

Antimicrobial activity and cytotoxicity test of *Scrophularia ningpoensis* hemsl extracts against *Klebsiella pneumoniae*

Keun-Dol Yook*

Abstract

Scrophularia ningpoensis hemsl has been traditionally used in China and Vietnam for treatment of bacteria, atopy, pimple, tonsillitis, angina and encephalitis for a long time. The main objectives of this study were to evaluate the antibacterial activity of the *Scrophularia ningpoensis* hemsl extract on biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae*. Antibacterial activity was conducted using disc diffusion assay and minimum inhibitory concentration (MIC), and minimum bactericidal concentration (MBC) were determined using the broth micro dilution method in accordance to Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines (CLSI). Furthermore, cytotoxicity on L929 were assessed using animal cell culture for the proliferation test (MTT cell assay) and the biofilm forming capacity of the *K. pneumoniae* were determined using the colony forming unit (CFU) assay. The extract exhibited considerable antibacterial activity. *K. pneumoniae* was susceptible to the extract with the MIC and MBC of 0.1875 and 1.5 mg/ml respectively. Cytotoxicity test in L929 showed no sign of toxicity at the concentration of 0.75mg/ml and at the same concentration the extract caused inhibition of bacterial biofilm formation. The extract of *Scrophularia ningpoensis* hemsl possesses an in vitro antibacterial antibiofilm activities against *K. pneumoniae*, with no sign of cytotoxicity on L929.

▶ Keyword : Antibacterials activities, Biofilm, *Klebsiella pneumoniae*, *Scrophularia ningpoensis* hemsl

I. Introduction

*Klebsiella pneumoniae*는 자연에 넓게 분포하고 있으며 흙과 물에서 많이 있다. *K. pneumoniae*는 *Proteobacteria* 문, 장내세균과에 속하는 세균이다. 이 세균은 원통형의 막대기 모양이면 길이는 2 마이크로, 직경은 0.5 마이크로 이다. 협막을 가지고 있으며 협막은 160 nm 이다[1]. *Klebsiella*는 그람음성 막대균으로 폐렴, 요로감염 그리고 연골 조직 감염, 균혈증 등과 같은 감염을 일으키고 이 질환들을 막기 위해 요즘 많은 방법들을 찾아내고 있다[2-3]. 특히 *K. pneumoniae*는 병원내에서 획득한 내성유전자가 Extended-Spectrum β -Lactamase를 생성하여 항생제 내성을 초래하는 것은 세계적인 문제가 되었고 적절한 감염관리와 항생제 관리 전략이 필요하다[4].

병원내 병원성 세균에 대한 내성은 최근 문제화 되고 있으며 이는 헬스케어의 중대한 도전이 되고 있다[5]. 항균제의 잘못된 사용은 약제에 대한 다제내성을 유도하여 항균제 내성을 키우고 치료를 더 어렵게 만든다[6]. *Scrophularia* 속에는 300여 가지의 종이 존재하는 것으로 알려져 있으며, 중국의 전통 의학에서는 말린 뿌리를 다양한 질병을 치료하는 허브 차로 수백 년에 걸쳐 중국에서 이용되어 지고 있다[7]. *Scrophularia ningpoensis* Hemsl에는 다양한 iridoid glycosides 성분을 함유하고 있는 것으로 알려져 있으며, 이는 앞선 연구에서 항균 작용, 해열, 항염작용(후두염, 신경염), 부종제거, 변비 및 농양 치료, 혈압을 낮추는 등의 효과가 있는 것으로 보고된바 있다 [8-11] Harpagoside, angroside C, acteoside 그리고 cinnamic acid가 생물체 작용하는 성분이다[8,12-15].

*First Author: Keun-Dol Yook, Corresponding Author: Keun-Dol Yook

*Keun-Dol Yook(kdyook@hit.ac.kr), Dept. of Clinical Laboratory Science, Daejeon Health Institute of Technology

Received: 2016. 04. 27, Revised: 2016. 05. 16, Accepted: 2016. 05. 26.

This study was supported by the Research Program(2014) funded by the Daejeon Health Institute of Technology.

본 연구는 *Scrophularia ningpoensis* Hemsl 추출물의 *K. pneumoniae*에 대한 항균력 시험(디스크확산법, 최소억제농도, 최소살균농도, 바이오필름 형성과 부유생물의 성장)과 세포독성을 평가하고자 실시하였다.

II. Material and Methods

2.1 식물추출액 및 사용균주

2.1.1 추출액

본 연구에 사용된 식물 추출액은 해외생물소재센터(International Biological Material Research center)에서 분양 받아 사용하였다. 말린 *Scrophularia ningpoensis* Hemsl, *Buddleja officinalis* Maxim, *Clinopodium chinense* (Benth.) Kuntze 200g을 1.5L 메탄올 용액에 첨가 한 후, 50°C에서 초음파로(15분/2시간 간격) 파쇄하며 3일간 추출하였다. 식물추출액은 여과지로 필터한 후, 45°C에서 감압 농축하였으며, 농축 잔여물은 최종 동결 건조하였다.

2.1.2 사용 균주

본 연구에서는 *Staphylococcus aureus*(ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853), *K. pneumoniae* (ATCC 700831)을 Muller-Hinton (MH) agar에 접종하여 37°C에서 24시간 2회 계대 배양하여 활성화 한 후, 실험에 사용 하였다.

2.2 시약 및 배지

2.2.1 시약제조

본 연구에서 균을 배양하기 위해 Muller Hinton agar, broth 배지 (Sparks, MD, USA)를 사용 하였으며, 구입처인 BD사의 양식에 따라 제조하여 사용 하였다.

2.2.2 디스크 확산(Disk diffusion) 검사

본 연구에서 식물추출액의 항균력을 알아보기 위해 디스크 확산법을 시행하였다[16]. *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*는 MH agar에 24시간 전 미리 배양하였으며, 형성된 집락을 이용해 McFaland 0.5 (1.5 X 10⁸ colony forming unit(CFU)/ml) 탁도의 균주액을 제조하여 100 μ l을 배지에 분주한 후, 멸균 면봉을 이용하여 도말 하였다. 시험균으로는 구매한 직경 6mm blank 디스크(Thermo)에 각각의 식물추출액(최종농도 0.5mg)을 탑재 하였으며, 음성 대조균으로는 메탄올 50 μ l, 양성 대조균으로는 cefotaxime 30 μ g, ampicillin 10 μ g, 디스크를 올려놓은 후, 37°C에서 24시간 동안 배양하였으며, 이후 형성된 억제대의 직경을 측정하였다.

2.1.3 최소억제농도 시험

*K. pneumoniae*에 대한 식물추출액의 최소억제농도(minimum Inhibitory concentration, MIC)와 최소살균농도(minimum bacteriocidal concentration, MBC) 실험은 액체배지 희석법을 이용하여 측정하였다[16]. MIC의 측정은 96-well plate의 각 well에 MH broth를 이용하여 10⁷CFU/ml로 조정된 균주액 100 μ l씩을 넣고, 항균제 디스크 확산 검사에서 항균 효과를 보인 식물 추출액을 2단계씩 희석한 농도의 식물추출액을 50 μ l씩 첨가하였다. 37°C에서 24시간 동안 배양 후, 식물추출액을 첨가하지 않은 균 배양액과 식물 추출액을 첨가한 균 배양액과 비교하여, 최초로 균의 증식이 억제된 농도를 각 균의 MIC로 하였다.

2.1.4 최소 사멸 농도 시험

MBC의 측정은 96-well plate의 각 well에 MH broth를 이용하여 10⁷CFU/ml로 조정된 각 균주액 100 μ l씩을 첨가하고, MIC 농도를 전·후로 2단계씩 희석한 농도의 식물추출액을 50 μ l씩 첨가한 다음, 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 균의 사멸여부를 확인하기 위하여, 각 well에 있는 배양액 50 μ l씩을 MH agar에 도말하여, 37°C에서 24시간 동안 추가 배양하였다.

2.1.5 세포독성 시험 (MTT assay)

MTT assay에 사용된 흰쥐의 섬유아세포(L929)세포는 DMEM배지에 10% FBS, 100 unit ml⁻¹의 penicillin/streptomycin을 첨가한 것을 사용 하였으며, 37°C, 5% CO₂ 배양기를 이용하여 유지하였다.

2×10⁵의 L929세포를 96-well plate에 분주 한 후, 0.75, 1.5, 3mg/ml의 최종농도로 식물추출액과 혼합하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양 하였다. 24시간 후, MTT 용액 10 μ l (5 mg/ml)을 각각의 well에 첨가하고 4시간 추가 배양하였다. 배지를 제거하고 200 L의 DMSO (dimethyl sulfoxide)로 well에 생성된 formazan 결정을 완전히 용해시켜 ELISA reader (Tecan, Zurich, Switzerland) 640 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포독성은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

2.1.6 바이오필름 형성 억제 효과 평가시험

24-well plate (TPP, Trasadingen, Switzerland) 각 well에 10⁷CFU/ml 조정된 균주액(MH broth)과 세포독성이 없는 것으로 확인 된 0.75mg/ml의 최종농도로 식물추출액을 첨가한 후, 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 음성대조균으로는 균주액 또는 MH broth만을 배양하였으며, 양성대조균으로는 gentamicin을 200 μ g/ml의 최종농도로 균주액과 함께 배양 하였다. 배양이 끝난 실험군 및 대조군은 phosphate buffered saline (PBS)로 5회 세척한 후, CFU assay를 시행하였다. CFU assay는 각 well에 형성된 바이오필름에 1ml의 PBS를

침가한 후, scraper을 이용하여 균을 수집 하였으며, 단계별 희석을 통하여 형성된 집락의 수를 측정하였다.

2.2 통계 처리

본 연구에서 모든 실험은 최소 세 번 이상 수행 하였으며 모든 결과 값들은 mean±standard deviation(S.D.)으로 나타내었다. 실험 군에 따른 데이터간의 통계적 유의성 검정을 위해 ANOVA와 student's t-test를 수행하였다(p<0.05).

III. Results

3.1 식물 추출액의 항균 효과

3.1.1 항균제 디스크 검사 결과

항균력이 있는 식물추출액(Table.1)을 선별하기 위해 디스크 확산시험을 우선적으로 시행하였다. 각각의 식물 추출액은 0.5mg의 최종농도로 디스크에 분주 하였으며, 음성 대조군으로는 메탄올을 양성 대조군으로는 cefotaxime항생제(30µg)를 *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* 표준균주 실험군에 ampicillin(10µg,) 디스크는 *S. aureus* 표준균주 실험군에 사용하여 항균력을 비교하였다(Data not shown). 실험 결과, *Scrophularia ningpoensis* hemsl의 메탄올 추출물이 *Buddleja officinalis maxim*, *Clinopodium chinense* (Benth.) Kuntze 추출물에 비해 그람음성세균인 *K.pneumoniae* 에 대하여 대조군 항균제 cefotaxime은 평균 32mm이고 *Scrophularia ningpoensis* hemsl는 평균 10mm의 억제대, *Buddleja officinalis maxim*와 *Clinopodium chinense* Kuntze는 전혀 억제대가 없는 6mm로 나타나 항균력의 유의한 차이를 보여 주었다(Fig 1). 디스크 확산 시험을 통해 항균력이 있는 것으로 확인 된 *Scrophularia ningpoensis* hemsl 메탄올 추출물의 *K. pneumoniae* 에 대한 MIC, MBC를 측정 하였다.

3.1.2 최소억제농도 시험 결과

액체배지 희석법을 통한 실험 결과 *K. pneumoniae* 에 대한 *Scrophularia ningpoensis* hemsl MIC 농도는 0.1875mg/ml로 나타났다.

3.1.3 최소 사멸 농도 시험 결과

MBC 농도는 1.5mg/ml로 각각 측정되었다(Table 2).

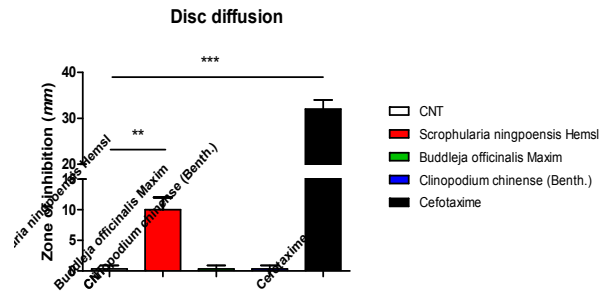


Fig. 1. Antibacterial activity of different plant extracts(**p< 0. 0 5, ***p<0.001)

Table 1. Information on the plants used and report on evidence of their activities

Botanical Name	Traditional uses
<i>Scrophularia ningpoensis</i> Hemsl	Antibacteria, Atopy, Pimple, tonsillitis, Angina, Encephalitis, Hypertensive petechial fever, scrofula
<i>Buddleja officinalis</i> Maxim	Rheumatism
<i>Clinopodium chinense</i> (Benth.) Kuntze	Gonorrhoea, Hematuria, Epistaxis

Table 2. Antibacterial activity of the methanol extract of *Scrophularia ningpoensis* Hemsl against *K.pneumoniae* (n=3)

Antibacterial activity	<i>Scrophularia ningpoensis</i> Hemsl
MIC	0.1875mg/ml
MBC	1.5mg/ml

3.1.4 *Scrophularia ningpoensis* hemsl의 흰쥐섬유아세포(L929)에 대한 세포독성 평가

L929는 일반적으로 어떤 물질의 독성을 판단할 때 기준이 되는 세포로서 한국식품의약품안전청에서 독성평가 시에 사용되는 세포주이다. *Scrophularia ningpoensis* hemsl 추출물이 L929세포에 미치는 세포독성을 알아보기 위하여 MTT assay를 시행하였다. MBC농도를 기준으로 고농도와 저농도의 추출물을 사람 말초혈액세포(2 X 10⁵/well)와 24시간 배양하였다. 실험결과, 세포배양액만 첨가한 대조군은 102%의 세포 생존율을 보였으며, 3mg/ml의 추출액 농도에 대해서는 79%, 1.5mg/ml은 91%, 0.75mg/ml은 98%의 세포생존율을 보임으로써 L929 세포에 대한 세포독성을 띄지 않음을 확인 할 수 있었다(Fig. 2).

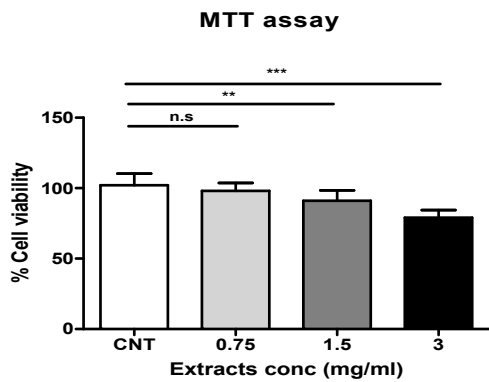


Fig. 2. Effect of the different concentration on L929 cells. (**p<0.05, ***p<0.001)

3.1.5 Scrophularia ningpoensis hemsl

추출물의 K. pneumoniae 바이오필름 형성 억제 효과

Scrophularia ningpoensis hemsl 추출물의 K. pneumoniae 바이오필름에 대한 항균효과를 확인하기 위해 추출액과 (0.75 mg/ml) 균부유액을 (1.5 X 10⁸ /ml) 함께 배양하였다. 24시간 배양 후, 현미경 관찰 및 CFU assay를 시행한 결과, Scrophularia ningpoensis hemsl 추출물이 첨가된 실험군이 대조군에 비해 유의하게 생존균수가 감소해 있음을 확인하였다 (Figure 3).

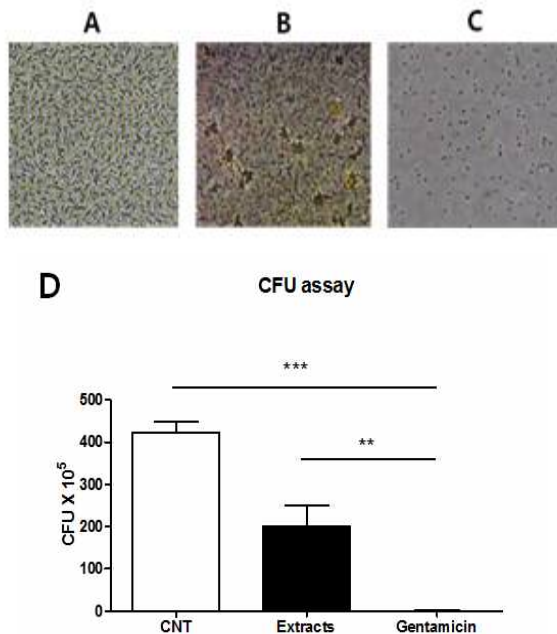


Fig. 3. Microscopic images (X400) on biofilm formation of K. pneumoniae treated with Scrophularia ningpoensis Hemsl extract (**p<0.05, ***p<0.001)

A: CNT(음성대조군), B: Scrophularia ningpoensis hemsl 추출물 C: gentamicin D: Colony forming unit (CFU) assay 결과 (CNT : only K.pneumoniae, Extracts : Scrophularia ningpoensis hemsl 추출물 (0.75mg/ml), gentamicin

(200ug/ml)

IV. Conclusions

앞선 연구에서 Scrophularia ningpoensis hemsl에 대한 항균작용, 해열, 항염작용, 부종제거, 변비 및 농양치료, 혈압을 낮추는 등의 효과가 있는 것으로 보고된 바 있지만 폐렴과 요로감염 등을 일으키는 K. pneumoniae에 대한 항미생물 작용과 세포독성 실험 연구가 없어 본 연구를 실시하였다. 디스크 확산 항균력 시험을 위해 식물 추출액은 0.5mg의 최종농도로 디스크에 분주하고, 음성 대조군으로는 메탄올을 양성 대조군으로는 하여 cefotaxime (30µg) 항생제를 E. coli, P. aeruginosa, K. pneumoniae을 실험군에 ampicillin (10µg,) 디스크는 S. aureus 표준균주 실험군에 사용하여 항균력을 비교한 바, 장내 세균인 K. pneumoniae에 Scrophularia ningpoensis hemsl의 메탄올 추출물이 10mm 억제대를, Buddleja officinalis maxim 와 Clinopodium chinense (Benth.) Kuntze은 억제대가 나타나지 않아 유의한 차이를 보였다. 액체배지 희석법을 이용하여 실험한 결과 K. pneumoniae에 대한 Scrophularia ningpoensis hemsl 최소억제농도 (MIC)는 0.1875mg/ml로 나타났다. 최소사멸농도 (MBC)는 1.5mg/ml로 각각 결과가 보였다. 일반적으로 어떤 물질의 독성을 판단할 때 기준이 되는 세포로서 L929는 한국식품의약품안전청에서 독성 평가 시에 사용되는 세포주이다. Scrophularia ningpoensis hemsl 추출물이 L929세포에 미치는 세포독성을 알아보기 위하여 MTT assay를 시행하였다. 최소사멸농도를 기준으로 고농도와 저농도의 추출물을 L929 세포주 (2 X 10⁵/well)와 24시간 배양하여 세포배양액만 첨가한 대조군은 102%의 세포 생존율을 보였으며, 3mg/ml의 추출액 농도에 대해서는 79%, 1.5mg/ml은 91%, 0.75mg/ml은 98%의 세포생존율을 보여 L929세포에 대한 세포독성을 띄지 않음을 확인 할 수 있었다. Scrophularia ningpoensis hemsl 추출물의 K. pneumoniae 바이오필름에 대한 항균효과를 보기 위해 추출액과 (0.75 mg/ml) 균부유액을 (1.5 X 10⁸ /ml) 함께 배양하였고 24시간 배양 후, 현미경 관찰 및 CFU assay를 분석한 결과, Scrophularia ningpoensis hemsl 추출물이 첨가된 실험군이 대조군에 비해 유의하게 생존균수가 감소해 바이오 필름에 대한 항균효과도 있음을 확인하였다.

REFERENCES

[1]Gowsiya Shaik, Sujatha and Santosh Kumar Mehar,

- "Medicinal plants as source of antibacterial agents to counter *Klebsiella pneumoniae*", Journal of Applied Pharmaceutical Science Vol. 4(01), pp. 135-147, January, 2014.
- [2] Wu HS, Wang FD, Tseng CP, Wu TH, Lin YT, Fung CP, "Characteristics of healthcare associated and community acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremia in Taiwan", J Infect, Vol. 64, pp. 162-168, 2012.
- [3] Sneh Lata, Geetika Sharma and Harmanjot Kaur Sandhu, "Antibacterial Properties of Various Medicinal Plants Extracts against *Klebsiella* Sp". International Research Journal of Environment Sciences, Vol. 3(10), pp. 75-78, October 2014.
- [4] David L. Paterson, Wen-Chien Ko, Anne Von Gottberg, Sunita Mohapatra, Jose Maria Casellas, "Implications of Extended-Spectrum-Lactamase Production in Nosocomial Infections", Ann Intern Med. Vol. 140 pp. 26-32, 2004.
- [5] Neethu H, Tincy K.T, Jayakumaran A.N, "Comparative Study on the Synergistic Action of Garlic Synthesized and Citrate Capped Silver Nanoparticles with β -Penem Antibiotics" Nanotechnology Vol. 2013, pp. 6, 2013.
- [6] Khanuja S.P.S, Arya J.S, Srivastavaetal S.K, "Antibiotic pharmaceutical composition with lysergol as bioenhancer and method of treatment", United States Patent Number 20070060604A1, 2007.
- [7] "Pharmacopoeia Commission of the People's Republic of China", Chemical Industry Press: Beijing, China, 2005.
- [8] Miyazawa. M, Okuno. Y, Nakamura. S.I, Kameokam. H, "Suppression of SOS-inducing activity of chemical mutagens by cinnamic acid derivatives from *Scrophularia ningpoensis* in the *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 umu test", J. Agric. Food Chem, Vol. 46, pp. 904-910, 1998.
- [9] Greten. J, Kursbuch Traditionelle Chinesische Medizin, Thieme Verlag, "Iridoids from *Scrophularia ningpoensis*", Phytochemistry Vol. 28, pp. 2701-2704, 1989.
- [10] Sagare AP, Kuo CL, Chueh FS, Tsay HS, "De novo regeneration of *Scrophularia yoshimurae* Yamazaki (*Scrophulariaceae*) and quantitative analysis of harpagoside, an iridoid glucoside, formed in aerial and underground parts of in vitro propagated and wild plants by HPLC", Biol Pharm Bull Vol. 24 pp. 1311-1315, 2001.
- [11] Yen KY, "The Illustrated Chinese Material Medica Crude and Prepared", Taiwan, SMC Publishing Inc Press. pp. 64, 1992.
- [12] Liu L, Hudgins WR, Shack S, Yin MQ, Samid D, "Cinnamic acid: a natural product with potential use in cancer intervention", Int J Cancer Vol. 62, pp. 345-350, 1995.
- [13] Garcia D, Fernandez A, Saenz T, Ahumada C, "Antinflammatory effects of different extracts and harpagoside isolated from *Scrophularia frutescens* L", Farmaco Vol. 51 pp. 443-446, 1996.
- [14] De Santos Galindez J, Díaz Lanza A, Fernandez Matellano L, "Biologically active substances from the genus *Scrophularia*", Pharm Biol Vol. 40, pp. 45-59, 2002.
- [15] Díaz AM, Abad MJ, Fernández L, Silván AM, De Santos J, et al. "Phenylpropanoid glycosides from *Scrophularia scorodonia*", In vitro anti-inflammatory activity. Life Sci Vol. 74, pp. 2515-2526, 2004.
- [16] CLSI, "Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26th ed. CLSI supplement M100S", Wayne, PA, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2016.

Authors



Keun-Dol Yook received the B.S., M.S. and Ph.D. degrees in the science of agriculture, health science and microbiology from Korea Open University, Chungnam University and Hannam University, in 1996, 1999 and 2014, respectively .