내성유전자를 획득함으로써 나타난다 (Kim, 2011). 따라서 *mecA* 유전자 검출을 위해서 MHA에서 배양하고 증식한 개의 집락을 취하여, 300 μL의 cell lysis buffer에 혼합하였으며, 20분간 100°C로 가열한 다음, 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리한 뒤, 상층액을 이용하였다. 추출한 DNA 2 μL를 MRSA Primer Mix Kit (Genotek Co., Daejeon, Korea)를 이용하여 PCR을 시행하였다. PCR 반응조건은 94°C, 60초, 55°C, 60초, 72°C, 60초로 30회 반응시켰다. 증폭산물을 2% agarose gel에 넣고, 0.5% Tris-borate buffer에서 25분간 전기영동하여 판독하였다.

7. 감수성 측정

최소억제농도 (Minimum inhibitory concentrations, MICs)의 측정은 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines에 기술된 broth microdilution method에 따라 수행하였다. 실험 전, BRZ와 HgB는 DMSO (diluted using MH broth; v/v)를 이용하여 희석하였고 MHB에 연속 2배 희석으로 96well-plates와 microtube에 준비하였다. *S. aureus* 접종물들은 0.5 McFarland standard (approximately 1.5 × 10⁸ colony-forming units (CFU)/mL)로 조정하였으며, 최종적으로 접종물들은 약 1.5 × 10⁶ CFU/spot로 희석되었다. MICs 값은 37°C에서 24시간 동안 배양하여 *S. aureus*의 성장이 억제되는 가장 낮은 농도로서 정의하였다.

8. 혼합효과 측정

본 실험에 사용된 checkerboard method는 BRZ와 HgB사이에 상호영향을 확인하기 위하여 사용하였다. MHA에서 밤새 배양된 집락을 취하여 최종적으로 1.5 × 10⁶ CFU/spot으로 접종하였다. 96well-plates에 혼합효과를 측정할 BRZ와 HgB를 최고 농도에서 연속 2배 희석하여 BRZ는 수평축으로 HgB는 수직축으로 각 well에 연속적으로 희석하였다. 이후

37°C에서 24시간 동안 배양 후에 BRZ와 HgB의 상호적으로 억제된 가장 낮은 농도로서 정의하였으며, 두 약제 사이의 상호작용은 fractional inhibitory concentration (FIC)로 나타내었다.

9. Fractional Inhibitory Concentration (FIC) Index

FIC index는 공식에 따라 계산되었다:

$$\text{FIC index} = \text{FIC}_A + \text{FIC}_B = \frac{[A]}{\text{MIC}_A} + \frac{[B]}{\text{MIC}_B}$$

A는 A 희석열에서 억제효과를 보이는 최소농도이며 B는 B 열에서 억제효과를 보이는 최소농도이다. MIC_A와 MIC_B는 BRZ와 HgB 각각의 최소억제농도이다. FIC index가 FIC index가 ≤0.5이면 synergism, >0.5-4이면 indifference, >4이면 antagonism으로 정의하였다.

10. Time-kill 분석을 통한 약효평가

실험균주에 대한 time-kill 분석은 Fu 등 (2007)과 최 등 (2008)의 방법을 변형하여 다음과 같이 측정하였으며, *S. aureus*에 대해 BRZ와 HgB의 상승효과를 시간대별로 측정하기 위하여 수행하였다. 시험균주는 MH broth에 접종하여 37°C에서 24시간 배양하였고, 이후 BRZ와 HgB를 연속 2배 희석하여 BRZ는 수평축으로 HgB는 수직축으로 각 well에 연속적으로 희석하였으며, *S. aureus*의 접종물은 MIC 실험법과 동일하게 최종적으로 약 1.5 × 10⁶ CFU/spot이 되도록 첨가하였다. 이후 0, 12, 24, 36, 48 시간 동안 37°C에서 각각 배양한 후 600 nm에서 microplate reader로 측정하였다.

결과 및 고찰

1. Brazilein의 분리 및 구조동정

소목을 80% MeOH로 추출하였고, 추출물을 극성에 따라 EtOAc로 분배 추출하였다. EtOAc 분획에 대하여 Silica gel 컬럼을 이용하여 화합물 1을 분리하였다. 화합물 1(reddish-crystals)은 TLC에 전개하고, 10% 황산 발색 시 붉은색으로 발색되었으며, EI/MS 측정결과 분자량은 284 [M]⁺로 결정되었다. ¹H-NMR (400MHz, DMSO, δ_H) spectrum 데이터 분석 결과, δ_H 7.90 (1H, d, *J*=8.4 Hz, H-1), 6.65 (1H, dd, *J*=8.4, 2.4 Hz, H-2) 및 6.45 (1H, dd, *J*=2.4 Hz, H-4)의 signal로부터 1,2,4-3치환 benzene이 존재함을 확인할 수 있었고, δ_H 6.40 (1H, s, H-8), 6.98 (1H, s, H-11)의 signal로부터 이중결합이 존재함을 확인하였다. 산소가 치환된 영역에서는 δ_H 4.08 (1H, *J*=12.0 Hz, H-6a) 및 4.50 (1H, *J*=12.0 Hz, H-6b)로부터 한 개의 oxygenated methylene proton이 존재를 확인 하였으며, 고자장 영역에서는 적분 값이

2로 나타난(1H: 1) methylene proton [δ_H 2.95 (2H, s, H-7)] signal이 관측되었다. Proton NMR data를 종합한 결과, 화합물 1은 소목에서 주요화합물로 보고되어 있는 brazilein으로 구조 동정을 하였고, proton 및 carbon data를 참고문헌 (Kim *et al.*, 1997)과 비교하여 brazilein임을 최종 구조결정 하였다.

2. Methicillin 내성유전자 (mecA) 검출

1940년대 초, *S. aureus* 감염증의 치료를 위해 penicillin, methicillin 등의 항생제를 사용하여 왔으나, 1940년대 후반에 penicillin에 대하여 내성을 나타내기 시작하였으며, 1950년대에 tetracycline, chlororamphenicol 및 erythromycin에 대해서도 내성이 나타나기 시작하였다 (Leclercq *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2010). 1961년에는 MRSA가 보고되었고 그 출현빈도는 계속 증가하고 있으며, MRSA 감염증으로 인한 사망자의 비율 또한 1993년에 12%에서 2002년에 66%로 급증하였다 (Kim *et al.*, 2013). 특히 2004년에 발표된 대학병원 중환자실 병원 감염 감시결과에 따르면, 전국 16개의 만 15세 이상의 환자를 대상으로 분리된 *S. aureus* 중 93%가 MRSA라고 보고되었다 (Kim, 2013). *S. aureus*는 세포벽 합성단백질인 penicillin binding protein의 변형되고 low affinity penicillin binding protein (PBP2' 또는 PBP 2a)이 생성된 경우이며, 이 변형된 PBP를 encoding하는 유전자인 *mecA* 유전자를 검출할 경우 MRSA라 동정하고 있으며 MRSA에 특이적인 *mecA* 유전자는 Staphylococcal cassette chromosome *mec* 라

불리는 이동성 유전자에 위치하고 있으며 독성과 내성을 운반하고 다른 종간에도 전파가 가능하다고 알려지고 있다 (Kim, 2011). 따라서 음성 대조군으로 methicillin에 감수성을 나타내는 *S. aureus*인 MSSA (methicillin-susceptible *S. aureus*) 표준균주 (ATCC 25923)와 양성 대조군인 MRSA 표준균주 (ATCC 33591) 및 분리된 6 균주의 내성 여부를 *mecA* 유전자 검출로서 측정하여 Table 2에 나타내었다.

3. BRZ 와 HgB의 항균력 평가

식물에서 항균 활성이 있는 물질을 추출해 내고 자 하는 연구는 전 세계적으로 오래전부터 진행되어 왔으며 항생제 내성균들이 등장하여 새로운 항생제에 대한 개발요구가 증대됨에 따라 최근 이에 대한 연구는 더욱 활발하게 진행되고 있다 (Aqil *et al.*, 2005; Jang *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2013). 따라서 본 연구는 식물로부터 항균물질을 찾아내기 위한 연구의 일환으로, 우리나라에서 오래 동안 사용되어 인체에 큰 해가 없는 것으로 알려진 한약 재료 중의 하나인 소목에서 BRZ를 분리하여 항균활성이 있는 추출물을 감염성 질환의 치료에 사용할 수 있게 함을 목표로 시행되었다. 소목은 콩과 (Leguminosae)의 식물로 *Caesalpinia sappan* L.의 심재를 전통 한약으로 행혈 (行血)·지혈·구어혈 (驅瘀血)·진통·소종 (消腫)의 치료를 위하여 사용되어 왔다 (Kwon *et al.*, 2007; Eum *et al.*, 2013). 또한 HgB는 임상적으로는 중요하지 않으나 매우 광범위한 항균활성을 가지고 있는 aminoglycoside계 항생물질이며 가축에 대한 구충을 목적으로 사료첨가제로 사용되고 있다. (Kalivoda *et al.*, 2011). 따라서 Standard broth microdilution method에 따라 총 6개의 포도상구균에 대하여 BRZ와 HgB의 항균 감수성 측정을 수행하였으며, 측정된 포도상구균에 대하여 BRZ는 62.5-500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, HgB는 250-500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 억제되었다. 대조군으로 사용된 oxacillin은 1.9-

Table 1. Sequences of the primers used in PCR.

Primer		Sequence (5' to 3')
<i>mecA</i>	Forward primer	ATGAGATTAGGCATCGTTTC
	Reverse primer	TGGATGACAGTACCTGAGCC
<i>femA</i>	Forward primer	CATGATGGCGAGATTACAGG
	Reverse primer	CGCTAAAGGTACTAACACACGG

Table 2. Characteristics of *S. aureus* used in the study.

<i>S. aureus</i> strains		<i>mecA</i> gene	β -lactamase activity
MSSA	ATCC 25923	-	-
MRSA	ATCC 33591	+	+
Clinical isolate	KWMr1 1039 [†]	+	-
	KWMr1 1040	+	+
	KWMr1 1041	+	-
	KWMr1 1046	+	-
	KWMr1 1047	+	-
	KWMr1 1048	+	-

[†]KWMr1 indicates staphylococcal strain from the Department of Plastic Surgery, Wonkwang University Hospital.

Table 3. Antibacterial activity of brazilein (BRZ), hygromycin-b (HgB) and oxacillin against 8 strains of *S. aureus*.

<i>S. aureus</i> strains		Minimum Inhibitory Concentrations ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
		Brazilein	Hygromycin-b	Oxacillin
MSSA	ATCC 25923	62.5	500.0	1.9
MRSA	ATCC 33591	62.5	500.0	500.0
Clinical isolate	KWMr1 1039 [†]	62.5	500.0	> 500.0
	KWMr1 1040	500.0	250.0	> 500.0
	KWMr1 1041	62.5	500.0	> 500.0
	KWMr1 1046	62.5	500.0	500.0
	KWMr1 1047	250.0	250.0	> 500.0
	KWMr1 1048	500.0	500.0	500.0

[†]KWMr1 indicates staphylococcal strain from the Department of Plastic Surgery, Wonkwang University Hospital.

Table 4. Result of the combined effect of HgB and BRZ against *S. aureus*.

<i>S. aureus</i> strains		Minimum Inhibitory Concentrations ($\mu\text{g/mL}$)				
		HgB Alone [†]	With BRZ [‡]	BRZ Alone	With HgB	FICI
MSSA	ATCC 25923	500.0	62.5	62.5	3.9	0.18
MRSA	ATCC 33591	500.0	125.0	62.5	15.6	0.50
Clinical isolate	KWMrI 1039*	500.0	62.5	62.5	3.9	0.18
	KWMrI 1040	250.0	62.5	500.0	125.0	0.50

[†]Alone; not combined with BRZ or HgB.

[‡]With BRZ, HgB + BRZ.

*KWMrI indicates staphylococcal strain from the Department of Plastic Surgery, Wonkwang University Hospital.

500 $\mu\text{g/mL}$ 이상으로 측정되었다. 이는 실험에 사용된 균주들이 methicillin 뿐만 아니라 β -lactam 계열 항생제인 oxacillin에서도 내성을 보유한 것이며, oxacillin 보다 *S. aureus*에 대한 항균력은 BRZ가 더 높다는 것을 보여주었다. 측정된 BRZ와 HgB의 MIC는 Table 3에 나타내었다.

4. BRZ와 HgB 혼합에 따른 상승효과 검토

현재 사용되는 항생제는 심각한 부작용과 내성으로 국가차원에서 사용량을 제한하고 있으며, 특히 aminoglycoside계 항생물질은 대체로 심각한 이독성과 신독성에 대한 우려로 BRZ를 비롯한 천연 항균물질을 이용하여 부작용이 높은 항생물질에 대한 사용량을 줄이면서 우수한 효능을 가진 새로운 항생제 개발이 현재 주목받고 있다 (Kettle and Schacht, 2002). BRZ와 HgB의 상승효과는 checkerboard dilution assay를 사용하여 측정한 결과를 FIC index로 나타내었다. MRSA 표준균주인 ATCC 33591에 대한 FICI는 0.18로 상승효과를 나타내었으며, MSSA 표준균주인 ATCC 25923 또한 0.5로 상승효과를 나타내었다. 또한 2개의 임상분리 균주 (KWMrI 1039 및 KWMrI 1040)에 대해서도 0.18 및 0.5로 상승효과를 나타내었다. 결론적으로 실험한 모든 *S. aureus* 균주에 대하여 BRZ는 HgB의 MIC값을 감소시켰으며, HgB 또한 BRZ의 MIC값의 감소를 나타내므로 각각의 성분에 대한 특이적인 화학적 작용으로 활성이 증가한 것으로 생각된다 (Table 4).

5. Time-kill 분석

BRZ와 HgB 혼합에 따른 상승작용을 증명하기 위하여 MRSA 표준균주와 MSSA 표준균주에 BRZ와 HgB를 혼합 처리하여 Time-kill 분석을 실시하였다. Fig 2-3에 나타난 바와 같이, MRSA 균주에서 BRZ는 3.9 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도와 HgB 62.5 $\mu\text{g/mL}$ 에서의 농도에서 균의 성장을 완전히 저해하지 않았으나 BRZ는 3.9 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도와 HgB 62.5 $\mu\text{g/mL}$ 을 혼합

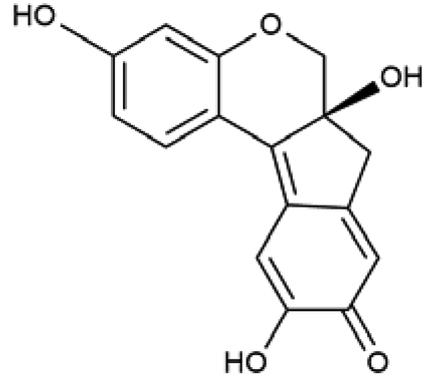


Fig. 1. Chemical structure of Brazilein (BRZ).

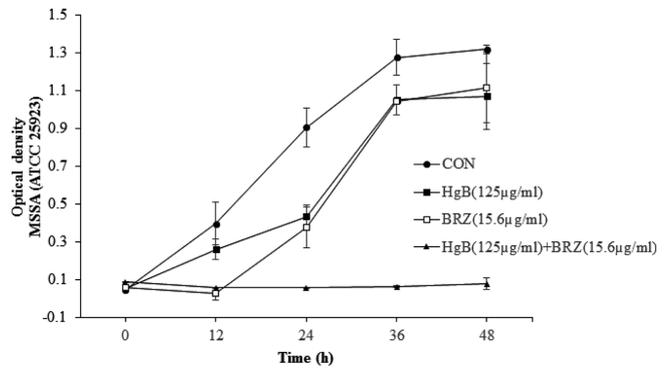


Fig. 2. The time-kill curves of brazilein against the standard MSSA (ATCC 25923) strain. The growth of bacteria was determined by measuring the OD of the cultures at 600 nm.

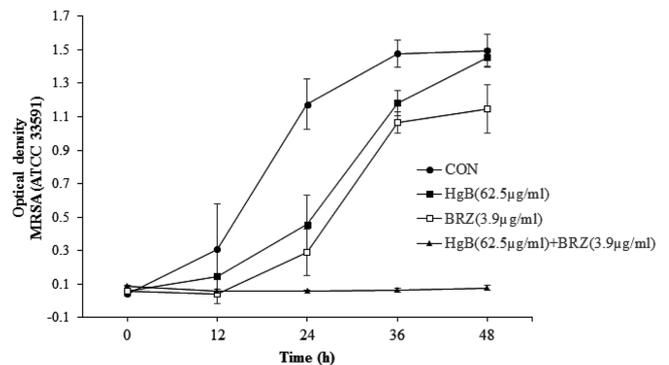


Fig. 3. The time-kill curves of brazilein against the standard MRSA (ATCC 33591) strain. The growth of bacteria was by measuring the OD of the cultures at 600 nm.

처리 시 MRSA 균주를 48시간이 지나도록 완전히 억제하는 것으로 나타났다. 또한 MSSA 균주에서도 HgB 125 $\mu\text{g/mL}$ 와 BRZ 15.6 $\mu\text{g/mL}$ 을 혼합 처리 시 MSSA 균주를 완전히 억제하는 것으로 나타났다. 따라서 추가연구를 통하여 독성여부와 전신 투여 가능성 여부가 규명된다면 새로운 항균제로서

사용이 가능할 것이며 우수한 신약후보물질이 될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2014년도 농촌진흥청 국립원예특작과학원 박사 후 연수과정지원사업에 의해 이루어진 수행된 결과로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Aqil F, Khan MS, Owais M and Ahmad I. (2005). Effect of certain bioactive plant extracts on clinical isolates of beta-lactamase producing methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Basic Microbiology*. 45:106-114.
- Choi JG, Kang OH, Lee YS, Oh YC, Chae HS, Jang HJ, Kim JH, Sohn DH, Shin DW, Park H and Kwon DY. (2008). In vitro activity of methyl gallate isolated from *Galla Rhois* alone and in combination with ciprofloxacin against clinical isolates of salmonella. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 18:1848-1852.
- Clinical and Laboratory Standards Institute(CLSI). (2012). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard(9th Ed.). Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA, USA. CLSI document. M7-A5.
- Eum WS, Lee KJ, Kim DW, Lim SS, Kang IJ, Park J and Choi SY. (2013). Anti-Inflammatory effects of extracts from *Caesalpinia sappan* L. on skin inflammation. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 42:384-388.
- Fu Y, Zu Y, Chen L, Shi X, Wang Z, Sun S and Efferth T. (2007). Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. *Phytotherapy Research*. 21:989-994.
- Lee JH, Lee SH, Park CG, Park CB, Kim OT, Choi AJ, Kim YJ and Cha SW. (2013). Cultivation characteristics and variation of artemisinin contents by harvest time of *Artemisia annua* L. distributed in Korea. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 21:433-438.
- Lee JH, Song KY, Hyeon JY, Hwang IG, Kwak HS, Han JA, Chung YH and Seo KH. (2010). Comparison of standard culture method and real-time PCR assay for detection of *Staphylococcus aureus* in processed and unprocessed foods. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*. 30:410-418.
- Lee JY, Wang HJ, Shin DB and Cho YS. (2013). Antibiotic resistance and bacterial biofilm formation by *Staphylococcus aureus* strains isolated from various foods. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*. 41:96-104.
- Jang S, Kim TH, Lee AR, Lee AY, Choi G and Kim HK. (2012). Monitoring of heavy metal contents in commercial herbal medicines. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 20:434-439.
- Kalivoda EJ, Horzempa J, Stella NA, Sadaf A, Kowalski RP, Nau GJ and Shanks RMQ. (2011). New vector tools with a hygromycin resistance marker for use with opportunistic pathogens. *Molecular Biotechnology*. 48:7-14.
- Kang TY, Kang ST, Ihn YH, Lee YH, Cho DY, Lee SJ, Son WG, Heo MS and Jeong DK. (2010). Prevention of salmonella infection in layer hen fed with microbial fermented citrus shell. *Journal of Life Science*. 2:190-196.
- Kettle A and Schacht J. (2002). Antioxidant therapy: A promising approach to the prevention of noise- and drug-induced hearing loss. *Korean Journal of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery*. 45:931-935.
- Kim DS, Baek NI, Oh SR, Jung KY, Lee IS and Lee HK. (1997). NMR assignment of brazilin. *Phytochemistry*. 46:177-178.
- Kim E, Choi CH, Kim IH, Lee HI and Song YS. (2013). Antibacterial effect of huanggeumjakyak-tang against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Korean Medicine Rehabilitation*. 23:15-26.
- Kim EA. (2013). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection in neonates. *Neonatal Medicine*. 20:354-360.
- Kim KM, Yoo JH, Choi JH, Park ES, Kim KS, Kim KS, Kim SR, Kim SM, Kim HJ, Jung JS, Yoo KH, Oh HS, Yoon SW, Suh MR, Yoon YK, Lee JY, Jang YS, Jin HY, Kim SW, Kim YR, Kim YS, Kim YS, Kim JU, Kim JM, Peck KR, Lee H, Oh MD, Oh SH, Lee WK, Lee SH, Chung MH, Jung SI, Cheong HJ and Shin WS. (2006). The nationwide surveillance results of nosocomial infections along with antimicrobial resistance in intensive care units of sixteen university hospitals in Korea, 2004. *Korean Journal of Nosocomial Infection Control*. 11:79-86.
- Kim NY, Jang MK, Jeon MJ, Lee DG, Jang HJ, Lee SW, Kim M, Kim SG and Lee SH. (2010). Verification of antimicrobial activities of various pine needle extracts against antibiotic resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Life Science*. 20:589-596.
- Kim SJ. (2011). Comparison between antimicrobial susceptibility test and *mecA* PCR method for reading of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Korean Journal of Microbiology*. 47:381-385.
- Kim SK, Lee YS, Lee TJ, Lee TY and Kim HS. (1993). Identification and antimicrobial susceptibility aspects of pathogenic *Staphylococcus aureus*. *The Journal of the Korean Society for Microbiology*. 28:251-259.
- Kwon HJ, Jung UH, Park HR, Shin DH and Jo SK. (2007). Effects of gamma irradiation on color changes and antioxidative activities of *Caesalpinia sappan* L. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 36:1055-1061.
- Leclercq R, Derlot E, Duval J and Courvalin P. (1998). Plasmid mediated resistance to vancomycin and teicoplanin. *New England Journal of Medicine*. 319:157-161.
- Pfister P, Risch M, Brodersen DE and Bottger EC. (2003). Role of 16S rRNA helix 44 in ribosomal resistance to hygromycin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 47:1496-1502.
- Shin SH and Seong IW. (2006). Antimicrobial activity of the extracts from *Paeonia japonica* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Korean Journal of Microbiology*. 42:54-58.