

Antioxidant Activity of Native Korean Halophyte Extracts and Their Anti-biofilm Activity against *Acinetobacter baumannii*

Eun Seong Lee^{1,2}, Jeong Woo Park^{1,3}, Ki Hwan Moon^{1,3} and Youngwan Seo^{1,2*}

¹Ocean Science & Technology School, Korea Maritime & Ocean University, Busan 49112, Korea

²Bioorganic advanced Material Lab, Division of Convergence on Marine Science, Korea Maritime & Ocean University, Busan 49112, Korea

³Lab. Of Marine Microbiology, Division of Convergence on Marine Science, Korea Maritime & Ocean University, Busan 49112, Korea

Received October 16, 2023 /Revised October 29, 2023 /Accepted October 30, 2023

Antibiotics have greatly contributed to the treatment and prevention of bacterial diseases in humans, animals, and fish. However, antibiotic misuse has led to the emergence and spread of multi-drug-resistant bacteria. In addition to antibiotic discovery research, efforts are being made to combat such multidrug-resistant bacteria using antimicrobial agents, antioxidants, host immune enhancement, probiotics, and bacteriophages, as well as various symptomatic therapies. To discover novel bioactive compounds, it is crucial to adopt approaches that incorporate fresh ideas, new targets, innovative techniques, and untapped resources. Halophytes are plants that grow in high-salt soils and are known to adapt to salt-induced stress through unique metabolic processes that produce secondary metabolites. This study aimed to investigate the effects of extracts of halophytes native to Korea on oxidative stress and to determine whether they exert inhibitory activity against biofilms, which are major pathogenic factors of infectious bacteria. The *Acinetobacter baumannii* strain ATCC 17978, a representative drug-resistant bacterium, was used to measure anti-biofilm activity. The results showed that *Aster spathulifolius*, *Carex kobomugi*, *Rosa rugosa*, and *Asparagus cochinchinensis* exerted strong antioxidant and anti-biofilm effects without affecting bacterial growth itself. The halophytes used in this study are promising candidates for the development of pharmaceutical agents with antioxidant and antimicrobial properties.

Key words : Anti-biofilm activity, halophyte, multi-drug resistant, oxidative stress

서 론

항생제는 사람과 동물 및 어류의 세균성 질병을 치료하고 예방하는데 크게 기여하였으나 항생제의 지속적인 사용으로 다제약제 내성균이 출현하고 이들의 분포가 증가하여 항생제 선택에 대한 선택압이 증가하고 있는 실정이다[6]. 최근 세계보건기구(WHO), 동물보건기구(OIE), G20 정상회의, 글로벌보건안보구상(GHSA) 등에서는 항생제 내성 문제의 심각성을 지적하고 국가차원의 대응을 촉구하고 있으며, WHO 및 Public Health England O'Neill 보고서에 따르면 해마다 약 70만 명이 여러 항생제에 내성을 보이는 세균인 다제약제 내성균으로 숨지고, 사망자 규모

가 2050년에는 연간 1,000만 명까지 늘어나며, 매년 100조 달러(USD) 이상의 경제적 손실을 예상하고 있는 실정이다[17]. 최근 다제약제 내성균의 제어 및 치료를 위해 항생제 발굴 연구 외 항병원성물질, 항산화물질, 숙주면역증강제, 프로바이오틱스, 항균 펩타이드 및 박테리오파지 등을 활용한 새로운 치료 기술 개발이 활발히 이루어지고 있으며, 이러한 새로운 생리활성물질 발굴을 위해 new concepts, new methods 및 new sources를 활용한 접근법의 중요성이 대두되고 있다. 생물막 형성은 미생물이 적대적인 환경에서 적응하고 생존하기 위한 전략으로 감염성 세균의 주요 병원성인자로 인식되고 있다. 특히 생물막을 형성한 병원성 세균은 쉽게 사멸되지 않아 항생제에 훨씬 더 큰 내성을 가지게 되므로 매우 치료하기 어려운 실정이다[12, 16]. 생물막을 근절하기 위해 표면에 대한 세균 부착 및 세균 집락화 억제, 생물막 발달을 조절하는 신호 분자와의 간섭, 그리고 생물막 매트릭스의 분해 등과 같은 주요 전략들이 사용되었지만 여러 가지 단점으로 인해 생물막 형성을 효과적으로 방지하기 위한 대체 접근 방식의 필요성이 제기되고 있다. 산화 스트레스는 미생물이

*Corresponding author

Tel : +82-51-410-4328, Fax : +82-51-404-4750

E-mail : ywseo@kmou.ac.kr

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

부유 상태에서 생물막을 형성한 고착상태로 이동하도록 하는 주요 메커니즘 중의 하나이다[4]. 따라서 항산화제와 같은 산화 스트레스 조절제를 표적으로 삼을 수 있는 화합물은 생물막 형성 관련 감염을 치료하는 데 사용할 수 있을 것으로 사료되고 있다.

예로부터 인류는 각종 질병과 상처를 치료하기 위한 수단으로 여러 종류의 약초를 사용해 이를 해결했으며 시대가 지남에 따라 축적된 여러 약초에 대한 지식은 현재 많은 천연소재 의약품 개발에 지표로 이용되고 있다. 하지만 인류의 수명연장과 새로운 질병의 발생 등으로 인해 새로운 의약품 개발에 대한 필요성은 급격히 증가하였으나 오랜 연구에 따른 육상자원의 양과 수는 점점 한계에 이르고 있다. 이를 해결하기 위해 인류는 해양 및 그 주변의 생물자원에 주목하게 되었다. 지구상에 존재하는 생명체 중 약 80%가 해양에 존재하며 해양 생물종에 대해 진행된 연구는 미흡한 실정이다. 또한 육상 생물과는 다른 환경에서 서식하기 때문에 육상 생물과는 다른 특이한 생화학적 대사산물이 발견될 가능성이 크다고 할 수 있다.

염생식물은 해안의 사구 또는 갯벌 등과 같이 염분 함량이 높은 토지에서 자라는 식물로서 육상식물과는 달리 흡수된 염분을 배출하거나 세포의 삼투압을 유지하는 방식을 통해 강력한 염분 저항력을 가지고 있는 식물로 잘 알려져 있다[7, 15]. 높은 염분 환경은 염생식물 조직에 높은 산화스트레스를 유도하며, 이러한 산화스트레스는 식물의 기체교환 감소를 유도하여 잎 조직에 이산화탄소 공급을 줄이고, 결국 광합성 전자 전달을 감소시켜 다양

한 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 생성을 유도한다. 이러한 고 염분 환경 유도 산화스트레스 저항을 위해 염생식물들은 매우 독특한 항산화 기전을 발전시켜 왔으며, 현재까지 많은 염생식물에서 다양한 항산화 물질들이 발견되고 있다[1, 3]. 본 연구에서는 다양한 국내 자생 염생식물을 조추출물을 확보하여 해당 추출물의 항산화 효능 및 다제약제 내성균 중 하나인 *Acinetobacter baumannii*의 항생물막 효과를 검증하고, 나아가 세포주를 활용한 *in vitro* 상의 독성 평가를 통해 새로운 형태의 항생제 내성균 제어 물질 후보군을 탐색하고자 한다. 항산화물질의 항병원성(항생물막) 능력 검증은 다제약제 내성균의 제어를 위한 기존약물의 신약 재창출(drug-repositioning) 개념과도 일맥상통하며, 해당 연구를 통해 국내 자생 염생식물로부터 새로운 항산화 물질의 신약 활용 가능성을 확인할 수 있을 것으로 기대한다.

재료 및 방법

재료

본 연구에서는 해안의 자생식물을 채집하여 사용하였으며(Table 1), 채집한 시료는 실온의 응달에서 공기중에 자연 건조한 후 methylene chloride (CH₂Cl₂)로 24시간 동안 2회 침지하여서 비극성도가 높은 물질들을 우선 추출하였고 그 이후 methanol을 이용하여 동일한 방법으로 극성도가 높은 물질들을 2회 추출하였다. 이후 CH₂Cl₂ 추출용매와 methanol 추출용매를 각각 여과하고 농축한 후에 모든 농축된 잔류물을 합하여 조추출물로 사용하였다.

Table 1. List of halophytes

Sample No.	Sample name	Scientific name of sample
1	해국	<i>Aster spathulifolius</i> Maxim.
2	큰비쭈	<i>Artemisia fukudo</i>
3	갯사상자	<i>Cnidium japonicum</i>
4	갯강활	<i>Angelica japonica</i>
5	통보리사초	<i>Carex kobomugi</i>
6	도깨비고비	<i>Cyrtomium falcatum</i>
7	갯방풍	<i>Glehnia littoralis</i>
8	갯제비쭈	<i>Artemisia japonica</i> subsp. <i>littoricola</i> Kitam.
9	암대극	<i>Euphorbia jokinii</i>
10	가는갯능쟁이	<i>Atriplex gmelinii</i>
11	여정실	<i>Ligustrum japonicum</i> Thunb.
12	비쭈	<i>Artemisia scoparia</i> Waldst. & Kit.
13	백년초	<i>Opuntia</i>
14	번행초	<i>Tetragonia tetragonoides</i> (Pall.) Kuntze
15	흰명주아귀	<i>Persicaria lapathifolia</i>
16	해당화	<i>Rosa rugosa</i> Thunb.
17	만형자	<i>Vitex rotundifolia</i> L.
18	천문동	<i>Asparagus cochinchinensis</i> Merr.

환원력(Ferric reducing antioxidant power, FRAP) 측정

환원력을 측정하기 위해 시료를 200, 100, 50 µg/ml 농도로 희석한 후, 희석한 시료 0.2 ml와 200 mM sodium phosphate (pH 6.6) 0.2 ml, 1% potassium ferricyanide 0.2 ml를 혼합한다. 이를 50°C에서 20분 동안 반응시킨 뒤, 10% trichloroacetic acid 0.2 ml를 첨가한 뒤, 10,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 원심분리 후, 상등액 0.5 ml와 0.1% ferric chloride 0.5 ml를 혼합하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로 vitamin C (L-ascorbic acid)를 사용하였다[21].

Peroxynitrite 소거활성

Peroxynitrite (ONOO⁻) 소거 활성은 dihydrorodamine 123 (DHR 123)의 산화되는 정도를 측정해 나타내었다. DHR 123은 dimethylformamide (DMF)에 녹여 질소로 purge시켜 80°C에 보관하였고, DHR 123 용액의 희석은 암실의 얼음 위에서 조제하여 사용하였다. Buffer는 90 mM sodium phosphate, 90 mM sodium chloride, 5 mM potassium chloride를 혼합하여 pH를 7.4로 조절한 후 100 µM diethylenetriaminepenta acetic acid (DTPA)를 혼합하여 냉장 보관하였고, buffer로 DHR 123을 5 µM로 희석하여 실험에 사용하였다. DHR 123 buffer 용액에 화합물과 peroxynitrite를 첨가하고 실온에서 5분간 반응시킨 후, Victor3 1402 multilabel counter (PerkinElmer, MA, USA)를 이용하여 excitation 485 nm, emission 530 nm에서 측정하였다. Authentic peroxynitrite 대신에 SIN-1을 첨가하는 경우는 동일한 방법으로 실시하되 1시간 동안 반응시킨 뒤 측정하였다. 이는 3-morpholinsydnonimine (SIN-1)이 NO·와 O₂·⁻를 동시에 발생시켜 ONOO⁻를 생성시키는 화합물로, authentic peroxynitrite의 급속한 DHR 123의 산화와는 달리 점진적으로 산화가 일어나게 하기 때문이다. 실험은 triplicate로 행하였으며, 결과는 blank를 차감한 값을 평균하여 대조군에 대한 백분율로 계산하였다[13, 14].

실험 균주 및 배양 조건

본 연구에서는 다제약제내성균 중의 하나인 *Acinetobacter baumannii* 균주에 대한 실험을 수행하였다. 실험에 사용된 *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 표준 균주는 Luria-Bertani (BD, USA) 액체 배지 및 1.5% agar를 첨가한 고체 배지를 사용하여 37°C 조건에서 18시간 배양되었다.

생물막 생성량 측정

시료에 대한 *A. baumannii* ATCC 17978균주의 생물막 생성량을 정량하기 위해 crystal violet (Sigma-Aldrich, USA) 시약을 사용하여 염색된 생물막 생성량을 측정하였다. 5 ml polystyrene tube (Corning, USA)에 LB 액체 배지를

500 µl씩 분주한 후 *A. baumannii* ATCC 17978 전배양액을 5 µl (1%) 접종하였다. 균이 접종된 액체 배지에 각 시료를 1 mg/ml 농도(최종 DMSO 농도 1%)로 처리하였다. 음성 대조군으로는 동일한 농도의 DMSO를 처리하였고, 양성 대조군으로는 부역제성 농도의 trimethoprim과 sulfamethoxazole 항생제를 혼합하여 처리하였다(6 µg/ml, 30 µg/ml). 최종 혼합물을 37°C에서 200 rpm으로 18시간 배양하였다. 배양 후, 각 polystyrene tube는 1차수로 3회 세척되었으며 600 µl의 0.1% crystal violet 용액으로 20분간 생물막을 염색하였다. Crystal violet 용액을 제거 후 각 polystyrene tube를 1차수로 3회 세척한 뒤 완전 건조하였다. 600 µl의 30% acetic acid를 분주하여 염색된 생물막을 녹인 후 96 well plate에 200 µl씩 분주하여 Microplate Reader (Bio-Tek instruments, USA)에서 흡광도 550 nm 파장에서 측정하였다.

세포배양

실험에 사용된 HT-1080 세포는 인간 섬유육종 세포이며, 한국 세포주 은행(KCLB, Korean cell line bank)에서 분양 받아 실험에 사용하였다. 10% fetal bovine serum (FBS), 100 unit/ml penicillin-streptomycin을 첨가한 RPMI 1640을 배양액으로 하여 37°C, 5% CO₂ incubator (Forma scientific)에서 배양하였다. 배양된 세포의 배지는 일주일에 3-4회 교환해 주었고, trypsin-EDTA (0.05% trypsin, 0.02% EDTA)를 수 분간 처리하여 부착된 세포를 분리하여 계대배양 하였다.

세포생존율 측정

시료에 대한 세포의 생존율을 측정하기 위해서 배양된 HT-1080 cell을 5×10³ cells/well이 되도록 96 well plate에 분주하여 5% CO₂, 37°C 조건에서 24시간 배양하였다. 그 후 조추출물을 농도별로 처리하였으며, 대조군으로는 phosphate buffered saline(PBS, BYLABS, Korea)를 처리하여 24시간 동안 동일조건으로 배양하였다. 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-dipheyltetrazolium bromide (MTT, fc. 1 mg/ml) 용액을 넣어 4시간 동안 동일한 조건에서 배양하여 MTT formazan crystal 형성을 유도한 후 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 처리하여 녹인 후 ELISA reader (Bio-Tek instruments, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다 [19].

Intracellular Reactive oxygen species(ROS) 측정

세포 내 free radical 생성은 DCFH-DA assay로 측정하였다. DCFH-DA (2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate, sigma)는 세포 내 활성산소와 반응해 형광물질을 만드는데 이 시약을 처리해 발생하는 형광을 측정함으로써 세포 내 활성산소의 농도를 측정할 수 있다. HT-1080 세포를 Black 96 well plate에 분주한 후 24시간 배양한 뒤 20 µM

DCFH-DA를 20분간 처리 후 시료를 농도별로 가하여 1시간 동안 배양한 뒤 PBS로 세척하였고, 500 µM H₂O₂를 처리하였다. 30분 간격으로 0-120분 동안 excitation 485 nm과 emission 530 nm에서 형광도를 측정하였으며, 시료와 H₂O₂를 처리하지 않은 대조군과 비교하여 ROS 소거능을 평가하였다[19].

Glutathione(GSH) 함량 측정

세포내 축적된 GSH 함량은 thiol-staining reagent인 mBBR (monobromobimane)을 이용하여 측정하였다. 세포는 fluorescence microtiter 96 well plate에 well 당 1×10⁷ cells/ml가 되도록 분주하여 24시간 배양한 후, 각 well에 농도별로 시료를 처리하여 다시 5% CO₂, 37°C 조건에서 30분간 배양하였다. 각 well은 PBS buffer로 씻은 후 40 µM mBBR을 처리하여 동일한 조건에서 30분간 반응시킨 뒤, 시료처리에 의한 GSH 함량의 변화를 시간별로 excitation 360 nm, emission 465 nm에서 형광분석기로 측정하였다[8].

통계처리

실험결과는 평균±표준편차(Mean ± Standard deviation, n=3)로 표기하였고, statistical analysis system v9.1 (SAS Institute Inc., USA)를 이용하여 실험결과의 유의성을 검토하였다. 집단 간의 유의성을 알아보기 위하여 일원 배치 분산분석(One way Analysis Of Variance: ANOVA)을 실시하였고, 사후검증은 Duncan’s multiple range test를 이용하여 p<0.05 수준에서 검증하였다.

결 과

환원력(Ferric reducing antioxidant power, FRAP) 측정

환원력 측정은 항산화물질이 노란색의 ferricyanide 착

화합물(potassium ferricyanide)에 존재하는 Fe³⁺ 이온을 Fe²⁺ 이온의 형태로 환원시켜 파란색의 Perl’s prussian blue가 생성되는 정도를 700 nm에서 측정하는 것으로 항산화 활성과 환원력은 밀접한 관련이 있다. 각 시료의 Crude extract를 200, 100, 50 µg/ml 농도로 희석하였고, 대조군으로는 vitamin C (L-ascorbic acid)를 같은 농도로 희석하여 실험에 사용하였다. 모든 시료들이 농도 의존적으로 환원력을 보여주었으며, 그 중 해국, 통보리사초, 비쭉, 해당화, 천문동은 가장 낮은 처리 농도인 50 µg/ml의 농도에서 각각 89.29%, 94.37%, 88.16%, 96.73%, 97.12%의 환원력을 보였다(Fig. 1).

Peroxynitrite 소거활성

Peroxynitrite (ONOO⁻)는 DHR 123과 반응하여 형광성 물질인 rhodamine 123으로 바뀌게 되므로, DHR 123에 ONOO⁻와 SIN-1을 처리한 후 반응 생성물의 흡광도를 측정하여 시료의 peroxynitrite 소거능을 검토하였다. 대조군으로는 L-ascorbic acid와 penicillamine을 사용하였으며, 조추출물과 대조군을 200, 100, 50 µg/ml의 농도로 희석하여 사용하였다. Authentic ONOO⁻를 조추출물로 처리한 결과 모든 샘플의 조추출물에서 농도 의존적인 소거 활성을 보였고 그 중 해국, 통보리사초, 암대극, 해당화, 천문동은 가장 낮은 처리 농도인 50 µg/ml에서 각각 76.1%, 71.8%, 81.9%, 81.4%의 높은 소거 활성을 보였다(Fig. 2). SIN-1에서 유도된 peroxynitrite를 조추출물로 처리하였을 때도 모든 샘플에서 농도 의존적인 소거 활성을 보였으며, 그 중 해국, 통보리사초, 암대극, 해당화, 천문동은 가장 낮은 처리 농도인 50 µg/ml에서 각각 77%, 81%, 73.3%, 78.4%의 높은 소거 활성을 보였다(Fig. 3). Authentic peroxynitrite와 SIN-1에서 유래된 peroxynitrite에 대한 소거율을 측정하는 것의 차이점은 authentic peroxynitrite는 말 그대로 peroxynitrite에 대한 소거율을 측정하는 것이고 SIN-1에서 유래된 peroxynitrite를 소거한다는 것은 SIN-1이 NO와 ·O₂

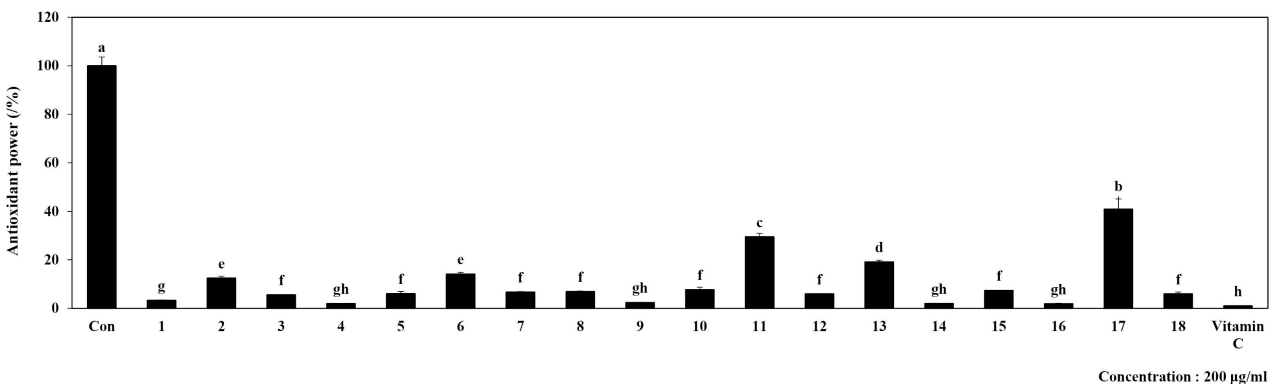


Fig. 1. Ferric reducing antioxidant power of crude extracts from halophytes (% of control). ^{a-h}Means with the different letters are significantly different (p<0.05) by Duncan’s multiple range test.

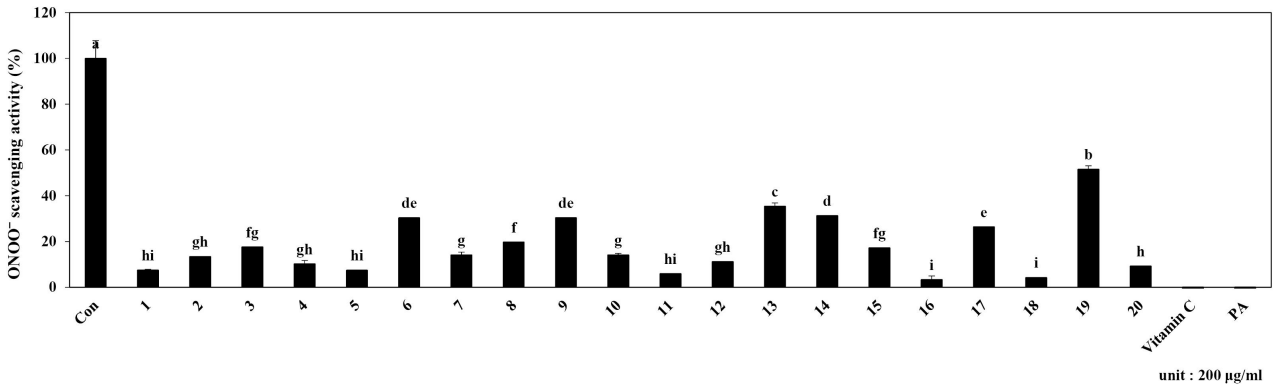


Fig. 2. Scavenging activity of crude extract from halophytes on authentic ONOO⁻ (% of control). ^{a-i}Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

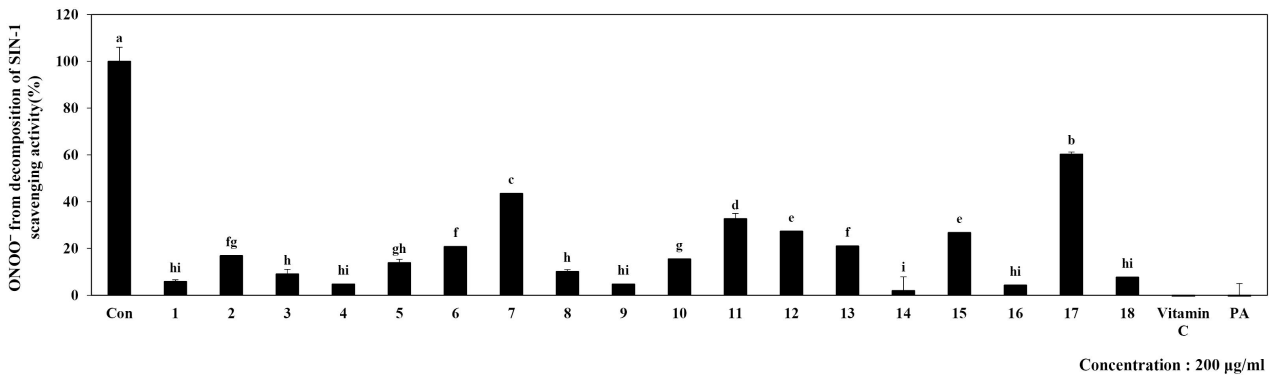


Fig. 3. Scavenging activity of crude extract from halophytes on ONOO⁻ from SIN-1 (% of control). ^{a-i}Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

를 발생시켜 결과적으로 강력한 독성작용을 가진 ONOO⁻를 생성하는 물질이기 때문에 ONOO⁻를 생성하는 반응물 자체(NO 혹은 ·O₂)를 소거하거나 반응 생성물인 ONOO⁻를 소거한다는 의미를 가진다.

생물막 생성량 측정

시료를 처리하였을 때의 *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 균주의 생물막을 Crystal violet 용액으로 염색하여 측정하였다(Fig. 4). 실험 결과, 모든 농도의 시료에서의 균 성장 저해는 발생하지 않았다(Fig. 5). 해국 조추출물을 처리하였을 때에는 100 µg/ml 농도까지 생물막 형성량이 감소하였고, 해당화 및 천문동 조추출물에서는 200 µg/ml 농도에서만 생물막 형성량이 감소하였다. 통보리사초 조추출물의 경우, 유의미한 생물막 저해능이 확인되지 않았다.

세포생존율 측정

시료의 조추출물의 항산화 활성을 측정하기 위해 조추출물이 HT-1080 세포 생존율에 미치는 영향을 MTT assay를 통해 확인하였다(Fig. 6). 모든 시료의 농도는 200, 100, 50 µg/ml로 희석하여 사용하였다. 가장 높은 처리 농도인

200 µg/ml에서 해국, 통보리사초, 해당화, 천문동의 세포 생존율은 각각 82.6%, 74%, 84.8%, 86.9%로 나타났다. 이러한 MTT assay 측정결과를 바탕으로 세포 내 항산화 활성 실험을 실시하였다.

Intracellular Reactive oxygen species (ROS) 측정

세포내 활성 산소와 반응하여 형광물질을 만들어내는 DCFH-DA를 사용해 0~120분까지 30분 간격으로 DCF fluorescence값의 변화를 측정하였다(Fig. 7). HT-1080 세포에 추출물을 200, 100, 50 µg/ml의 농도로 처리한 뒤 500 µM의 H₂O₂를 처리하였고, 시료를 처리하지 않고 500 µM의 H₂O₂만 처리한 control과 시료와 500 µM의 H₂O₂ 모두 처리하지 않은 blank를 대조군으로 하여 비교하였다. Control은 시간이 지날수록 DCF fluorescence 값이 지속적으로 증가하였으나 blank의 경우 그 값의 변화가 거의 없었다. 모든 시료에서 농도 의존적으로 ROS의 생성을 억제하였으며, 200 µg/ml 농도에서 2시간 후 ROS 소거효과를 측정하였을 때 천문동, 해당화, 통보리사초, 해국의 순으로 높은 소거능을 보였다.

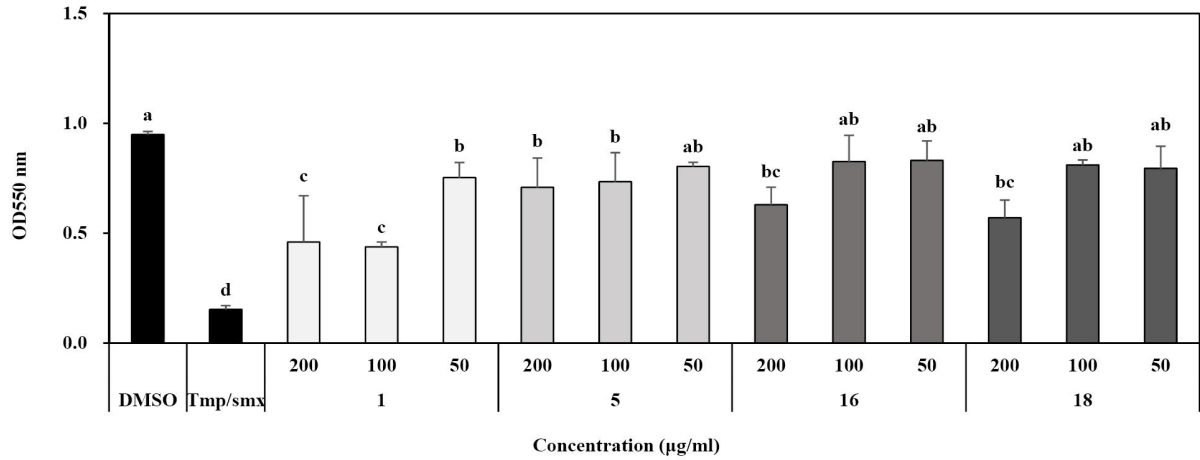


Fig. 4. Anti-biofilm activity of crude extracts from halophytes against *A. baumannii* ATCC 17978. ^{a-d}Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

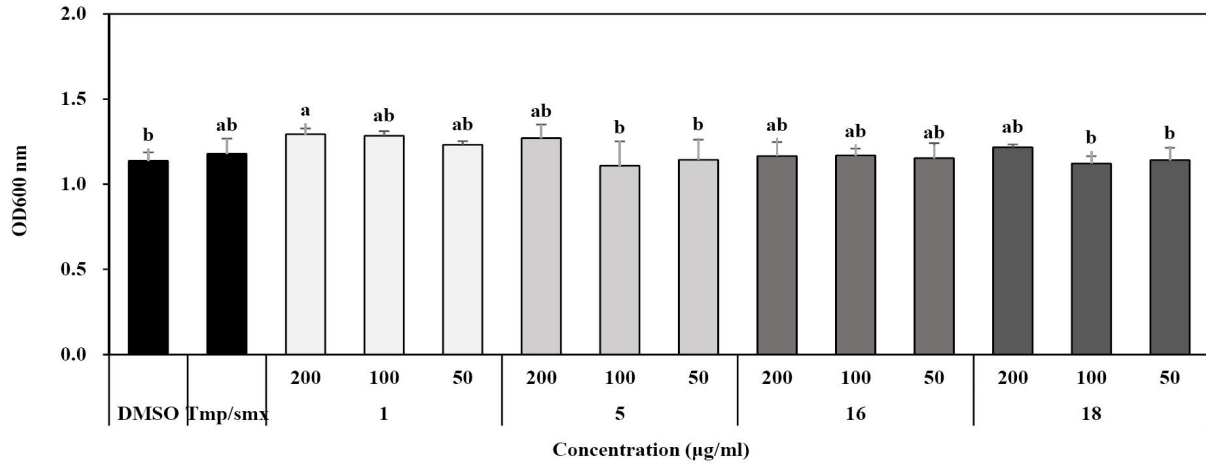


Fig. 5. Growth ratio of *A. baumannii* ATCC 17978 with crude extracts from halophytes. ^{a-b}Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

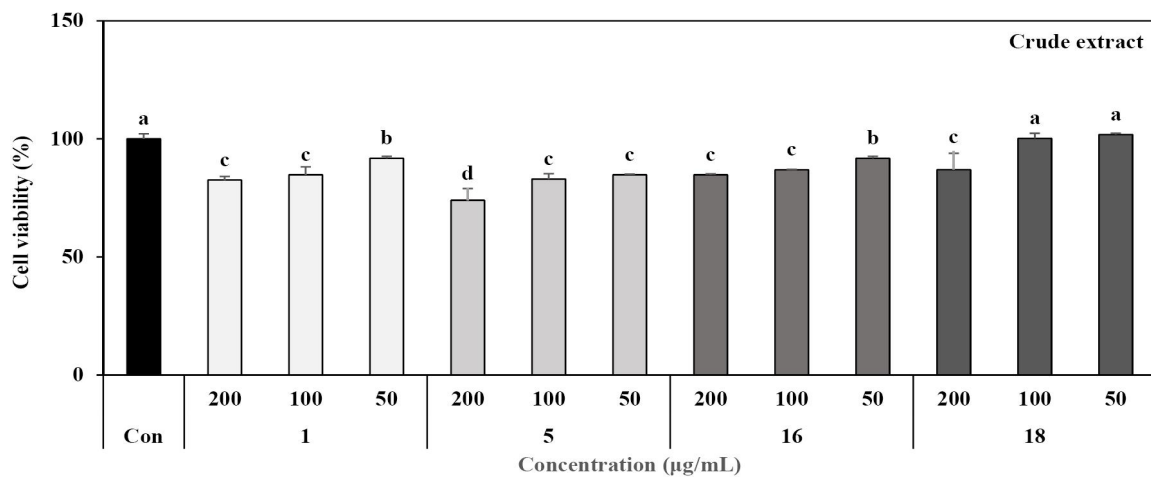


Fig. 6. Cytotoxic effects of crude extracts on HT-1080 cells by using the MTT analysis. The cells were treated with 200, 100, 50 µg/ml of crude extracts for 24 hr. ^{a-d}Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

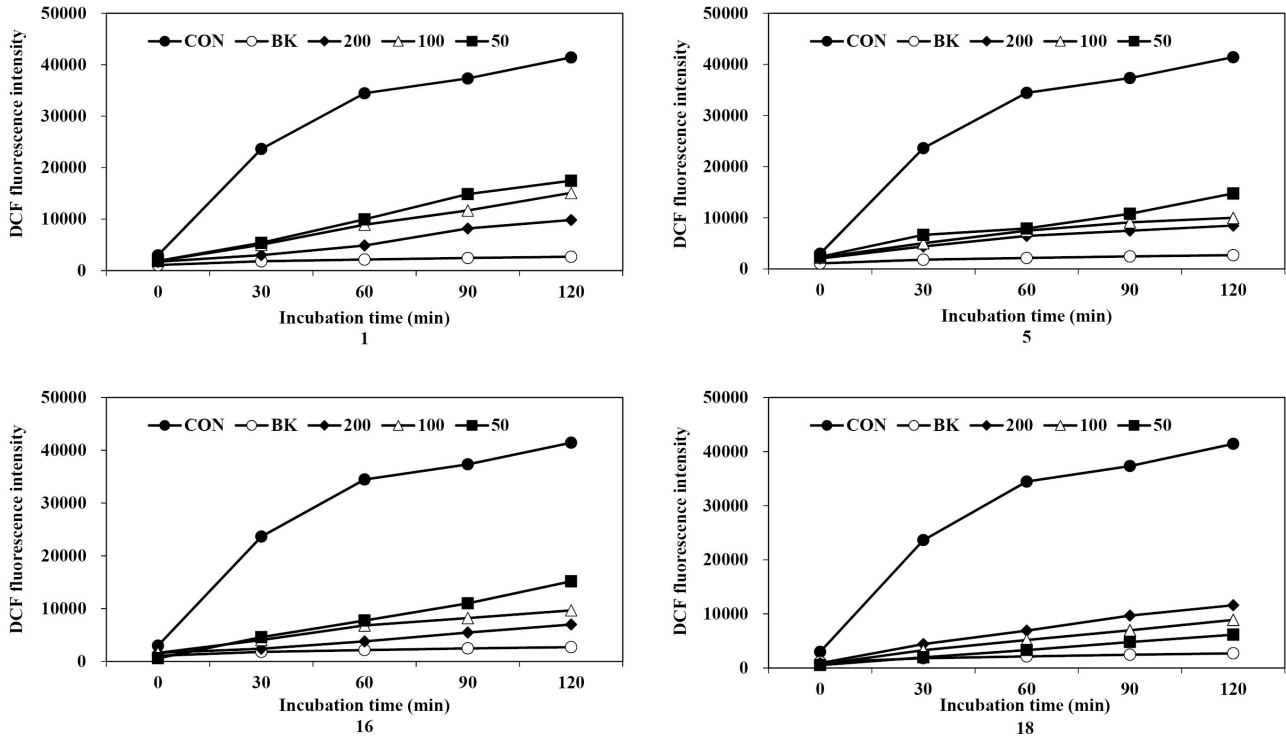


Fig. 7. Effects of crude extracts on intracellular ROS generation by DCFH-DA assay. HT-1080 cells were treated with DCFH-DA and exposed with H₂O₂. CON: with H₂O₂, BK: without H₂O₂.

Glutathione(GSH) 함량 측정

세포내 축적된 GSH 함량은 thiol-staining reagent인 mBBr (monobromobimane)을 이용하여 측정하였다. 비형광 물질인 mBBr은 세포내 산화생성물을 제거하는 역할을 하는 GSH와 결합하여 형광을 나타내기 때문에 이를 측정하여 GSH 함량을 측정하였다. 배양된 HT-1080 세포에 시료를 처리한 후 1시간 뒤, 40 μM mBBr을 처리하여 1시간

후 GSH 함량의 변화를 측정하였다(Fig. 8). 대조군으로는 시료를 처리하지 않고 mBBr만 처리하여 사용하였다. 실험 결과, 조추출물을 처리한 세포는 대조군과 비교하여 200 μg/ml에서 대부분 GSH 함량이 증가하였음을 확인할 수 있었으며, 특히 해국 조추출물에서는 200 및 100 μg/ml 농도에서 대조군과 비교하여 각각 4.5% 및 4.4% 가량의 GSH 함량이 증가하였다.

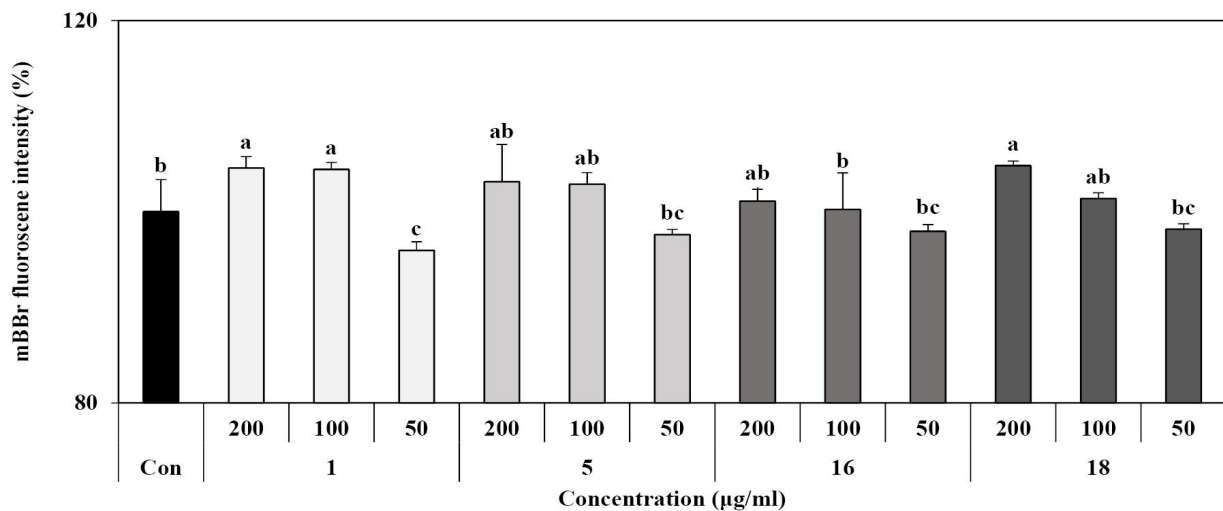


Fig. 8. Effects of crude extracts on regulation of GSH level in HT-1080 cells. ^{a-c}Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

고 찰

현대의학의 발달로 평균수명이 늘어나면서 인간은 단순히 오래 사는 것이 아니라 건강한 삶을 살아가는 것에 대한 관심이 높아가고 있다. 항생제의 사용은 인간을 비롯한 가축 및 어류의 세균성 감염 질환을 치료하는 데에 큰 기여를 하였지만, 그 오남용으로 인해 다양한 다제약제 내성균의 등장을 야기하였다[10, 18]. 항생제 내성균은 일반적인 항생제에 내성을 보이고 의료기관 내에서 환자 간의 전파가 쉬우며 치료도 어렵다[2]. 항생제 내성 균주의 치료제 개발에 관한 연구는 주로 새로운 항균물질 개발과 기존 항생제와의 병용투여에 초점이 맞추어져 있지만, 아직 괄목할 만한 성과가 부족하다[16]. 따라서 항생제 내성 균주의 발생에 관한 우려가 없으며 항생제를 대신할 수 있는 천연물질을 이용한 새로운 형태의 신약 물질의 개발이 활발히 진행되고 있으며, 새로운 항생제 개발 연구 외에도 항균제, 항산화제, 숙주면역증강제, 항균펩타이드, 프로바이오틱스 및 박테리오파지 활용 등과 같은 다양한 치료법의 개발이 진행되고 있다[11].

세균의 생물막은 물체의 표면에 강하게 부착되어 있어 제거가 힘들고 미생물로 하여금 가혹한 환경조건(pH의 변화, 온도의 변화, 영양분의 고갈 등)과 항생제와 같은 물질들에 상대적으로 강한 저항력을 갖게 하는 것으로 알려져 있다. 국립보건원(NIH)은 세계 모든 미생물 감염의 70%가 생물막과 연관되어 있다고 추정하고 있으며, 기존의 항생제에 내성이 있는 변종의 출현은 전세계 공중보건에 심각한 위협이 되고 있다. 따라서 대체의학 물질을 찾아내는 것은 중요한 문제로 인식되고 있다[5, 16]. 산화 스트레스는 미생물이 부유 상태에서 생물막을 형성한 고착상태로 이동하도록 하는 주요 메커니즘 중의 하나이다. 따라서 항산화제와 같은 산화 스트레스 조절제를 표적으로 삼을 수 있는 화학물질은 생물막 형성 관련 감염을 치료하는 데 사용할 수 있을 것으로 사료되고 있다. 염생식물은 염분이 높은 환경에서 적응하여 염분에 의해서 야기된 산화 스트레스에 적응하기 위한 독특한 항산화 방어기작이 있다고 알려져 있다[17]. 따라서 본 연구에서는 국내 자생 염생식물 18종의 조추출물로 항산화 효과가 있는 물질을 screening 한 뒤, 활성이 있는 시료를 선정하여 *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 균주에 대한 항생물막 실험을 진행하고, HT-1080 cell을 이용한 세포독성 실험 및 세포 내 항산화 실험을 추가로 진행하였다. 해당 18종의 국내 자생 염생식물 조추출물의 *in vitro* 상에서의 환원력 및 peroxynitrite (ONOO⁻) 소거활성능을 확인해 본 결과 해국, 통보리사초, 해당화 및 천문동 샘플에서 좋은 활성을 확인할 수 있었다. 이 후, 해당 네개 샘플에 대해 *A. baumannii*의 생물막 저해 능력을 확인해 본 결과 해국, 해당화, 천문동 샘플에서 활성을 보였으나 통보리사초의

경우 생물막 저해능은 확인되지 않았다. 세포생존률 측정에서도 네개 샘플 모두 80% 내외의 생존률을 보였으며, 세포 내 항산화 활성 및 GSH 함량 측정에서도 좋은 활성을 나타내었다. 결론적으로 이상과 같은 실험결과는 해국, 통보리사초, 해당화, 천문동이 항산화 및 항생물막 효과를 가진 천연 소재로의 개발 가능성을 제시하였다. 본 연구를 통해 국내 자생 염생식물 유래 항산화 물질의 항생물막 활성을 함께 확인하였으며, 이를 바탕으로 새로운 천연물 유래 신약 후보군을 제시함으로써 향후 다제약제 내성균의 제어를 위한 신약 발굴에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다. 특히, 국내 연안습지에 서식하고 있는 다양한 염생식물들의 신약 후보군으로서의 가능성을 제시함으로써 해양 바이오 신소재 산업 분야 발전에 기여하고 새로운 고부가가치 창출의 가능성을 제시할 수 있는 초석 연구가 될 것으로 기대한다.

감사의 글

본 연구는 과학기술정보통신부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기본연구사업(No 2022R1F1A1065328)의 연구결과입니다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

1. Aghaleh, M., Niknam, V., Ebrahimzadeh, H. and Razavi, K. 2009. Salt stress effects on growth, pigments, proteins and lipid peroxidation in *Salicornia persica* and *S. europaea*. *Biol. Plant.* **53**, 243-248.
2. Ahn, B. K., Min, K. C., Cho, S. H., Lee, D. G., Kim, A. and Lee, S. H. 2021. Isolation of lactic acid bacteria with anti-MRSA bacteriocin activity and characterization of the bacteriocin product. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **49**, 131-137.
3. Bose, J., Ana, M. and Sergey, S. 2014. ROS homeostasis in halophytes in the context of salinity stress tolerance. *J. Exp. Bot.* **65**, 1241-1257.
4. Briandet, R., Hery, J. M. and Bellon-Fontaine, M. N. 2001. Determination of the van der Waals, electron donor and electron acceptor surface tension components of static Gram-positive microbial biofilms. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **21**, 299-310.
5. Chin, J. N., Jones, R. N., Sader, H. S., Savage, P. B. and Rybak, M. J. 2008. Potential synergy activity of the novel ceragenin, CSA-13, against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, including multidrug-resistant *P. aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**, 365-370.

6. Jang, J. S., Kim, J. H and Kwon, M. J. 2011. Antibacterial activity of *Scutellaria baicalensis* extract against antibiotic resistant bacteria. *J. Kor. Soc. Food Sci Nutr.* **24**, 708-712.
7. Jang, Y. A. and Lee, J. T. 2018. Anti-wrinkle effect of berberine by inhibition of MMP-2 and MMP-9 activity in fibroblasts. *J. Appl. Biol. Chem.* **61**, 9-15.
8. Jeong, S. H. Anti-oxidant Activities of Phytol on Keratinocytes. 2017. *Asian J. Beauty Cosmetol.* **15**, 457-465
9. Jung, H., Jeong, H. J., Shin, K., Kim, Y. S., Moon, J. H. and Lee, T. H. 2018. Protective effect of *Thymus quinquecostatus* extracts UVB-induced matrix metalloproteinase-1 via suppressing MAPKs phosphorylation in human keratinocyte. *J. Appl Biol Chem.* **61**, 417-421.
10. Kim, C. H., Lee, J. Y., Kim, M. K., Kim, S. H., Park, G. Y., Bae, S. Y., Seo, M. J. and Go, I. H. 2012. Isolation rate of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from nasal cavity inferior regions and cellular phones. *Kor. J. Clin. Lab. Sci.* **44**, 118-123.
11. Kim, N. Y., Jang, M. K., Jeon, M. J., Lee, D. G., Jang, H. J., Lee, S. W., Kim, M. H., Kim, S. G. and Lee, S. H. 2010. Verification of antimicrobial activities of various pine needle extracts against antibiotic resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *J. Life Sci.* **20**, 589-596.
12. Kim, Y. H., Yun, J. W and Lee, J. H. 2015. Relation of self-perception of halitosis according to some dental hygiene students' oral care habits and dietary habits. *J. Kor. Med. Sci.* **3**, 268-275.
13. Kooy, N. W., James, A. R., Harry, I. and Joseph, S. B. 1994. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radic. Biol. Med.* **16**, 149-156
14. Lee, J. I. 2011. Peroxynitrite-scavenging Activity of the Halophyte *Limonium tetragonum*. *Ocean Polar Res.* **33**, 185-191.
15. Lee, S. K. 2017. Anti-melanogenic effect of *Limonium tetragonum* extracts on mouse melanoma cells. Silla University, Busan, South Korea.
16. Liljemark, W. F. and Bloomquist, C. 1996. Human oral microbial ecology and dental caries and periodontal diseases. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **7**, 180-98.
17. Mahady, G. B. 2005. Medicinal plants for the prevention and treatment of bacterial infections. *Curr. Pharm. Des.* **11**, 2405-2427.
18. Miller, L. G., Remington, F. P., Rieg, G., Mehdi, S., Perleth, J., Bayer, A. S., Tang, A. W., Phung, T. O. and Spellberg, B. 2005. Necrotizing fasciitis caused by community-associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Los Angeles. *N. Engl. J. Med.* **352**, 1445-1453.
19. Okimoto, Y., Watanabe, A., Niki, E., Yamashita, T. and Noguchi, N. 2000. A novel fluorescent probe diphenyl-1-pyrenylphosphine to follow lipid peroxidation in cell membranes. *FEBS Lett.* **474**, 137-140.
20. O'Neill, J. Tackling Drug-Resistant Infections Globally. 2016. Final report and recommendations. London. The review on antimicrobial resistance.
21. OYAIZU, M. 1986. Antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn. J. Nutr.* **44**, 307-315.

초록 : 한국 자생 염생식물 추출물의 항산화 활성 및 다재내성 *Acinetobacter baumannii*에 대한 항생물막 활성

이은성^{1,2} · 박정우^{1,3} · 문기환^{1,3} · 서영완^{1,2*}

(¹한국해양대학교 해양과학기술전문대학원 해양과학기술융합학과, ²한국해양대학교 해양과학융합학부 생유기신소재연구실, ³한국해양대학교 해양과학융합학부 해양미생물학실험실)

항생제는 인간을 비롯한 가축 및 어류의 세균성 감염 질환의 치료에 크게 기여해 왔으나, 그 오남용으로 인해 많은 다제약제 내성균의 등장을 야기하였다. 최근, 항생제 내성균의 제어를 위한 새로운 항생물질 소재 발굴 및 신약 개발에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 염생식물은 염분이 높은 토양에서 자생하는 식물로 산화 스트레스로 작용하는 염분에 대한 적응으로 독특한 대사과정을 통한 특이한 이차 대사산물을 생성하는 것으로 알려져 있다. 최근 항생제의 오용 및 남용으로 항생제 내성균이 증가해 천연물질을 활용한 새로운 신약 개발의 필요성이 커지고 있다. 세균의 생물막 형성은 적대적 환경으로부터 스스로를 보호하는 적응 및 생존을 위한 전략으로 인식되며, 감염성 세균의 경우 숙주 내 부착 및 집락화를 위한 주요 병원성 인자로 여겨진다. 특히, 생물막을 형성한 세균은 항생제에 대해 더 큰 내성을 보이며 쉽게 죽지 않아 치료가 더욱 어려워진다. 부유성 세균은 다양한 외부 환경을 인식하여 표면 부착을 통한 생물막 형성이 유도되는데 산화적 스트레스는 이를 유도할 수 있는 주요 신호 중 하나이다. 따라서 항산화제와 같은 산소 스트레스 조절 효과를 갖는 화학 물질은 세균의 생물막 형성과 관련된 감염성 질환 치료에 사용될 수 있을 것으로 여겨지고 있다. 본 연구에서는 총 18종의 국내에 자생하는 염생식물 추출물에 대한 항산화 효능을 확인하고 나아가 *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978균주에 대한 항생물막 효과 및 세포 독성을 검증하였다. 그 결과 해국, 통보리사초, 해당화, 천문동에서 높은 항산화 효과와 항생물막 효과가 있는 것을 확인하였고 세포독성 역시 보이지 않음을 확인하였다. 해당 연구를 통해 국내 자생 염생식물 유래 항산화 물질의 항생물막 활성을 함께 확인함으로써, 새로운 천연물 유래 신약 후보군을 제시하고 향후 다제약제 내성균의 제어를 위한 의약 소재로서 개발이 가능할 것으로 기대된다.