

黃黑散의 메티실린 내성 황색포도상구균에 대한 항균 활성과 옥사실린과의 시너지 효과

최성훈^{1#}, 강옥화¹, 주전¹, 공룡¹, 이승진¹, 강담희¹, 정혜인¹, 이영섭², 권동렬^{1*}

1 : 원광대학교 약학대학 한약학과, 원광한약연구소,
2 : 농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부 인삼특작이용팀

The antimicrobial activity of *Hwangheuk-san* and synergy effect with oxacillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Sung-Hoon Choi^{1#}, Ok-Hua Kang¹, Tian Zhou¹, Ryong Kong¹, Seung-Jin Lee¹,
Dam-Hee Kang¹, Hye-In Jung¹, Young-Seob Lee², Dong-Yeul Kwon^{1*}

1 : Department of Oriental Pharmacy, College of Pharmacy, Wonkwang Oriental Medicines Research Institute,
Wonkwang University, Iksan, Jeonbuk 570-749
2 : Department of Herbal Crop Research, National Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA, 92 Bisanro,
Eumsung, Chungbuk 369-873, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : *Hwangheuk-san* is a complex prescription composed of oriental traditional medicine and has been reported for antioxidant, antimicrobial and anticancer effects in the recent study. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is one of important causes of fatal infectious diseases such as septicemia, endocarditis, toxic shock syndrome, pneumonia, skin and soft tissue infections (SSTIs). *S. aureus* is reported as being for a variety of human diseases and its epidemiological relevance is mainly due to their ability of becoming highly resistant to common antimicrobials such as tetracycline, penicillin, cephalosporin and aminoglycoside. The objective of this study is to determine the antimicrobial effect of *Hwangheuk-san ethanol extracts* (HHS) and synergistic effects with antibiotics oxacillin against MRSA.

Methods : The antimicrobial activity of HHS was measured by the disc diffusion method, broth microdilution method and the checkerboard dilution test, time-kill curve assay was performed to investigate synergistic effects with antibiotics oxacillin against MRSA.

Results : HHS showed antimicrobial activity against MRSA with a MIC value of 125 µg/ml. In the checkerboard test, the interaction of HHS with antibiotics oxacillin produced almost synergy or partial synergy against MRSA. This study showed that HHS reduced the MICs of oxacillin tested, and a remarkable antibacterial effect of HHS, with membrane permeability enhancers.

Conclusions : These results suggest that HHS has the antimicrobial effect and synergistic effects with antibiotics oxacillin against MRSA. This study thus can be a valuable source for the development of a new drug with low MRSA resistance.

Key words : *Hwangheuk-san*, MRSA, antibiotics, antimicrobial, synergistic effects, oxacillin

*Corresponding author : Dong-Yeul Kwon, Wonkwang Oriental Medicines Research Institute, Wonkwang University, Iksan, Jeonbuk 570-749.

· Tel : +82-63-850-6802 · Fax : +82-63-852-6802 · E-mail : sssimi@wku.ac.kr

#First author : Sung-Hoon Choi, Wonkwang Oriental Medicines Research Institute, Wonkwang University, Iksan, Jeonbuk 570-749.

· Tel : +82-63-850-6802 · Fax : +82-63-852-6802 · E-mail : huna2000@hanmail.net

· Received : 7 August 2016 · Revised : 30 August 2016 · Accepted : 20 September 2016

I. 서론

세균성 감염은 병원에서의 질병 및 사망률에 많은 부분을 차지하고 있는 주요 질환으로, 특히 포도상구균에 의한 감염 질환은 미국에서 매년 12,000여명의 사망자가 발생할 만큼 위험한 질환이다.¹⁾ 특히 포도상구균의 감염에 의한 질환으로는 패혈증, 심내막염, 독성 쇼크 증후군, 병원성 폐렴, 피부 및 연조직 감염 등으로 심한 경우 사망에 이를 수 있는 질환들이다.²⁻⁴⁾ 이러한 세균의 감염을 치료하기 위해 penicillin계, cephalosporin계, aminoglycoside계, tetracycline계의 다양한 항생제가 개발되어 임상에서 사용되었으나, 1960년대에 처음으로 항생제 내성 균주인 메티실린 내성 황색포도상구균 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)의 발견을 기점으로 하여 점차 penicillin계열의 내성 균주 외에도 다양한 종류의 항생제에 대한 내성 균주가 나타나면서 항생제에 의한 치료가 점차 어려워지고 있으며, 최후의 항생제로 알려진 vancomycin이나 linezolid, daptomycin에 대한 약물 저항성을 지닌 균주가 발견됐다고 알려짐에 따라 세균에 의한 감염질환은 더욱 큰 문제로 다가오고 있다.⁵⁻⁷⁾

Penicillin계 항생제 중 하나인 methicillin에 내성을 가진 균주인 MRSA의 주요 내성기전에는 β -lactamase와 PBP2a가 있다. β -lactamase에 의한 내성기전은 β -lactam계 항생제들이 공통적으로 가지고 있는 β -lactam 고리를 β -lactamase라고 하는 효소를 통해 가수분해하여 항생제를 불활성 시키는 것이고, PBP2a에 의한 기전은 β -lactam계 항생제와 친화성이 강한 penicillin-binding proteins (PBPs)이라 불리는 MRSA의 세포벽 합성에 관여하는 주요 인자를 대신하여 β -lactam계 항생제에 친화성이 약한 PBP2a를 통해 대신 세포벽을 합성하는 것으로 항생제의 작용을 회피하는 기전이다.⁸⁻¹¹⁾

이외에도 다양한 항생제에 대한 내성기전이 발견되고 있으며, 항생제를 사용함에 따라 꾸준히 증가하는 세균의 내성을 극복하기 위하여 새로운 항생제의 연구 및 개발이 필요한 상황이다. 이에 최근 새로운 항생물질의 소재로 천연물에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 또한 현재 임상에서 상용되고 있는 항생제와의 병용을 통해 MRSA의 내성을 극복하기 위한 연구가 이루어지고 있다.¹²⁾

따라서 본 연구에서는 전통적으로 사용되어 온 한의학 처방을 활용하여 MRSA에 대한 항균 활성을 확인하고, 임상에서 사용되는 항생제와의 병용처리를 통해 내성을 극복할 수 있는 새로운 소재를 찾고자 하였다.

이 실험에서 사용된 黃黑散은 『東醫寶鑑』에 수록된 처방으로 “治腹內癰腫”이라 하여 뱃속에 생긴 응종을 치료한다고 하였다. 처방 구성은 大黃, 補骨脂, 牛蒡子, 牽牛子로 되어 있으며,¹³⁾ 大黃은 瀉熱通腸, 涼血解毒의 본초학적인 효능을 가지고 있고, 항균, 항염, 항알레르기 등의 다양한 약리학적 효과가 보고되고 있다.¹⁴⁾ 補骨脂는 溫腎助陽, 納氣, 止瀉의 본초학적인 효능을 가지고 있으며, 補骨脂의 추출물이 간에서의 지방 축적과 염증을 억제함으로써 고지방식으로 유도한 비만 모델 마우스의 비알콜성지방간 (NAFLD)을 개선한다는 보고가 있다.¹⁵⁾ 牛蒡子は 疎散風熱, 宣肺透疹, 解毒利咽의 본초학적인 효능을 가지고 있고, 항알레르기 효과에 대한 작용기전의

연구¹⁶⁾와 콜라겐 합성을 통한 피부노화 개선효과의 연구가 있으며¹⁷⁾, new butyrolactone type lignans의 항염증 효과가 보고되고 있다.¹⁸⁾ 牽牛子는 瀉水通便, 殺蟲攻積, 消痰滌飲의 본초학적인 효능을 가지고 있으며, 항암, 항염 효과가 보고되고 있다.^{19,20)}

이에 따라 본 연구에서는 다양한 생리활성이 보고된 약재로 구성된 黃黑散을 활용하여 MRSA에 대한 항균 활성과 상용 항생제와의 병용처리를 통한 병용효과를 확인하고, detergent를 병용처리 하여 세포막 투과성 증진이 黃黑散 에탄올 추출물 (HHS)의 항균 효과에 미치는 영향을 확인하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용된 약재인 大黃, 補骨脂, 牛蒡子, 牽牛子는 대한한약국에서 구입하여 권동렬교수가 감정하여 보관하고 (WK-1607) 사용하였다.

2) 시약

Mueller-Hinton agar (MHA)와 Mueller-Hinton broth (MHB)는 Difco™ (Baltimore, MD, USA)에서, Tris-(hydroxymethyl) aminomethane (Tris)은 AMRESCO (San Francisco, CA)에서, N,N-dicyclohexylcarbodiimide (DCCD)와 oxacillin 및 gentamicin은 Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)에서 구입하여 실험에 사용하였다.

3) 균주 및 배양

본 실험에 사용한 표준균주 ATCC 33591은 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 구입하였고, CCARM 3090, 3095, 3102는 서울여자대학교 항생제 내성 균주은행 (Culture Collection of Antimicrobial Resistant Microbes, CCARM, Korea)으로부터, 임상균주 DPS-1, DPS-2는 원광대학교 병원 성형외과 (Department of plastic surgery, DPS)로부터 분양받아 실험에 사용하였다.

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

2. 방법

1) 黃黑散의 제조

大黃 (Rhei Rhizoma) 5 g, 補骨脂 (Psoraleae Fructus) 5 g, 牛蒡子 (Arctii Fructus) 5 g, 牽牛子 (Pharbitidis Semen) 5 g을 70% ethanol 500 mL로 추출하여 감압농축, 동결건조의 과정을 거쳐 13.2%의 수득률을 취했다.

2) 디스크 확산법 (Disc diffusion method)

HHS의 항균 효과는 디스크 확산법을 통해 MRSA에 대한

항균 활성을 측정하였다.^{21,22)} 고압 멸균된 MHA에 24시간 배양된 균 100 μ L를 골고루 도말하여 최종적으로 1.5×10^6 CFU/mL이 되게 하였다. 다음으로 멸균된 paper disc (6mm)에 HHS (25 μ g, 50 μ g, 100 μ g, 200 μ g)과 oxacillin 10 μ g을 각각 20 μ L씩 주입하여 완전히 흡수시킨 후 37°C incubator에서 24시간 배양시켜 paper disc 주위에 형성된 clear zone을 측정하였다.

3) 최소억제농도 (Minimum inhibitory concentration, MIC)

최소억제농도 (MIC)는 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2000) 방법에 따라 액체배지 희석법을 통해 측정하였다.²³⁾ HHS를 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/mL이 되게 하였다. 다음으로 37°C 항온기에서 24시간 배양 후 미생물이 증식되지 않는 가장 낮은 약물의 농도를 MIC로 측정하였다.

4) 약물병용효과 (Fractional inhibitory concentration index, FICI)

HHS와 항생제의 병용효과를 보기위해 checkerboard dilution test를 실시하였다.²⁴⁾ 상용 항생제는 oxacillin (OX)이며 상기 액체배지 희석법과 동일한 방법으로 항생제를 병용하였을 때 MIC를 측정하였다.

FICI 산출기준은 다음과 같다.

Fractional inhibitory concentration index (FICI)

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

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

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

partial synergy; $0.75 < FICI \leq 1.0$, additive effect;

$1.0 < FICI \leq 4.0$, no synergy; $FICI > 4.0$, antagonism.

5) Time-kill curve assay

HHS와 항생제 OX를 병용했을 때 MRSA의 증식 변화를 보기 위해 4시간, 8시간, 16시간, 24시간 별로 성장곡선을 나타내었다. 약물농도는 subinhibitory concentration (sub-IC)에서 HHS와 항생제를 단일 및 병용처리 하여 측정하였다. 박테리아는 24시간 배양된 균을 사용하였으며, 1.5×10^5 CFU/mL을 기준으로 하여 MHB를 10~100배씩 순차적으로 희석한 다음, 100 μ L 도말하였다. Control로써는 MHB에 균만을 배양하였다. Colony counts는 37°C incubator에서 24시간의 간격을 두고 30~300 colonies를 측정하였다.

6) 세포막 투과성 (Cytoplasmic membrane permeability) 증진제와의 병용효과

HHS와 세포막 투과성 증진제를 병용처리 하였을 때 활성의 변화를 보기 위해 detergent인 Tris를 사용하였다.

7) 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% ($p < 0.01$)에서 통계적 유의차를 평가하였다.

III. 결 과

1. 디스크 확산법 (Disc diffusion method)

디스크 확산 실험을 통해 HHS의 항균 효과를 측정하고, ATCC 33591에 대한 HHS에서 disc zone이 나타난 것을 확인하였다. HHS의 disc zone의 크기를 확인한 결과, ATCC 33591에서 농도 의존적으로 disc zone이 확장되는 것을 확인하였다 (Figure 1.).

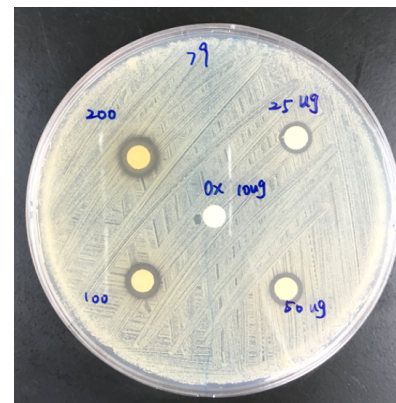
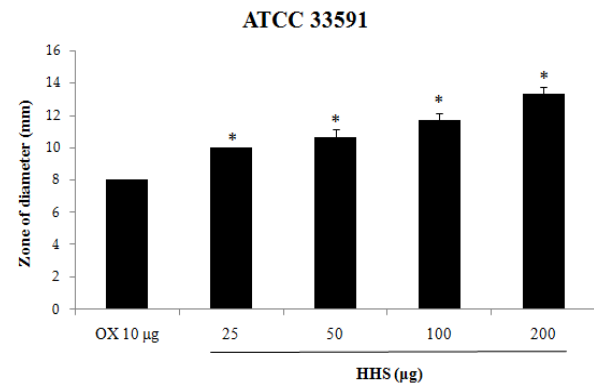


Figure 1. Diameter of inhibition zone (mm) of HHS against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (ATCC 33591). * $p < 0.05$ compared to antibiotic

2. 최소억제농도 (Minimum inhibitory concentration, MIC)

HHS의 최소억제농도 (MIC)를 측정하고, 6개의 표준균주 및 임상균주에서의 최소억제농도는 125 μ g/mL인 것을 확인하였다 (Table 1.).

3. 약물병용효과 (Fractional inhibitory concentration index, FICI)

HHS와 oxacillin (OX)를 병용하여 실험한 결과, CCARM

3095와 DPS-2에서 시너지효과가 나타났고, CCARM 3090, CCARM 3102에서는 부분적인 시너지효과가 나타난 것을 확인하였다 (Table 2.).

Table 1. The minimum inhibitory concentrations (MIC) of HHS against MRSA.

Strains	Type	MIC (μg/mL)	
		HHS	OX
ATCC 33591	HA [*] -MRSA	125	500
CCARM 3090	HA-MRSA	125	62,5
CCARM 3095	HA-MRSA	125	500
CCARM 3102	HA-MRSA	125	500
DPS-1	HA-MRSA	125	250
DPS-2	HA-MRSA	125	1,95

*HA, hospital-acquired; HHS, *Hwangheuk-san ethanol extracts*; OX, oxacillin.

Table 2. Results of the combination of HHS and OX against MRSA.

Strains	agent	MIC (μg/mL)		FIC	FICI	Outcome
		Alone	Combination			
ATCC 33591	HHS	125	62,5	0,5	1	Additive effect
	OX	250	125	0,5		
CCARM 3090	HHS	125	62,5	0,5	0,75	Partial synergy
	OX	62,5	15,6	0,25		
CCARM 3095	HHS	125	31,25	0,25	0,375	Synergy
	OX	500	62,5	0,125		
CCARM 3102	HHS	125	62,5	0,5	0,75	Partial synergy
	OX	500	125	0,25		
DPS-1	HHS	125	62,5	0,5	1	Additive effect
	OX	250	125	0,5		
DPS-2	HHS	125	15,6	0,125	0,25	Synergy
	OX	31,25	3,9	0,125		

4. Time-kill curve assay

HHS와 OX의 1/2 MIC를 단일 및 병용처리 하여 CCARM 3095에 대한 시간에 따른 균의 성장정도를 확인한 결과, control (drug-free) 및 단일 처리군의 경우 균의 생장이 억제되지 않았으나, HHS와 OX를 같이 처리하였을 때 8시간 이후부터 균의 생장이 감소하는 경향을 보여주었다 (Figure 2.).

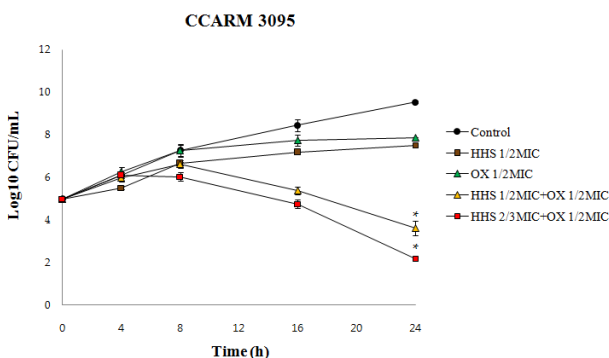


Figure 2. Growth curves for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) CCARM 3095 in the single or combination of *Hwangheuk-san ethanol extract* (HHS) and oxacillin (OX). *p < 0,05 compared to antibiotic alone.

5. HHS와 막 투과성 증진제와의 병용효과

HHS와 막 투과성 증진제와의 병용처리를 통해 막 투과성 증진이 HHS의 항균 효과에 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과 HHS를 단독으로 사용하였을 때보다 HHS와 막 투과성 증진제인 Tris를 병용처리 하였을 때 항균 활성이 더욱 증진된 것을 확인할 수 있었다 (Figure 3.).

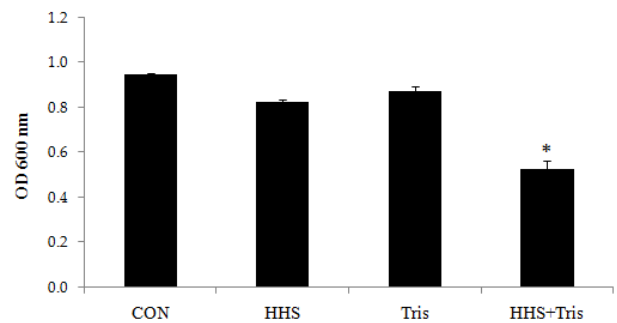


Figure 3. Effect of the membrane-permeabilizing agent Tris on the susceptibility of MRSA (ATCC 33591) to HHS. The viability of bacteria was determined spectrophotometrically (optical density at 600 nm, OD₆₀₀) after incubation for 24 h with 7.8 μg/mL HHS and 250 μg/mL Tris. The data are average of triple-independent experiments. *p < 0,05 compared to HHS alone.

IV. 고찰

MRSA의 내성을 극복하기 위해 새로운 기전 또는 구조를 지닌 항생물질을 개발하고 각테일 요법 등의 다양한 연구가 이루어지고 있으며, 근래에는 천연물을 이용한 항생 후보물질의 개발이 활발히 이루지고 있다.^{25,26)}

이번 연구에서는 전통 한의학처방인 黃黑散을 이용하여 내성 균주에 대한 항균 활성과 상용 항생제와의 병용효과를 확인하고, 후보물질로써의 가능성을 확인하고자 하였다.

黃黑散은 『東醫寶鑑』에 수록된 처방으로 “治腹內癰腫”이라 하여 뱃속에 생긴 응종을 치료한다고 하였으며, “小腹痞堅按之痛 身有熱 乃結熱所成 宜大黃牡丹湯, 或桃仁承氣湯, 黃黑散”이라 하여 아랫배가 단단해져 누르면 아프고 몸에 열이 나는 것은 열이 몰려서 생긴 것이므로 黃黑散을 쓴다고 하였다.¹³⁾

黃黑散에 대한 이전 연구로는 항산화 효능 및 항암 활성이 있다고 보고되었으며, 대장균인 *Escherichia coli*와 위염을 발생시키는 *Helicobacter pylori*에 대하여 항균 활성이 있다고 보고되었다. 또한, AGS 위암세포에 黃黑散 추출물을 처리하였을 때 농도 의존적으로 증식이 억제되었다고 보고되었다.^{27,28)}

본 실험에서는 HHS의 항균 효과와 상용 항생제와의 병용효과를 확인하고, detergent를 같이 처리하여 세포막 투과성 증진이 HHS의 항균효과에 미치는 영향을 확인하였다.

디스크 확산법 및 MIC를 통해 HHS의 항균 활성을 확인한 결과, MRSA에 유효한 항균활성이 있음을 확인할 수 있었고 (Figure 1, Table 1), β-lactam계 항생제인 oxacillin을 같이 병용처리 하였을 때 시너지효과가 나타난다는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 2, Table 2). Oxacillin은 현재 사용되고 있는 대표적인 β-lactam계 항생제로 주 기전은 세포벽 합성에 관여하는 PBP의 활성을 저해하여 균의 세포벽 합성을 억

제하는 약물이다. MRSA에는 PBP2a와 β -lactamase라고 하는 두 주요 기전을 통해 β -lactam계 항생제의 활성을 떨어뜨려, 내성을 나타나게 된다. 본 실험에서는 Oxacillin을 단독으로 투여하였을 때에는 MRSA에 대하여 유효한 항균활성을 보이지 않았으나, HHS와 같이 투여하였을 때에는 낮은 농도에서도 유효한 항균활성이 나타난 것을 확인할 수 있었다. 또한 Detergent인 Tris를 단독 또는 HHS와 같이 처리하여 막 투과성 변화가 HHS의 항균 효과에 미치는 영향을 확인한 결과, 균의 생장에 거의 영향을 미치지 않는 최대 농도인 HHS 7.8 μ g/mL과 Tris 250 μ g/mL을 같이 병용투여 하였을 때, 단독으로 투여하였을 때와 비교하여 유효한 성장억제효과가 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 이는 곧 세포막 투과성에 영향을 주는 약물과 병용하여 사용 시 균의 성장을 억제할 수 있다는 것을 알 수 있었다. β -lactam계 항생제의 항균활성 기전은 세포벽 합성에 영향을 주는 것으로 이는 세포막 투과성에도 영향을 미친다.²⁹⁾ HHS가 β -lactam계 항생제인 oxacillin과 시너지효과를 보이는 것은 세포막 투과성과 깊은 연관이 있을 것으로 사료되며, 이에 대한 기전은 더욱더 연구가 진행되어야 할 것으로 보인다.

V. 결 론

黃黑散 에탄올 추출물 (HHS)의 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)에 대한 항균 활성을 측정 한 결과는 다음과 같다.

1. 디스크 확산법에서 HHS가 MRSA 표준균주 ATCC 33591에 대해 25 μ g 이상에서 농도 의존적인 항균 효과를 나타냈다.
2. HHS의 MRSA 최소억제농도는 (MIC)는 125 μ g/mL 이었다.
3. HHS와 항생제 OX의 병용 결과, MRSA 네 균주에 대하여 partial synergy와 synergy가 나타났다.
4. Time-kill curve assay에서 HHS는 OX와 같이 병용 처리 하였을 때, 시간에 따른 균 생장의 억제양상이 나타났다.
5. HHS와 detergent인 Tris를 같이 사용하였을 때 항균 활성의 상승됨이 나타났다.

이상 실험 결과, HHS의 MRSA에 대한 유효한 항균 활성을 확인하였으며, 기존 항생제와의 상승효과로 항생제의 농도를 낮추어줄 수 있어 다제 내성 균주인 MRSA의 성장억제에 효과적인 항생제 후보물질이 될 수 있음을 시사하는 바이다.

감사의 글

이 논문은 2015년도 정부(미래창조과학부)의 재원(No. 2008-0062484)으로 한국연구재단과 교육과학기술부의 재원으로 지원을 받아 수행된 산학협력 선도대학(LINC) 육성사업의 지원에 의해 수행된 결과로 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. de Araújo RS, Barbosa-Filho JM, Scotti MT, Scotti L, da Cruz RM, Falcão-Silva Vdos S, de Siqueira-Júnior JP, Mendonça-Junior F. Modulation of Drug Resistance in *Staphylococcus aureus* with Coumarin Derivatives. *Scientifica* (Cairo). 2016;2016:6894758.
2. Koga T, Masuda N, Kakuta M, Namba E, Sugihara C, Fukuoka T. Potent in vitro activity of tomopenem (CS-023) against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 ; 52(8) : 2849-54.
3. Hwang JH, Lee JH, Moon MK, Kim JS, Won KS, Lee CS. The efficacy and safety of arbekacin and vancomycin for the treatment in skin and soft tissue MRSA infection: preliminary study. *Infect Chemother*. 2013 ; 45(1) : 62-8.
4. Antignac A, Tomasz A. Reconstruction of the phenotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by replacement of the staphylococcal cassette chromosome mec with a plasmid-borne copy of *Staphylococcus sciuri* pbpD gene. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 ; 53(2) : 435-41.
5. Villegas-Estrada A, Lee M, Heseck D, Vakulenko SB, Mobashery S. Co-opting the cell wall in fighting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: potent inhibition of PBP 2a by two anti-MRSA beta-lactam antibiotics. *J Am Chem Soc*. 2008 ; 130(29) : 9212-3.
6. Aires A, Marrinhas E, Carvalho R, Dias C, Saavedra MJ. Phytochemical Composition and Antibacterial Activity of Hydroalcoholic Extracts of *Pterospartum tridentatum* and *Mentha pulegium* against *Staphylococcus aureus* Isolates. *Biomed Res Int*. 2016;2016:5201879.
7. Thangamani S, Mohammad H, Abushahba MF, Sobreira TJ, Hedrick VE, Paul LN, Seleem MN. Antibacterial activity and mechanism of action of auranofin against multi-drug resistant bacterial pathogens. *Sci Rep*. 2016;6:22571.
8. Chen FJ, Wang CH, Chen CY, Hsu YC, Wang KT. Role of the mecA gene in oxacillin resistance in a *Staphylococcus aureus* clinical strain with a pvl-positive ST59 genetic background. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 ; 58(2) : 1047-54.
9. Lovering AL, Gretes MC, Safadi SS, Danel F, de Castro

- L, Page MG, Strynadka NC. Structural insights into the anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) activity of ceftobiprole. *J Biol Chem*. 2012 ; 287(38) : 32096–102.
10. Lemaire S, Fuda C, Van Bambeke F, Tulkens PM, Mobashery S. Restoration of susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to beta-lactam antibiotics by acidic pH: role of penicillin-binding protein PBP2a. *J Biol Chem*. 2008 ; 283(19) : 12769–76.
 11. Goldstein F, Perutka J, Cuirolo A, Plata K, Faccone D, Morris J, Sournia A, Kitzis MD, Ly A, Archer G, Rosato AE. Identification and phenotypic characterization of a beta-lactam-dependent, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 ; 51(7) : 2514–22.
 12. Hong SB, Rhee MH, Yun BS, Lim YH, Song HG, Shin KS. Synergistic Anti-bacterial Effects of *Phellinus baumii* Ethyl Acetate Extracts and β -Lactam Antimicrobial Agents Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Ann Lab Med*. 2016 ; 36(2) : 111–6.
 13. Heo J. paginal translation. Donguibogam. Yeogang publisher. 2001 ; 2176–78.
 14. Son DB, Song SP, Hwang CH, Hong SH, Hwang CY. A Study on the Anti-microbacterial Activity, Anti-inflammatory and Anti-allergic Effects of mixture of *Rheum coreanum* *Scutellaria baicalensis* *Phellodonon amurense*. *The journal of Korean Medicine Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology*. 2005 ; 18(1) : 154–71.
 15. Seo E, Oh YS, Jun HS. *Psoralea corylifolia* L. Seed Extract Attenuates Nonalcoholic Fatty Liver Disease in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. *Nutrients*. 2016 ; 8(2) : 83.
 16. Yoo JM, Yang JH, Yang HJ, Cho WK, Ma JY. Inhibitory effect of fermented *Arctium lappa* fruit extract on the IgE-mediated allergic response in RBL 2H3 cells. *Int J Mol Med*. 2016 ; 37(2) : 501–08.
 17. Knott A, Reuschlein K, Mielke H, Wensorra U, Mummert C, Koop U, Kausch M, Kolbe L, Peters N, Stäb F, Wenck H, Gallinat S. Natural *Arctium lappa* fruit extract improves the clinical signs of aging skin. *J Cosmet Dermatol*. 2008 ; 7(4) : 281–9.
 18. Yang YN, Huang XY, Feng ZM, Jiang JS, Zhang PC. New Butyrolactone Type Lignans from *Arctii Fructus* and Their Anti-inflammatory Activities. *J Agric Food Chem*. 2015 ; 63(36) : 7958–66.
 19. Kim KH, Woo KW, Moon E, Choi SU, Kim SY, Choi SZ, Son MW, Lee KR. Identification of antitumor lignans from the seeds of morning glory (*Pharbitis nil*). *J Agric Food Chem*. 2014 ; 62(31) : 7746–52.
 20. Kim KH, Ha SK, Choi SU, Kim SY, Lee KR. Bioactive phenolic constituents from the seeds of *Pharbitis nil*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2011 ; 59(11) : 1425–9.
 21. 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 : 871–5.
 22. Bala, M., Ray, K. and Gupta, S.M. Comparison of disc diffusion results with minimum inhibitory concentration (MIC) values for antimicrobial susceptibility testing of *Neisseria gonorrhoeae*. *Indian J. Med. Res*. 2005 ; 122 : 48–51.
 23. 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.
 24. 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.
 25. You YO, Choi NY, Kang SY, Kim KJ. Antibacterial Activity of *Rhus javanica* against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:549207.
 26. 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.
 27. Lee MH, Lee JW, Park C, Han MH, Hong SH, Choi YH. Antioxidant, Antimicrobial and Anticancer Properties of Seven Traditional Herb-combined Remedies. *Journal of Life Science*. 2015 ; 25(4) : 406–15.
 28. Hong SH, Park C, Kim KM, Choi YH. Induction of Apoptosis by Hwangheuk-san in AGS Human Gastric Carcinoma Cells through the Generation of Reactive Oxygen Species and Activation of Caspases. *Journal of Life Science*. 2015 ; 25(11) : 1235–43.
 29. Hashizume T, Yamaguchi A, Sawai T. Outer membrane permeability of imipenem in comparison with other beta-lactam antibiotics. *J Antibiot (Tokyo)*. 1986 ; 39(1) : 153–6.