

# 萬應丸 에탄올 추출물의 메티실린 내성 포도상구균에 대한 항균활성 및 내성억제 효과

나용수\* · 김종규<sup>†</sup> · 송용선\*

원광대학교 한의학전문대학원 제3의학과\*, 원광대학교 한의과대학 한방재활의학교실<sup>†</sup>

## Antibacterial Activity and Inhibition of Resistance in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by Maneung-hwan Ethanol Extract

Yong-su Na, Ph.D.\*, Jong-gyu Kim, K.M.D.<sup>†</sup>, Yung-sun Song, K.M.D.\*

Department of Third Medicine of Korean Medicine, Professional Graduate School of Korean Medicine, Wonkwang University\*,  
Department of Rehabilitation Medicine of Korean Medicine, College of Korean Medicine, Wonkwang University<sup>†</sup>

본 연구는 2018년 원광대학교 교내연구비 지원으로 수행되었음.

RECEIVED December 21, 2019

REVISED January 8, 2020

ACCEPTED January 13, 2020

### CORRESPONDING TO

Yung-sun Song, Department of Rehabilitation Medicine of Korean Medicine, College of Korean Medicine, Wonkwang University, 460, Iksan-daero, Iksan 54538, Korea

TEL (063) 850-5114

FAX (063) 850-6666

E-mail yssong@wku.ac.kr

Copyright © 2020 The Society of Korean Medicine Rehabilitation

**Objectives** In this study, we investigated the antimicrobial activity of a 70% ethanol extract of Maneung-hwan (MEH), which is prescribed by practitioners of oriental medicine for use against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).

**Methods** The antibacterial activity of MEH against MRSA strains was evaluated using the disc diffusion method, broth microdilution method (minimal inhibitory concentration, MIC), checkerboard dilution test, and time-kill test. The mechanism of action of MEH was investigated by bacteriolysis using detergents or ATPase inhibitors. Additionally, mRNA and protein expression were investigated by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction and western blot assay, respectively.

**Results** The MIC of MEH was 25~1,600 µg/mL against all the tested bacterial strains. We showed that MEH extract exerts strong antibacterial activity. In the checkerboard dilution test, the fractional inhibitory concentration index of MEH in combination with antibiotics indicated synergism or partial synergism against *S. aureus*. The time-kill study indicated that the growth of the tested bacteria was considerably inhibited after a 24-h treatment with MEH and selected antibiotics. To measure the cell membrane permeability, MEH (3.9 µg/mL) was combined with Triton X-100 (TX) at various concentrations. N,N-dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) was also tested as an ATPase inhibitor. TX and DCCD cooperation against *S. aureus* exhibited synergistic action. Accordingly, the antimicrobial activity of MEH in the context of cell membrane rupture and ATPase inhibition was assessed. Additionally, the expression of genes and proteins associated with resistance was reduced after exposing MRSA to MEH.

**Conclusions** These results suggest that MEH possesses antibacterial activity and acts as a potential natural antibiotic against MRSA. (*J Korean Med Rehabil* 2020; 30(1):31-45)

**Key words** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Maneung-hwan, Antibacterial activity, Resistance inhibition

## 서론»»»»

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)에 의한 감염 질환은 현재 상용되고 있는 항생제에 내성을 가지고 있어 치료가 어렵고, 이에 따라 높은 사망률과 경제적 부담을 주고 있어 세계적인 문제가 되고 있다<sup>4)</sup>. MRSA의 내성기전에 대하여 완벽히 규명된 것은 아니지만 항생제에 따라 여러 기전들이 보고되고 있다. 베타락타마제( $\beta$ -lactamase)에 의한 항생제 분해, PBP2a 등의 생산으로 인한 표적 물질 변화, efflux pump에 의한 세포 외 항생제 유출 등의 기전 등이 밝혀진 바 있으며, 세균은 여러 가지 기전이 복합적으로 작용하면서 항생제 내성 등을 가지게 된다<sup>5-7)</sup>. 현재 MRSA 치료를 위해 여러 항생제가 개발되고 있으나 합성의약품의 경우 높은 개발 비용과 내성균주의 출현빈도가 높다. 이에 내성을 회피하기 위한 복합적인 성분을 함유한 천연자원의 추출물이나 복합추출물에 의한 대체 항생제의 개발이 각광받고 있다<sup>8-11)</sup>.

한의학 처방은 전통 한의학에서 천연소재인 한약재들을 조합하여 병을 치료하는데 쓰인 오래된 방식으로 이들 한약재를 조합한 한의학 처방은 각 한약재가 가진 생리적 활성도를 높이고, 부작용을 줄인 것이기에 더욱 연구가치가 높은 자원으로 볼 수 있다. 한의학 처방은 한의학 서적에 기재된 효능 외에 연구를 통해 다른 효능이 나타나는 경우가 보고된 바 있다<sup>12)</sup>. 이에 우리는 한의학 처방 중 MRSA의 항균활성에 유효한 물질을 찾고 그 유효성을 확인하고자 하였다. 그 결과 개별 약재들의 항균효과를 확인하고 항균효과 있는 처방을 검색하던 중 萬應丸이 해당하는 약물로 구성되어 있기에 실험을 하게 되었다.

萬應丸은 『醫學入門』 최초로 기재되어 있으며 許俊의 東醫寶鑑에 수록된 처방으로 ‘여러 가지 충을 아래로 잘 몰아낸다(善下諸蟲)’라고 하였다<sup>13)</sup>.

萬應丸은 大黃, 檳榔, 黑牽牛子로 구성되어 있으며, 大黃은 瀉熱通腸, 涼血解毒, 逐瘀經痛의 약리학적 효능을 가지고 있으며 항암, 항염증, 항산화, 항고지혈증 등의 약리활성이 있다고 보고되었으며, 박테리아에 대한 항균활성 또한 보고되어 있다. 또한 대황은 안트라퀴논(Anthraquinone)계 화합물인 chrysophanol, emodin, aloe-emodin, rhein, physcion, sennoside A, B, C, D, E 등을 함유하고 있으며,

이중 emodin은 MRSA에 대해 항균효과가 있다고 보고되었다<sup>14-21)</sup>.

檳榔은 殺蟲, 消積行氣, 行水 약리학적 효능을 가지고 있으며 항두통, 진통, 항염증, 항산화 및 항균활성의 효능이 보고되어 있다. 빈랑은 Pyridine계 alkaloid와 여러 steroid를 함유하고 있다<sup>21-24)</sup>.

黑牽牛子는 瀉水通便, 消痰水飲 약리학적 효능을 가지고 있으며 pharbitin C, D 및 triterpene glycoside계 화합물을 함유하고 있다. 흑견우자 추출물 및 분리된 함유성분에서 항암 및 항균효과가 있다고 보고되었다<sup>21,25,26)</sup>.

萬應丸은 전통적으로 충을 치료하기 위한 처방으로 사용되었고, 구성 한약재 각각의 추출물은 항균효과가 있다는 보고가 있으며, 특히 대황의 함유성분 중 emodin은 MRSA에 대한 항균효과가 있다는 보고가 있기에 萬應丸이 MRSA에 대한 항균활성이 있을 것으로 생각하고 연구를 진행하였다.

본 연구에서는 MRSA에 대한 萬應丸의 항균활성 평가와 기전 연구를 통해 향후 항균활성을 위한 소재로써 가능한지를 평가하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법»»»»

### 1. 약재 및 시약

사용된 약재는 大黃, 檳榔, 黑牽牛子로 원광대학교 전주한방병원에서 구입하여 감정하여서 사용하였다.

실험에서 시약은 oxacillin (OX; Sigma, St. Louis, MO, USA), ampicillin (AM; Sigma), gentamicin (GT; Sigma), Mueller-Hinton broth (MHB; DIFCO, Baltimore, MD, USA), Mueller-Hinton agar (MHA; BD, Franklin Lake, NJ, USA), N,N-dicyclohexylcarbodiimide (DCCD), dimethyl sulfoxide (Sigma), triton X-100 (Sigma), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 5 mg/mL를 사용하였다.

### 2. 시료의 조제

萬應丸 에탄올 추출물(Maneung-hwan, MEH)은 大黃

**Table I.** The Composite of Maneung-hwan

Herbal name	Pharmacognostic name	Weight (g)
Rheum palmatum	<i>Rheum palmatum L</i>	8
Areca catechu	<i>Areca catechu LINNEA</i>	5
Pharbitis nil Choisy	<i>Pharbitis nil Choisy</i>	4
Total amount		17

8 g, 檳榔 5 g, 黑牽牛子 4 g을 70% alcohol 500 mL로 2시간씩 2회에 달여서 추출하였으며, 감압농축 후 동결 건조하여 1.08 g (수득률: 6.36%)을 얻었으며 4°C에서 보관하였다. 시약은 dimethyl sulfoxide에 녹여 사용하였다(Table I).

### 3. 균주 배양

본 실험에 사용된 표준균주 ATCC 33591, ATCC 25923은 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 구입하였으며, CCARM 3090, 3091, 3095, 3102는 서울여대 항생제 내성 균주은행(Culture Collection of Antimicrobial Resistant Microbes [CCARM], Seoul, Korea)에서, 임상균주 DPS-1, DPS-2은 원광대학교병원 성형외과(Department of Plastic Surgery, DPS)에서 분양받아 사용하였다.

균주는 -79°C 냉동고에서 30% glycerol에 보관하였다가 MHA에 접종시킨 다음에 37°C 항온기(incubator)에 24시간 배양하여 사용하였다.

### 4. Disc diffusion method (디스크 확산법)

萬應丸 에탄올 추출물(MEH)의 항균활성을 확인하기 위해 디스크 확산법을 실시하였다. 고압으로 멸균된 MHA에 24시간 동안 배양된 균 100 µL를 골고루 도말해서 최종적으로  $1.0 \times 10^6$  CFU/mL이 될 수 있게 하였다. 다음으로 멸균되어 있는 paper disc (6 mm)에 MEH와 상용항생제인 OX를 각 20 µL씩 주입한 다음 완전히 흡수시켜 37°C incubator에서 24시간 배양 후 paper disc 주위에 형성되어 나타나는 clear zone을 측정하였다.

### 5. Minimum inhibitory concentration (MIC, 최소억제농도)

MIC의 측정은 Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines (CLSI)에 따라 실시하였다<sup>27)</sup>. 실험은 CLSI에 따라 萬應丸 에탄올 추출물을 액체배지에 농도별로 나누어 첨가하고, 여기에 탁도를  $1.0 \times 10^8$  CFU/mL로 맞춘 균들을 10 µL 접종하여 최종적으로  $1.0 \times 10^6$  CFU/mL이 되게 만들었다. 그런 다음 37°C incubator에서 18시간 동안 배양한 후에 MTT 5 mg/mL을 사용해서 색이 변하지 않는 것 중 가장 낮은 농도를 측정하였다.

### 6. Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI, 약물병용효과)

MEH와 상용 항생제인 AM, OX, GT를 병행처리하였을 때 상승효과가 나타나는지를 측정하기 위해서 checkerboard dilution test를 실시하였다<sup>28,29)</sup>. 두 가지 항균물질은 MHB를 보충하여 순차적으로 희석시켰다. 접종원은 37°C incubator에서 24시간 동안 배양한 후에 사용하였고 최종적으로  $1.0 \times 10^6$  CFU/mL이 되게 하였다.

$$FICI = FICA + FICB = [A]/MIC_A + [B]/MIC_B$$

[A]: 병용할 때에 MEH의 MIC

MIC<sub>A</sub>: MEH를 단독으로 사용할 때의 MIC

[B]: 병용할 때에 상용항생제의 MIC

MIC<sub>B</sub>: 상용항생제를 단독으로 사용할 때의 MIC

FICI는 ≤0.5, synergy; 0.5~0.75, partial synergy; 0.76~1.0, additive effect; 1.0~4.0, indifference; and >4.0, antagonism.

### 7. Time-kill assay

Time-kill은 MEH 시간에 따라 박테리아 증식 정도를 보기위해서 4, 8, 16, 24시간별로 CFU/mL를 측정하여 나타내었다. 박테리아는 18시간 배양하여 탁도를  $1.0 \times 10^8$  CFU/mL로 맞춘 균들을 10 µL 접종하였으며, 최종적으로  $1.0 \times 10^6$  CFU/mL이 되게 하였다. 약물농도는 MEH 1/2 MIC 항생제와 1/2 MIC를 각각으로 측정, MEH 1/2 MIC+항생제 1/2 MIC를 처리한 다음 측정하였다. Control은 MHB에 균만 접종하였다.

## 8. Membrane permeability of MEH combination with detergent

MEH와 *S. aureus*의 membrane 투과성을 증진시킨다고 잘 알려진 detergent인 TX-100을 병용할 때 얼마만큼 membrane 투과성을 증진시키는가를 알아보기 위해서 실험을 하였다<sup>30,31</sup>).

## 9. Metabolic inhibition of MEH combination with ATPase-inhibitor

MEH와 *S. aureus*의 energy 대사를 저해시킨다고 잘 알려진 약물인 DCCD를 병용하였을 때 얼마만큼 energy 대사를 저해시키는가를 알아보기 위해 실험을 하였다<sup>30,31</sup>).

## 10. RNA 분리 및 quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR)

MRSA 내성 관련 mRNA의 발현 정도를 보기 위하여 qRT-PCR 방법을 사용하였다. RNA를 추출할 균주를 MHB에 희석(OD<sub>600</sub> 0.35~0.45)하였으며, 희석한 후 여러 농도의 MEH를 처리한 후 30분 동안 배양하여 13,000 rpm에서 1분간 원심분리한 후 균들을 모아 easy-REDTM BYF Total RNA Extraction Kit (Intron Co., Seongnam, Korea)를 제조사 지시에 따라 사용하여 RNA를 추출한 후 QuantiTect® Reverse Transcription Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)를 이용하여 cDNA를 만들었다. 합성된 cDNA에 *mecA*, *mecR1*, *blaZ*, *blaR1*, 16s rRNA의 primer와 power

**Table II.** Primer Used in This Experiment

Primer	Sequence (5' → 3')
<i>blaZ</i> -F	GATAAGAGATTTGCCTATGC
<i>blaZ</i> -R	GCATATGTTATTGCTTGACC
<i>blaR1</i> -F	CATGACAATGAAGTAGAAGC
<i>blaR1</i> -R	CTTATGATTCCATGACATACG
<i>mecA</i> -F	ATGAGATTAGGCATCGTTCC
<i>mecA</i> -R	TGGATGACAGTACCTGAGCC
<i>mecR1</i> -F	AAGCACCGTTACTATCTGCACA
<i>mecR1</i> -R	GAGTAAATTTTGGTCGAATGCC
16sRNA-F	CGTGCCTAATACATGCAAGTC
16sRNA-R	CCGTCTTTCACCTTTTGACCA

SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)를 섞어준 후, StepOnePlus realtime PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 이용하여 qRT-PCR을 실시하였다(Table II).

## 11. Western blot

Protein을 추출할 균주를 MHB에 희석한(OD<sub>600</sub> 0.35~0.45) 후 OX와 여러 농도의 MEH를 처리하여 20분간 배양한 후 13,000 rpm에서 1분간 원심분리하였다. 균들을 모아 350 µL의 SMART™ Bacterial Protein Extraction Solution (Intron, Seongnam, Korea)을 첨가한 다음 1분간 vortexing 한 후 13,000 rpm에서 5분간 원심 분리해서 상층액을 취했다. 상층액의 단백질의 농도는 bovine serum albumin을 표준화하였으며, Bio-Rad Protein Assay Kit (BIO-RAD, Hercules, CA, USA)를 사용해 정량하였다. 20~30 µL의 lysate를 8~12% mini gel sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis로 변성 분리해서 이를 polyvinylidene difluoride membrane (BIO-RAD)에 200 mA로 2시간 동안 transfer하였다. 그리고 membrane의 blocking은 5% skim milk가 함유된 TBST (0.1% tween 20+tris buffered saline) 용액으로 상온에서 2시간 동안 실시하였다. PBP2a 발현량을 검토히기 위해 항체로는 monoclonal mouse anti-PBP2a (1:1,000) (DiNonA Inc., Seoul, Korea)를 TBST 용액에 희석하여 상온에서 2시간 반응시킨 후 TBST로 3회 세정하였다. 2차 항체로는 HRP가 결합된 anti-mouse IgG (Amersham Pharmacia Biotech Ltd., Little Chalfon, England)를 1:2,000으로 희석하여 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후 TBST로 3회 세정하여 enhanced chemiluminescence 기질(Amersham Biosciences Copr., Bath, UK)과 반응 후 ImageQuant LAS 4000 Mini Biomolecular Imager (GE Healthcare, Chicago, IL, USA)를 통해 확인하였다.

## 12. 통계분석

모든 실험들은 3회 이상 반복하였으며 실험결과는 각 항목에 따라 평균±표준편차(standard deviation)를 구하여 Student's t-test 분석법을 이용해 신뢰수준 95% (p<0.05)에서 통계적인 유의차를 평가하였다.

## 결과»»»»

### 1. Disc diffusion method (디스크 확산법)의 항균 활성도 평가

MRSA에 대한 MEH 항균활성을 확인하기 위해 디스크 확산법을 실시하였다. MRSA 표준균주인 ATCC 33591에서 MEH의 농도가 100~400 µg/mL일 경우 8~24 mm의 clear zone이 형성되었으며, MRSA 임상균주인 DPS-1에서는 50~400 µg/mL의 농도에서 34~46 mm의 clear zone이 형성되었고, DPS-2에서는 50~400 µg/mL의 농도에서 22~32 mm의 clear zone이 형성되었다. MRSA 임상균주인 CCARM 3090, CCARM 3095, CCARM 3102에서도 50~400 µg/mL의 농도에서 8~20 mm의 clear zone이 형성되었다. 이로써 MEH가 MRSA에 항균활성이 있음을 확인할 수 있었고, ATCC 25923과 DPS-2를 제외한 다른

균주에서는 상용항생제인 OX와 비교하였을 때 우수한 항균활성이 있음을 확인할 수 있었다(Table III).

### 2. MIC (최소억제농도) 평가

MRSA에 대한 MEH의 MIC를 측정한 결과 25~1,600 µg/mL로 나타났다. MEH에 대한 효과를 비교하기 위하여 AM과 OX, GT의 MIC를 같이 측정하였다. 항생제와 비교하였을 때 MEH의 항균활성은 비슷하거나 더 좋았다(Table IV).

### 3. FICI (약물병용효과)

#### 1) 항생제 AM과 MEH의 병용효과

MEH와 AM의 병용효과를 측정한 결과, DPS-2에서는 synergy를 보였고, ATCC 33591, DPS-1, CCARM 3090,

**Table III.** Antimicrobial Activity (as the Inhibition Zone Diameter) of MEH against MRSA and MSSA

Strains	OX		MEH (mm)			
	10 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL	400 µg/mL	
ATCC 33591	ND	ND	8	10	24	
ATCC 25923	60	20	24	26	28	
DPS-1	ND	34	40	42	46	
DPS-2	62	22	26	30	32	
CCARM 3090	ND	10	13	16	19	
CCARM 3095	ND	8	11	14	17	
CCARM 3102	ND	10	13	17	20	

MRSA: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MSSA: methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*, OX: oxacillin, MEH: Maneung-hwan, ND: no detected activity at this concentration.

**Table IV.** Antibacterial Activity of MEH Extract against 8 Strains of *Staphylococcus aureus*

Strains	MIC (µg/mL)			
	OX	AM	GT	MEH
ATCC 33591	1,000	125	3.9	50
ATCC 25923	<0.9	<0.9	<0.9	25
DPS-1	500	125	62.5	25
DPS-2	0.9	1.9	31.25	50
CCARM 3090	125	31.25	31.25	50
CCARM 3091	2,000	62.5	>500	1,600
CCARM 3095	500	15.6	125	100
CCARM 3102	250	62.5	125	200

MEH: Maneung-hwan, MIC: minimum inhibitory concentration, OX: oxacillin, AM: ampicillin, GT: gentamicin.

**Table V.** Minimum Inhibitory Concentration of MEH Combination with AM against *Staphylococcus aureus*

Strains	Agent	MIC (µg/mL)		FICI	Outcome
		Alone	Combination		
ATCC 33591	MEH	50	12.5	0.75	Partial S.
	AM	125	62.5		
DPS-1	MEH	25	1.56	0.56	Partial S.
	AM	125	62.5		
DPS-2	MEH	50	12.5	0.48	Synergy
	AM	1.9	0.45		
CCARM 3090	MEH	25	12.5	0.75	Partial S.
	AM	31.25	15.6		
CCARM 3095	MEH	100	50	0.53	Partial S.
	AM	15.6	0.45		

The synergistic combinations were investigated in the checkerboard method. FICI was interpreted as follows: synergy,  $x \leq 0.5$ ; partial synergy,  $0.5 < x \leq 0.75$ ; additive effect,  $0.76 < x \leq 1.0$ ; indifference,  $1.0 < x \leq 4.0$ ; and antagonism,  $4.0 < x$ . MEH: Maneung-hwan, AM: ampicillin, MIC: minimum inhibitory concentration, FICI: Fractional Inhibitory Concentration Index, Partial S.: partial synergy.

**Table VI.** Minimum Inhibitory Concentration of MEH Combination with OX against *Staphylococcus aureus*

Strains	Agent	MIC (µg/mL)		FICI	Outcome
		Alone	Combination		
DPS-1	MEH	25	0.39	0.52	Partial S.
	OX	500	250		
DPS-2	MEH	50	12.5	0.52	Partial S.
	OX	0.45	0.12		
CCARM 3090	MEH	50	25	0.63	Partial S.
	OX	125	15.6		
CCARM 3095	MEH	100	50	0.75	Partial S.
	OX	500	125		

The synergistic combinations were investigated in the checkerboard method. FICI was interpreted as follows: synergy,  $x \leq 0.5$ ; partial synergy,  $0.5 < x \leq 0.75$ ; additive effect,  $0.76 < x \leq 1.0$ ; indifference,  $1.0 < x \leq 4.0$ ; and antagonism,  $4.0 < x$ . MEH: Maneung-hwan, OX: oxacillin, MIC: minimum inhibitory concentration, FICI: Fractional Inhibitory Concentration Index, Partial S.: partial synergy.

CCARM 3095에 대해서는 partial synergy를 보였다. 특히 DPS-2, CCARM 3095에서는 AM의 억제농도를 크게 감소시켰는데 이를 통해 MEH가 항생제의 사용량을 줄이는데 기여할 수 있음을 확인할 수 있었다(Table V).

2) 항생제 OX와 MEH의 병용효과

MEH와 OX의 병용효과를 측정된 결과, DPS-1, DPS-2, CCARM 3090, CCARM 3095에서 partial synergy를 보였다. 특히 DPS-2, CCARM 3090, CCARM 3095에서는

OX의 억제농도를 크게 감소시켰는데 이를 통해 MEH가 항생제의 사용량을 줄이는데 기여할 수 있음을 확인할 수 있었다(Table VI).

3) 항생제 GT와 MEH의 병용효과

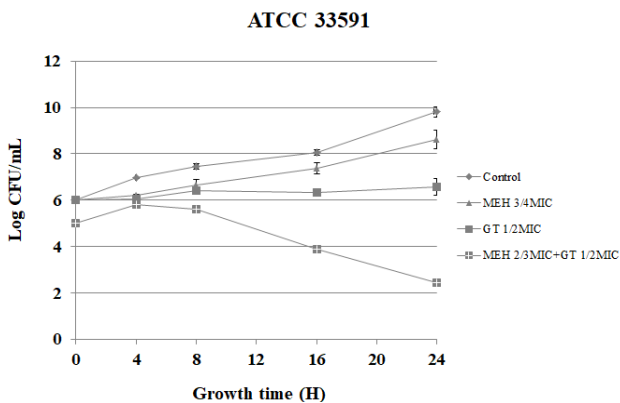
MEH와 GT의 병용효과를 측정된 결과, CCARM 3090, CCARM 3095에서 partial synergy를 보였다. 특히 두 균주에서 GT의 억제농도를 크게 감소시켰는데 이를 통해 MEH가 항생제의 사용량을 줄이는데 기여할 수 있음을

**Table VII.** Minimum Inhibitory Concentration of MEH combination with GT against *Staphylococcus aureus*

Strains	Agent	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )		FICI	Outcome
		Alone	Combination		
CCARM 3090	MEH	50	25	0.53	Partial S.
	GT	31.25	0.9		
CCARM 3095	MEH	100	50	0.53	Partial S.
	GT	125	3.9		

The synergistic combinations were investigated in the checkerboard method. FICI was interpreted as follows: synergy,  $x \leq 0.5$ ; partial synergy,  $0.5 < x \leq 0.75$ ; additive effect,  $0.76 < x \leq 1.0$ ; indifference,  $1.0 < x \leq 4.0$ ; and antagonism,  $4.0 < x$ .

MEH: Maneung-hwan, GT: gentamicin, MIC: minimum inhibitory concentration, FICI: Fractional Inhibitory Concentration Index, Partial S.: partial synergy.



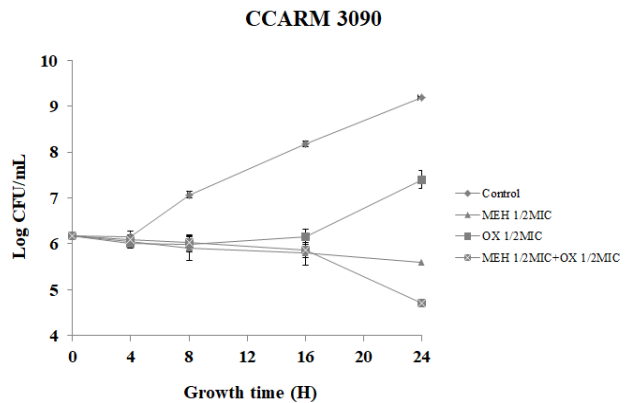
**Fig. 1.** Time-kill curves of ATCC 33591 using MEH with GT. Viable counts were conducted at 4, 8, 16 and 24h by plating aliquots of the samples on agar and subsequent incubation for 18 hours at 37°C. The data are average of triple-independent experiments. MEH: Maneung-hwan, GT: gentamicin, MIC: minimum inhibitory concentration.

확인할 수 있었다(Table VII).

#### 4. The time-kill assay 결과

표준 MRSA 균주인 ATCC 33591에 대한 MEH와 GT의 성장억제 정도를 확인하기 위해 time-kill assay를 실시한 결과, MRSA에 3/4 MIC의 MEH와 1/2 MIC의 GT를 단일 처리하였을 때는 시간에 따른 균의 성장억제 양상이 확인되지 않았으나, 병용 투여하였을 때에는 시간에 따라 균의 생장이 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 1).

표준 MRSA 균주인 CCARM 3090에 대한 MEH와 OX의 성장억제 정도를 확인하기 위해 time-kill assay를 실시한 결과, MRSA에 1/2 MIC를 단일 처리하였을 때는 균의 생장이 억제되는 양상을 보였으나 유의적인 차

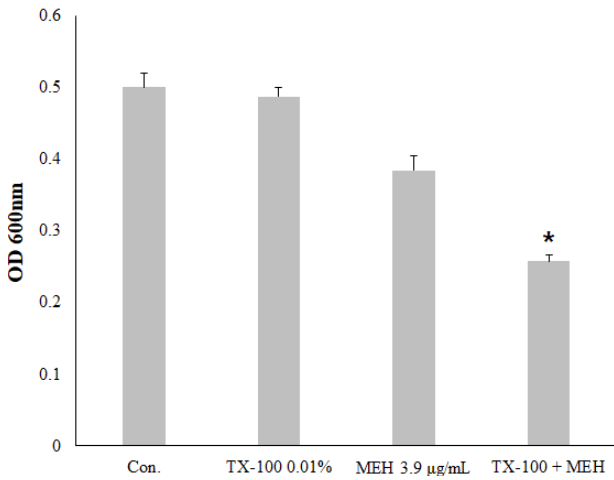


**Fig. 2.** Time-kill curves of CCARM 3090 using MEH with OX. Viable counts were conducted at 4, 8, 16 and 24 hr by plating aliquots of the samples on agar and subsequent incubation for 18 hours at 37°C. The data are average of triple-independent experiments. MEH: Maneung-hwan, OX: oxacillin, MIC: minimum inhibitory concentration.

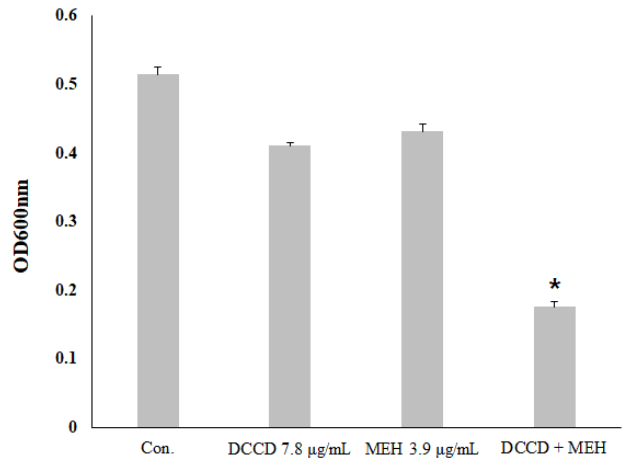
이는 없었으며, OX를 단독 처리하였을 때는 균의 생장이 억제되는 양상을 보이지 않았다. 그러나 1/2 MEH와 1/2 OX를 병용 투여하였을 때에는 시간에 따라 균의 생장이 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 2).

#### 5. Membrane 투과성에 대한 MEH와 detergent의 병용효과

Detergent를 사용하여 MEH의 membrane 투과성이 강화되는 효과를 보기 위해 MEH와 detergent를 단일 투여 또는 병용 투여하였다. 그 결과 3.9  $\mu\text{g/mL}$  MEH와 0.01% TX를 단일 투여하였을 때에는 균의 성장억제가 크지 않았으나, 두 시약을 병용하였을 때에는 균의 생장이 크게 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3).



**Fig. 3.** Effect of membrane-permeabilizing agent TX-100 on the susceptibility of *Staphylococcus aureus* to MEH. The viability of bacteria was determined by a spectrophotometer (optical density at 600 nm, OD<sub>600</sub>) after incubation of 24 hr with 3.9 µg/mL MEH and 0.01% TX. The data are mean±standard deviation for triple-independent experiments. Con: control, TX-100: triton X-100, MEH: Maneung-hwan. \*p<0.05 as compared to control, were determined.



**Fig. 4.** Effect of ATPase-inhibitor agent DCCD on the susceptibility of *Staphylococcus aureus* to MEH. The viability of bacteria was determined by a spectrophotometer (optical density at 600 nm, OD<sub>600</sub>) after incubation of 24 hr with 3.9 µg/mL MEH and 7.8 µg/mL DCCD. The data are mean±standard deviation for triple-independent experiments. Con: control, DCCD: N,N-dicyclohexylcarbodiimide, MEH: Maneung-hwan. \*p<0.05 as compared to control, were determined.

## 6. Energy 대사저해에 대한 MEH와 ATPase-inhibitor의 병용효과

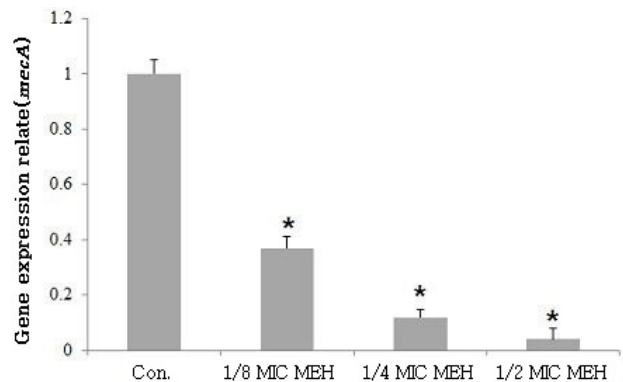
ATPase-inhibitor를 사용하여 MEH의 ATPase 억제에 의한 에너지대사 저해능이 강화되는 효과를 보기 위해 MEH와 ATPase-inhibitor를 단일 투여 또는 병용 투여 하였다. 그 결과 3.9 µg/mL MEH와 7.8 µg/mL DCCD를 단일 투여하였을 때에는 균의 성장억제가 크지 않았으나, 병용 투여하였을 때는 균의 생장이 크게 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

## 7. qRT-PCR 분석

MEH가 MRSA의 항생제에 대한 내성 유전자에 미치는 영향들을 알아보기 위해 qRT-PCR을 수행한 결과, *mecA*, *mecR1*, *blaZ*, *blaR1*의 발현이 대조군과 비교하였을 때 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 농도의존적인 양상을 보였다(Figs. 5~8).

## 8. Western blot 결과

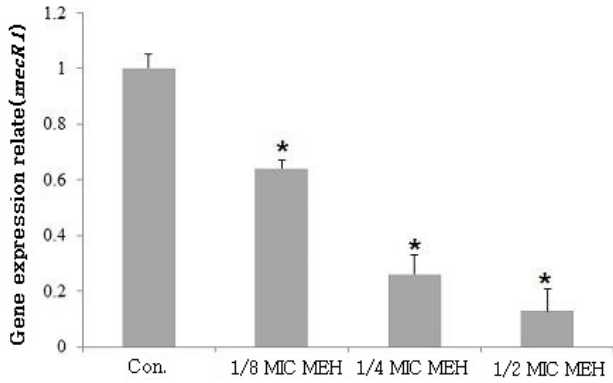
MEH MRSA의 항생제 내성에 관여하는 protein인



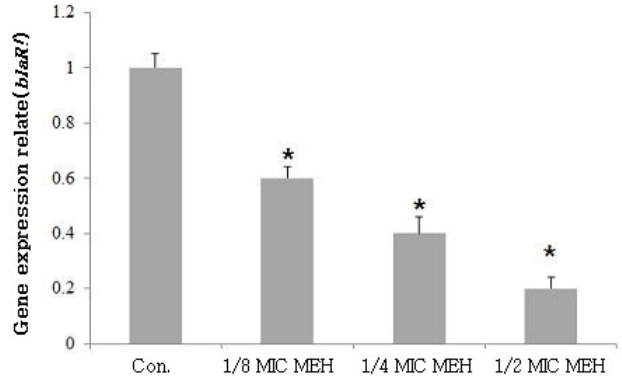
**Fig. 5.** Effects of MEH on the mRNA expression of *mecA* as analyzed by qRT-PCR. Cells of ATCC 33591 were treated with serial dilutions of MEH (1/8 MIC, 1/4 MIC and 1/2 MIC) for 30 min. The data are mean±standard deviation for triple-independent experiments. Con.: control, MIC: minimum inhibitory concentration, MEH: Maneung-hwan, qRT-PCR: quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. \*p<0.05 as compared to control, were determined.

PBP2a에 미치는 영향들을 알아보기 위해 western blot을 수행하였다. 표준균주인 ATCC 33591과 임상균주인 CCARM 3090에 MEH를 처리하여 발현 정도를 확인한 결과 대조군과 비교하여 PBP2a의 발현이 감소하는 것을 확인하였고, 농도의존적인 양상을 보였다(Figs. 9, 10).

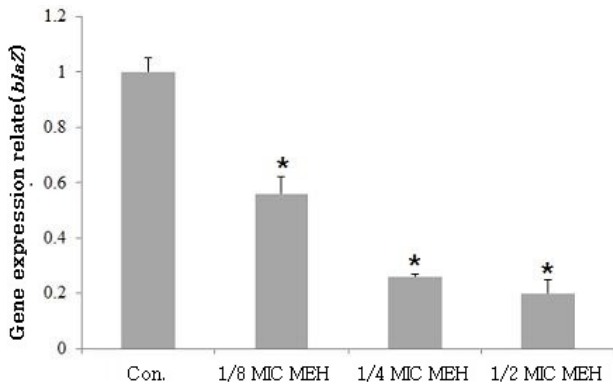




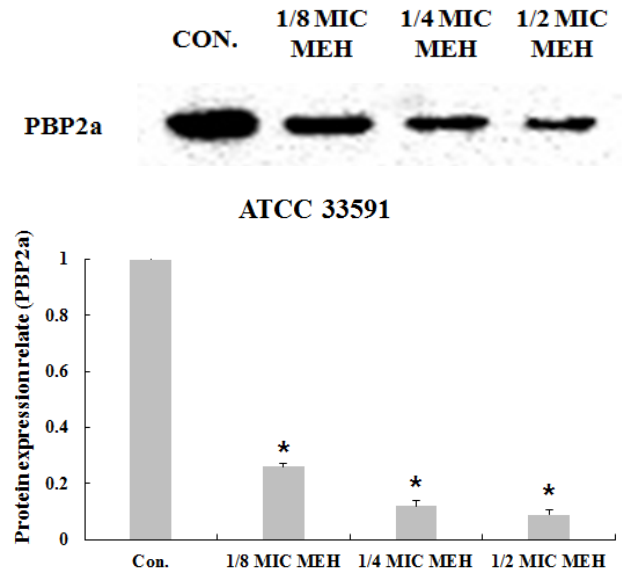
**Fig. 6.** Effects of MEH on the mRNA expression of *mecR1* as analyzed by qRT-PCR. Cells of ATCC 33591 were treated with serial dilutions of MEH (1/8 MIC, 1/4 MIC and 1/2 MIC) for 30 min. The data are mean±standard deviation for triple-independent experiments. Con.: control, MIC: minimum inhibitory concentration, MEH: Maneung-hwan, qRT-PCR: quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. \* $p < 0.05$  as compared to control, were determined.



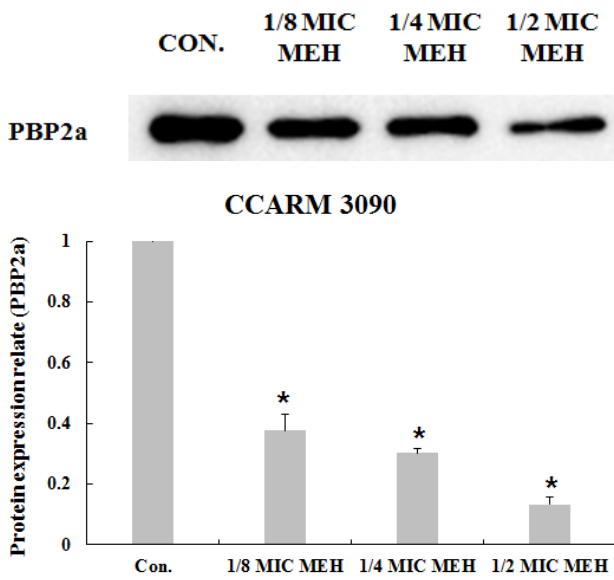
**Fig. 8.** Effects of MEH on the mRNA expression of *blaR1* as analyzed by qRT-PCR. Cells of ATCC 33591 were treated with serial dilutions of MEH (1/8 MIC, 1/4 MIC and 1/2 MIC) for 30 min. The data are mean±standard deviation for triple-independent experiments. Con.: control, MIC: minimum inhibitory concentration, MEH: Maneung-hwan, qRT-PCR: quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. \* $p < 0.05$  as compared to control, were determined.



**Fig. 7.** Effects of MEH on the mRNA expression of *blaZ* as analyzed by qRT-PCR. Cells of ATCC 33591 were treated with serial dilutions of MEH (1/8 MIC, 1/4 MIC and 1/2 MIC) for 30 min. The data are mean±standard deviation for triple-independent experiments. Con.: control, MIC: minimum inhibitory concentration, MEH: Maneung-hwan, qRT-PCR: quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. \* $p < 0.05$  as compared to control, were determined.



**Fig. 9.** Inhibitory effects of MEH on the PBP2a production, as analyzed by western blot. Cells of ATCC 33591 were treated with serial dilutions of MEH (1/8 MIC, 1/4 MIC and 1/2 MIC) for 30 min. The data are mean±standard deviation for triple-independent experiments. Con.: control, MIC: minimum inhibitory concentration, MEH: Maneung-hwan. \* $p < 0.05$  as compared to control, were determined.



**Fig. 10.** Inhibitory effects of MEH on the PBP2a production, as analyzed by western blot. Cells of CCARM 3090 were treated with serial dilutions of MEH (1/8 MIC, 1/4 MIC and 1/2 MIC) for 30 min. The data are mean±standard deviation for triple-independent experiments. Con.: control, MIC: minimum inhibitory concentration, MEH: Maneung-hwan. \*p<0.05 as compared to control, were determined.

## 고찰

1960년대 이후 병원에서 MRSA에 의한 감염은 균혈증, 폐렴, 수막염, 심내막염, 피부 및 연조직, 수술 부위, 요로, 뼈 및 관절 감염, 독성 쇼크 증후군을 포함하는 광범위한 감염을 유발한다<sup>32,33</sup>.

유럽에서는 2007년 17,000명 이상의 환자의 혈류에서 MRSA 감염이 확인되었으며, 이 중 5,400명이 사망하였고, 감염으로 인한 경제적 부담은 3억 8천만 달러로 추정되었다. 또한 질병통제 및 예방센터는 2011년 미국에서 8만 명 이상의 환자가 MRSA에 감염되었다고 보고하였고, 이 중 11,285명의 사망자가 발생하였다. 홍콩에서는 MRSA에 의한 균혈증으로 진단된 환자 중 32.3%가 사망했고 치료비는 환자 당 10,565달러로 추정된다고 보고하였다<sup>1-4</sup>.

이렇듯 MRSA에 의한 감염 질환은 높은 사망률과 치료비용 증가 등을 일으키는 질환으로 문제되고 있다.

MRSA는 메티실린(methicillin)과 같은 베타락탐( $\beta$ -lactam)계 항생제에 대하여 강한 내성을 지니고 있어 이에 글리코

펩타이드(glycopeptide)계 항생제인 반코마이신(vancomycin)이 MRSA 감염을 치료하기 위한 항생제로 쓰이게 되었다. 그러나 반코마이신 사용이 증가함에 따라 반코마이신에 대한 내성이 강한 균주인 vancomycin-resistant *S. aureus* (VRSA)가 나타나게 되었다<sup>34,35</sup>.

일부 연구에서는 반코마이신의 항균력보다 강한 내성을 지닌 MRSA인 VRSA의 감염에 대해서는 반코마이신에 의한 치료 시 그 효과가 덜 하거나 미미하며, 오히려 내성 증가로 인해 사망률을 증가시킬 수 있다고 보고하였다. 또한 반코마이신의 남용은 복용하는 환자에게 신독성을 유발하는 부작용이 있다<sup>34-37</sup>.

VRSA의 등장으로 이를 치료할 옥시졸리딘(oxazolidinone)계 항생제인 리네졸리드(linezolid)를 사용하게 되었는데 대다수의 그람양성구균에 대한 광범위한 활성을 가지고 있다. 리네졸리드는 반코마이신으로 치료가 되지 않는 VRSA 감염에 대해 유효하다는 것이 밝혀졌으나 안전성에 대한 우려로 사용이 제한적인 항생제이다. 또한 최근 임상에서 리네졸리드에 내성을 지닌 MRSA가 발견되었다고 보고되었다<sup>35-37</sup>.

이렇듯 MRSA의 항생제 내성은 항생제에 의한 치료를 어렵게 만드는 주요 원인이며, 특히 MRSA는 베타락탐계 항생제에 대하여 강한 내성을 지니는데 그 내성 기작에 대해서는 여러 기전이 보고되어 있으며<sup>38,39</sup>, 대표적으로는 PBP2a와  $\beta$ -lactamase가 있는 것들로 알려져 있다<sup>40,41</sup>.

PBP2a는 MRSA의  $\beta$ -lactam계 항생제에 내성을 보이는 효소 중 하나이다. MRSA는 penicillin binding protein (PBP)에 의해 펩티도글리칸(peptidoglycan)층을 형성하며, 이를 통해 다양한 환경에서 생존할 수 있다. 베타락탐계 항생제는 이 PBP를 타겟으로 하여 결합하며, 결합한 PBP는 활성을 잃고 펩티도글리칸층을 형성할 수 없게 된다. 이에 MRSA는 PBP보다 베타락탐계 항생제와의 결합 친화성이 낮은 PBP2a를 만들어 PBP의 역할을 대신하게 하여 생존율을 높인다<sup>42</sup>. 베타락탐(β-lactamase) 또한 대표적인 베타락탐계 항생제에 대한 MRSA의 내성 기전이다. 베타락탐(β-lactamase)은 베타락탐계 항생제의 베타락탐 고리를 가수분해하여 비활성화시킨다. 이 두 내성인자는 각각 MRSA의 *mecA*, *blaZ* gene의 전사에 의해 발현된다. 이 두 유전자는 staphylococcal chromosome cassette mec (SCCmec)에 위치하며 다음의

순서에 의해 전사가 이루어진다. MRSA의 외막에 위치한 신호전달 단백질인 MecR1, BlaR1에 의해 신호가 전달되면, SCCmec에 위치해 전사를 억제하는 MecI, BlaI의 활성이 억제되고, 이로 인해 *mecA*와 *blaZ*의 전사가 이루어진다<sup>43-46</sup>). 베타락탐계 항생제 이외에도 다양한 항생제에 대한 MRSA의 내성기전은 시간이 지남에 따라 계속 진화하고 있고, 발견되고 있다. 이에 MRSA의 항생제에 대한 내성을 극복하기 위한 새로운 항생제 또는 내성억제제의 개발이 필요하다.

최근 천연물을 활용한 새로운 항생물질 소재의 연구가 활발하며, 현재 임상에서 사용 중인 항생제와 병용하여 MRSA의 내성을 극복하기 위한 연구가 활발히 이루어지고 있다<sup>3</sup>). 또한 천연 항균물질은 합성된 항생제에 비해 경제적이며 개발 기간이 짧고 안정성이 높다는 이점이 있다<sup>47-51</sup>). 한의학 처방은 이미 전통적으로 입증된 천연복합추출물로, 이를 활용하여 항생제의 소재 탐색을 진행한다면 개발비용 및 내성 출현빈도를 낮출 수 있다. 이에 우리는 한의학 처방 중 萬應丸을 활용하여 MRSA에 대한 항균활성 및 내성에 대한 기전을 확인하여 그 유효성을 확인하고자 하였다.

萬應丸은 『醫學入門』에 최초로 기재되었으며, 許俊의 東醫寶鑑에 수록된 처방으로 대황(大黃), 빈랑(檳榔), 흑견우자(黑牽牛子)로 구성되어 있으며<sup>13</sup>), 萬應丸을 이루는 약재의 본초학적인 효능을 보면, 大黃(대황, *Rheum palmatum L*)은 蓼科(마디풀과, Polygonaceae)에 속하는 多年生 草本으로 瀉熱通腸, 涼血解毒, 逐瘀經痛의 약리학적 효능을 가지고 있으며, 항암, 항염증, 항산화, 항고지혈증 등의 약리활성이 있다고 보고되었으며, 박테리아에 대한 항균활성 또한 보고되어 있다.

또한 대황은 안트라퀴논(Anthraquinone)계 화합물인 chrysophanol, emodin, aloe-emodin, rhein, physcion, sennoside A, B, C, D, E 등을 함유하고 있으며, 이중 emodin은 MRSA에 대해 항균효과가 있다고 보고되었다<sup>14-21</sup>).

檳榔(빈랑나무, *Areca catechu LINNE*)은 棕櫚科(야자나무과, Palmae)의 과실에서 과피를 벗긴 씨이다. 殺蟲, 消積行氣, 行水 약리학적 효능을 가지고 있으며, 항두통, 진통, 항염증, 항산화 및 항균활성 또한 보고되어 있다. 빈랑은 Pyridine계 alkaloid와 여러 steroid를 함유하고 있다<sup>21-24</sup>).

黑牽牛子(흑견우자, *Pharbitis nil Choisy*)는 나팔꽃으

로 鈴蘭科(영란과, Convolvulaceae)의 一年生 덩굴식물의 씨를 말린 것이다. 씨껍질이 흑자색인 것을 흑축(黑丑), 황백색인 것을 백축(白丑)이라고 한다<sup>52</sup>). 黑牽牛子는 瀉水通便, 消痰水飲 약리학적 효능을 가지고 있으며, pharbitin C, D 및 triterpene glycoside계 화합물을 함유하고 있다. 흑견우자 추출물 및 분리된 함유성분에서 각 항암 및 항균효과가 있다고 보고되었다<sup>21,25-26</sup>).

이상에서 살펴본 바와 같이 약재 각각의 추출물들은 항균활성이 있다고 보고되어 있다. 그러나 복합처방인 萬應丸에 대해서는 항균활성에 대한 연구나 생리학적 활성에 대한 연구들은 아직까지 보고된 적이 없다. 이에 항균활성 작용을 가진 약재를 구성으로 하고 있는 萬應丸을 이용하여 MRSA에 대한 항균활성을 확인함으로써 항생제를 대체 또는 보조할 항생후보물질로써 가능성이 있음을 확인하고자 하였다.

본 실험은 萬應丸의 MRSA에 대한 항균활성과 상용항생제와의 상승작용 등과 시간에 따른 성장억제 효과, 세포막 투과성 및 에너지 대사 저해 시약과의 상승효과와 내성기전에 대한 유전자 및 단백질의 발현 정도에 미치는 영향을 확인하였다. 디스크 확산법에서 MEH에는 MRSA 표준균주인 ATCC 33591과 임상균주인 DPS-1, 2, CCARM 3090, CCARM 3095, CCARM 3102에 대하여 50, 100, 200, 400 µg/mL의 농도에서 8~46 mm의 clear zone을 형성하였으며, 이는 기존항생제인 OX clear zone과 비교해보았을 때, 천연복합 추출물로써 좋은 항균활성을 나타낸다는 것을 확인할 수 있다(Table III). 최소억제농도를 통해서도 MEH가 상용항생제와 비교하였을 때, 25~1,600 µg/mL으로 역시 좋은 항균활성을 보인다는 것을 알 수 있었다(Table IV). 또한 MEH를 AM, OX, GT와 같이 병용하여 사용하였을 때 표준균주인 ATCC 33591과 AM에서 partial synergy가 확인되었고, 임상균주인 DPS-1, 2, CCARM 3090, CCARM 3095는 AM, OX, GT에서 partial synergy 및 synergy effect가 확인되었다. 또한 MEH와의 병용 투여 시 몇몇 조합에서는 항생제의 억제농도가 단일로 투여하였을 때보다 크게 감소되는 것을 확인하였다(Table V~VII). 이는 MEH가 상용항생제와의 병용을 통해 항생제의 사용량을 줄이고, MRSA의 내성빈도를 낮추는데 효과가 있음을 알 수 있었다. Time-kill assay를 통한 시간에 따른 균의 억제정도를 확인한 결과, ATCC 33591에서는 MEH와 GT의

조합에서는 병용 투여 시 단일 투여와 비교하여 시간에 따른 균의 생장이 억제되는 것을 확인하였고, CCARM 3090에서는 MEH와 OX의 조합에서 병용 투여 시 단일 투여와 비교하여 시간에 따른 균의 생장이 억제되는 것을 확인하였다(Figs. 1, 2).

이 결과 역시 항생제를 단독 투여하였을 때보다 萬應丸과 병용 시 MRSA의 성장을 억제하는데 더 효과적임을 확인할 수 있었다.

MEH의 막투과성에 영향을 주는 항생제와의 병용 시의 효과를 보기 위해 detergent인 TX-100과 MEH를 단일 또는 병용 투여하여 균의 생장억제 정도를 확인한 결과, 단일 투여보다 병용 투여할 때 생장억제가 더 크게 나타났고, 이는 MEH가 MRSA의 막투과성에 영향을 주는 물질과 좋은 시너지를 보일 수 있다는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 또한 MEH를 ATPase-inhibitor인 DCCD와 병용투여할 때 MRSA의 ATPase에 영향을 주어 항균활성을 나타내는 항생제와 시너지 효과를 보일 수 있는지를 확인하였고, 그 결과 단일 투여보다 병용 투여 시에 균의 생장억제가 크게 나타나는 것을 보였다. 이를 통해 MEH가 MRSA의 ATPase억제를 통해 항균활성을 나타내는 물질과 좋은 시너지 효과를 낼 수 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

또한 MEH의 항균활성이 MRSA의 내성에 미치는 영향을 보기 위해 qRT-PCR과 western blot을 실시하였다. 그 결과, MEH는 *mecA*, *mecR1*, *blaZ*, *blaR1*의 발현을 감소시켰고, PBP2a의 발현 또한 감소시켰다(Figs. 9, 10). *mecA*와 *blaZ*는 각 PBP2a와 β-lactamase의 발현에 관여하는 유전자로 이들 두 유전자의 전사에 의해 두 내성인자의 발현이 진행된다. 또한 이 두 내성인자의 발현은 MecR1, BlaR1에 의해 조절되는데, 이들 두 조절인자는 같은 *mecA* 및 *blaZ*와 같은 SCCmec에 위치한 유전자인 *mecR1*, *blaR1*의 전사에 의해 발현된다<sup>11-19</sup>). MEH는 이들 유전자들의 발현을 억제시켰고, MEH 처리 시 PBP2a의 발현 또한 감소되었다. 이는 MEH가 내성인자의 발현에 관여하는 유전자들의 전사를 억제함으로써 결과적으로 내성인자의 발현을 억제시킨다는 것을 알 수 있었다. 이러한 억제기전을 통해 항생제와 병용 시 좋은 상승효과를 보인다는 것을 알 수 있었다.

위 실험들로 보아 萬應丸 에탄올 추출물에는 MRSA의 성장을 억제할 수 있는 항균효과가 있음을 확인하였

으며, 또한 기존 항생제들과 병용하였을 때 약물 상승효과 그리고 시간에 따라서 균의 생장억제 및 기전실험을 통한 항균효과 확인으로 항생제 후보물질이 될 수 있음을 확인할 수 있었다. 향후 萬應丸이 MRSA 내에서 내성인자의 발현을 조절하는 유전자 및 단백질에 미치는 효과에 대한 연구를 진행한다면 MRSA를 치료를 위한 항생제 후보물질로써 가치가 있을 것으로 생각된다.

## 결론»»»»

萬應丸 에탄올 추출물(MEH)의 MRSA에 대한 항균활성을 측정된 결과는 다음과 같다.

1. 디스크 확산법을 통해 MRSA (ATCC 33591, DPS-1, 2, CCARM 3090, 3095, 3102)에 대하여 MEH 50, 100, 200, 400 µg/mL의 농도에서 8~46 mm의 clear zone을 형성하는 것을 확인하였다.
2. MRSA 대한 MEH의 최소억제농도(MIC)는 25~1,600 µg/mL이었다.
3. MEH와 항생제 AM, OX 및 GT의 병용 결과 synergy 및 partial synergy를 나타냈다.
4. MEH와 TX-100의 병용 투여를 통해 막 투과성에 영향을 주는 항생제와 좋은 상승효과를 보임을 확인할 수 있었다.
5. MEH와 DCCD의 병용 투여를 통해 ATPase 억제에 영향을 주는 항생제와 좋은 상승효과를 보임을 확인할 수 있었다.
6. MEH를 처리하였을 때 *mecA*, *mecR1*, *blaZ*, *blaR1*의 유전자 발현이 모두 감소하였다.
7. MEH와 처리하였을 때 내성 단백질인 PBP2a의 발현이 감소하였다.

이상의 실험 결과를 통해, 萬應丸 에탄올 추출물이 MRSA에 항균효과가 있다는 것을 확인하였고, 향후 萬應丸이 MRSA 내에서 내성인자의 발현을 조절하는 유전자 및 단백질에 미치는 효과에 대한 연구를 진행한다면 MRSA를 치료를 위한 항생제 후보물질로써 가치가 있을 것으로 생각된다.

## References&gt;&gt;&gt;&gt;

1. Walter J, Noll I, Feig M, Weiss B, Claus H, Werner G, Eckmanns T, Hermes J, Abu Sin M. Decline in the proportion of methicillin resistance among *Staphylococcus aureus* isolates from non-invasive samples and in outpatient settings, and changes in the co-resistance profiles: an analysis of data collected within the Antimicrobial Resistance Surveillance Network, Germany 2010 to 2015. *BMC Infect Dis.* 2017;17(1):169.
2. Kraker ME, Davey PG, Grundmann H; BURDEN study group. Mortality and hospital stay associated with resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteremia: estimating the burden of antibiotic resistance in Europe. *PLoS Med.* 2011;8(10):e1001104.
3. Centre for Disease Control and Prevention. Antibiotic resistance threats in the United States. Centre for Disease Control and Prevention:2013.
4. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2009. In: Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2010.
5. Otto CC, Cunningham TM, Hansen MR, Haydel SE. Effects of antibacterial mineral leachates on the cellular ultrastructure, morphology, and membrane integrity of *Escherichia coli* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2010;9:26.
6. Greninger AL, Chatterjee SS, Chan LC, Hamilton SM, Chambers HF, Chiu CY. Whole-genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to fifth-generation cephalosporins reveals potential non-mecA mechanisms of resistance. *PLoS One.* 2016;11(2):e0149541.
7. Al-Habib A, Al-Saleh E, Safer AM, Afzal M. Bactericidal effect of grape seed extract on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Toxicol Sci.* 2010; 35:357-64.
8. Kim KJ, Yu HH, Cha JD, Seo SJ, Choi NY, You YO. Antibacterial activity of *Curcuma longa* L. against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytother Res.* 2005;19(7):599-604.
9. Saad A, Fadli M, Bouaziz M, Benharref A, Mezrioui NE, Hassani L. Anticandidal activity of the essential oils of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* and their synergism with amphotericin B and fluconazole. *Phytomedicine.* 2010;17(13):1057-60.
10. Etefagh KA, Burns JT, Junio HA, Kaatz GW, Cech NB. Goldenseal (*Hydrastis canadensis* L.) extracts synergistically enhance the antibacterial activity of berberine via efflux pump inhibition. *Planta Med.* 2011;77(8): 835-40.
11. Yoon JI, Bajpai VK, Kang SC. Synergistic effect of nisin and cone essential oil of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu against *Listeria monocytogenes* in milk samples. *Food Chem Toxicol.* 2011;49(1):109-14.
12. Zhou L, Li D, Wang J, Liu Y, Wu J. Antibacterial phenolic compounds from the spines of *Gleditsia sinensis* Lam. *Nat Prod Res.* 2007;21(4):283-91.
13. Heo Jun. *Dongyibogam*. Kyeongnam:Dongyibogam Publisher. 2005:437, 1205-6.
14. El-Saied MA, Sobeh M, Abdo W, Badr OM, Youssif LT, Elsayed IH, Osman SM, Wink M. Rheum palmatum root extract inhibits hepatocellular carcinoma in rats treated with diethylnitrosamine. *J Pharm Pharmacol.* 2018;70(6):821-9.
15. Hwang DS, Gu PS, Kim N, Jang YP, Oh MS. Effects of Rhei Undulati Rhizoma on lipopolysaccharide-induced neuroinflammation in vitro and in vivo. *Environ Toxicol.* 2018;33(1):23-31.
16. Kwon OJ, Kim MY, Shin SH, Lee AR, Lee JY, Seo BI, Shin MR, Choi HG, Kim JA, Min BS, Kim GN, Noh JS, Rhee MH, Roh SS. Antioxidant and anti-inflammatory effects of Rhei Rhizoma and Coptidis Rhizoma mixture on reflux esophagitis in rats. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2016;2016:2052180.
17. Xie HC, Shang J. Study on the extraction process of total anthraquinones in Radix et Rhizoma Rhei and their antilipemic effects. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 2014;11(2):358-62.
18. Arokiyaraj S, Vincent S, Saravanan M, Lee Y, Oh YK, Kim KH. Green synthesis of silver nanoparticles using Rheum palmatum root extract and their antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2017;45(2): 372-9.
19. Yang ZC, Wang BC, Yang XS, Wang Q, Ran L. The synergistic activity of antibiotics combined with eight traditional Chinese medicines against two different strains of *Staphylococcus aureus*. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2005;41(2-3):79-81.
20. Liu M, Peng W, Qin R, Yan Z, Cen Y, Zheng X, Pan X, Jiang W, Li B, Li X, Zhou H. The direct anti-MRSA effect of emodin via damaging cell membrane. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2015;99(18):7699-709.
21. Pharmacology of Korean Medicine. The textbook compilation committee of pharmacology of Korean's medical schools in nations. Seoul:Shinil books. 2010:550-90.
22. Bhandare AM, Vyawahare NS, Kshirsagar AD. Anti-migraine effect of *Areca Catechu* L. nut extract in bradykinin-induced plasma protein extravasation and vocalization in rats. *J Ethnopharmacol.* 2015;171:121-4.

23. Bhandare AM, Kshirsagar AD, Vyawahare NS, Hadambar AA, Thorve VS. Potential analgesic, anti-inflammatory and antioxidant activities of hydroalcoholic extract of *Areca catechu* L. nut. *Food Chem Toxicol.* 2010;48(12):3412-7.
24. Chusri S, Settharaksa S, Chokpaisarn J, Limsuwan S, Voravuthikunchai SP. Thai herbal formulas used for wound treatment: a study of their antibacterial potency, anti-inflammatory, antioxidant, and cytotoxicity effects. *J Altern Complement Med.* 2013;19(7):671-6.
25. Jung HJ, Kang JH, Choi S, Son YK, Lee KR, Seong JK, Kim SY, Oh SH. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) induces apoptosis and autophagy in lung cancer cells and autophagy inhibition enhances PMA-induced apoptosis. *J Ethnopharmacol.* 2017;208:253-63.
26. Nguyen HT, Yu NH, Park AR, Park HW, Kim IS, Kim JC. Antibacterial activity of phorbol, isolated from the seeds of *Phorbolium nil*, against various plant pathogenic bacteria. *J Microbiol Biotechnol.* 2017;27(10):1763-72.
27. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria that grow aerobically; approved standard.* 8th ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009.
28. Shahverdi AR, Fakhimi A, Zarrini G, Demehan G, Iranshahi M. Galbanic acid from *Ferula szowitsiana* enhanced the antibacterial activity of penicillin G and cephalexin against *Staphylococcus aureus*. *Biol Pharm Bull.* 2007;30(9):1805-7.
29. Cha JD, Lee JH, Choi KM, Choi SM, Park JH. Synergistic effect between cryptotanshinone and antibiotics against clinic methicillin and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2014;2014:450572.
30. Choi JG, Kang OH, Obiang-Obounou B, Lee YS, Chae HS, Oh YC, Sohn DH, Park H, Choi HG, Kim SG, Shin DW, Kwon DY. Antibacterial activity of *Ecklonia cava* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. *Foodborne Pathog Dis.* 2010;7(4):435-41.
31. Mun SH, Joung DK, Kim SB, Park SJ, Seo YS, Gong R, Choi JG, Shin DW, Rho JR, Kang OH, Kwon DY. The mechanism of antimicrobial activity of sophoraflavanone B against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Foodborne Pathog Dis.* 2014;11(3):234-9.
32. Choi JG, Kang OH, Chae HS, Obiang-Obounou B, Lee YS, Oh YC, Kim MS, Shin DW, Kim JA, Kim YH, Kwon DY. Antibacterial activity of *Hylomecon hylomeconoides* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Appl Biochem Biotechnol.* 2010;160(8):2467-74.
33. Sit PS, Teh CS, Idris N, Sam IC, Syed Omar SF, Sulaiman H, Thong KL, Kamarulzaman A, Ponnampalavanar S. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection and the molecular characteristics of MRSA bacteraemia over a two-year period in a tertiary teaching hospital in Malaysia. *BMC Infect Dis.* 2017;17(1):274.
34. Kollef MH. Limitations of vancomycin in the management of resistant staphylococcal infections. *Clin Infect Dis.* 2007;45(Suppl 3):191-5.
35. Howden BP, Davies JK, Johnson PDR, Stinear TP, Grayson ML. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23:99-139.
36. Elyasi S, Khalili H, Dashti-Khavidaki S, Mohammadpour A. Vancomycin-induced nephrotoxicity: mechanism, incidence, risk factors and special populations. A literature review. *Eur J Clin Pharmacol.* 2012;68:1243-55.
37. Micek ST. Alternatives to vancomycin for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Clin Infect Dis.* 2007;45:S184-90.
38. Meziane-Cherif D, Saul FA, Moubareck C, Weber P, Haouz A, Courvalin P, Périchon B. Molecular basis of vancomycin dependence in VanA-type *Staphylococcus aureus* VRSA-9. *J Bacteriol.* 2010;192(20):5465-71.
39. Nishi H, Komatsuzawa H, Fujiwara T, McCallum N, Sugai M. Reduced content of lysyl-phosphatidylglycerol in the cytoplasmic membrane affects susceptibility to moenomycin, as well as vancomycin, gentamicin, and antimicrobial peptides, in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(12):4800-7.
40. Fishovitz J, Hermoso JA, Chang M, Mobashery S. Penicillin-binding protein 2a of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *IUBMB Life.* 2014;66(8):572-7.
41. Bhattacharya PK. Emergence of antibiotic-resistant bacterial strains, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, extended spectrum beta lactamases, and multi-drug resistance is a problem similar to global warming. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2014;47(6):815-6.
42. Kosowska-Shick K, McGhee PL, Appelbaum PC. Affinity of ceftaroline and other beta-lactams for penicillin-binding proteins from *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(5):1670-7.
43. Najjar-Peerayeh S, Jazayeri Moghadas A, Behmanesh M. Antibiotic susceptibility and mecA frequency in *Staphylococcus epidermidis*, Isolated from intensive care unit patients. *Jundishapur J Microbiol.* 2014;7(8):e11188.
44. Aedo S, Tomasz A. Role of the stringent stress response in the antibiotic resistance phenotype of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents*

- Chemother. 2016;60(4):2311-7.
45. Pence MA, Haste NM, Meharena HS, Olson J, Gallo RL, Nizet V, Kristian SA. Beta-lactamase repressor Blal modulates *Staphylococcus aureus* cathelicidin antimicrobial peptide resistance and virulence. PLoS One. 2015;10(8):e0136605.
  46. Gregory PD, Lewis RA, Curnock SP, Dyke KG. Studies of the repressor (Blal) of beta-lactamase synthesis in *Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol. 1997;24(5):1025-37.
  47. Condell O, Iversen C, Cooney S, Power KA, Walsh C, Burgess C, Fanning S. Efficacy of biocides used in the modern food industry to control *salmonella enterica*, and links between biocide tolerance and resistance to clinically relevant antimicrobial compounds. Appl Environ Microbiol. 2012;78(9):3087-97.
  48. Joung DK, Lee YS, Han SH, Lee SW, Cha SW, Mun SH, Kong R, Kang OH, Song HJ, Shin DW, Kwon DY. Potentiating activity of luteolin on membrane permeabilizing agent and ATPase inhibitor against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Asian Pac J Trop Med. 2016;9(1):19-22.
  49. Liu X, Pai PJ, Zhang W, Hu Y, Dong X, Qian PY, Chen D, Lam H. Proteomic response of methicillin-resistant *S. aureus* to a synergistic antibacterial drug combination: a novel erythromycin derivative and oxacillin. Sci Rep. 2016;6:19841.
  50. Choi JG, Choi JY, Mun SH, Kang OH, Bharaj P, Shin DW, Chong MS, Kwon DY. Antimicrobial activity and synergism of Sami-Hyanglyun-Hwan with ciprofloxacin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Asian Pac J Trop Med. 2015;8(7):538-42.
  51. Lee SH, Yumnam S, Hong GE, Raha S, Venkatarama Gowda Saralamma V, Lee HJ, Heo JD, Lee SJ, Lee WS, Kim EH, Park HS, Kim GS. Flavonoids of Korean *Citrus aurantium* L. Induce apoptosis via intrinsic pathway in human hepatoblastoma HepG2 cells. Phytother Res. 2015;29(12):1940-9.
  52. Han DS. Pharmacognosy. Paju:Dong Myeng Publishers. 1995:327.