

번데기동충하초(*Cordyceps militaris*) 추출물의 세포독성 및 유전독성 억제효과

김미남 · 최승필 · 이득식 · 함승시[†]

강원대학교 식품생명공학부

Cytotoxicity and Antigenotoxic Effects of *Cordyceps militaris* Extracts

Mi-Nam Kim, Cheng-Bi Cui, Deuk-Sik Lee and Seong-Shi Ham[†]

Division of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Abstract

This study was performed to investigate the effects on the cytotoxicity and antigenotoxicity of *Cordyceps militaris* extracts on the human cancer cell lines. The ethanol extract and five fractions which were hexane, chloroform, ethylacetate, butanol and aqueous were screened for cytotoxicity on human lung carcinoma (A549), human breast adenocarcinoma (MCF-7), human epitheloid carcinoma (HeLa), human fibrosarcoma (HT1080), human hepatocellular carcinoma (Hep3B), human gastric carcinoma (KATOIII) and chronic myelogenous leukemia (K562) cells by SRB and MTT assays. The results showed that growth inhibition rates of the human cancer cells in the presence of *Cordyceps militaris* were inhibited with increasing concentration of the extract. The ethanol extract from *Cordyceps militaris* had strong inhibitory effects in 1mg/mL treatment by SRB assay, showing 89.4%, 85.7%, 72.9% and 65.5% inhibition in HT1080, HeLa, Hep3B and A549, respectively. The treatment of 1 mg/mL hexane fraction by SRB assay had the strongest cytotoxicity with 97.0% on HT1080 followed by MCF-7 (92.9%) and HeLa (90.3%). The inhibition ratio on KATOIII by MTT assay was much higher in the butanol (83.7%) and aqueous (80.4%) than in the ethanol extract (61.5%). And also, K562 showed similar tendency with KATOIII. The effects of *Cordyceps militaris* extracts on the frequencies of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCEs) induced by *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine(MNNG) were investigated in the bone-marrow cells of ICR male mice. The amount of 10, 20, 40 and 80 mg/kg of each extract were administered to animals immediately after injection of MNNG, and the exposure time was 36 hours. Significant reductions ($p < 0.05$) with 39.7%, 52.7%, 71.4% and 83.9% were observed in the frequencies of MNPCE when 10, 20, 40 and 80 mg/kg of the hexane fraction of *Cordyceps militaris* extracts were given to the mice.

Key words: *Cordyceps militaris*, cytotoxicity, micronucleus

서 론

지구상에 자생하는 담자균과 자낭균류는 유전자원으로서의 가치가 크며, 바이오 기술의 도입이 기대되는 많은 버섯이 식품소재(기능성식품)로서, 또 약품개발소재로서 주목을 받고 있다. 그 중에서도 식용버섯은 최근, 식용전 정적인 특성이 있는 영양특성(1차기능), 기호특성(2차기능), 그리고 다음으로 식용후의 동적인 생체조절기능특성(3차기능)에 관여하는 성분의 질과 함량에 의해 평가되어지고 있다.

예로부터 약용으로 많이 사용되던 담자균류의 항암성분에 관한 연구는 1950년대부터 본격적으로 시작되었는데, Roland 등(1)은 *Calvatia gigantea*로부터 담자균 최초의 항암성분을 분리하여 calvaine이라 명명하였고, 담자균류로부터 분리된 단백질당체는 화학요법들과 달리 뚜렷한 부작용이 없을 뿐만 아니라 화학요법제의 부작용을 완화하기도 한다고 하였다. 또한 버섯은 당질, 단백질, 비타민, 무기질 등의 일반 영양

소들이 풍부할 뿐만 아니라 다양한 생물활성이 보고되고 있는데 특히 항암효과는 일본을 중심으로 활발히 연구되어 왔다. 버섯류의 항암효과는 Ikekawa 등(2)에 의하여 말굽버섯과(*Polyporaceae*)를 위시하여 식용균류의 자실체를 열수추출하여 얻은 추출물이 sarcoma 180 등의 동물 이식암에 대하여 항종양 활성이 있는 것이 발견되었으며, 이후 표고버섯(*Lentinus edodes*), 운지버섯(*Coriolus versicolor*), 자작나무버섯(*Piptoporus betulinus*), 영지버섯 등에서도 항종양 효과가 있는 물질이 발견되었다(3). 특히, 풀버섯(*Volvariella volvacea*), 팽나무버섯(*Flammulina velutipes*)이 생산하는 심장독성단백질(cardiotoxic protein)인 volvatoin(4)은 에를리히아 복수종양세포(Ehrlich ascites tumor cell)의 호흡을 억제하는 것이 입증되었다(5). 이들 담자균류의 항암성분이 면역능에 미치는 연구를 통해 다당류 성분의 일종인 lentinan이 세포성 면역의 immuno-accelerator로 작용함과 동시에 T-cell adjuvant로 작용함을 입증하였다(6). 한편, 한

[†]Corresponding author. E-mail: hamss@cc.kangwon.ac.kr
Phone: 82-33-250-6453. Fax: 82-33-250-6453

국산 담자균류의 항암성분에 관한 연구는 Kim 등(7)이 구름버섯, 표고버섯, 느타리버섯 등의 자실체의 열수추출물이 sarcoma 180에 강한 저지력이 있음을 밝혔고, Kim 등(8)과 Han 등(9)은 상황버섯이 항암활성이 있음을 보고한 바 있다. 또한 Lee 등(10)은 상황버섯 자실체와 배양 균사체 유래 β -glucan 성 다당류의 항암활성, 면역활성, 지질 과산화 억제효과 및 유리기 제거능이 있음을 확인하였다. 상황버섯은 최근 인공 재배법으로 대량생산이 가능하게 되었고, 특히 재배된 상황버섯은 장내세균의 유효효소를 저해하고 장점막 알파글루코시다아제를 저해하는 효과가 있는 것으로 밝혀지고 있다(11). 이와같이 버섯은 지구상에 수만 종이나 존재하는 귀중한 생물자원이며, 균사체의 영양대사로 얻어지는 대사산물이 축적된 자실체의 형태로 나타나며, 자실체 추출물이나 균사체 배양물이 체질개선이나 각종 병의 예방과 치료에 대한 효과가 속속 밝혀지고 있다. 한편, 지금까지 알려진, 곤충을 침입하는 곰팡이균은 약 800여 종으로, 이들 중 버섯을 형성하는 것으로 알려진 대표적인 균은 대부분 자낭균류의 동충하초속에 속하는 균들로서 약 300여 종이 보고되었으며, 한국에서도 번데기동충하초 등 현재까지 76종이 채집되어 분리 동정(同定)되었다(12).

최근 들어서는 동충하초에 대한 생리활성 연구와 활성을 갖는 물질의 동정이 이루어지고 있다(13). 일부 선진국에서는 최근 곤충기생성균을 이용하여 주요 농작물 해충의 방제를 목적으로 천연 미생물 농약을 개발, 상품화하여 상용화 단계에 접어들었으며 각국에서 본균을 천연물 농약으로 개발하는데 박차를 가하고 있는 실정이다. 매년 새로운 종이 채집되고 있으며 외국에 보고된 300여종에 비하면 국내 연구는 아직 초보 단계에 놓여 있다. 따라서 본 연구에서는 신비한 버섯 번데기동충하초의 생리활성을 검색하여 기능성식품의 가치를 밝히고 가공개발 및 의약 신소재 개발의 기초자료를 얻는데 그 목적을 두고 있다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 번데기동충하초는 강원대학교 동충하초은행(EFCC: Entomopathogenic Fungal Culture Collection)으로부터 구입하였으며, 건조 분말화한 후 -20°C 냉동실에 보관하면서 실험에 사용하였다.

시료의 추출 및 분획

추출에 적합하도록 분말화하여 환류냉각기를 부착시킨 플라스크에 분말상태인 번데기동충하초와 시료중량으로 10배의 70% 에탄올을 첨가하고 80°C 에서 3시간씩 5회 추출한 후, 감압여과 장치에서 뜨거운 상태로 여과한 후 감압농축기를 사용하여 추출용매를 제거한 후 동결건조기를 이용하여 건조시킨 다음 실험에 사용하였다. 70% 에탄올로 추출하여 얻은 농축물을 용매의 극성에 따라 분별분리를 행하여 핵산,

클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 볼층으로 극성의 차이에 의해 다섯가지 분획으로 조제하였다. 분리된 각각의 용매 분획물은 감압농축 시켜 용매를 제거하여 농축물을 얻었다.

세포주 및 배양

본 실험에 이용된 세포주는 암세포로 인간 폐암세포 A549 (lung carcinoma, human), 인간 유방암세포 MCF-7 (breast adenocarcinoma, human), 인간 상피성암세포 HeLa (epitheloid carcinoma, human), 인간 섬유성육종세포 HT1080 (fibrosarcoma, human), 인간 간암세포 Hep3B (human hepatocellular carcinoma), 인간 위암세포 KATOIII (gastric carcinoma, human) 및 인간 만성골수성백혈병암세포 K562 (chronic myelogenous leukemia, human)가 이용되었고, 정상세포로는 인간 간세포 WRL68 (human embryo liver)을 Korea Cell Line Bank (KCLB)로부터 구입하여 본 실험실에서 배양하면서 실험에 사용하였다. A549, MCF-7, KATOIII, K562 세포주는 RPMI Medium 1640 복합배지(1 L당 RPMI 1 pack, NaHCO_3 2 g, HEPES 2 g, gentamycin sulfate 0.057 g, serum 10% (v/v), pH 7.0~7.2)를 사용하였으며, Hep3B, HT1080, HeLa, WRL68 세포주는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, 1 L 중에 DMEM 1 pack, NaHCO_3 2 g, HEPES 2 g, gentamycin sulfate 0.057 g, serum 10% (v/v), pH 7.0~7.2) 배지를 이용하여 37°C , 5% CO_2 에 적응시켜 각각 배양시켰다.

실험동물

명진실험동물센터(주)에서 4주령의 ICR male mouse (25 ± 2.5 g)를 구입하여 강원대학교 농업생명과학대학 식품생명공학부 동물 사육실에서 일주일간 적응시켜 사용하였으며, 각각의 실험군당 6마리를 사용하였다. 동물 사육실 실험 조건은 온도 $21 \sim 26^{\circ}\text{C}$, 습도 45~55%로 유지시켰으며, 조명은 오전 9시에 자동 점등, 오후 9시에 자동 소등하여 12시간 간격으로 조명을 조절하였다. 사료는 삼양유지사료(주)의 마우스용 배합사료(조단백질 22.1%, 조지방 3.5%, 조섬유 5.0%, 회분 8.0%, 칼슘 0.6%, 인 0.4%)를 사용하였고, 물은 증류수를 공급하였으며 사료와 물을 자유롭게 먹도록 하였다.

항암활성 측정

Sulfo Rhodamine B (SRB) assay : SRB 분석(14)은 세포 단백질 염색을 이용하여 세포생육정도를 측정하는 방법이다. 10% fetal bovine serum 및 각각의 암세포(A549, MCF-7, HeLa, Hep3B)를 함유하는 RPMI 1640과 DMEM 배지를 5×10^4 cells/mL 농도로 100 μL 씩 각 well에 첨가한다. 24시간 동안 배양(37°C , 5% CO_2)시킨 후 0.2 M 이하의 DMSO로 녹인 시료를 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 mg/mL 농도로 100 μL 씩 첨가하여 48시간 동안 다시 배양하였다. 그 후 상등액을 aspirator로 조심스럽게 제거하고 냉장보관한 10% (w/v) trichloroacetic acid (TCA)를 100 μL 씩 첨가한 후 1시간 동안 4°C 에서 방치

한 후 증류수로 다섯 번 정도 행구었다. 실온에서 건조시킨 후 1%(v/v) acetic acid에 녹인 0.4%(w/v) SRB용액 100 µL를 첨가해 30분 동안 염색시켰다. 세포와 결합되지 않은 SRB 염색액은 1%(v/v) acetic acid용액으로 네 번 행군 후, 초산 용액을 완전히 제거시키기 위해 건조시킨 다음 10 mM Tris buffer 100 µL로 세포와 결합되어 있는 염색제를 용해시켜 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

MTT assay : MTT assay(15)는 세포의 생육 및 분화를 측정하는 colorimetric assay이다. 이 assay는 살아 있는 세포의 미토콘드리아내 dehydrogenase라는 효소가 노란색의 수용성 물질인 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT)에 의해 dark blue formazan 생성을 기초로 하였다. KATOIII, K562 및 10% fetal bovine serum을 함유한 RPMI 1640배지를 5×10^4 cell/mL 농도로 각각의 well에 100 µL씩 첨가하여 24시간 동안 배양(37°C, 5% CO₂)시킨 후 각각의 시료를 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 mg/mL의 농도로 100 µL씩 첨가하여 48시간 동안 다시 배양시켰다. 여기에 MTT(5 mg/mL)용액을 20 µL씩 첨가하여 네시간 동안 배양시켜 formazan을 형성시킨 후 조심스럽게 aspirator로 상등액을 제거시킨 다음, DMSO 150 µL를 첨가하여 formazan을 녹인 후 540 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

번데기동충하초 에탄올 추출물과 분획물의 유전독성 억제효과

변이원물질의 농도에 따른 유전독성 억제효과를 살펴보기 위해 소핵유발물질로 MNNG를 사용하였으며 마우스당 투여량은 0.2 mL(체중 25 g 기준)가 되도록 50, 100, 150 그리고 200 mg/kg 용량으로 증류수 용해하여 투여직전에 측정 한 제충에 따라 산출하여 복강투여하였다. 복강투여 36시간 후에 회생시킨 다음 검경하여 MNNG 자체의 용량반응관계를 실험하였다. 그 결과, 양성 대조군으로서 이용할 수 있는 MNNG의 유전독성 용량이 결정되었으며, 번데기동충하초 추출물의 억제효과를 파악하기 위하여 번데기동충하초 추출물과 분획물(10, 20, 40 및 80 mg/kg)은 양성대조군으로서 MNNG(150 mg/kg)를 복강투여하는 시각에 경구투여하였다. 그 후 36시간을 노출시킨 후 회생, 검경하여 각 투여군의 가장 높은 억제농도를 관찰하였다. 동시에 용매의 영향을 음성대조군(negative control)으로 하였다.

MNNG 및 시료를 투여한 마우스는 Schmid 방법(16,17)에 따라 경추탈골하여 회생시킨 후 대퇴골을 적출하여 실험을 진행하였다. 검경은 1000개의 다염성 적혈구(polychromatic erythrocyte: PCE)중 소핵을 가진 소핵다염성 적혈구(micronucleated polychromatic erythrocyte: MNPCE)를 계수하여 생성빈도(%)를 구하였다.

통계처리

*In vivo*계 유전독성 억제효과 측정 실험에서 얻어진 결과

의 통계적 유의성은 SAS(Statistical Analysis System) program을 이용하여 실험군당 평균(mean)±표준편차(SEM)로 표시하였고, 각 군의 평균차의 통계적 유의성을 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test에 의해 검정하였다.

결과 및 고찰

번데기동충하초 에탄올추출물 및 분획물의 세포독성 효과 역학적 연구에서 보면 식이요소들이 인간 암의 진전에 중요 역할을 하는 것을 알 수 있으며, 자연 발생적으로 식이에서 오는 발암성 물질과 항암성 물질을 동정하려는 시도들이 암예방을 위해 새로운 전략으로 나타나고 있다(18).

동충하초는 자연 생태계 내에서 곤충 집단의 밀도를 조절하기도 하고, 예로부터 인류에게 유용하게 이용되기도 하였으며, 최근에는 사람들에게 여러 모로 흥미를 불러일으키고 있다. 따라서 본 실험에서는 각종 암세포에 대한 번데기동충하초 추출물 및 분획물의 세포독성을 규명하기 위하여 암세포로 A549, MCF-7, HeLa, HT1080 및 Hep3B를 이용하였다. Fig. 1은 각종 암세포주에 대하여 SRB assay를 이용한 번데기동충하초 에탄올 추출물의 저해효과를 나타내었다. 그 결과 1 mg/mL의 농도에서 HT1080과 HeLa세포의 경우 89.4%와 85.7%의 높은 억제효과를 보였으며, Hep3B와 A549 세포의 경우 각각 72.9%, 65.5%의 억제효과를 보였다. 또한 최저농도인 0.25 mg/mL에서 MCF-7 세포를 제외하고 다른 모든 세포에서 약 60% 이상의 억제효과를 보였다.

번데기동충하초 에탄올 추출물의 활성성분의 특성을 검토하고자 극성이 다른 용매인 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물층으로 분획하여 농축한 후 이 분획물로 여러 종류의 암세포(A549, MCF-7, HT1080, HeLa 및 Hep3B)에 대한 성장억제 효과를 SRB assay에 의해 검토하였다. Ta-

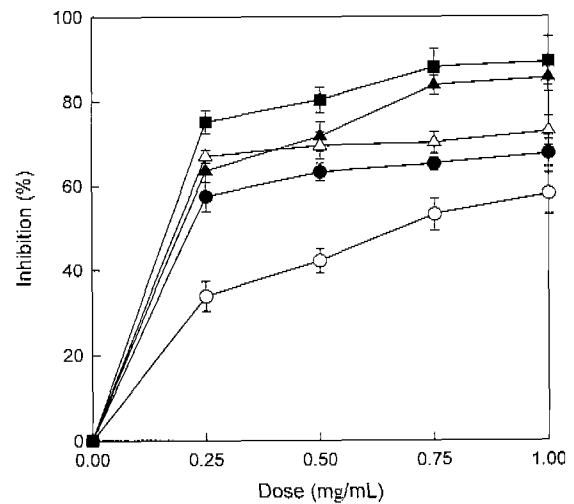


Fig. 1. Growth inhibitory effects of *Cordyceps militaris* ethanol extract on human cancer cell lines. ●—A549, ○—MCF-7, ▲—HeLa, △—Hep3B, ■—HT1080

Table 1. Growth inhibitory effects of *Cordyceps militaris* fractions against the human cancer cell lines by SRB assay (unit: %¹⁾)

<i>C. militaris</i>	Dose (mg/mL)	A549	MCF-7	HeLa	HT1080	Hep3B
Hexane fr.	0.25	69.3±5.5 ²⁾	54.4±1.6	85.1±3.4	92.4±1.4	66.9±3.5
	0.5	71.9±3.0	63.5±2.3	86.4±2.4	97.8±1.2	94.3±2.8
	0.75	73.7±4.5	86.9±2.5	87.8±3.2	97.3±0.7	95.4±3.8
	1	78.4±5.0	92.9±3.0	90.3±2.8	97.0±1.5	94.3±2.5
Chloroform fr.	0.25	65.1±3.0	34.7±1.3	80.0±2.8	79.8±1.8	64.6±3.5
	0.5	70.7±1.6	42.8±3.5	83.1±1.5	78.6±3.4	66.4±1.7
	0.75	70.5±2.4	43.9±4.8	85.2±3.4	84.1±2.5	74.8±2.1
	1	68.0±3.5	52.3±3.0	84.5±2.5	82.4±3.0	79.7±1.4
Ethyl acetate fr.	0.25	64.0±3.5	12.9±3.8	70.6±3.0	64.6±3.5	69.2±1.8
	0.5	75.3±2.2	26.5±3.0	77.9±2.8	72.2±3.0	74.9±2.0
	0.75	78.0±2.8	58.2±4.0	78.2±3.5	71.2±2.0	75.1±2.0
	1	78.8±1.5	65.6±3.5	74.1±2.5	73.1±3.2	76.1±3.5
Butanol fr.	0.25	0.4±1.2	4.2±3.2	67.3±2.5	56.9±0.6	26.0±2.5
	0.5	13.5±3.5	25.8±2.8	71.3±1.8	69.1±2.8	53.7±2.5
	0.75	38.4±1.8	29.3±3.0	73.2±3.4	79.9±3.0	55.1±3.0
	1	47.8±0.9	42.1±4.5	77.4±2.8	91.0±2.0	58.3±3.5
Aqueous fr.	0.25	16.8±3.0	11.5±1.8	44.2±3.0	54.9±3.5	19.5±2.0
	0.5	35.0±2.0	11.3±2.5	71.8±2.8	78.1±2.5	58.8±2.5
	0.75	47.1±3.5	37.9±3.5	81.7±2.4	83.2±3.2	62.0±1.8
	1	57.1±1.7	54.1±3.2	86.1±1.5	91.0±2.8	60.3±2.5

¹⁾% = (OD₅₄₀ of positive control - OD₅₄₀ of sample / OD₅₄₀ of positive control) × 100.

²⁾Mean value ± SD (n=3).

ble 1에서와 같이 A549 세포에 대한 분획물들의 억제효과는 실험상 고농도인 1 mg/mL를 첨가시, hexan 분획물과 에틸아세테이트 분획물에서 78.4%와 78.8%의 높은 성장 억제효과를 보였다. MCF-7 세포의 경우 hexan 분획물이 최고 시료농도 1 mg/ml에서 92.9%로 다른 분획물보다 현저히 높은 성장 억제효과를 나타냈다. HeLa와 HT1080 세포의 경우 1 mg/mL의 농도에서 대부분의 분획물 70% 이상의 높은 성장 억제효과를 보였으며, 특히 최저농도인 0.25 mg/mL에서는 hexan 분획물이 85.1%와 92.4%로 가장 높은 억제효과를 보였고, Hep3B 세포의 경우 1 mg/mL의 농도에서 부탄올과 물 분획물을 제외하고 모든 분획물이 70% 이상의 억제효과를 보였다. 또한 Fig. 2는 인간 정상 간세포 WRL68에 대하여

시료 농도에 따른 세포독성 효과를 나타낸 것으로 1 mg/mL 시료 첨가시 암세포에 대해서 대부분이 70% 전후의 억제율을 보이는데 반해 WRL68 세포에 대해서는 50% 이하의 생육 억제율을 보였다. 이는 암세포에 대한 높은 억제효과에 비해 정상세포에 대해서는 비교적 낮은 독성효과를 나타냄을 알 수 있었다.

SRB assay에 의한 각종 암세포의 세포독성과는 달리 세포의 성장 특성상 부유상태로 성장하는 인간 위암세포인 KATOIII와 인간 만성골수성백혈병세포인 K562는 생존 암세포의 효소활성을 측정하는 방법인 MTT assay로 실험하였다. Fig. 3은 KATOIII 세포에 대한 억제효과를 나타낸 것으로 최종농도인 1 mg/mL 투여시 에탄올 추출물의 경우 61.5%를 보였고 부탄올과 물 분획물에서는 각각 83.7%와 80.4%로 다소 높은 억제효과를 보였다. Fig. 4는 K562 세포에 대한 시료의 성장 억제효과를 나타낸 것으로 1 mg/mL의 에탄올 추출물을 가했을 때 60.5%의 억제율을 보이는데 반해 같은 농도의 에틸 아세테이트, 부탄올 및 hexan 분획물에서는 각각 88.6%, 80.6% 및 75.6%로 높은 성장 억제효과를 보였다.

한편, 운지버섯에서 추출한 단백당인 Krestin 또한 sarcoma 180, P-388과 Yoshida sarcoma 등 다양한 암세포에 항암효과를 나타내었으며(19), 암 환자에게 경구투여시 다른 부작용 없이 임상적 효과를 보이고 있다(20). 버섯 다당류들의 항종양작용은 암세포를 직접적으로 공격하지는 않고 숙주의 면역계에 작용하여 생체방어력 증가에 의한 것으로 알려져 있다(21). 그리고 영지버섯의 약효성분은 주로 다당류와 단백질이 결합된 polysaccharide-protein complex로서 그 화학적 조성도 밝혀진 바 있고, 동물실험에서도 암세포 억제효과가 입증되었다(22). 본 실험에서도 예로부터 인삼,

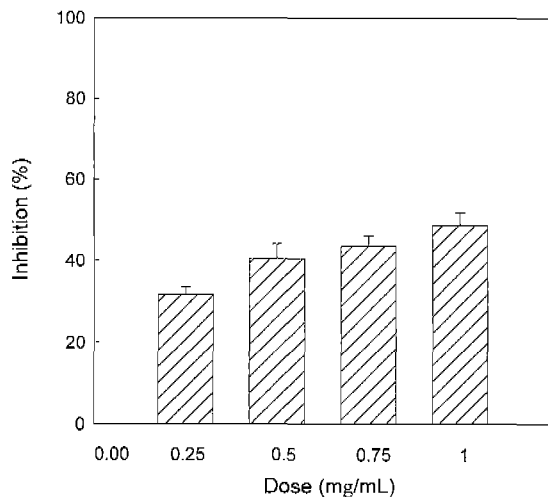


Fig. 2. Growth inhibitory effects of *Cordyceps militaris* ethanol extract on human liver embryo, WRL68.

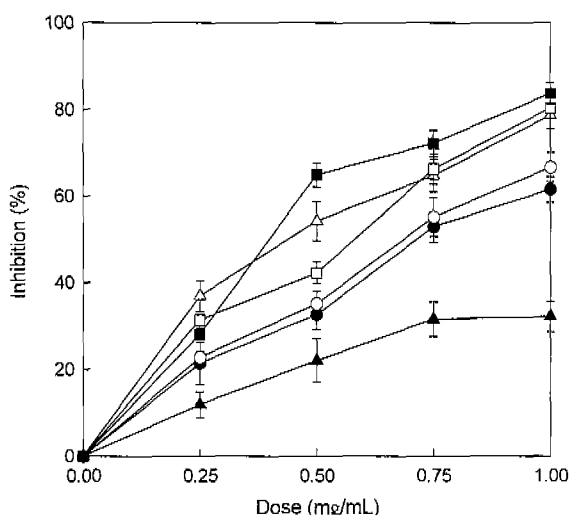


Fig. 3. Growth inhibitory effects of each fraction of *Cordyceps militaris* ethanol extract on human gastric carcinoma (KATOIII).

● Ethanol extract, ○ Hexane fr., ▲ Chloroform fr.,
 △ Ethyl acetate fr., ■ Butanol fr., □ Aqueous fr.

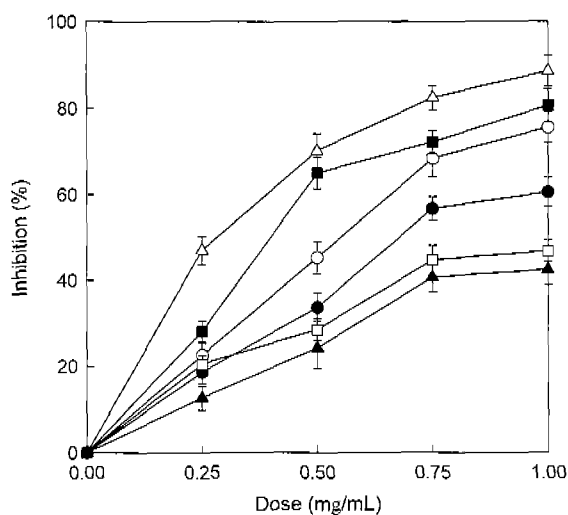


Fig. 4. Growth inhibitory effects of each fraction of *Cordyceps militaris* ethanol extract on human chronic myelogenous leukemia (K562).

● Ethanol extract, ○ Hexane fr., ▲ Chloroform fr.,
 △ Ethyl acetate fr., ■ Butanol fr., □ Aqueous fr.

녹용과 함께 3대 한방 약재로 여겨져 온 번데기동충하초 추출물 및 분획물이 암세포 성장을 크게 저해함을 알 수 있었다. Chen 등(23)은 인간 종양세포 U937 세포에 대하여 동충하초의 항암효과를 입증하였다. 이와 같은 결과는 동충하초에 함유된 물질이 암세포의 성장을 효과적으로 저지할 수 있음을 시사하였다.

번데기동충하초 에탄올 추출물과 분획물의 유전독성 억제효과

MNNG 투여농도에 따른 소핵생성빈도(MNPCEs/1000 cells)를 검토하기 위하여 MNNG 용액을 50, 100, 150, 200

mg/kg 복강내 투여 후 36시간 사육시킨 다음 소핵생성율을 검토해 본 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 각각의 소핵생성빈도(MNPCEs/1000 cells)는 3.6 ± 0.8 , 4.2 ± 1.2 , 11.2 ± 0.8 그리고 16.2 ± 1.5 를 나타내었다. 그러나 200 mg/kg을 투여한 경우에는 mouse의 중량변화가 대조군에 비해 낮았고, 대체적으로 건강치 못하였다. 따라서 억제효과를 규명하기 위한 MNNG의 농도를 150 mg/kg으로 설정하였다.

양성대조군에 대한 소핵유발 억제효과를 검토하기 위하여 MNNG와 번데기동충하초 에탄올 추출물과 분획물을 동시에 투여하였다. MNNG 150 mg/kg은 복강내로, 시료는 10, 20, 40, 80 mg/kg의 농도로 경구 투여한 후 36시간 사육 후에 소핵생성빈도를 관찰하였다. 동시에 용매의 영향을 음성대조군으로 하였다. 번데기동충하초 에탄올 추출물의 소핵생성 억제효과는 Fig. 6에 나타내었으며, 양성대조군의 11.2 ± 0.8 에 비하여 10, 20, 40, 80 mg/kg의 농도에서 10.5 ± 0.8 , 8.3 ± 0.5 , 7.8 ± 0.3 , 3.7 ± 0.6 로 8.7, 25.9, 30.4 그리고 67.0%로 유의적인 억제효과를 나타내었다. 또한 Table 2에서는 각각의 분획물에 대한 소핵생성 억제효과를 나타내었다. 유전손상 물질(MNNG: 150 mg/kg, I.P.)만 투여한 양성대조군에 비해서 시료 농도를 10, 20, 40, 80 mg/kg 처리하였을 경우 동일한 시료 농도 80 mg/kg에서 부탄올, 에틸 아세테이트, 클로로포름 그리고 물 분획물이 각각 3.1 ± 0.3 , 3.7 ± 0.6 , 4.2 ± 0.3 , 4.8 ± 0.3 으로 72.3%, 67.0%, 63.0% 그리고 57.1%의 순으로 소핵생성 억제효과를 나타내었으며, 그 중 헥산 분획물이 2.8 ± 0.5 의 75.0%로 가장 높은 소핵생성 억제효과를 나타내었다. 이와 같이 동충하초는 발암물질에 의한 소핵생성을 낮게는 57.1%(물분획물)에서 높게는 75%(헥산분획물)까지 억제하는 효과를 나타내어 세포독성 효과와 함께 우수한 생리기능 활성을 나타내는 것이 확인되었다. 지금까지 진행된 동충하초의 연구보고에서 생리활성 기능을 나타내는 성분은 gal-

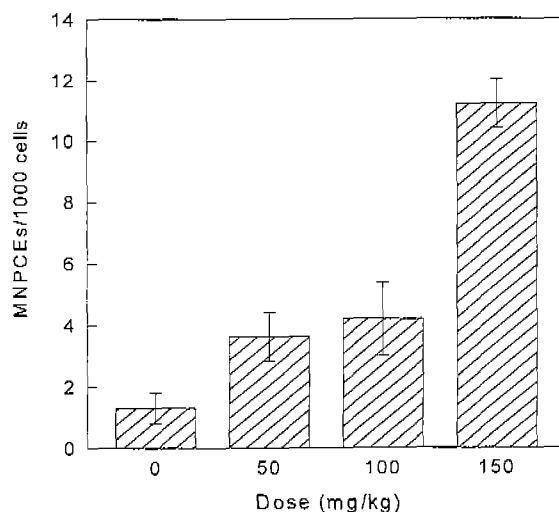


Fig. 5. Micronucleus induction of *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) in ICR male mice after exposure 36 hours with administration.

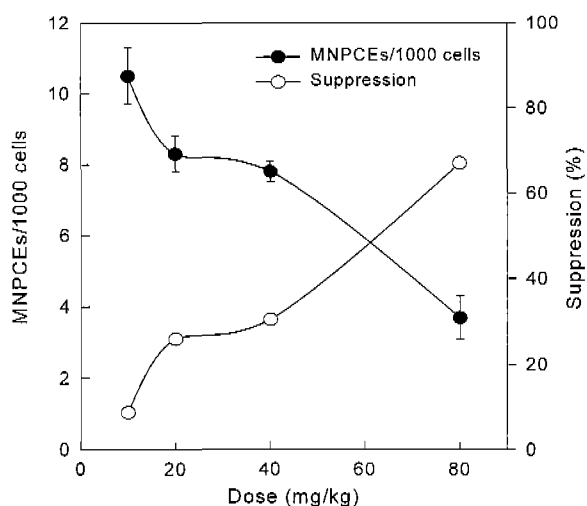


Fig. 6. Suppression of *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG, 150 mg/kg) induced micronucleated polychromatic erythrocyte (MNPCE) by single treatment of *Cordyceps militaris* ethanol extract in bone-marrow cells of ICR male mice.

Table 2. Suppression of MNNG induced micronucleated polychromatic erythrocyte by single treatment of each fractions of *Cordyceps militaris* in bone marrow cells of ICR male mice

Fractions	Dose (mg/kg)	MNPCEs/1000 cells Mean ± SD ¹⁾	Suppression ²⁾ (%)
Negative control ³⁾		1.3 ± 0.5	
Positive control ⁴⁾		11.2 ± 0.8 ^a	
Hexane fr.	10	6.7 ± 0.5 ^b	40.1
	20	5.3 ± 0.4 ^c	52.7
	40	3.2 ± 0.7 ^d	71.4
	80	2.8 ± 0.5 ^d	75.0
Chloroform fr.	10	10.7 ± 0.5 ^a	4.5
	20	8.7 ± 0.4 ^b	22.3
	40	6.7 ± 0.6 ^c	40.2
	80	4.2 ± 0.3 ^d	62.5
Ethyl acetate fr.	10	8.7 ± 0.7 ^b	22.3
	20	6.8 ± 0.8 ^c	39.3
	40	4.7 ± 0.5 ^d	58.0
	80	3.7 ± 0.6 ^d	67.0
Butanol fr.	10	8.2 ± 0.5 ^b	26.8
	20	6.3 ± 0.5 ^c	43.8
	40	5.7 ± 0.3 ^c	49.1
	80	3.1 ± 0.3 ^d	72.3
Aqueous fr.	10	10.3 ± 0.3 ^a	8.9
	20	8.3 ± 0.4 ^b	25.9
	40	7.0 ± 0.6 ^c	37.5
	80	4.8 ± 0.3 ^c	57.1

¹⁾Each point represents the mean ± SD of 6 mice (p < 0.05).

²⁾100 - [MNPCEs of sample / MNPCEs of positive control × 100].

³⁾Distilled water (0.2 mL/25 g).

⁴⁾*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (150 mg/kg, I.P.).

actomannan(24)이나 cordycepin(25) 등이 알려져 있으나, 이들의 다른 미지의 성분은 속속 밝혀지고 있는 상황이다. 이들

성분의 활성효과는 특히 종양에 우수한 것으로 나타난 것으로 보고되고 있으며, 본 연구에서도 나타났듯이 유전독성 억제효과도 이들 성분과 미지의 다른 성분이 상호 작용하여 나타낸 것으로 추정되었다. 향후 이들 성분에 대한 동정 및 생리활성 기능에 대한 정량분석이 필요할 것으로 사료된다.

요 약

각종 암세포에 대한 번데기동충하초(*Cordyceps militaris*) 추출물 및 분획물의 세포독성을 규명하기 위하여 암세포로 A549, MCF-7, HeLa, HT1080, Hep3B, KATOIII 및 K562를 이용하였다. 그 결과, SRB assay에 의한 1 mg/mL의 에탄올 추출물 농도에서 HT1080, HeLa, Hep3B 그리고 A549는 각각 89.4%, 85.7%, 72.9% 그리고 65.5%의 억제효과를 나타내었다. MCF7, HeLa 그리고 HT1080 세포의 경우는 hexan 분획물 1 mg/mL 농도에서 각각 92.9%, 90.3% 그리고 97.0%로 다른 분획물보다 현저히 높은 억제효과를 나타냈다. KATO III 세포에 대한 억제효과는 1 mg/mL 투여시 에탄올 추출물의 경우 61.5%를 보였고 부탄올과 물 분획물에서 각각 83.7%와 80.4%로 다소 높은 억제효과를 보였다. K562 세포에 대한 시료의 억제효과는 에탄올 추출물(1 mg/mL)이 60.5%의 억제율을 보인데 반해 같은 농도에서 에틸 아세테이트, 부탄올 및 hexan 분획물에서는 각각 88.6%, 80.6% 및 75.6%로 높은 억제효과를 보였다. 번데기동충하초 에탄올 추출물의 소핵생성 억제효과는 양성대조군의 11.2 ± 0.8에 비하여 10, 20, 40, 80 mg/kg의 농도에서 10.5 ± 0.8, 8.3 ± 0.5, 7.8 ± 0.3, 3.7 ± 0.6로 8.7, 25.9, 30.4 그리고 67.0%의 유의적인 억제효과를 나타내었다. 또한 각각의 분획물에 대한 소핵생성 억제효과는 유전손상물질(MNNG: 150 mg/kg, I.P.)만 투여한 양성대조군에 비해서 시료 농도를 10, 20, 40, 80 mg/kg 처리하였을 경우 동일한 시료 농도 80 mg/kg에서 부탄올, 에틸 아세테이트, 물 그리고 클로로포름 분획물이 각각 3.1 ± 0.3, 3.7 ± 0.6, 4.2 ± 0.3, 4.8 ± 0.3으로 72.3%, 67.0%, 63.0% 그리고 57.1%의 순으로 소핵생성 억제효과를 나타내었으며, 그 중 hexan 분획물이 2.8 ± 0.5의 75.0%로 가장 높은 소핵생성 억제효과를 나타내었다.

문 헌

- Roland, J.F., Chmielwicz, Z.F., Weiner, B.A., Gross, A., Boering, O.P., Luck, J.V., Bardos, T.J., Reall, H.C., Sugiura, K., Stock, C.C., Lucas, E.H. and Scevena, J.A.: Calvacine a new antitumor agent. *Science*, **132**, 1987-1993 (1960)
- Ikekawa, J., Nakamishi, M., Uehara, N., Chihara, G. and Fukuoka, F.: Antitumor action of some basidiomycetes especially *Phellinus linteus*. *Gann.*, **59**, 155-157 (1968)
- Hartwell, J.L.: Plants used against cancer. A survey. *Lloydia.*, **34**, 386-389 (1971)
- Maeda, Y.Y. and Chihara, G.: Lentinan, a new immunaccelerator of cell-mediated responses. *Nature* (London),

- 229, 634-636 (1971)
5. Lin, J.Y., Lin, Y.J., Chen, C.C., Wu, H.L., Shi, G.Y. and Jeng, T.W. : Cardiotoxic protein from edible mushroom. *Nature (London)*, **252**, 235-237 (1974)
 6. Sasaki, T. and Tasasuka, N. : Further studies of the structure of lentinan, an antitumor polysaccharides from *Lentinus edodes*. *Carbohydr. Res.*, **47**, 99-104 (1976)
 7. Kim, B.K., Park, E.K. and Shim, M.J. : Studies on constituents of higher fungi of Korea (X XIV), antineoplastic activities of *Coriolus versicolor* (Fr.) Qel, *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kummer and *Lentinus edodes* (Berk) Sing. *Arch. Pharm. Res.*, **2**, 145-149 (1979)
 8. Kim, H.M., Han, S.B., Oh, G.T., Kim, Y.H., Hong, D.H. and Yoo, L.D. : Stimulation of humoral and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. *Int. J. Immunopharmacol.*, **18**, 295-303 (1996)
 9. Han, S.G., Lee, C.W., Jeon, Y.J., Hong, N.D., Yoo, I.D., Yang, K.H. and Kim, H.M. : The inhibitory effect of polysaccharides isolated from *Phellinus linteus* on tumor growth and metastasis. *Immunopharmacology*, **41**, 157-164 (1999)
 10. Lee, J.W., Baek, S.J., Bang, K.W., Kang, S.W., Kang, S.M., Kim, B.Y. and Ha, I.S. : Biological activities of polysaccharide extracted from the fruit body and cultured mycelia of *Phellinus linteus* IY001. *Kor. J. Food Sci. Technol.*, **32**, 726-735 (2000)
 11. Kim, D.H., Choi, H.F., Bae, E.A., Han, M.J. and Park, S.Y. : Effect of artificially culture *Phellinus linteus* on harmful intestinal bacteria enzymes at intestinal β -glucosidases. *J. Food Hyg. Safe*, **13**, 20-23 (1998)
 12. Sung, J.M., Kim, C.H., Yang, K.J., Lee, H.K. and Kim, Y.S. : Studies on distribution and utilization of *Cordyceps militaris* and *C. nutans*. *Kor. Mycol.*, **21**, 94-105 (1993)
 13. Shimizu, D. : *Color iconography of vegetable wasps and plant worms*. Seibundo Shinkosha, Japan, p.381 (1994)
 14. Martin, A. and Martin, C. : Comparison of 5 microplate colorimetric assay for *in vitro* cytotoxicity testing and cell proliferation assays. *Cytotechnology*, **11**, 49-54 (1997)
 15. Carmichael, J., Degraff, W.G., Gazdar, A.F., Minna, J.D. and Mitchell, J.B. : Evaluation of a tetrazolium-based automated colorimetric assay. Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.*, **47**, 936-949 (1987)
 16. von Ledebur, M. and Schmid, W. : The micronucleus test. methodological aspects. *Mutat. Res.*, **19**, 109-117 (1973)
 17. Schmid, W. : The micronucleus test. *Mutat. Res.*, **31**, 9-15 (1975)
 18. National Research Council : *Diet, Nutrition and Cancer*. National Academy Press Washington D.C., chapters 18 (1982)
 19. Hiroshi, F., Satsui, O., Masanori, I., Mikio, M., Shinji, N., Michie, S., Masanori, T., Yoshikumi, C. and Yshio, K. : Effect of PSK, A protein bound polysaccharide from *Coriolus versicolor*, on drug-metabolizing enzyme in sarcoma 180 bearing and normal mice. *Int. J. Immunopharmacol.*, **10**, 445-451 (1988)
 20. Youlchi, M. and Osamu, Y. : Activation by protein bound polysaccharide PSK (krestin) cytotoxic lymphocytes that act on fresh autologous tumor cells and T24 human urinary bladder transitional carcinoma cell line in patients with urinary bladder cancer. *J. Urology*, **145**, 1082-1088 (1991)
 21. Kweon, M.H., Lim, E.J. and Sung, H.C. : Studies on bioactive polysaccharide isolated form *Agaricus bisporus*. *Agric. Chem. Biotech.*, **41**, 60-66 (1998)
 22. Kim, S.W. : Studies on anti-microbial and anti-cancer function of polysaccharide extracted *Ganoderma lucidum*. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.*, **27**, 1183-1188 (1988)
 23. Chen, Y.J., Shiao, M.S., Lee, S.S. and Wang, S.Y. : Effect of *Cordyce sinensis* on the proliferation and differentiation of human leukemia U937 cells. *Life Sci.*, **60**, 2349-2359 (1997)
 24. Miyazaki, J., Oikawa, N. and Yamada, H. : Studies on fungal (*Penicillium chrysogenum*) polysaccharides. XX. Galactomannan of *Cordyceps sinensis* (Lepi doptera). *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **25**, 3324-3330 (1977)
 25. Kuo, Y.C., Lin, C.Y., Tsai, W.J., Wu, C.L., Chen, C.F. and Shiao, M.S. : Growth inhibitors against tumor cells in *Cordyceps sinensis* other than cordycepin and polysaccharides. *Cancer Invest.*, **12**, 611-618 (1994)

(2001년 5월 17일 접수)