

神效越桃散이 메티실린에 내성이 있는 *Staphylococcus aureus*에 대한 항균활성에 관한 연구

신인식[‡], 강옥화, 정대기, 강희정, 김지은, 황형칠, 김인원, 권동렬^{*}

원광대학교 약학대학 한약학과, 원광한약연구소, 원광생명공학연구소

Antibacterial Effect of Sinhyowoldosan Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*

In-Sik, Shin[‡], Ok-Hwa Kang, Dae-Ki Joung, Hee-Jung Kang, Ji-Eun Kim, Hyeong-Chil Hwang, In-Won Kim, and Dong-Yeul Kwon^{*}

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

ABSTRACT

Objectives : Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a cephalosporin and beta-lactam antibiotic-resistant strains. In most cases, that is spread from infected patients and infection rates are growing increasingly. Thus, accordingly, increased resistance to antibiotics is causing serious problems in the world. Therefore, there is a need to develop alternative antimicrobial drugs for the treatment of infections diseases.

Methods : The antibacterial activities of Sinhyowoldosan were evaluated against 3 strains of Methicillin-resistant *staphylococcus aureus*(MRSA) and 1 standard Methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) strain by using the disc diffusion method, minimal inhibitory concentrations (MICs) assay, colorimetric assay using MTT test, checkerboard dilution test and time-kill assay was performed under dark.

Results : The MIC (minimum inhibitory concentration) of Sinhyowoldosan water extract against *S. aureus* strains ranged from 500 to 2,000 µg/mL, so we have confirmed it on a strong antibacterial effect. Also, the combinations of Sinhyowoldosan water extract and conventional antibiotics exhibited improved inhibition of MRSA with synergy effect. We suggest that Sinhyowoldosan water extract against MRSA have antibacterial activity, it has potential as alternatives to antibiotic agent, the combination test was used, Triton X-100 (TX) and DCCD for measurement of membrane permeability and inhibitor of ATPase. As a result, antimicrobial activity of SH is affected by the cell membrane were assessed.

Conclusion : We suggest that the Sinhyowoldosan water extract lead the treatment of bacterial infection to solve the resistance and remaining side-effect problems that are the major weak points of traditional antibiotics.

Key words : Sinhyowoldosan, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*

서론

Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

는 1961년 영국에서 처음 출현하였으며 1980년대 이후 급격하게 증가하고 있다. 최근에는 우리나라 종합병원이나 대학병원에서 MRSA가 *S. aureus* 균주 중 70% 이상 차지하는 것

* 교신저자 : 권동렬, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 약학대학 한약학과 본초학교실
· Tel : 063-850-6802 · E-mail : sssimi@wku.ac.kr
제1저자 : 신인식, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 약학대학 한약학과 본초학교실
· Tel : 063-850-6802 · E-mail : herveau@hanmail.net
· 접수 : 2012년 12월 11일 · 수정 : 2013년 1월 7일 · 채택 : 2013년 1월 12일

으로 알려져 있다¹⁾. 모든 Beta-lactam계 항균제에 내성이 있으며 aminoglycoside, quinolone계 항생제 등 대부분의 항생제에 강한 내성을 가지고 있어 감염 후 사망률이 높기 때문에 전 세계적으로 심각한 문제로 대두되고 있다²⁾.

일부 세균은 항생제에 노출이 되면 항생제에 대한 내성 정도가 강해지는데, 그 이유는 효소에 의한 항생제의 불활성화, 표적 물질의 변화, 세포막의 항생제 투과성 변화와 세포 외로의 항생제 유출 등 다양한 기전이 있다³⁾. 세균은 이들 중 한 가지 또는 여러 가지가 복합적으로 작용하여 항생제에 내성을 가지게 된다⁴⁾. 그렇기 때문에 천연물을 가지고 균에 대해 약물치료를 하였을 때 최소억제농도(MIC)가 비록 높게 나왔을 지라도 항생제와 병용하여 약물치료 하였을 때 synergy effect가 나왔다면 앞으로도 꾸준히 가치가 있는 연구방향이 될 수 있을 것이다⁵⁻⁶⁾. 신효월도산(神效越桃散)은 동의보감 내경편(東醫寶鑑 內景篇)에 수록되어 있으며 대치자인(大梔子仁), 고량강(高良薑)이 각각 12g으로 구성되어있는 처방으로 陰과 陽이 어긋나게 뒤섞여서 고르지 못하여 발병한 이질로 뱃속이 그득하고 참을 수 없이 아픈 것을 치료한다⁷⁾.

처방 중 치자(梔子)는 양혈해독(涼血解毒)의 효능이 있어 혈열출혈(血熱出血), 용종창독(癰腫瘡毒)을 治療하고 고량강(高良薑)은 脾胃의 한사(寒邪)를 온산(溫散)하고 온중지통(溫中止痛)하는 효능으로 지사(止瀉) 작용이 있다⁸⁾. 본 논문은 이 신효월도산을 이용한 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*에 대한 항균작용을 얻어 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 생약

본 실험에 사용한 신효월도산(SH)은 《東醫寶鑑》⁷⁻⁸⁾ 처방을 기준으로 하였으며, 사용된 약재는 대치자인, 고량강으로 대한한약국(익산, 한국)에서 구입하여 감정하여 사용하였다.

2) 항생제 및 시약

실험에 사용한 시약은 Ampicillin & Oxacillin & Gentamicin & Ciprofloxacin & Norfloxacin & Vancomycin (SIGMA), Mueller-Hinton Broth & Mueller-Hinton Agar (BD), dimethyl sulfoxide[DMSO], MTT[3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, 5 mg/mL]는 시그마케미칼사(MO, USA)에서, sodium hydroxide[NaOH] (DAE JUNG, KOREA)에서 구입하여 사용하였다.

3) 균주

본 실험에 사용한 균주 MRSA [ATCC 33591]와 MSSA [ATCC 25923]는 ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)에서 구입하였고, DPS-1,2는 원광대학교 병원 (익산, 한국)에서 MRSA 보균자로부터 채취하여 임상 균주로 사용하였다.

2. 방법

1) 시료의 조제방법

SH 물 추출물은 치자와 고량강을 각각 12g을 증류수 500 mL로 2시간씩 2회에 달여 추출하였으며, 감압 농축한 다음 동결 건조하여 4℃에서 보관하였다. 시약은 멸균증류수에 녹여 실험에 사용하였다.(Table 1).

Table 1. The composition of Sinhyowoldosan

Herbal Name	Pharmacognostic Name	Weight(g)
梔子	Gardeniae Fructus	12
高良薑	Alpiniae Officinari Rhizoma	12

2) 균주 배양

각각의 균주들은 -70℃ deep freeze에서 10% glycerol에 보관하고, Mueller-hinton agar (MHA)에 접종하여 37℃ incubator에서 24시간 배양 후 0.5 McFarland 표준 탁도 (1.5×10^8 CFU/mL)로 실험에 사용하였다.

3) Antimicrobial resistance testing⁹⁾

MRSA 균주의 mecA gene의 검출은 PCR (Polymerase chain reaction) 증폭기를 이용하였다. PCR 반응은 MRSA Primer mix kit (Genotek Co, Korea) 을 사용하여 행하였다(Table 2).

Table 2. Determination of the mecA gene of the *S. aureus* strains used in the experiment

S. aureus strain	Class	mecA gene	β -Lactamase activity	Antibiotic resistance pattern
ATCC 33591	MRSA	+	+	AM, OX
ATCC 25923	MSSA	-	-	-
Clinical isolates				
DPS-1	MRSA	+	+	AM, OX
DPS-2	MRSA	+	-	AM, OX

+ : positive ; - : negative, AM : ampicillin ; OX : oxacillin, DPS: staphylococcal strains from the Department of Plastic Surgery, Wonkwang University Hospital.

4) 항균효과 측정 (Disc diffusion method)

항균효과는 디스크 확산법(Disc diffusion method)에 의해 측정하였다¹⁰⁻¹¹⁾. Mueller-hinton agar (MHA)를 고압 멸균하여 petri-dish에 굳힌 다음, 균 100 uL를 골고루 도말하였다. 모든 균주는 37℃ incubator에서 24시간 배양하였으며, 1.5×10^8 CFU/mL 을 희석하여 MHA에 최종적으로 1.5×10^5 CFU/mL가 되게 하였다. 다음으로 멸균 된 paper disc(6 mm)에 SH 500, 1,000 2,000 μ g과 ampicillin 10 μ g을 주입하여 완전히 흡수시킨 후 37℃ incubator에서 24시간 배양시켜 paper disc의 직경을 포함한 주위에 형성된 inhibition zone의 직경을 측정하였다.

5) 최소억제농도 (Minimum inhibitory concentration, MIC) 측정

Minimum inhibitory concentration (MIC)는 배지 미량 희석법을 통해 측정하였다¹²⁻¹³⁾. SH를 액체배지에 농도별로 첨가하고, 여기에 탁도를 1.5×10^8 CFU/mL로 맞춘 균을 10 μ L 접종하여 최종적으로 1.5×10^6 CFU/mL이 되게 하였다. 다음으로 37℃ incubator에서 18시간 배양한 후에 육

안으로 관찰하였을 때 미생물이 증식되지 않는 가장 낮은 SHH 농도를 MIC로 측정하였다¹⁴⁾.

6) 약물병용효과 (Fractional Inhibitory Concentration Index, FICI)

Checkerboard dilution test 는 SH와 상용 항생제인 ampicillin, oxacillin, gentamicin, ciprofloxacin, norfloxacin, vancomycin을 병행처리 하였을 때 항생제 효능의 변화를 통해 최소억제농도 (Minimum inhibitory concentrations)를 측정하였다¹⁵⁾. 두 항균물질은 MHB를 보충하여 순차적으로 희석하였다. 접종원은 37°C incubator에서 24시간 배양한 후에 사용하였으며, 최종적으로 1.5×10^6 CFU/mL 가 되게 하였다.

Fractional inhibitory concentration index (FICI) = FICA+FICB = [A]/MIC_A+ [B]/MIC_B [A]는 병용한 A약물의 농도이며, MIC_A는 A약물의 MIC이다. FICI는 0.5미만은 synergy, 0.5에서 0.75까지는 partial synergy, 0.76부터 1.0미만은 additive effect, 1.0이상 4.0미만은 indifference, 그리고 4.0이상은 antagonism 을 따른다¹⁶⁾. 따라서 이들의 범위에 따라 두 항균물질의 다양한 synergy 비율을 측정하였다.

7) Time-kill assay

Time-kill curve assay는 SH의 농도에 따른 박테리아의 성장을 4시간, 8시간, 16시간, 24시간 별로 그래프를 나타내었다¹⁷⁾. 항균물질은 단일약물로 3/ MIC로 측정하였으며, 항생제와 병용하였을 때의 박테리아 수를 측정하였다. 박테리아는 24시간 배양된 균을 사용하였으며, 1.5×10^6 CFU/mL 을 기준으로 하여 MHB를 100배씩 순차적으로 희석하였고, 100 μ L씩 도말하였다. control로써는 MHB에 균만을 배양하였다. Colony counts는 37°C incubator에서 24시간의 간격을 두고 30~300 colonies를 측정하였다.

8) MRSA에 대한 세포막 투과성 및 ATPase 억제 기전

SH의 항균활성이 membrane 투과성의 변형과 ATPase 억제에 어느 정도 연관성이 있는지 보기위해 SH에 Membrane 투과성을 증진시키는 약물인 Triton (Triton X-100)과 ATPase inhibitor로써 사용되는¹⁸⁾ DCCD를 병용하여 억제된 균의 생존력을 관찰하였다. 0.1% Triton과 200 μ g DCCD를 사용하여 SH 1/16 MIC에서 항균활성을 측정하였다.

9) 통계분석

모든 실험은 3회 이상 반복하였고, 실험결과는 Microsoft office excel 2007을 이용하여 student' s t-test 분석법을 적용하였으며 그 값은 평균 \pm 표준편차로 나타내었고, 신뢰수준 95% ($p < 0.05$)에서 통계적 유의성을 검증하였다.

결 과

1. 디스크 확산법 (Disc diffusion method)

1) 표준균주 MSSA (ATCC 25923)에 대한 항균활성 측정결과

MSSA (ATCC 25923)에서는 SH 1,000~2,000 μ g에서 지름이 8~12 mm인 clear zone이 나왔으며, 농도 의존적으로 증가하였고 AM 10 μ g의 항균력 보다는 낮았다(Figure 1).

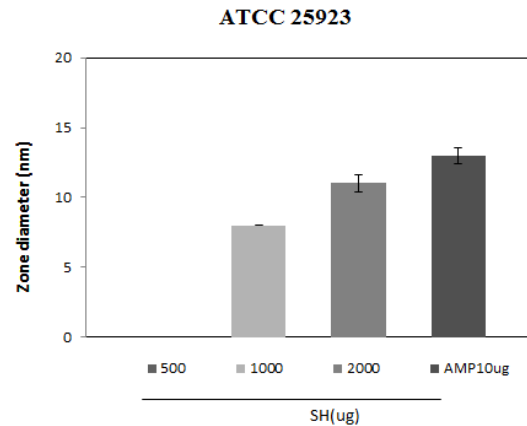


Figure 1. Zone of inhibition against *S. aureus* ATCC 25923 (MSSA). These data are Mean \pm SED for triple-independent experiments. AMP: Ampicillin

2) 표준균주 MRSA (ATCC 33591)에 대한 항균활성 측정결과

MRSA (ATCC 33591)에서는 SH 2,000~1,000 μ g을 적용 하였을 때 지름이 8~12mm인 clear zone을 보였다. (Figure 2)

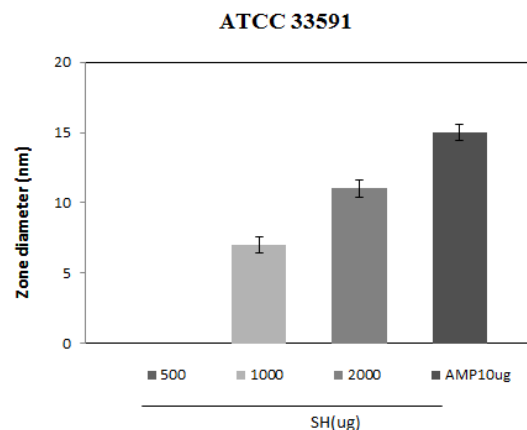


Figure 2. Zone of inhibition against *S. aureus* ATCC 33591 (MRSA). These data are Mean \pm SED. for triple-independent experiments. AMP: Ampicillin.

2. 약물병용효과 (Fractional inhibitory concentration Index, FICI)

1) 항생제 Gentamicin 과 SH의 병용효과 측정결과

SH과 gentamicin과의 약물병용효과를 본 결과(Table 3) MRSA (ATCC 33591)에서는 SH는 1/8 MIC, gentamicin 은 1/8 MIC로 저해농도가 현격하게 감소했다.

Table 3. Result of the combined effect of SH and GT against *S. aureus*

S. aureus strain	MIC(ug/mL) SH		MIC(ug/mL) GT [†]		FICI
	Alone	With GT	Alone	With SH	
MRSA (ATCC33591)	1,000	125	500	62,5	0,25
MSSA (ATCC25923)	1,000	250	15,63	1,95	0,375
MRSA (DPS-1)	1,000	250	250	125	0,75
MRSA (DPS-2)	1,000	500	62,5	31,25	1

*GT : gentamicin

2) 항생제 Ciprofloxacin 과 SH의 병용효과 측정결과

SH과 ciprofloxacin과의 약물병용효과를 본 결과(Table 4) MSSA (ATCC25923)에서는 SH는 1/8 MIC, ciprofloxacin 은 1/16 MIC의 효과를 보여 FICI가 0,1875 synergy인 효과를 보였으며 MRSA (ATCC 33591)은 약물에서 1/8로 낮아진 저해능도를 보였다.

Table 4. Result of the combined effect of SH and CP against *S. aureus*

S. aureus strain	MIC(ug/mL) SH		MIC(ug/mL) CP [†]		FICI
	Alone	With CP	Alone	With SH	
MRSA (ATCC33591)	1,000	125	250	62,5	0,375
MSSA (ATCC25923)	1,000	125	125	7,81	0,1875
MRSA (DPS-1)	1,000	250	250	62,5	0,5
MRSA (DPS-2)	1,000	500	250	125	1

*CP: ciprofloxacin

3. The time-kill assay

1) 표준균주 MRSA (ATCC 33591)에 대한 성장곡선 측정결과

MRSA 표준균주와 MSSA 표준균주에 대한 SH의 시간에 따른 항균활성을 측정하여 균의 성장정도를 나타낸 그래프에서는 각각의 SH 3/4 MIC와 gentamicin 1/2 MIC를 적용하였을 때는 균의 억제력이 뚜렷한 변화를 보이지 않지만 SH와 gentamicin을 병용하였을 때에는 16시간까지 균이 현저히 감소하는 것을 알 수 있었다. (Figure 3).

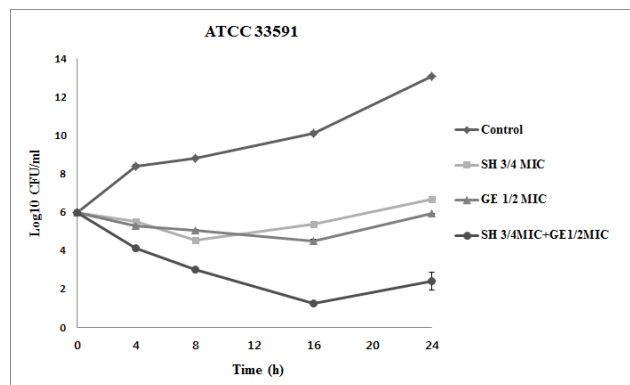


Figure 3. Time-kill curves of *S. aureus* MRSA 33591 using SH, GE: Gentamicin

2) 표준균주 MSSA (ATCC 25923)에 대한 성장곡선 측정결과

표준균주 25923에 대한 SH와 ciprofloxacin의 FICI는 0,1875로 높은 시너지를 보였으므로 SH와 CP를 병용하였을 때, 시간이 지남에 따라 균이 급격하게 사멸하다가 24시간에서 완전히 억제 되었다. (Figure 4).

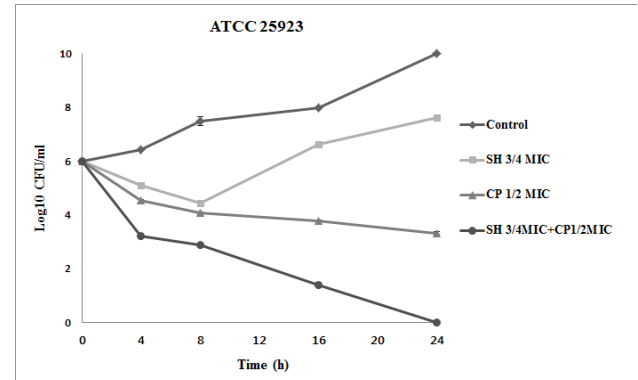


Figure 4. Time-kill curves of *S. aureus* ATCC 25923 using SH, CP: ciprofloxacin

4. MRSA에 대한 세포막 투과성 및 ATPase 억제 기전 측정결과

Detergent를 사용하여 SH의 membrane 투과성이 강화되는 효과를 보기위해 SH 1/16 MIC와 0,1% Triton-X (TX)를 병용하였을 때 SH의 항균활성을 측정하였다. TX는 조직 또는 세포막에서 그의 구성성분을 분리 정제할 때에 용해제로 첨가하여 약물의 세포막 투과성을 증진시키는 시약으로¹⁹⁾ SH의 membrane 투과성을 증가시켜 균의 생존력을 낮추어주는 결과를 얻었다(Figure 5).

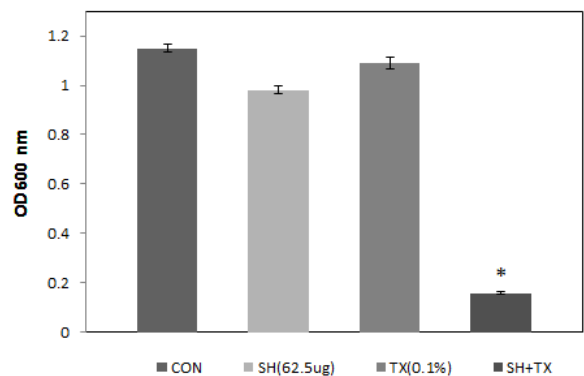


Figure 5. Effect of membrane-permeabilizing agent Triton on the susceptibility of *S. aureus* (ATCC 33591) to SH. The viability of bacteria was determined by a spectrophotometer (optical density at 600 nm, OD600) after incubation of 24 hr with 1/16 MIC SH and 0,1% TX. The data are Mean±SEM, for triple-independent experiments.

세포막에 에너지 전이 저해제로서 작용하는 DCCD20) 200 ug과 SH를 병용하였을 때 *S. aureus* (ATCC 33591)에 대한 억제정도를 본 결과, 균의 생존력이 감소하였다(Figure 6).

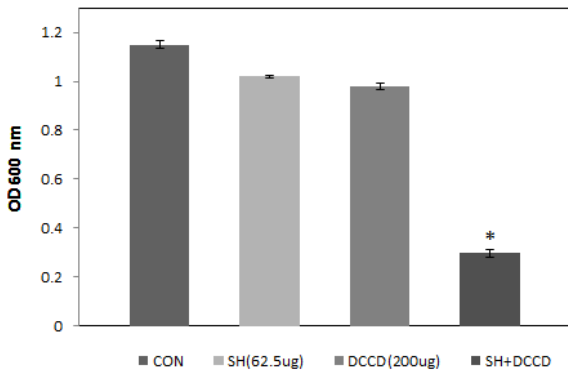


Figure 6. Effect of ATPase-inhibitors agent DCCD on the susceptibility of *S. aureus* (ATCC 33591) to SH. The viability of bacteria was determined by a spectrophotometer (optical density at 600 nm, OD600) after incubation of 24 hr with 1/16 MIC SH and DCCD 200 μ g. The data are Mean \pm SEM, for triple-independent experiments.

고찰

최근 MRSA의 출현에 따라 다양한 항생제에 내성을 가지는 “슈퍼 박테리아” 라는 수식어가 붙으면서 새로운 항생제에 대한 연구가 활발해지고 있다. 각종 생명체들 중 미생물은 생존 능력이 뛰어나서 외부의 공격에서도 살아남을 수 있는 능력을 진화시키고 있다. 따라서 더 강한 항생제를 만드는 것은 내성이 더 강한 균을 만드는 결과를 초래하는 것을 무시할 수 없다. 그렇기 때문에 높은 투자비용에도 불구하고 프로젝트 진행 중 부작용에 중시시킬 위험이 큰 화학 합성 신약에 비해 짧은 개발기간에 개발 비용이 적고 안전성이 높은 천연물을 이용한 의약품 개발에 대한 관심이 높아지고 있다.

따라서 본 실험에서는 神效越桃散이 Methicillin에 내성이 있는 *Staphylococcus aureus*에 대한 항균 활성에 관한 연구를 하기 위하여 神效越桃散 물 추출물의 MRSA에 대한 항균 효과의 연관성을 확인하였다.

육안으로 항균활성이 있는지 항생제와 비교해보기 위해 Beta-lactam계 항생제인 ampicillin 10 μ g과 神效越桃散 500~2,000 μ g으로 disc diffusion한 결과, ampicillin 보다는 항균력이 떨어졌지만 8~13mm의 clear zone이 나타났다. 神效越桃散 물 추출만으로 MRSA에 대한 MIC(최소 억제 농도)가 대부분 1,000 μ g 이었으며 항생제와 병용하였을 때 항균력이 어느 정도 증강하는지 측정해보기 위해 神效越桃散 물 추출물과 항생제와의 약물병용효과를 실험해 본 결과 각 약물의 농도를 1/4 이하로 줄일 수 있는 효과도 있었지만 두 약물농도를 1/2 밖에 낮출 수 없는 것도 있었다. 그래서 시간에 따른 균의 생존력을 보기 위해 0시간, 4시간, 8시간, 16시간, 24시간 별로 colony 개수를 측정한 결과 균의 생존력이 시간이 지남에 따라 점점 줄어들었다. 특히 synergy 효과가 높은 SH와 항균제의 병용에서는 24시간 경과 시에는 균이 거의 억제되거나 완전히 사멸되는 결과를 보였다.

이 결과로 神效越桃散이 MRSA에 대한 항균효과가 있으며 항생제와 병용하여 사용할 시 항균효과가 증강됨을 알 수 있었다.

따라서 MRSA에 치료에 神效越桃散이 항생제 후보물질의

가능성을 열어주었다. 이것은 神效越桃散이 기존 항생제에 대한 내성이 있는 균주에 항균 활성이 우수하였고, 항생제와 병용하여 실험한 결과에서 기존 항생제의 사용을 현저히 감량할 수 있음을 시사 하였다. 따라서 항생제의 과잉사용으로 인한 부작용을 해결하는 하나의 방안이 될 수 있으리라 사료 된다. 또한, 항생제로 인한 내성을 해결할 수 있는 우수한 후보물질임을 시사해 주었다.

결론

1. 神效越桃散은 MRSA에 대한 MIC (최소억제농도)가 1,000~2,000 μ g이었다.
2. 神效越桃散은 Disc diffusion method로 본 clear zone에서 1,000~2,000 μ g에서 항균 효과가 나타났다.
3. 神效越桃散은 항생제와의 약물병용 효과에서 MRSA (ATCC 33591, DPS-1,2), MSSA (ATCC 25923)에서 synergy effect와 partial synergy를 확인할 수 있었다.
4. 神效越桃散을 시간별로 균의 생장을 colony counts 측정한 결과, SH 3/4 MIC에서 시간이 경과함에 따라 균이 감소하였으며, 특히 MSSA (ATCC 25923)에 대하여 SH 3/4MIC와 ciprofloxacin 1/2MIC 병용시 균이 24시간에서 완전히 억제되었다.
5. 神效越桃散 1/16 MIC에 0.1% Triton-X (TX)를 병용하였을 때 membrane 투과성이 증가하여 MRSA (ATCC 33591)의 생존력이 감소하였다.

이상의 실험 결과로 보아 神效越桃散은 MRSA에 대해 유효한 항균작용을 보였고, 항생제와의 병용 실험에서 partial synergy 혹은 synergy effect를 확인할 수 있었으며 향후 계속적인 연구가 필요할 것으로 사료 된다.

감사의 글

This study was supported by the Grant of the Traditional Korean Medicine R&D project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (No. B120069).

참고문헌

1. Marraro RV, Mitchell JL. Experiences and observations with the typing of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol, 1975 ; 1(2) : 180-4.
2. Sanford MD, Widmer AF, MJ Bale, Jones RN, Wenzel RP. Efficient detection and long-term persistence of the carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis, 1994 ; 19(6) : 1123-8.
3. Bycroft BW, Shute R. The molecular basis for the mode of action of beta-lactam antibiotics and

- mechanism of resistance. *Pharm Res*, 1985 ; 2(1) : 3-14.
4. 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(3) : 357-64.
 5. Liu IX, Durham DG, Richards RM. Baicalin synergy with β -lactam antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* other β -lactam-resistant strains of *S. aureus*. *J Pharm Pharmacol*, 2000 ; 52(3) : 361-6.
 6. Dawis MA, Isenberg HD, France KA, Jenkins SG. In vitro activity of gatifloxacin alone and in combination with cefepime, meropenem, piperacillin and gentamicin against multidrug-resistant organisms. *J Antimicrob Chemother*, 2003 ; 51(5) : 1203-11.
 7. Huh J. NaeKyung-Pyun of Donguibogam, Yeogang, 2005 : 564
 8. Boo YM, Kwon DY, Seo BI, Choi HY, Lee JH. Chungyulyak/Clinical Traditional Herbagology. Younglimsa, 2004 : 198, 461
 9. Lee YS, Kang OH, Choi JG, Oh YC, Chae HS, Kim JH, Park H, Sohn DH, Wang ZT, Kwon DY. Synergistic effects of the combination of galangin with gentamicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Microbiol*, 2008 ; 46(3) : 283-8.
 10. Dzink JL, Socransky SS. Comparative in vitro activity of sanguinarine against oral microbial isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, 1985 ; 27(4) : 663-5.
 11. Kwon DY, Kang OH, Choi JG, Lee YS, Oh YC, Chae HS, Lee GH, Park PS, Kim YC, Sohn DH, Park H, Lee JH. Antibacterial effect of *Dryopteris crassirhizoma* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia*, 2007 ; 78(6) : 430-3.
 12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standards. CLSI document M2 A7. Wayne, PA: CLSI, 2000
 13. Veljic M, Tarbuk M, Marin PD, Ciric A, Sokovic M, Marin M. Antimicrobial activity of methanol extracts of mosses from Serbia. *Pharm Biol*, 2008 ; 46(12) : 871-5.
 14. Shahverdi AR, Fakhimi A, Zarrini G, Dehghan 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.
 15. Noble WC, Virani Z, Cree RG. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett*, 1992 ; 72(2) : 195-8.
 16. Guadalupe MN, Blanca EL, Mariano VP, Fortino SS. In vitro activity effects of combinations of cephalothin, dicloxacillin, imipenem, vancomycin and amikacin against methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. strains. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2006 ; 5 : 25.
 17. Nascimento AM, MG Brandao, GB Oliveira, IC Fortes, SE Chartone. Synergistic bactericidal activity of *Eremanthus erythropappus* oil or beta-bisabolene with ampicillin against *Staphylococcus aureus*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2007 ; 92(1) : 95-100.
 18. Linnett PE, Beechey RB. Inhibitors of the ATP synthetase system. *Methods Enzymol*, 1979 ; 55 : 472-518.
 19. Irvin RT, MacAlister TJ, Costerton JW. Tris(hydroxymethyl) aminomethane buffer modification of *Escherichia coli* outer membrane permeability. *J Bacteriol*, 1981 ; 145(3) : 1397-1403.
 20. Swallow CJ, Grinstein S, Rotstein OD. A vacuolar type H (+)-ATPase regulates cytoplasmic pH in murine macrophages. *J Biol Chem*, 1990 ; 265(13) : 7645-54.