大黃牽牛散 에탄올 추출물의 Methicillin 내성 Staphylococcus aureus에 대한 항균활성 연구

박주영* · 나용수* · 오공천* · 이상미* · 최병권* · 이윤승⁺ · 송용선⁺
원광대학교 한의학전문대학원 제3의학과*, 원광대학교 한의과대학 한방재활의학교실⁺

A Study on Antibacterial Activity of Daehwanggeonwoo-san(*Dahwangqianniu-san*) Ethanol Extract against Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus

Ju-yeong Park, Ph.D.* , Yong-su Na*, Gong-cheon Oh*, Sang-mi Lee*, Byeong-kwon Choi*,
Yoon-seung Lee, K.M.D.⁺, Yung-sun Song, K.M.D.⁺

Department of third medicine of Korean Medicine, professional graduate school of Oriental medicine, Won-kwang University*,
Department of Rehabilitation Medicine of Korean Medicine, College of Korean Medicine, Won-kwang University⁺

본 연구는 2017년 원광대학교
교내연구비 지원의 결과입니다.

RECEIVED Mar 18, 2018
ACCEPTED Apr 3, 2018

CORRESPONDING TO
Yung-Sun SONG, Department of
Rehabilitation Medicine of Korean
Medicine, College of Korean
Medicine, Won-Kwang University, 99,
Garyeonsan-ro, Deokjin-gu, Jeonju
561-851, Korea

TEL (063) 270-1070
FAX (063) 270-1594
E-mail yssong@wku.ac.kr

Copyright © 2018 The Society of
Korean Medicine Rehabilitation

Objectives The objective of this study is to determine the antimicrobial effect of Daehwanggyeonwoo-san(*Dahwangqianniu-san*, DGE) and synergistic effects with antibiotics oxacillin, ampicillin, and gentamicin against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus(MRSA).

Methods The antibacterial activity of DGE extract was evaluated against MRSA strains by using the Disc diffusion method, broth microdilution method(minimal inhibitory concentration; MIC), checkerboard dilution test. The checkerboard dilution test was used to examine synergistic effect of oxacillin, ampicillin, gentamicin, ciprofloxacin with DGE extract.

Results DGE showed antimicrobial activity against MRSA with an MIC value of 125 ~ 250 µg/mL. In the checkerboard test, the interaction of DGE with all tested antibiotics produced almost synergy or partial synergy against MRSA.

Conclusions This study shows that DGE reduced the MICs of several antibiotics tested, and a remarkable antibacterial effect of DGE, with membrane permeability enhancers and ATP synthase inhibitors. This study can be a valuable source for the development of a new drug with low MRSA resistance. (*J Korean Med Rehabil* 2018;28(2):21-35)

Key words Daehwanggyeonwoo-san(*Dahwangqianniu-san*, DGE), methicillin-resistant Staphylococcus aureus(MRSA), antibacterial effect, MIC.

서론»»»»

인간의 거의 모든 포도상구균성 질병은 증식할 때 포도상 세포군집을 형성하는 통성 혐기성 구균인 *Staphylococcus aureus*(*S. aureus*)에 의해서 일어난다. *S. aureus*는 건강한 사람 또는 가축의 피부와 비공에 상재하여 이 중 절반 이상이 식중독을 일으키는 내열성의 장독소(enterotoxin)를 생산한다¹⁻³⁾. 1940년대 초반 이래로 황색포도상구균 감염

증의 치료에 항균력이 우수한 penicillin, methicillin 등의 항생제를 사용하여 왔으며, 1961년 영국에서 MRSA(methicillin-resistant Staphylococcus aureus) 처음 보고 되었으며, 1981년 국내에서 처음 보고된 이래로 대표적인 병원감염균주인 MRSA는 국내 병원들의 임상 검체로부터 분리한 황색포도상구균의 70%를 차지하고, 중환자실 분리균주 중 황색포도상구균의 80%를 차지하고 있다⁴⁾.

항생제의 과다 사용은 다제내성균의 출현 및 제어 실

패의 중요한 원인이 되는 만큼 주요 의료관련 감염 원인균의 항균제 내성발현기전, 항균제 내성 전파방지를 위한 내성획득기전, 병원체의 분자 역학적 분석을 통한 내성균 전파 규명을 위해 노력해야 할 것이다⁵⁾. 임상에서 항균 및 항암치료 효과를 상승시키기 위해 교차 내성(cross-resistance)이 없고, 작용 기전이 서로 다른 약제를 사용하는 복합요법이 주로 이용되고 있음에 따라 본 연구에서는 이러한 항생제 내성문제를 낮추어주기 위한 천연물 유래 항균물질의 가능성을 알아보고자 한다⁶⁻⁸⁾.

大黃牽牛散은 『素問病機氣宜保命集』⁹⁾ 卷中「熱論第十四」에 최초로 기재되었으며, 『東醫寶鑑』¹⁰⁾에 수록된 처방으로 “治相火遊走臟腑, 大便秘結”이라 하였다. 처방구성은 大黃과 牽牛子로 되어있으며, 大黃은 瀉下作用, 清熱涼血의 약리학적 효능을 가지고 있어, 항균, 항염, 항바이러스, 항종양 등의 다양한 효능이 있다고 알려져 있다¹¹⁻¹⁴⁾. 牽牛子は 瀉下祛積, 逐水退腫, 殺蟲의 약리학적 효능을 가지고 있어, lipopolysaccharide에 의해 유도된 RAW 264.7 cell에서 염증억제 효과, 간기능 개선효과 등이 보고된 바 있다^{15,16)}. 이와 같이 大黃과 牽牛子에 단미에 대한 효과는 보고되고 있지만 복합제제인 大黃牽牛散에 대한 연구는 아직까지 보고된 바가 없다.

이에 저자는 大黃牽牛散의 Disc 확산 실험을 통해 MRSA에 대한 항균활성을 검증하였으며, 최소억제농도(MIC)를 측정하여 기존 항생제와 大黃牽牛散 추출물을 병행처리 하였을 때 synergy effect 및 partial synergy effect를 조사하였고, 大黃牽牛散의 항균활성이 세포막 투과성과 ATPase 억제에 연관성이 있는가를 실험하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법»»»»

1. 大黃牽牛散의 제조

大黃牽牛散은 『東醫寶鑑』¹⁰⁾의 처방을 기준으로 大黃 10 g, 牽牛子 5 g을 3첩 분량 45 g을 70% ethanol 500 mL로 추출하여 감압농축, 동결건조의 과정을 거쳐 18.8%의 수득률을 취했다(Table I).

Table I. The Composition of *Daehwanggyeonu-san* (*Dahwangqianniu-san*)

Herbal name	Pharmacognostic name	Weight
大黃	Rhei Rhizoma	10 g
牽牛子	Pharbitidis Semen	5 g

2. 시약

Mueller-Hinton agar(MHA)와 Mueller-Hinton broth(MHB)는 DifcoTM (Baltimore, MD, USA)에서, Tris-(hydroxymethyl) aminomethane은 AMRESCO(San Francisco, CA)에서, Sodium azide(NaN_3)는 Fluka (Neu-Ulm, Germany)에서, 항생제 oxacillin & ampicillin & gentamicin & ciprofloxacin과 Triton X-100, N,N -dicyclohexylcarbodiimide(DCC)는 Sigma-Aldrich(St. Louis, USA)에서 구입하여 실험에 사용하였다.

3. 균주 및 배양

본 실험에 사용한 표준균주(type strain) ATCC 33591은 American Type Culture Collection(Manassas, VA, USA)에서 구입하였고, CCARM 3090, 3091, 3095, 3102는 서울여대 항생제 내성 균주은행으로부터, DPS-1,2,3은 원광대학교 병원 성형외과에서 분양받아 임상균주로 사용하였다.

균주는 -79°C 냉동고에서 30% glycerol에 보관하다가, Mueller-Hinton agar(MHA)에 접종한 후 37°C 항온기(incubator)에서 24시간 배양하여 실험에 사용하였다.

4. 항균활성 측정

1) 디스크 확산법(Disc diffusion method)

大黃牽牛散 에탄올추출물(DGE)의 항균효과는 디스크 확산법을 통해 MRSA에 대한 항균활성을 측정하였다¹⁷⁻¹⁹⁾. 고압 멸균된 MHA에 24시간 배양된 균 100 μL 를 골고루 도말하여 최종적으로 1.5×10^5 CFU/mL이 되게 하였다. 다음으로 멸균된 paper disc(6 mm)에 DGE(25 μg , 50 μg , 100 μg , 200 μg)와 AP 10 μg 을 각각 20 μL 씩 주입하여 완전히 흡수시킨 후 37°C incubator에서 24시간 배양시켜 paper disc 주위에 형성된 억제직경을 측정

하였다.

2) 최소억제농도(Minimum inhibitory concentration, MIC)

최소억제농도(MIC)는 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2000) 방법에 따라 액체배지 희석법을 통해 측정하였다²⁰⁾. DGE를 액체배지에 농도별로 희석하여, 여기에 탁도 0.5 McFarland 1.5×10^8 CFU/mL을 기준으로 10 μ L씩 접종하여 최종적으로 1.5×10^5 CFU/well이 되게 하였다. 다음으로 37°C 항온기에서 24시간 배양 후 미생물이 증식되지 않는 가장 낮은 약물의 농도를 MIC로 측정하였다^{21,22)}.

3) 약물병용효과(Fractional inhibitory concentration index, FICI)

DGE와 항생제의 병용효과를 보기 위해 checkerboard dilution test를 실시하였다. 상용 항생제는 oxacillin (OX), ampicillin (AP), gentamicin (GT), ciprofloxacin (CP)이며 상기 액체배지 희석법과 동일한 방법으로 항생제를 병합하였을 때 MIC를 측정하였다.

FICI 산출기준은 다음과 같다^{22,23)}.

$$FICI = FICA + FICB = A/MICA + B/MICB$$

(MIC_A: 약물A의 MIC, MIC_B: 약물B의 MIC, A: 약물B를 병용한 약물A의 농도, B: 약물A를 병용한 약물B의 농도)

FICI < 0.5, synergy;

0.5 ≤ FICI < 0.75, partial synergy;

0.75 ≤ FICI < 1.0, additive effect;

1.0 ≤ FICI < 4.0, no synergy;

FICI ≥ 4.0, antagonism.

4) 생장곡선 분석(Growth curve assay)

DGE와 항생제 OX, AP, GT, CP를 병용했을 때 MRSA 증식 변화를 보기 위해 시간에 따른 MRSA의 생장곡선을 흡광도법(optical density, OD₆₀₀)으로 측정하였다^{24,25)}.

5) 세포막 투과성(cytoplasmic membrane permeability)과 Adenosine triphosphate(ATP) synthase 억제

DGE의 항균활성이 세포막 투과성 강화제와 ATP syn-

thase 저해제를 병합하였을 때 활성의 변화를 보기 위해 detergent인 Triton X-100(TX)과 Tris-(hydroxymethyl) aminomethane (Tris) 및 ATP synthase inhibitor를 사용하였다.

TX는 non-ionic detergent로 막 가용화 기능을 높임으로써 항생제 감수성을 증가시킬 수 있으며, TX와 Tris는 막투과성 증진제로 사용하였다²⁶⁻²⁷⁾.

N,N-Dicyclohexylcarbodiimide(DCCD)와 sodium azide (NaN₃)는 F₀-F₁-ATP synthase(F₀F₁)를 저해함으로써 ATP의 대사를 억제하는 것으로²⁸⁾, DGE의 항균활성이 MRSA의 ATP-dependent transport systems에 관여하는지 보기 위해 사용하였다.

5. 통계분석

모든 실험은 3회 이상 반복으로 이루어졌으며, 실험결과는 각 항목에 따라 평균치±표준편차 (SEM)를 구하여 그 유의성은 Student's t-test 분석법을 이용하여 신뢰수준 95% (p < 0.05)에서 통계적 유의차를 평가하였다.

결과»»»

1. 디스크 확산법(Disc diffusion method)

MRSA ATCC 33591, CCARM 3091, DPS-2에 대한 DGE의 항균효과는 디스크 확산법을 통해 나타냈다. DGE의 100 μ g/20 μ L 및 200 μ g/20 μ L에서 유효한 항균활성을 나타냈다(Fig. 1-3).

2. 최소억제농도(Minimum inhibitory concentration, MIC)

DGE의 항균활성은 최소억제농도(MIC)를 통해 확인하였다. MRSA 8균주에 대한 DGE의 최소억제농도는 125 ~ 250 μ g/mL이었다(Table II).

Fig. 1. Diameter of inhibition zone(mm) of DGE against MRSA(ATCC 33591).

Fig. 2. Diameter of inhibition zone(mm) of DGE against MRSA(CCARM 3091).

Fig. 3. Diameter of inhibition zone(mm) of DGE against MRSA(DPS-2).

Table II. Antimicrobial Activity of DGE Against 8 Strains of MRSA.

Strains	MIC ($\mu\text{g/mL}$)				
	DGE	OX	AP	GT	CP
CCARM 3090	250	62,5	125	1,95	0,48)
	250	1,000	15,6	0,48	31,25
CCARM 3091	125	500	31,25	1,000	7,8
CCARM 3095	250	250	15,6	125	250
CCARM 3102	125	250	250	250	62,5
DPS-1	250	3,9	15,6	31,25	0,48)
DPS-2	125	3,9	15,6	62,5	125
DPS-3	250	500	15,6	0,48)	31,25

OX, oxacillin; AP, ampicillin; GT, gentamycin; CP, ciprofloxacin.

Table III. Results of the Combination of DGE and OX Against MRSA.

Strains	agent	MIC ($\mu\text{g/mL}$)		FIC	FICI	Outcome
		Alone	Combination			
ATCC 33591	DGE	250	125	0,5	0,56	Partial S
	OX	62,5	3,9	0,06		
CCARM 3090	DGE	250	15,6	0,06	0,56	Partial S
	OX	1,000	500	0,5		
CCARM 3091	DGE	250	62,5	0,25	0,31	S
	OX	500	31,25	0,06		
CCARM 3095	DGE	250	62,5	0,25	0,28	S
	OX	250	7,8	0,03		
CCARM 3102	DGE	250	125	0,5	1,0	AE
	OX	250	125	0,5		
DPS-1	DGE	250	250	1,0	2,0	NS
	OX	3,9	3,9	1,0		
DPS-2	DGE	250	250	1,0	2,0	NS
	OX	3,9	3,9	1,0		
DPS-3	DGE	250	250	1,0	2,0	NS
	OX	500	500	1,0		

OX; oxacillin, S, synergy; AE, additive effect; NS, no synergy.

3. 약물병용효과(Fractional inhibitory concentration index, FICI)

1) DGE와 oxacillin(OX)의 병용효과

DGE와 베타락탐계(β -lactams) 항생제의 상승효과를 조사하기 위해 베타락탐계 항생제인 OX를 병용한 결과, MRSA 4균주에서 synergy effect 및 partial synergy effect를 나타냈다(Table III). 15,6~125 $\mu\text{g/mL}$ DGE에서 OX

의 농도를 2~32배 감소시켰다.

2) DGE와 ampicillin(AP)의 병용효과

DGE와 베타락탐계(β -lactams) 항생제인 AP를 병용한 결과, MRSA 6균주에서 synergy effect 및 partial synergy effect를 나타냈다(Table IV). 15,6~125 $\mu\text{g/mL}$ DGE에서 AP의 농도를 2~64배 감소시켰다.

Table IV. Results of the Combination of DGE and AP Against MRSA.

Strains	agent	MIC (μg/mL)		FIC	FICI	Outcome
		Alone	Combination			
ATCC 33591	DGE	250	15,6	0,06	0,56	Partial S
	AP	125	62,5	0,5		
CCARM 3090	DGE	250	125	0,5	0,51	Partial S
	AP	15,6	0,24	0,01		
CCARM 3091	DGE	250	125	0,5	0,75	Partial S
	AP	31,25	7,8	0,25		
CCARM 3095	DGE	250	62,5	0,25	0,5	S
	AP	15,6	3,9	0,25		
CCARM 3102	DGE	250	62,5	0,25	0,75	Partial S
	AP	250	125	0,5		
DPS-1	DGE	250	250	1,0	2,0	NS
	AP	15,6	15,6	1,0		
DPS-2	DGE	250	15,6	0,06	0,18	S
	AP	15,6	0,97	0,12		
DPS-3	DGE	250	250	1,0	2,0	NS
	AP	15,6	15,6	1,0		

AP; ampicillin, S, synergy; NS, no synergy.

Table V. Results of the Combination of DGE and GT Against MRSA.

Strains	agent	MIC (μg/mL)		FIC	FICI	Outcome
		Alone	Combination			
ATCC 33591	DGE	250	7,8	0,03	1,03	NS
	GT	1,95	1,95	1,0		
CCARM 3090	DGE	250	1,95	0,01>	1,01>	NS
	GT	0,48	0,48	1,0		
CCARM 3091	DGE	250	15,6	0,06	0,56	Partial S
	GT	1,000	500	0,5		
CCARM 3095	DGE	250	62,5	0,25	0,5	S
	GT	125	31,25	0,25		
CCARM 3102	DGE	250	62,5	0,25	0,75	Partial S
	GT	250	125	0,5		
DPS-1	DGE	250	7,8	0,03	0,15	S
	GT	31,25	3,9	0,12		
DPS-2	DGE	250	62,5	0,25	0,5	S
	GT	62,5	15,6	0,25		
DPS-3	DGE	250	-	-	-	-
	GT	0,48>	-	-		

GT; gentamicin, S, synergy; NS, no synergy.

Table VI. Results of the Combination of DGE and CP Against MRSA.

Strains	agent	MIC (μg/mL)		FIC	FICI	Outcome
		Alone	Combination			
ATCC 33591	DGE	250	-	-	-	-
	CP	0.48)	-	-	-	-
CCARM 3090	DGE	250	1.95	0.1)	0.13	S
	CP	31.25	0.97	0.03		
CCARM 3091	DGE	250	31.25	0.12	0.37	S
	CP	7.8	1.95	0.25		
CCARM 3095	DGE	250	15.6	0.06	0.31	S
	CP	125	31.25	0.25		
CCARM 3102	DGE	250	62.5	0.25	0.75	Partial S
	CP	62.5	31.25	0.5		
DPS-1	DGE	250	-	-	-	-
	CP	0.48)	-	-	-	-
DPS-2	DGE	250	1.95	0.1)	0.13	S
	CP	250	7.8	0.03		
DPS-3	DGE	250	125	0.5	0.53	Partial S
	CP	15.6	0.48	0.03		

CP; ciprofloxacin, S, synergy.

3) DGE와 gentamicin(GT)의 병용효과

DGE와 아미노글리코사이드계(aminoglycosides) 항생제의 상승효과를 조사하기 위해 GT를 병용한 결과, 실시한 MRSA 7균주 중 5균주에서 synergy effect 및 partial synergy effect를 나타냈다(Table V). 7.8~62.5 μg/mL DGE에서 GT의 농도를 2~8배 감소시켰다.

4) DGE와 ciprofloxacin(CP)의 병용효과

DGE와 퀴놀론계(quinolons) 항생제의 상승효과를 조사하기 위해 CP를 병용한 결과, 실시한 MRSA 6균주에서 synergy effect 및 partial synergy effect를 나타냈다(Table VI). 1.95~125 μg/mL DGE에서 CP의 농도를 2~32배 감소시켰다.

4. Growth curve assay

DGE(250 μg/mL)와 항생제 OX, AP, GT, CP를 병용하였을 때 MRSA의 생장곡선은 Fig.4 -7에 나타났다.

1) DGE + OX에서 MRSA(CCARM 3091)의 생장곡선

DGE와 OX의 1/2 MIC를 단일 및 병용하여 24시간동안 처리한 결과, 약물을 처리하지 않은 군에 비해 OX군은 비교적 정상적인 증식상태를 나타냈으며 DGE군은 약물활성에 의해 증식이 억제되었으나 8시간 이후부터 MRSA 증식이 점차 증가하는 양상을 나타냈다. 반면에 DGE와 OX를 병용한 군에서는 확연하게 억제된 MRSA의 증식을 보여주었다(Fig. 4).

2) DGE + AP에서 MRSA(DPS-2)의 생장곡선

DGE와 AP의 1/2 MIC를 단일 및 병용하여 24시간동안 처리한 결과, 약물을 처리하지 않은 군에 비해 AP와 DGE군은 약물활성에 의해 저해되었으나 동일한 양상을 나타냈다. 반면에 DGE와 AP를 병용한 군에서는 완전히 억제된 MRSA의 증식을 보여주었다(Fig. 5).

3) DGE + GT에서 MRSA(DPS-1)의 생장곡선

DGE와 GT의 1/2 MIC를 단일 및 병용하여 24시간동안 처리한 결과, 약물을 처리하지 않은 군과 GT군은 비슷한 증식양상을 나타냈으나 DGE군과 DGE와 GT병용

Fig. 4. Growth Curves for MRSA(CCARM 3091) in the Presence or Absence of DGE and Oxacillin(OX). Bacterial Cell Growth was Measured by Using OD at 600 nm at Indicated Time Points.

Fig. 5. Growth Curves for MRSA(DPS-2) in the Presence or Absence of DGE and Ampicillin(AP). Bacterial Cell Growth was Measured by Using OD at 600 nm at Indicated Time Points.

Fig. 6. Growth Curves for MRSA(DPS-1) in the Presence or Absence of DGE and Gentamycin(GT). Bacterial Cell Growth was Measured by Using OD at 600 nm at Indicated Time Points.

Fig. 7. Growth Curves for MRSA(CCARM 3095) in the Presence or Absence of DGE and Ciprofloxacin(CP). Bacterial Cell Growth was Measured by Using OD at 600 nm at Indicated Time Points.

Fig. 8. Effect of the Membrane-Permeabilizing Agent TX on the Susceptibility of MRSA(ATCC 33591) to DGE. The Viability of Bacteria was Determined Spectrophotometrically(Optical Density at 600 nm, OD₆₀₀) After Incubation for 24 hr with 7.8 µg/mL DGE and 0.0001% TX. The Data are Average of Triple-Independent Experiments. *p < 0.01 Compared to Control(CON).

Fig. 9. Effect of the Membrane-Permeabilizing Agent TRIS on the Susceptibility of MRSA(ATCC 33591) to DGE. The Viability of Bacteria was Determined Spectrophotometrically(Optical Density at 600 nm, OD₆₀₀) After Incubation for 24Hr with 7.8 µg/mL DGE and 62.5 µg/mL Tris. The Data are Average of Triple-Independent Experiments. *p < 0.01 Compared to Control(CON).

Fig. 10. Effect of the ATP Synthase Inhibitor DCCD on the Susceptibility of MRSA(ATCC 33591) to DGE. The Viability of Bacteria was Determined Spectrophotometrically(OD₆₀₀) after Incubation for 24 Hr with 7.8 μ g/mL DGE and 62.5 μ g/mL DCCD. The Data are Average of Triple-Independent Experiments. *p < 0.01 Compared to Control(CON).

Fig. 11. Effect of the ATP Synthase Inhibitor NaN₃ on the Susceptibility of MRSA(ATCC 33591) to DGE. The Viability of Bacteria was Determined Pectrophotometrically(OD₆₀₀) after Incubation for 24Hr with 7.8 μ g/mL DGE and 50 μ g/mL NaN₃. The Data are Average of Triple-Independent Experiments. *p < 0.01 Compared to Control(CON).

균은 약물활성에 의해 확연하게 억제된 MRSA의 증식을 보여주었다(Fig. 6).

4) DGE + CP에서 MRSA(CCARM 3095)의 생장곡선

DGE와 CP의 1/2 MIC를 단일 및 병용하여 24시간동안 처리한 결과, 약물을 처리하지 않은 군에 비해 CP군은 비교적 정상적인 증식상태를 나타냈으며 DGE군은 약물활성에 의해 증식이 억제되었으나 8시간 이후부터 MRSA 증식이 점차 증가하는 양상을 나타냈다. DGE와 CP를 병용한 군에서는 확연하게 억제되다가 8시간 이후 점차 증가하는 MRSA의 증식을 보여주었다(Fig. 7).

5. DGE와 막 투과성 증진제 및 ATP synthase 억제제

1) DGE와 막 투과성 증진제의 효과

DGE의 항균활성과 막 투과성 증진제의 효과를 조사하기 위해, 7.8 μ g/mL DGE와 0.0001% TX 및 62.5 μ g/mL Tris를 각각 병용하였다. 그 결과, 병용처리한 약물에서 MRSA(ATCC 33591)의 생존력을 각각 70%와 85%로 감소시켰다(Fig. 8, 9).

2) DGE와 ATP synthase 억제제의 효과

ATP synthase를 감소시키는 대사억제제로써, DCCD와

NaN₃을 7.8 µg/mL DGE와 각각 병용한 결과, 각각 82%와 47%의 억제율을 나타냈다(Fig. 10, 11).

고찰»»»»

황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*)는 농가진, 종기, 상처의 농양 등 화농성의 피부감염 뿐 아니라 결핵, 폐렴 및 독성 쇼크증후군 등의 중증감염을 포함한 광범위한 감염을 일으킬 수 있다^{29,30}. 병원성 *S. aureus*는 높은 2차 감염률의 원인균으로 혈액응고효소(coagulase), 백혈구사멸소(leucocidin)와 용혈소(hemolysin) 등의 전염병 발생에 중요한 세포외 단백질을 생성해낸다³¹⁻³³. 이중 반합성 penicillin인 methicillin에 내성을 보이는 것을 methicillin 내성 황색포도상구균(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; MRSA)이라 한다³⁴. *S. aureus*는 β -lactam 계열 항생제의 표적인 새로운 penicillin binding protein(PBP 2a)을 생성하여 *mec* 유전자에 의해 β -lactam 항생제와의 친화도가 낮은 새로운 페니실린 결합 단백질(penicillin binding protein, PBP 2a)을 생성하여 methicillin에 내성을 가지게 된다³⁵⁻³⁷.

세계 곳곳에서 항생제 내성으로 인해 다제내성균이 발생하고 있다. 항생제의 과다 사용은 다제내성균의 출현 및 제어 실패의 중요한 원인이 되는 만큼 적절한 대책이 시급하다^{38,39}. 최근 국내병원 중환자실에서 분리되는 *S. aureus*에서 메티실린(methicillin)내성이 90%로 보고되는 등 여러 계열의 항생제에 다제내성을 보이고 있어 이러한 다제내성균의 증가와 확산은 기존의 항생제로는 더 이상 치료하기 어려운 상황에 직면하게 했다^{40,41}. 최근 연구동향은 기존의 항균제들과는 다른 차별화된 새로운 작용기전을 갖거나 기존 항균제의 구조를 변형시켜 내성균에 효과를 보이는 광범위 스펙트럼 항생제를 개발하는 것이다. 또한 항생제 내성 발생으로 인한 항생제의 시장 판매주기가 짧은 점으로 개발비용이 낮은 점을 고려하여야 한다. 항균제 병용요법은 1차 단독요법의 실패를 극복, 효과적인 항균 범위를 확보하기 위한 2차 항생제에 있어 다제내성균에 유효한 항생효과를 발휘하여야 하며 병용 약제와의 상호작용 등 임상적 특성도 고려되어야 한다⁴²⁻⁴⁴.

大黃牽牛散은 『東醫寶鑑』에 수록된 처방으로 大黃牽牛散을 이루는 개별 약재의 본초학적인 효능을 살펴보면, 大

黃은 蓼科(여뀌과; Polygonaceae)에 속한 多年生高大草本인 장군풀 및 同屬近緣植物의 根 및 根莖이다. 苦, 寒, 無毒하고 脾, 胃, 大腸, 肝, 心 五經에 작용하며 攻積導滯, 瀉火解毒 行瘀通經, 清利濕熱 등의 효능이 있어 實熱便秘, 積滯腹痛, 腸癰, 瀉利不爽, 瘀血經閉, 濕熱黃疸 등의 병증을 치료한다. 牽牛子是 旋花科(메꽃과; Convolvulaceae)에 속한 1年生攀援草本인 나팔꽃 및 둥근나팔꽃의 成熟한 種子이다. 苦, 辛, 寒, 大毒하고 肺, 腎, 大腸 三經에 작용하며 瀉下祛積, 逐水退腫, 殺蟲, 瀉肺逐痰 등의 효능이 있어 水腫脹滿, 二便不通, 諸蟲病, 痰飲積聚, 氣逆哮喘 등의 병증을 치료한다⁴⁵.

개별 약재의 성분 및 이전 연구를 살펴보면, 大黃의 주요성분은 glucosides rhein-8monoglucoside, physcion monoglucoside, aloemodin monoglucoside, sennoside tannin, gallic acid, catechin 등으로 보고되었다⁴⁶. 大黃에 관련된 이전 연구로는 최 등⁴⁷이 지방조직의 염증 및 인슐린 저항성에 미치는 영향을 알아보았으며, 장 등⁴⁸, 조 등⁴⁹, 이 등⁵⁰이 大黃의 혈당 및 혈청 지질 개선에 효과가 있다는 발표가 있었으며, 윤 등⁵¹은 HepG2 Cell에 대한 항암효과, 박 등⁵²의 항산화 효과와 MMP-1의 활성 저해 효과에 대한 실험 등 다양한 실험적 연구가 있었다. 또한 大黃에 대한 항균활성에 대한 연구로는 이⁵³의 大黃에서 분리된 플로로탄닌의 여드름균에 대한 항균 및 시너지효과를 보고하였으며, 엄⁵⁴의 MRSA에 대한 항균물질의 화학구조 구명 및 작용기작을 해석한 연구가 있으며, 최⁵⁵의 大黃에서 추출한 emodin의 MRSA에 대한 항균작용이 보고되고 있고, 이와 같이 항균효과에 대해 많은 보고가 있었다. 牽牛子の 대표 성분은 Gibberel- lenic acid, Pharbitin, Nilic acid, Pharbitic acid 등이 함유되어 있다고 보고되어져 있으며⁵⁶, 牽牛子の 성분 중 Pharbitin은 腸道, 腎腸, 中추신경 계통 등에 손상을 일으킨다⁵⁷. 牽牛子에 대한 실험적 연구로는 고 등¹⁵, 윤 등⁵⁸이 소염 및 해열작용에 미치는 영향을 보고하였고, 김 등⁵⁹이 조골세포 분화에 미치는 영향을 연구하였고, MRSA에 대한 항균작용에 대한 보고는 없었다. 현재까지 大黃牽牛散에 대한 연구는 보고되지 않았으며, 항균활성 연구가 보고된 大黃에 瀉下祛積, 殺蟲의 효능을 가진 牽牛子가 처방되어 보다 높은 항균효과를 높일 수 있기를 기대하는 大黃牽牛散에 대한 연구가 필요하리라 사료된다.

본 실험은 DGE의 MRSA에 대한 항균효과와 기존 항생

제와의 상승작용 및 세포의 구조적 특성과 에너지대사에 기인하여 항균활성의 작용기작을 조사하였다. 大黃과 牽牛子の 두 약물로 이루어진 DGE는 디스크 확산법을 통해 MRSA ATCC 33591, CCARM 3091, DPS-2에 유효한 항균활성을 나타냈다. 또한 MRSA 표준균주와 임상균주를 포함한 8균주에서 우수한 항균효과를 나타냈다.

DGE를 항생제와 병용처리 하였을 때 MRSA에 대한 상승효과를 확인하기 위해 베타락탐계(OX & AP), 아미노글리코사이드계(GT) 및 퀴놀론계(CP) 항생제를 병합한 결과, 대부분 상승효과를 나타내었으며, DGE와 항생제 OX, AP, GT, CP를 병용하였을 때 MRSA의 생장곡선을 분석한 결과, 병용한 균에서는 확연하게 억제된 MRSA의 증식을 보여주었다. 이는 DGE가 다제내성을 갖는 MRSA의 항생제 내성을 낮추어줄 수 있는 천연물 항균제로써의 가능성을 유추할 수 있었다^{21,60,61}.

DGE의 항균활성과 막 투과성 증진제 및 ATP synthase 억제제 효과를 조사하기 위해, 7.8 µg/mL DGE와 0.0001% TX 및 62.5 µg/mL Tris를 각각 병용하였다. 그 결과, 병용처리한 약물에서 MRSA(ATCC 33591)의 생존력을 감소시켰으며, ATP synthase를 감소시키는 대사억제제로써, DCCD와 NaN₃을 7.8 µg/mL DGE와 각각 병용한 결과, 억제율을 나타냈다. DGE의 항균활성은 세포막의 구조적 특성과 에너지대사 기능에 있어서 침투력이 상승했다. 세포벽 안쪽에서 세포질을 둘러싸고 있는 세포막(cytoplasmic membrane)은 세포 내외로 물질의 선택적 투과성을 부여한다. 이는 어떤 분자나 이온들은 쉽게 막을 통과할 수 있지만 어떤 것들은 제한을 받는다⁶². 大黃牽牛散과 병용투여 하였을 때 TX와 Tris가 MRSA의 막 표면 구조를 보완시켜 세포내로 침투하는 항생제의 이동을 증가시키는 데 기인하여 大黃牽牛散 항균활성의 침투력을 높여주었다고 사료된다. 세포막은 cytochrome oxidase, dehydrogenase, ATPase, protein synthetase 등 에너지 생산 및 물질 생산에 필요한 다양한 효소와 전자운반체를 갖고 있다. ATP synthase는 ADP와 인산을 합성하여 ATP를 만들어내는 반응 촉매효소로써 DCCD와 NaN₃은 이러한 ATP 대사를 저해하는 데 기인하여 大黃牽牛散의 항균활성을 증진시켰을 것으로 사료된다.

위 실험들로 보아 大黃牽牛散 에탄올 추출물에는 MRSA를 저해할 수 있는 강한 항균효과가 있음을 확인하였고, 또한 기존의 항생제와 병용하였을 때 약물 상승효과를 볼

수 있어 MRSA에 대한 항생제 후보물질 중 하나로 大黃牽牛散 또는 大黃牽牛散과 항생제의 병용요법이 충분한 가치가 있음을, 더 나아가 기존 항생제의 사용을 감소시킬 수 있는 후보물질임을 기대할 수 있을 것으로 사료된다. 그러나 임상에서 실제 치료에 응용하기 위하여 향후 임상시험을 통한 항균효과 및 항생제 병용 효과에 대한 추가적인 연구가 필요할 것이라 사료된다.

결론»»»

大黃牽牛散 에탄올추출물(DGE)의 Methicillin 내성 *Staphylococcus aureus*(MRSA)에 대한 항균활성을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. DGE는 디스크 확산법을 통해 MRSA 세 균주에 대해 100 µg/20 µL 및 200 µg/20 µL에서 항균효과를 나타냈다.
2. DGE의 MRSA 최소억제농도는(MIC)는 125~250 µg/mL 이었다.
3. DGE와 항생제 OX, AP, GT, CP의 병용결과, 大黃牽牛散 1.95~125 µg/mL에서 상승효과를 나타냈으며, 항생제의 농도를 2배~64배 낮추어주었다.
4. DGE는 TX와 Tris가 막투과성을 증가시켜 항균활성의 침투력을 증가시켰다.
5. DGE는 DCCD와 NaN₃가 ATP 대사를 저해하여 항균활성이 증진되었다.

이상 실험 결과, 大黃牽牛散 에탄올추출물이 MRSA에 유효함과, 기존 항생제와의 상승효과로 항생제 농도를 낮추어줄 수 있어 다제내성 MRSA에 대한 항생제 후보물질로써 가능성을 시사하는 바이다.

References»»»

1. Rao Q, Shang W, Hu X, Rao X. *Staphylococcus aureus* ST121: a globally disseminated hypervirulent clone. *J Med Microbiol*. 2015;64(12):1462-73. DOI:10.1099/jmm.0.000185.
2. da Silva Sdos S, Cidral TA, Soares MJ, de Melo MC. Enterotoxin-encoding genes in *staphylococcus* spp. from food handlers in a university restaurant. *Foodborne*

- Pathog Dis. 2015;12(11):921-5.
3. Zhao WH, Hu ZQ, Okubo S, Hara Y, Shimamura T. Mechanism of synergy between epigallocatechin gallate and beta-lactams against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45(6):1737-42.
4. Korea National Institute of Health. Investigation of Infection Patterns and carrier of MRSA in Newborn Infants [Internet]. 2011. Available from: <http://www.nih.go.kr>
5. Mihailescu R, Furustrand T, Corvec S, Oliva A, Betrisey B, Borens O, Trampuz A. High activity of fosfomicin and rifampin against methicillin-resistant Staphylococcus aureus biofilm In Vitro and in an experimental foreign-body infection model. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(5):2547-53.
6. Pham MH, Delestre L, Dewitte A, Wattez N, Lepretre F, Lansiaux A. Synergistic effect of SN-38 in combination with cetuximab on angiogenesis and cancer cell invasion. Anticancer Res. 2015;35(11):5983-91.
7. Arzuman L, Beale P, Proschogo N, Yu JQ, Huq F. Combination of genistein and cisplatin with two designed monofunctional platinum agents in human ovarian tumour models. Anticancer Res. 2015;35(11):6027-39.
8. Son DJ, Hong JE, Ban JO, Park JH, Lee HL, Gu SM, Hwang JY, Jung MH, Lee DW, Han SB, Hong JT. Synergistic inhibitory effects of cetuximab and cisplatin on human colon cancer cell growth via inhibition of the erk-dependent egf receptor signaling pathway. Biomed Res Int. 2015;2015:397563.
9. Yu WS. Byungigiyibomyungjip. Seoul:Mok and Toe. 2000:154-163.
10. Heo J. Dongyibogam. Hadong:Dongyibogam Publisher. 2005:420-1.
11. You X, Feng S, Luo S, Cong D, Yu Z, Yang Z, Zhang J. Studies on a rhein-producing endophytic fungus isolated from Rheum palmatum L. Fitoterapia. 2013;85:161-8.
12. Ma YS, Hsiao YP, Lin JH, Hsu SC, Chueh FS, Weng SW, Lai KC, Lin JG, Chung JG. Crude extract of Rheum palmatum L inhibits migration and invasion of LS1034 human colon cancer cells acts through the inhibition of matrix metalloproteinase-2/-9 by MAPK signaling. Environ Toxicol. 2015;30(7):852-63.
13. Campbell MJ, Hamilton B, Shoemaker M, Tagliaferri M, Cohen I, Tripathy D. Antiproliferative activity of Chinese medicinal herbs on breast cancer cells in vitro. Anticancer Res. 2002;22(6C):3843-52.
14. Wang J, Zhao H, Kong W, Jin C, Zhao Y, Qu Y, Xiao X. Microcalorimetric assay on the antimicrobial property of five hydroxyanthraquinone derivatives in rhubarb (Rheum palmatum L.) to Bifidobacterium adolescentis. Phytomedicine. 2010;17(8-9):684-9.
15. KO MJ, Park SY, Lee KJ, Yi TH, Lee WC, Han CK, Khil JH. Anti-inflammatory effects of Pharbitis nil Choisy in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 cells. The Journal of Cosmetological Science. 2010;6(2):105-11.
16. Keum SS, You KW. Effect of Wubangja on the serum lactate dehydrogenase and protein content of hepatic insufficiency. Journal of Korean medicine. 1978;15(1):59-68.
17. Lee SA. Antimicrobial activity of Papefussia kuromi against methicillin-resistant Staphylococcus aureus [master's thesis]. [Iksan]:wonkwang university;2014.
18. Veljić M, Tarbuk M, Marin PD, Ćirić A, Soković M, Marin M. Antimicrobial activity of methanol extracts of mosses from Serbia. Pharm Biol. 2008;46(12):871-5.
19. Bala M, Ray K, Gupta SM. Comparison of disc diffusion results with minimum inhibitory concentration (MIC) values for antimicrobial susceptibility testing of Neisseria gonorrhoeae. Indian J Med Res. 2005;122(1):48-51.
20. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standards. CLSI/ document M7-A5. Wayne, PA:CLS;2000.
21. Mun SH, Kang OH, Joung DK, Kim SB, Seo YS, Choi JG, Lee YS, Cha SW, Ahn YS, Han SH, Kwon DY. Combination Therapy of Sophoraflavanone B against MRSA: In Vitro Synergy Testing. Foodborne Pathog Dis. 2014;11(3):234-9.
22. Mun SH, Kang OH, Joung DK, Kim SB, Choi JG, Shin DW, Kwon DY. In vitro anti-MRSA activity of carvone with gentamicin. Exp Ther Med. 2014;7(4):891-6.
23. Mun SH, Lee YS, Han SH, Lee SW, Cha SW, Kim SB, Seo YS, Kong R, Kang DH, Shin DW, Kang OH, Kwon DY. In vitro potential effect of morin in the combination with β -Lactam antibiotics against methicillin-resistant staphylococcus aureus. Foodborne Pathog Dis. 2015;12(6):545-50.
24. Santiago C, Pang EL, Lim KH, Loh HS, Ting KN. Reversal of ampicillin resistance in MRSA via inhibition of penicillin-binding protein 2a by Acalypha wilkesiana. Biomed Res Int. 2014;2014:965348.
25. Santiago C, Pang EL, Lim KH, Loh HS, Ting KN. Inhibition of penicillin-binding protein 2a (PBP2a) in methicillin resistant Staphylococcus aureus(MRSA) by combination of ampicillin and a bioactive fraction from Duabanga grandiflora. BMC Complement Altern Med. 2015;15:178.
26. Komatsuzawa H, Suzuki J, Sugai M, Miyake Y, Suganaka H. The effect of Triton X-100 on the in vitro susceptibility of methicillin-resistant Staphylococcus aureus to oxacillin. J Antimicrob Chemother. 1994;34(6):885-97.
27. Irvin RT, MacAlister TJ, Costerton JW. Tris (hydroxymethyl) aminomethane buffer modification of Escherichia coli outer membrane permeability. J Bacteriol. 1981;145(3):1397-403.

- PMid:7009585 PMCID:PMC217144
28. Toei M, Noji H. Single-molecule analysis of F0F1-ATP synthase inhibited by N,N-dicyclohexylcarbodiimide. *J Biol Chem*. 2013;288(36):25717-25726.
 29. Rudkin JK, Edwards AM, Bowden MG, Brown EL, Pozzi C, Waters EM, Chan WC, Williams P, O'Gara JP, Massey RC. Methicillin resistance reduces the virulence of healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by interfering with the agr quorum sensing system. *J Infect Dis*. 2012;205(5):798-806.
 30. Takahashi N, Imanishi K, Uchiyama T. Overall picture of an emerging neonatal infectious disease induced by a superantigenic exotoxin mainly produced by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Immunol*. 2013;57(11):737-45.
 31. Stanier RY, John L, Ingraham, Mark L, Wheelis, Page R, Palnter. Basic and applied microbiology. Bae M, translator. Seoul:Academy company;1998:544.
 32. Moellering RC Jr. MRSA: the first half century. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(1):4-11.
 33. Khosravi AD, Hoveizavi H, Farshadzadeh Z. The prevalence of genes encoding leukocidins in *Staphylococcus aureus* strains resistant and sensitive to methicillin isolated from burn patients in Taleghani Hospital, Ahvaz, Iran. *Burns*. 2012;38(2):247-51.
 34. Ba X, Harrison EM, Lovering AL, Gleadall N, Zadoks R, Parkhill J, Peacock SJ, Holden MT, Paterson GK, Holmes MA. Old drugs to treat resistant bugs: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates with mecC are susceptible to a combination of penicillin and clavulanic acid. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(12):7396-404.
 35. Mun SH, Joung DK, Kim YS, Kang OH, Kim SB, Seo YS, Kim YC, Lee DS, Shin DW, Kweon KT, Kwon DY. Synergistic antibacterial effect of curcumin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytomedicine*. 2013;20(8-9):714-8.
 36. Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 2001;9:486-93.
 37. Hiramatsu K, Katayama Y, Yuzawa H, Ito T. Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol*. 2002;292(2):67-74.
 38. Klitgaard JK, Skov MN, Kallipolitis BH, Kolmos HJ. Reversal of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* by thioridazine. *J Antimicrob Chemother*. 2008;62(6):1215-21.
 39. Ohlsen K, Lorenz U. Novel targets for antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiol*. 2007;2(6):655-6.
 40. Amaral L, Viveiros M, Kristiansen JE. 'Non-antibiotics': alternative therapy for the management of MDRTB and MRSA in economically disadvantaged countries. *Curr Drug Targets*. 2006;7(7):887-91.
 41. Viswanathan K, Frey KM, Scocchera EW, Martin BD, Swain Iii PW, Alverson JB, Priestley ND, Anderson AC, Wright DL. Toward new therapeutics for skin and soft tissue infections: propargyl-linked antifolates are potent inhibitors of MRSA and *Streptococcus pyogenes*. *PLoS One*. 2012;7(2):e29434.
 42. Poulsen MØ, Jacobsen K, Thorsing M, Kristensen NR, Clasen J, Lillebaek EM, Skov MN, Kallipolitis BH, Kolmos HJ, Klitgaard JK. Thioridazine potentiates the effect of a beta-lactam antibiotic against *Staphylococcus aureus* independently of mecA expression. *Res Microbiol*. 2013;164(2):181-8.
 43. Segatore B, Bellio P, Setacci D, Brisdelli F, Piovano M, Garbarino JA, Nicoletti M, Amicosante G, Perilli M, Celenza G. In vitro interaction of usnic acid in combination with antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates determined by FICI and ΔE model methods. *Phytomedicine*. 2012;19(3-4):341-7.
 44. Barber KE, Werth BJ, Ireland CE, Stone NE, Nonejuie P, Sakoulas G, Pogliano J, Rybak MJ. Potent synergy of ceftobiprole plus daptomycin against multiple strains of *Staphylococcus aureus* with various resistance phenotypes. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69(11):3006-10.
 45. Sin MK. Yimsangbonchohak. Seoul:YounglimSa. 2006:785-7, 791-3.
 46. Shah CS, Qadry JS, Bhatt JG. Qualitative and quantitative evaluation of anthraquinone derivatives in Indian rhubarb. *Planta Med*. 1972;22(1):103-8.
 47. Choi SB, Ma YH, Han YH, Jeong SJ, Jo HS. Effects of Rhei Radix et Rhizoma on insulin resistance and adipose tissue inflammatory response in high fat diet induced obese C57BL/6 mice. *J Int Korean Med*. 2014;35(2):195-207.
 48. Jang YH, Choi SW, Cho SH. Effect of Eisenia Bicyclis and its pill on serum lipid status in rats fed high fat diet. *Korean J Nutr*. 2008;41(1):5-12.
 49. Cho SH, Park SY, Choi SW. Effects of Eisenia Bicyclis extracts and pill on blood glucose and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic mice. *Korean J Nutr*. 2008;41(6):493-501.
 50. Lee YJ. The effects of fraction obtained from rhei rhizoma on the blood lipids in hypercholesterol rats. *Kor J Herbology*. 2000;15(2):87-93.
 51. Yun HJ, Hwang SG, Yun HJ, Kim CH, Seo GS, Park WH, Park SD. Anticancer effect of Rheum Rhizoma on human liver cancer HepG2 cells. *Kor J Herbology*. 2006;21(4):27-36.
 52. Park SM, Lee GW, Cho YH. Effect of Rheum undulatum extract on antioxidant activity and activity of matrix metalloproteinase-1 in human skin fibroblasts. *Journal*

- of Life Science. 2008;18(12):1700-4.
53. Lee JH. Antibacterial and synergistic effect of phlorotannins isolated from *Eisenia bicyclis* against acne-related bacteria [dissertation]. [Busan]:Pukyong National University;2014.
54. Eom SH. Anti-MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) substance isolated from *Eisenia bicyclis* and its action mechanism [dissertation]. [Busan]:Pukyong National University;2012.
55. Choi MS. The antibacterial effects of emodin from *rheiradix et rhizoma* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [master's thesis]. [Iksan]:Wonkwang University;2007.
56. Lyu KW, Yun ES. A study on the influence of pharbitidis semen on the activity of serum transaminase in carbon tetrachloride poisoned rabbits. *The Journal of The Yellow-Emperor's Medicine*. 1977;2(3):14-20.
57. Seo BI, Lee YJ. A philological study on poisoning of pharbitidis semen. *The Journal of East-West Medicine*. 2008;33(2):1-13.
58. Yoon SG, Park YH, Lee MJ. Effects of PS (Pharbitidis Semen) on anti-inflammatory and anti-febrile activities in arthritic rats. *J Oriental Rehab Med*. 2003;13(3):63-72.
59. Kim JH, Seong JM, Moon HJ, Hwang JM, Hwang KS, Kwon YD, Kwon IK, Park YD. Effects of pharbitidis semen extract on osteoblast differentiation in MC3T3-E1 cells. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2010;7(2):230-6.
60. Hu Y, Liu A, Vaudrey J, Vaiciunaite B, Moigboi C, McTavish SM, Kearns A, Coates A. Combinations of β -lactam or aminoglycoside antibiotics with plectasin are synergistic against methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*. 2015;10(2):e0117664.
61. Dosler S, Gerceker AA. In vitro activities of nisin alone or in combination with vancomycin and ciprofloxacin against methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. *Chemotherapy*. 2011;57(6):511-6.
62. Nester EW, Roberts CE, Pearsall NN, Anderson DG, Nester MT. Functional Anatomy of Prokaryotes and Eukaryotes. In Kane KT, Ronald E, Terrance S, Editors. *Microbiology*. 2nd ed. New York:WCB/McGraw-Hill;1998:63-6.