생쥐에서 유발된 급성 부비동염에서 리도카인의 항균 작용

계명대학교 의과대학 이비인후과학교실,[1] 병리학교실,[2] 미생물학교실[3]
안병훈[1] · 김은덕[1] · 이상윤[1] · 최종원[1] · 신승진[1] · 김상표[2] · 서성일[3]

Antibacterial Effect of Lidocaine in Mouse Model of Acute Rhinosinusitis

Byung Hoon Ahn, MD[1], Eun Deok Kim, MD[1], Sang Yun Lee, MD[1], Jong Won Choi, MD[1], Seung Jin Shin, MD[1], Sang Pyo Kim, MD[2] and Seong Il Suh, MD[3]
[1]Department of Otolaryngology, [2]Pathology and [3]Microbiology, School of Medicine, Keimyung University, Daegu, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : This study was performed to verify the antibacterial effect of lidocaine against common bacterial pathogens which causes acute bacterial rhinosinusitis in vitro, and also to evaluate *in vivo* effects in the nasal cavity of mice with an acute rhinosinusitis induced by *Streptococcus pneumoniae inoculation*. **Materials and Method** : The initial cultures of *Streptococcus pneumonia, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus and Hemophilus influenza* were done in Mueller-Hinton broth and the subsequent culture in 5% sheep blood agar (SBA). Minimal inhibitory concentration (MIC) was obtained by making culture broth to a turbidity of McFarland No 0.5 overnight by having it diluted by 1 : 200 times, and medicating 100 μL lidocaine in each culture. It was cultured for 24 hours at 36℃ and analyzed spectrophotometrically. Minimal bactericidal concentration (MBC) was obtained by the same work as MIC and was followed by the subculture in 5% SBA to obtain the minimum concentration of no growth. Two percent concentration of lidocaine, MBC of *S. pneumoniae* was used for in vivo study. Thirty-six experimental mice (C57BL6/J) were divided : the control Group I contained only broth inoculation, Group II S. pneumoniae inculation and Group III to VI varying concentrations of lidocaine inoculation in different intervals and exposure time. On the 6th day, nasal lavage was done and mucosal neutrophil count was sought by dissecting the mice head by selecting three sections of anatomicallynd same site and 4 randomly selected places from each section. **Results** : MIC and MBC values of *S. pneumoniae* were 1%, 2%, *K. pneumoniae* 2% and 2%, *P. aerusinosa* 2% and 4%, *S. aureus* 2% and 4%, *H. influenzae* 0.25%, and 1%, respectively. Mucosal neutorophils revealed a more statistically significant increase in Group II than all other groups followed by Group V, VI, III, and IV. The nasal lavage showed larger colony count in Group II, III, and V than those of other groups without any statistical meaning. **Conclusion** : This study enabled us to find out the MIC and MBC of lidocaine on various pathogens, the causes of an acute rhinosinusitis *in vitro*. It also showed that an acute rhinosinusitis is developed by using S. pneumoniae *in vitro* and that the longer the exposure time and higher the exposure frequency of lidocaine, the greater were antibacterial effects. **(Korean J Otolaryngol 2004;47:741-6)**

KEY WORDS : Sinusitis · Mice · Lidocaine.

서 론

리도카인은 1.5시간의 반감기를 가지는 amide계의 국소마취제로서 비부비동 수술 또는 균 동정을 위한 비강내 전처치 등에 필요한 부분마취를 위하여 흔히 사용되며, 술 후 메로셀 등의 탐폰을 이용한 패킹을 할 때 이용된다. Wimberley 등[1)]은 기관지 내시경을 이용하여 균배양을 시행할 때 국소마취제로 사용되는 리도카인의 항균작용에 의해 위음성이 나올 수 있다는 것을 보고하였고, 여러 저자들에 의해서 이러한 리도카인의 항균작용이 보고 되었다.[1-3)]

저자들은 시험관내에서 비부비동염의 흔한 원인균에 대한 리도카인의 항균작용에 대하여 알아보고 이후 시험관 실험을 통해 알게 된 폐렴구균에 대한 살균 농도인 2% 리도카인을 급성 비부비동염이 유발된 생쥐의 코속에 시간과 횟수를 달리하여 접종하여 리도카인의 생체내 항균작용의 유무와 약제의 노출 시간과 노출 횟수에 따른 항균작용력의 차이를 살펴보고자 하였다.

논문접수일 : 2004년 1월 5일 / 심사완료일 : 2004년 5월 8일
교신저자 : 안병훈, 700 - 712 대구광역시 중구 동산동 194
계명대학교 의과대학 이비인후과학교실
전화 : (053) 250 - 7715 · 전송 : (053) 256 - 0325
E - mail : bhahn@dsmc.or.kr

재료 및 방법

시험관내 리도카인의 항균작용 실험

균주 및 배지

비부비동염의 흔한 원인 병원균(Table 1)으로 알려진 폐렴구균을 비롯한 5종의 균주를 본 연구에 이용하였다. 모든 균주는 Mueller - Hinton 액체배지(BBL, Becton Dickinson, USA)에서 배양하였으며 그리고 2차 배양은 5% sheep blood agar (SBA) plate를 이용하였다.

최소억제농도(Minimal inhibitory concentration, MIC)

리도카인 4%용액을 증류수를 이용하여 순차적 이배수 희석을 실시하였다. 희석된 리도카인과 비교군을 무균상태의 96 - well plates에 100 μL 씩 접종하였다. McFarland No. 0.5의 혼탁도로 희석시킨 균을 밤새 배양한 후 균수가 약 5×10^5/mL가 되도록 희석하였다.

희석시킨 균 100 μL를 순차적으로 희석된 리도카인이 들어있는 well에 접종하였다. 음성대조군을 구하기 위하여 분광광도계(Coda automated EIA analyzer, BIO - RAD, Germany)로 450 nm에서 측정하여 흡광도 값을 구한 다음, 37℃에서 24시간 배양하였다. 세균의 성장 정도는 육안과 분광광도계를 이용하여 측정, 분석하였고, 세균 성장이 90%이상 감소가 초래된 리도카인 농도를 MIC로 정하였다.

최소살균농도(Minimal bactericidal concentration, MBC)

MIC를 측정하는 방법과 동일한 방법으로 실험을 실시한 다음, 균의 성장 억제가 초래된 well의 배양액을 취하여 5% SBA plate에 접종하여 37℃에서 24시간 배양한 다음 균이 자라지 않는 리도카인의 최소농도를 MBC로 정하였다.

이상의 실험은 신뢰도를 높이기 위하여 3회에서 7회에 걸쳐서 반복 실시하였다.

동물실험

생후 4~5주의 17~21 g(평균 20.5 g)의 C57BL6/J 암컷 생쥐 36마리를 이용하였다. 비강에 Mueller - Hinton 액체배지만 접종한 군(제 I 군), 폐렴구균을 접종한 5일 후 리도카인의 용매인 증류수를 24시간 동안 6시간 간격으로 4번 접종한 군(제 II 군), 리도카인의 노출시간과 노출횟수를 달리하여 12시간동안 6시간 간격으로 2번 접종한 군(제 III 군), 12시간 간격으로 1번 접종한 군(제 V 군), 24시간동안 6시간 간격으로 4번 접종한 군(제 IV 군), 12시간 간격으로 2번 접종한 군(제 VI 군)을 각각 6마리씩 총 36마리를 6군으로 나누어서 실험을 진행하였다(Fig. 1).

균 및 리도카인접종

생쥐는 실험을 시작하기 전과 실험 후에 몸무게를 측정하였다. 생쥐에게 80 mg/kg의 ketamine을 복강내 주사를 하여 마취시켰다. 폐렴구균은 ATCC(American Tissue Culture Collection) 49619를 이용하였고 비강내 접종은 수술 현미경하에서 외비공을 통하여서 피펫 주사기를 이용하여 0.02 mL의 폐렴구균이 혼합된 용액을 외비공에 조금씩 떨어뜨려 쥐가 용액을 흡입하는 동안 비강내로 자연스럽게 흘러 들어가게 하였다. 용액을 흡입하는 동안 호흡곤란이 와서 생쥐가 죽는 것을 예방하기 위해 조심스럽게 호흡

Table 1. Bacterial strains used in this study

Organisms	Collection and strain number
Streptococcus pneumoniae	ATCC 49619
Klebsiella pneumoniae	ATCC 13883
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 27853
Staphylococcus aureus	ATCC 25923
Haemophilus influenzae	Clinical strain

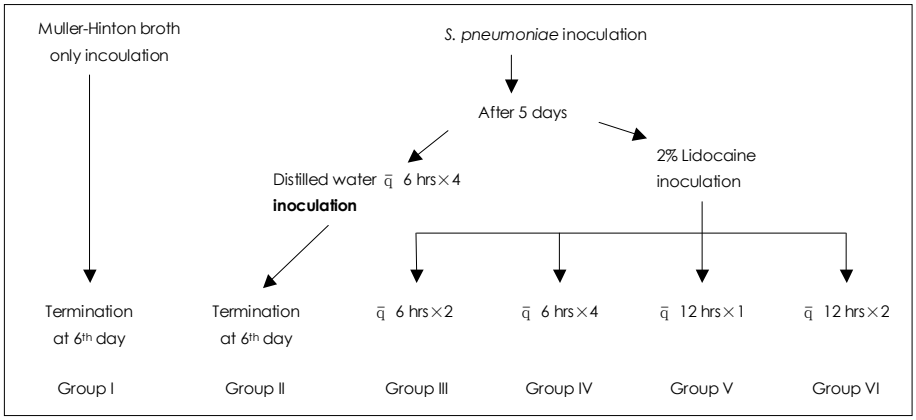

Fig. 1. Algorithm of this study.

수와 피부색깔을 관찰하였고 피부색깔이 변하고 호흡의 곤란이 초래된 생쥐는 고개를 옆으로 돌리고 겸자를 이용하여 혀를 밖으로 빼 주었다. 대조군인 제 I 군에 투여한 것은 Mueller - Hinton 액체배지였고, 나머지 군에는 mL 당 1.2 $\times 10^9$의 균집락을 형성하는 McFarland No.3 혼탁도를 가지는 폐렴구균과 Mueller - Hinton 액체배지와 2% 농도의 리도카인 용액을 투여하였다.

조직학적 관찰

호흡 정지를 일으킬만한 양인 120 mg/kg의 pentobarbital sodium을 복강내로 주사하였다. 마취가 되고난 후 균배양시에 이차적 오염을 막기위해 75% 알코올을 이용하여 외비공, 입안, 머리를 닦고 말렸다. 24 gauge의 angio needle을 이용하여 0.15 mL의 살균된 생리식염수를 생쥐의 콧구멍으로 넣은 후 30초 가량 기다린 다음 피펫 주사기로 다시 흡인하는 방법으로 비강을 세척하였고 이렇게 얻어진 용액은 5% SBA plate에 바로 떨어뜨려서 3번 수직으로 배지위에 그어 선배양을 시켰다. 균이 자라지 않은 경우를 0, 첫 번째 선에서만 폐렴구균이 자란 경우를 1, 첫 번째, 두 번째 선에서 자란 경우를 2, 모든 선에서 자란 경우를 3으로 등급을 매겼다.

머리를 절단하고 피부, 근육, 눈알, 혀, 하악골 등을 제거한 부분을 포르말린 용액에 2일간 고정 시켰다. 이후 탈석회화 용액을 이용하여 16시간 탈석회화시켰다.

잘려진 머리는 면도칼을 이용하여 다듬어 졌고, 코의 앞쪽 부분을 제거한 후 앞쪽에서 뒤쪽으로 3 mm의 두께로 박절한 다음 수세 및 파라핀 포매과정을 거쳐 5 μm 두께로 절편하여 Hematoxylin - Eosin 염색을 시행하였다. 결과를 분석하기 위해 해부학적으로 동일한 세부위를 선택하였는데, 첫 번째 절단면은 상악동이 나타나는 제일 앞 부분, 두 번째 절단면은 사골비개 복합체(complex ethmoid turbinals)가 시작하는 부분 그리고 세 번째 절단면은 위쪽으로 뇌를 포함하는 상악동의 가장 뒷부분이었다. 10배의 저배율을 이용하여 비부비동의 전반적인 모습과 비부비동안의 중성구 군집을 관찰하였고, 400배의 현미경 시야에서 무작위로 비부비동의 4군데를 선택하여 점막하 중성구의 숫자를 세어 평균하였다.

통계처리 방법

일원배치분산분석법과 다중분석법를 이용하여 통계 처리하였으며 유의수준은 0.01이하로 하였다.

결 과

리도카인에 대한 MIC와 MBC는 폐렴구균에서 각각 1%와 2%로, 폐렴간균에서 모두 2%로, 녹농균에서 각각 2%와 4%로, 황색포도구균에서 각각 2%와 4%로, 헤모필루스 인플루엔자에서 각각 0.25%와 1%였다(Table 2).

C57BL6/J 생쥐의 비부비동의 해부학적인 구조는 인간과는 달리 전두동과 접형동은 존재하지 않았고 좌 우 흡연결하는 비중격 결손이 후방에 존재하였으며 사골동과 상

Table 2. Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of lidocaine against bacterial strains used in this study

Organisms	MIC	MBC
Streptococcus pneumoniae	1%	2%
Klebsiella pneumoniae	2%	2%
Pseudomonas aeruginosa	2%	4%
Staphylococcus aureus	2%	4%
Haemophilus influenzae	0.25%	1%

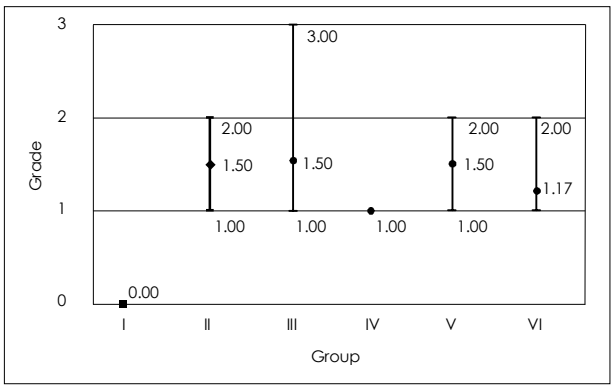

Fig. 3. Mean grade of nasal lavage for culture. Graded according to standard microbiological techniques. 0 : no growth, 1 : growth only the first streak, 2 : growth on the first and second streaks, 3 : growth on first, second and third streaks.

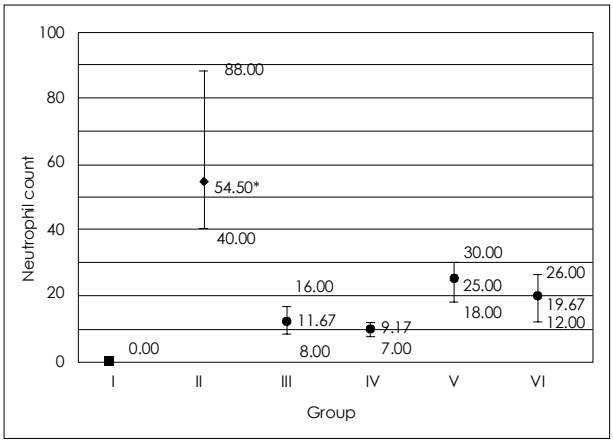

Fig. 5. Mean count of infiltrating neutrophils in the mucosa (original magnification×400). A randomized sampling of four high power fields, were determined for each of the 3 anatomically identical sections per mouse. *p<0.01.

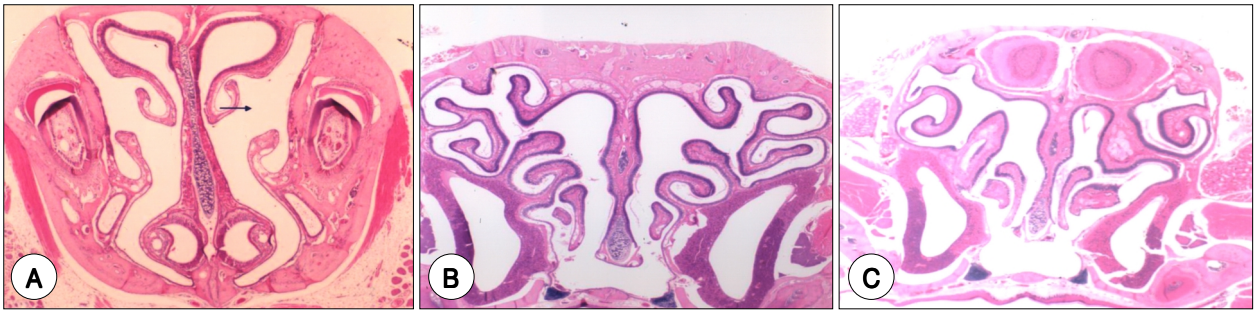

Fig. 2. Three paraffin-embedded coronal sections of a mouse nasal cavity. Sections are representative of anterior (A), middle (B) and posterior (C) regions of the nasal cavity. Arrows indicate maxillary sinuses (H & E, original magnification×10).

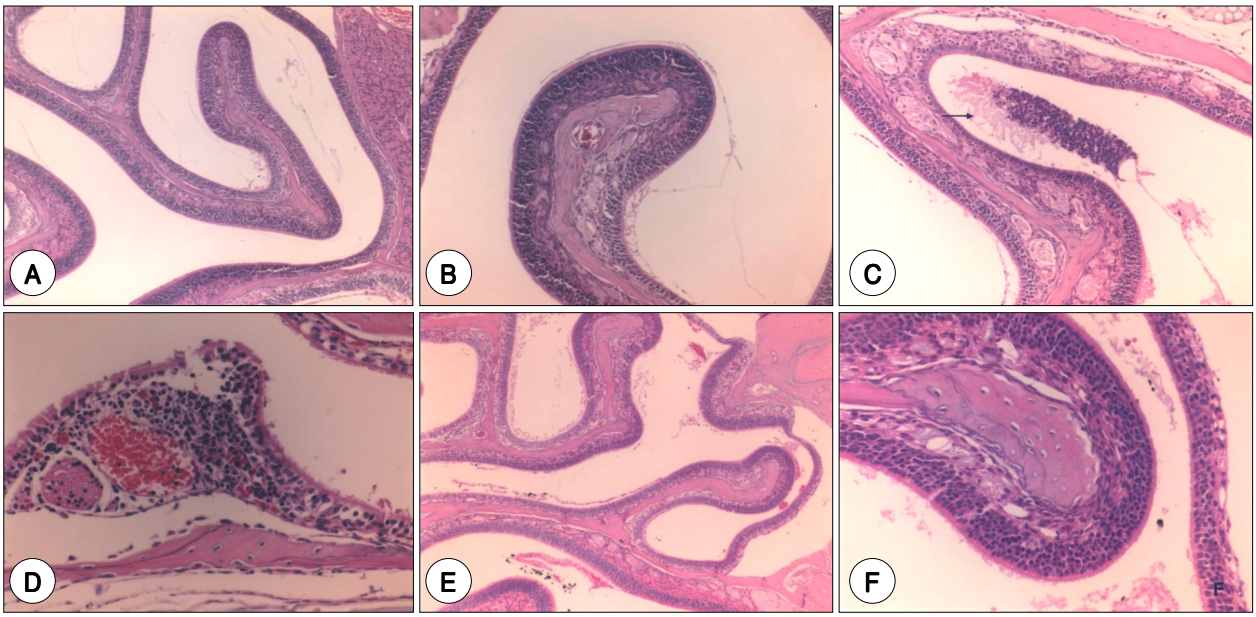

Fig. 4. Light microscopic findings of sinus mucosa of Group I (A and B), Group II (C and D), Group IV (E and F). In group II, the mucosal infiltrating neutrophil has shown the most, and in group IV, the mucosal infiltrating neutrophil has decreased. Arrows indicate neutrophil cluster (H & E : A, C and E original magnification×100 ; B, D and F original magnification×400).

악동이 비강과 연결된 공기강으로 존재하였다. 또한, 부비동의 점막은 술잔세포들을 포함한 위중층원주상피세포였고 점막하 혈관들과 신경들이 있었으며 점막하분비선도 존재하였다(Fig. 2).

실험군 및 대조군에서 생쥐의 활동량 감소는 보이지 않았고 먹고 마시는 것은 잘하였다. 또한, 실험전후의 생쥐의 몸무게는 평균 20.5 g과 20.3 g으로 큰 차이가 없었다.

비강세척을 시행하여 제 I 군, 제 III 군, 제 V 군에서 배양된 균주 정도는 평균 1.5로 다른 군 보다는 조금 높았지만 통계학적으로 의미는 없었다($p>0.01$)(Fig. 3).

부비동의 점막에 침윤된 중성구의 숫자는 제 II 군에서 나머지 군보다 통계학적으로 의미있게 그 수가 증가한 것(54.5±17.2)을 볼 수 있었고($p<0.01$), 통계학적으로는 의미는 없지만 제 V 군(25.0±5.9), 제 VI 군(19.7±5.9), 제 III 군(11.7±2.9) 그리고 제 IV 군(9.2±1.7)순으로 중성구의 숫자가 증가되었다(Figs. 4 and 5).

고 찰

이비인후과 의사라면 종종 원인불명의 고열 때문에 오는 환자 의뢰를 받게되고 다른 부위에서 의미있는 것이 발견되지 않으면 부비동이 감염의 가능한 부위로 간주된다.[4] 이 때, 부비동에서 검사물을 얻는 방법으로는 상악동경유 접근, 비강경유 접근, 상악동 자연공을 통한 흡인의 세 가지 방법이 있고 이를 위해서 국소적인 마취가 필요하게 된다. 흔히 4% 리도카인이 솜 거즈에 배어 비강에 넣어두면 리도카인의 항균작용에 의해서 위음성의 결과가 나올 가능성을 배제할 수 없다. Kiefer 등[5]은 리도카인에 의해서 중성구의 탐식능력이 저해된다고 보고하였으나, Ohsuka 등[3]은 리도카인이 박테리아의 세포막의 특정부위에 결합하여 세포

막의 투과성에 영향을 미쳐 항균작용이 있음을 보고하였고, 여러 실험자들에 의하여 리도카인이 그람음성균과 그람양성균에 대해서 광범위한 항균효과를 가진다는 것이 알려졌다.[1-3)6-8)]

인간에게서 부비동 점막의 채취의 한계와 실험적으로 비부비동염을 만드는 것에 한계가 있기 때문에 건강한 상피가 만성 염증이 있는 점막으로 변하는 병리적 기전이 아직 명확하게 알려져 있지 않다. 지금까지 급성 비부비동염의 동물모델로는 토끼가 많이 이용이 되었지만,[9)10)] 토끼의 경우에는 비부비동염을 유발하기 위해서 상악동의 자연 개구부를 폐쇄하여야 하고 이러한 조작에 의한 상악동의 손상과 이차적 감염을 배제할 수 없게 된다. 저자들은 비록 그 크기가 작아서 실험적 조작이 힘든 점은 있지만 비강 및 상악동과 사골동의 구분이 명확하고 토끼나 흰쥐에 비해서 다양한 일차 및 이차 항체가 유용하여 유전과 감염 연구에 장점이 있다는 점, 인간의 비부비동과 해부병리적으로 유사하다는 점 그리고 비교적 가격이 싸다는 점 때문에 생쥐를 이용하였다.[11)]

생쥐 부비동의 조직학적 형태의 세밀한 부분 때문에 이전에 정확히 기술이 된 것이 많지는 않지만, Bomer 등[11)]은 생쥐에서 발견된 부비동의 형태는 인간의 것과 비슷하고, 사골동과 상악동은 비강과 연결된 구조로 이루어져 있으며 비중격 천공이 있어 양측 비강의 연결이 되어 있고 사람에서와 마찬가지로 부비동의 상피는 술잔세포를 포함한 위중층원주상피세포들로 이루어져 있다고 하였다. Min 등[12)]은 토끼에게 유발된 급성 비부비동염 때 상피하 부종, 세정맥 확장, 술잔세포의 증식, 섬모의 유실, 상피의 괴사와 궤양화, 백혈구, 림프구, 대식세포 등의 염증세포의 침착과 편평상피화생 등이 일어난다고 하였고 본 실험에서도 상기의 변화를 관찰 할 수 있었다.

급성 비부비동염의 원인균은 폐렴구균 31%, 헤모필루스 인플루엔자 21%, 그람음성 세균 9%, 혐기성 세균 6%, 폐렴구균과 헤모필루스 인플루엔자 혼합감염 5%, 황색포도구균 4% 순으로 많았고 위음성도 존재할 수 있다.[13)]

본 실험에서는 시험관내에서 리도카인의 MIC와 MBC를 측정하여, 2% 리도카인이 폐렴구균의 살균농도임을 확인할 수 있었다. 이어서 생쥐의 생체내에서 급성 비부비동염을 유발한 후 리도카인을 노출 시간과 노출 횟수를 달리하여 접종하여 이에 따른 리도카인의 항균효과를 알아보고자 하였고, 노출시간과 노출횟수가 많을수록 항균력이 증가한다는 것을 알 수 있었다.

본 실험에서 접종전후의 생쥐에게서 전신상태가 양호하고 균을 접종 후 특별한 이상소견이 없었고 접종 전후의 몸무게에도 별다른 차이가 없는 것으로 보아 급성 비부비동염 자체만으로는 전신적인 영향을 일으키지는 않는 것으로 생각된다.

본 실험의 초기설정에서는 비강과 부비동의 중성구 군집을 모두 보려고 하였으나 비강세척을 시행할 때 외비공이 너무 작아 0.15 mL의 생리식염수를 넣고 난 후 세척액을 떨어 뜨리는 것만으로는 비강내의 시료를 충분히 얻을 수 없어 흡인하는 방법을 이용하였고 흡인시 중성구 군집들이 떨어져 나와서 병리 소견에서는 중성구 군집들을 많이 관찰할 수 없었던 것으로 생각된다.

결 론

이 연구에서 실험관 내에서 급성 비부비동염을 일으키는 여러 균에 대한 리도카인의 최소억제농도와 최소살균농도를 알아볼 수 있었고, 최소 2% 농도의 리도카인을 12시간 이상 접촉 하였을 때 폐렴구균증식의 억제 효과가 있다는 것을 알 수 있었다. 또한, 생체내에서 폐렴구균을 이용하여 급성 비부비동염을 일으킬 수 있는 것을 알 수 있었고 통계학적인 의의는 없었으나 리도카인의 노출시간과 노출횟수가 많을수록 항균력이 증가하는 양상을 관찰할 수 있었다.

비부비동으로부터 세균을 배양할 때 전처치로 리도카인을 사용한 경우 리도카인의 항균작용에 의해서 위음성의 결과가 나올 가능성을 항상 염두에 두어야겠고 향후 술 후 관리에 있어 원치 않는 병원균의 성장을 저해 할 수 있는 치료제로서의 가능성이 있다고 생각된다.

중심 단어 : 부비동염 · 생쥐 · 리도카인.

REFERENCES

1) Wimberley N, Willey S, Sullivan N, Bartlett JG. *Antibacterial properties of lidocaine. Chest 1979;76:37-40.*
2) Lebeda MD, Haller JR, Graham SM, Hoffman HT. *Evaluation of maxillary sinus aspiration in patients with fever of unknown origin. Laryngoscope 1995;105:683-5.*
3) Ohsuka S, Ohta M, Masuda K, Arakawa Y, Kaneda T, Kato N. *Lidocaine hydrochloride and acethylsalicylate kill bacteria by disrupting the bacterial membrane potential in different ways. Microbiol Immunol 1994;38:429-34.*
4) Schmidt RM, Rosenkranz HS. *Antimicrobial activity of local anesthetics: Lidocaine and procaine. J Infect Dis 1970;121:597-607.*
5) Kiefer RT, Ploppa A, Krueger WA, Plank M, Nohe B, Haeberle HA, *et al. Local anesthetics impair human granulocyte phagocytosis activity, oxidative burst, and CD11b expression in response to staphylococcus aureus. Anesthesiology 2003;98:842-8.*
6) Stratford AF, Zoutman DE, Davidson JD. *Effect of lidocaine and epinephrine on staphylococcus aureus in a guinea pig model of sur-*

gical wound infection. Plast Reconstr Sur 2002;110:1275-9.
7) Aydin ON, Eyigor M, Aydin N. *Antimicrobial activity of ropivacaine and other local anaesthetics. Eur J Anaesthesiol 2001;18:687-94.*
8) Aldous WK, Jensen R, Sieck BM. *Cocaine and lidocaine with phenylephrine as topical anesthetics: Antimicrobial activity against common nasal pathogens. Ear Nose Throat J 1998;77:554-7.*
9) Westrin KM, Norlander T, Stierna P, Carlsoo B, Nord CE. *Experimental maxillary sinusitis induced by bacteroides fragilis. Abacteriological and histological study in rabbit. Acta Otolaryngol 1992;112:107-14.*
10) Scharf KE, Lawson W, Shapiro JM, Gannon PJ. *Pressure measurements in the normal and occulused rabbit maxillary sinus. Laryngoscope 1995;105:570-4.*
11) Bomer K, Brichta A, Barody F, Boonlayangoor S, Li X, Naclerio RM. *A mouse model of acute bacterial rhinosinusitis. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1998;124:1227-32.*
12) Min YG, Kim YK, Choi YS, Shin JS, Juhn S. *Mucociliary activity and histopathology of sinus mucosa in experimental maxillary sinusitis: A comparison of systemic administration of antibiotic and antibiotic delivery by polylactic acid polymer. Laryngoscope 1995;105:835-42.*
13) Gwaltney JM. *Acute community-acquired sinusitis. Clin Infect Dis 1996;23:1209-25.*