

CCl₄ 유도 肝 독성에 대한 冬蟲夏草의 항산화 효과

민건우, 박종혁, 신상국, 윤철호, 서운교, 정지천, 한영환¹⁾, 신억섭²⁾
동국대학교 한의과대학 내과학교실, 동국대학교의료원 약제과¹⁾, 동국대학교 자연과학대학 생물학과²⁾

Effects of *Cordyceps Sinensis* and *Cordyceps Militaris* on Antioxidation in liver of CCl₄-treated rats

Gun-Woo Min, Jong-Hyuck Park, Sang-Guk Shin, Cheol-Ho Yoon, Woon-Gyo Seo, Ji-Cheon Jeong, Yeong-Hwan Han¹⁾, Uk-Seob Shin²⁾

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dongguk University, Department of Pharmacy, Dongguk Medical Center¹⁾, Department of Biology, College of Natural Science, Dongguk University²⁾

Objectives : This study was performed to investigate the effects of *Cordyceps Sinensis* (CS) and *Cordyceps Militaris* (CM) on antioxidation in the livers of CCl₄-treated rats.

Methods : Hepatotoxicity in rats was induced by carbon tetrachloride. CCl₄-induced rats were administered with the extract of CS and CM.

Results : In vitro, CS and CM didn't affect levels of lipid peroxide and the activities and type conversion ratio of xanthine oxidase. However, hydroxyl radicals and DPPHL radicals were decreased. In vivo, in the CCl₄-treated rats, lipid peroxide, the activities and type conversion ratio of xanthine oxidase and superoxide radicals were increased but superoxide dismutase was decreased. After CS and CM were administered to CCl₄-treated rats, levels of lipid peroxide, the activities and type conversion ratio of xanthine oxidase and superoxide radicals were decreased but superoxide dismutase was increased.

Conclusions : These results suggest that CS and CM decrease the activities of free-radical-generating enzymes which form lipid peroxide and increase the activities of oxygen free radical scavenging enzymes. (*J Korean Oriental Med* 2001;22(3):31-41)

Key Words: *Cordyceps Sinensis*, *Cordyceps Militaris*, free radical, antioxidation

서론

Free radical은 세포에 지나친 과산화반응을 일으켜 세포의 기능을 현저하게 저하시키거나 괴사시킴으로써 노화반응의 진행과 밀접한 관계가 있고^{1,2)}, 여러

조직에서 심한 독성을 나타내어 간질환, 치매, 심근경색, 신부전 등 많은 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다³⁾. Free radical의 생성에는 xanthine oxidase와 aldehyde oxidase 등의 효소들이 관계하며, superoxide dismutase, catalase 및 glutathione peroxidase 등의 효소에 의하여 분해된다^{4,5)}.

肝障害는 간실질 장애와 담즙 분비 장애의 2가지로 대별되는데 간실질 장애는 실험적으로 carbon tetrachloride (CCl₄), d-galactosamine, thioacetamide,

· 접수 : 2001년 5월 10일 · 채택 : 6월 20일
· 교신저자 : 민건우, 서울시 강남구 논현1동 37-21 동국대 강남한방병원
(Tel. 02-3416-9792, Fax. 02-3444-9171, E-mail: icalus11@hitel.net)

ethionine 등을 이용하여 독성 동물모형을 만들 수 있다⁹⁾. 본 실험에 사용된 CCl₄는 간세포 소포체내 약물 대사 효소계인 monooxygenation system의 작용을 받아 free radical metabolite로 변하는데, 이 free radical이 간세포의 고분자 구조로 되어 있는 막지질과 결합함으로써 세포막의 과산화를 유발하여 세포손상을 초래하는 것으로 알려져 있다¹⁰⁾.

冬蟲夏草는 麥角菌 (*Clavicipitaceae*)에 속한 冬蟲夏草菌이 박쥐나방과 곤충인 蟲草蝙蝠蛾 (*Hepialus armoricanus* O.) 등의 幼蟲에 기생하여 자란 子實體와 幼蟲을 건조한 것이다. 補虛損, 益精氣, 補肺腎, 止喘咳, 止血化痰 등의 效能으로 陽痿, 病後久虛不復, 自汗盜汗, 遺精, 痰飲喘嗽 등의 치료에 사용되어 왔다¹¹⁻¹⁵⁾. 冬蟲夏草에 대한 실험연구로는 항암¹⁶⁾, 면역기능 증강효과¹⁷⁾ 및 陽虛 동물모형에서 항산화작용¹⁸⁾과 관련된 보고가 있다. 血府逐瘀湯과 관련된 보고¹⁹⁾가 있으나, 冬蟲夏草를 이용하여 肝障害시 발생하는 free radical 소거에 관한 연구는 아직 없었다.

이에 저자는 CCl₄로 유발된 독성 동물모형에서 冬蟲夏草 (*Cordyceps sinensis*) 및 변태기 冬蟲夏草 (*Cordyceps militaris*)의 배양체와 균사체에 의한 free radical의 소거효과에 대하여 실험을 시행한 결과, 유의한 효과를 얻었기에 보고하고자 한다.

실험 재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

*Cordyceps sinensis*의 배양체 (CSB : *Cordyceps sinensis* broth)와 균사체 (CSM : *Cordyceps sinensis* mycelia) 및 *Cordyceps militaris*의 배양체 (CMB : *Cordyceps militaris* broth)와 균사체 (CMM : *Cordyceps militaris* mycelia)를 본 실험의 약재로 사용하였다.

2) 시약 및 기기

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPHL), 2,3-dihydroxy benzoic acid, albumin bovine, cytochrome C, dimethyl sulfoxide (DMSO), glutathione reduced from,

hematoxylin, nicotineamide adenine dinucleotide (NAD), sodium chloride, sodium hydroxide, thiobarbituric acid sodium salt, uric acid sodium salt, xanthine sodium salt, (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetra-zolium bromide) (MTT)는 Sigma사 제품을, nicotineamide adenine dinucleotide phosphate reduced form (NADPH)은 Kohjin사, trichloroacetic acid는 Nakarai사 제품을, potassium phosphate mono and dibasic은 Wako pure Chemical은 Fluka사 제품을 각각 사용하였고, 그외 본 실험에 사용한 기타 모든 시약은 특급품을 구입하여 사용하였다.

3) 동물

동일한 조건 아래 사육된 외관상 건강한 웅성 Sprague-Dawley계 흰쥐 (체중 250 g 내외)를 사용하였다.

2. 방법

1) 冬蟲夏草 菌絲體 (mycelia) 배양

*Cordyceps sinensis*와 *Cordyceps militaris*의 배양은 준비된 10 ml의 포자용액 (10⁴ spores/ml)을 100 ml GYT 액체배지 (250 ml 삼각플라스크, 조성 : glucose 5%, yeast extract 0.5%, tryptone 0.2%)에 접종하여 27℃에서 10일간 진탕배양하였다. 준비된 액체 종균 100 ml를 20 l의 水桶 배양기에 접종하여 27℃에서 10일간 定置培養하였다. 水桶 배양기에는 에어펌프로부터 여과기 (milipore $\phi=0.2 \mu\text{m}$)를 통과한 제균 공기가 배양기내의 액체배지에 산소가 충분히 공급 되도록 하였다.

2) 冬蟲夏草 菌絲體 및 培養濃縮 시료의 제조

① 冬蟲夏草 菌絲體 試料 (CSM 및 CMM)의 제조
액체 배양된 배양액을 두겹의 거즈 (gauze)로 여과한 후, 걸러진 균사체를 증류수로 2-3회 세척하였다. 회수된 균사체를 24시간 동안 동결 (-20℃)한 다음 동결건조기 (-50℃, 9 mmTorr)로 건조하여 사용하였다.

② 冬蟲夏草 培養濃縮液 試料 (CSB 및 CMB)의 제조

액체 배양된 배양액을 두겹의 거즈 (gauze)로 여과한 후, 여액을 원심분리하여 胞子와 잔존하는 균사체

는 제거하였다. 상등액을 감압농축하여 배양 농축액을 얻은 후, 24시간 동안 동결 (-20℃)하였다. 동결된 농축 시료는 동결건조기 (-50℃, 9 mmTorr)로 건조한 후 사용하였다.

3) 약물의 투여

실험동물은 정상군, 冬蟲夏草 투여군, CCl₄ 투여군, CCl₄ · 冬蟲夏草 투여군으로 나누었고, 실험 전 16시간 동안 물만 주고 절식시켰다. 정상군은 체중 kg당 200 mg의 생리식염수를 경구 투여하였고, CCl₄ 투여군은 실험동물 체중 Kg당 50 mg의 CCl₄를 복강주사한 후 16시간이 경과한 다음 도살하여 실험을 행하였고, CCl₄ · 冬蟲夏草 투여군은 CCl₄를 투여하여 독성을 유발시킨 상태에서 冬蟲夏草 추출물을 일정기간 동안 투여한 후 실험에 이용하였다.

4) Carbon tetrachloride 독성 동물모형

CCl₄를 이용한 독성 동물모형은 Diaz-Gomez 등의 방법²⁰⁾을 참고하여 실시하였다. 실험동물 체중 Kg당 50 mg의 CCl₄를 복강주사한 후 16시간이 경과한 다음 도살하여 실험을 행하였다. 대조군은 동량의 생리식염수를 주사하였다.

5) 효소원의 조제

실험동물을 ether로 마취시킨 다음 복부 정중선을 따라 개복하여 복부대동맥으로 부터 혈액을 채취하고 0.9% 생리식염수로 관류시킨 간을 적출하였다. 적출한 간은 생리식염수에 씻은 다음 여지로 가볍게 압박하여 이물질을 제거하였다. 간 조직 1g당 4배량의 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5, 이하 K.P. buffer로 약함)를 가하여 빙냉하에서 glass teflon homogenizer로 마쇄하였다. 이 마쇄 균질액을 600 × g에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미마쇄부분을 제거한 상정액을 얻고 그 중 일부를 취하여 과산화지질의 함량 측정에 사용하였다. 이것을 다시 10,000 × g에서 20분간 원심분리하여 mitochondrial fraction을 얻었다. 한편 mitochondrial fraction을 제거시킨 상정액을 105,000 × g에서 1시간 동안 초원심분리하여 cytosolic fraction을 분리하였다. Cytosolic fraction은 superoxide dismutase 및 xanthine oxidase 활성 측정의 효소원으로 사용하였다. 이상의 모든 조작은 0-4℃에

서 행하였다.

6) 효소 활성의 측정

① Xanthine oxidase

Xanthine oxidase (type O) 활성 측정은 Stirpe 등의 방법²¹⁾에 준해 0.1 M K.P. buffer (pH 7.5) 일정량에 기질인 xanthine 60μM 및 효소원을 첨가하여 37℃에서 5분간 반응시킨 다음 20% TCA를 가하여 제단백시키고 원심분리하였다. 이때 생성되어진 uric acid를 파장 292 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 효소의 활성도를 산정하였다. 한편 xanthine dehydrogenase (type D)의 활성은 type O의 활성 측정 반응액에 coenzyme인 NAD⁺ 100 mM을 첨가해 동일하게 반응시킨 다음 측정하여 나온 활성도 (total type: type D+O) 에서 type O의 활성을 감한 값으로 산정하였다. 효소의 활성도는 1분당 1 mg의 단백질이 생성시킨 uric acid 양을 nmole로 나타내었다. 한편 xanthine oxidase의 형전환비 산출은 xanthine dehydrogenase 및 xanthine oxidase 반응에서 얻어진 효소의 활성도를 이용하여 xanthine dehydrogenase (type D)에서 xanthine oxidase (type O)로의 형전환 비율을 O/O+D의 비로 산출하였다.

② Superoxide dismutase

Superoxide dismutase 활성 측정은 Martin 등의 방법²²⁾에 준해 실시하였다. 효소원 조제 방법에 따라 분리된 cytosolic fraction에 EtOH : CHCl₃ (5 : 3) 혼액 0.4배량을 가하여 잘 혼합한 다음 10,000 × g에서 20분간 원심분리하여 상정액을 얻고 이것을 superoxide dismutase 활성 측정 효소원으로 사용하였다. 반응액은 50 mM K.P. buffer (pH 7.5, EDTA 0.1 mM 함유) 일정량에 5 mM hematoxylin, 효소액의 용량을 달리 하여 첨가하고 최종 반응액이 3.0 ml가 되게하였다. 이 반응액을 25℃에서 5분간 반응시킨 다음 560 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 효소 활성을 산정하였다. 효소 활성의 unit는 효소를 넣지않고 반응시킨 5 mM hematoxylin액의 흡광도 증가를 50% 억제하는 단백질의 양으로 산정하였다.

7) 과산화지질 함량 측정

과산화지질 함량 측정은 Ohkawa 등의 방법²³⁾에 준

해 간조직 마쇄균질액 일정량에 8.1% sodium dodecyl sulfate, 20% acetate buffer (pH 3.5) 및 0.8% thiobarbituric acid (TBA) 용액을 가해 95℃에서 1시간 동안 반응시킨 후 실온으로 냉각한 다음 생성된 홍색의 TBA reactive substance를 n-Butanol : Pyridine (15 : 1) 혼액으로 이행시켜 파장 532 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 정량하였다. 과산화지질의 함량은 조직 1 g당 MDA의 양을 nmole로 나타내었다.

8) Superoxide anion radical 정량

Superoxide radical 함량 측정은 Azzi 등의 방법²⁴⁾에 준해 50 mM K.P. buffer (pH 7.5) 일정량에 기질인 90 mM succinate, 150 mM KCl, 30 mM KCN, 0.3 mM cytochrome C 및 mitochondria 효소원을 첨가하여 최종반응액이 3.0 ml가 되게 하였다. 이 반응액을 37℃에서 일정시간 동안 반응시키면서 550 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 superoxide radical의 함량을 산정하였다. Superoxide radical의 함량은 1 mg의 단백질이 생성시킨 reduced cytochrome C의 양을 nmole로 나타내었다.

9) Hydroxyl radical 정량

Hydroxyl radical 함량 측정은 Richmond 등의 방법²⁵⁾에 따라 0.1 M K.P. buffer (pH 7.4)에 2.5 mM sodium salicylate, 0.3 mM EDTA, 0.1 mM FeSO₄, 1 mM H₂O₂, 0.2 mM hypoxanthine 및 정제 xanthine oxidase를 첨가시켜 25℃에서 90분간 반응시킨 다음 11.65 N HCl로 반응을 종료시키고 반응산물을 ether로 이행, 추출, 건조시킨 후 증류수 1 ml에 녹여 10% TCA, 10% sodium tungstate, 0.5% sodium nitrite 및 0.5 M KOH 용액을 가해 발색시킨 다음 파장 510 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 hydroxyl radical의 함량을 산정하였다. Hydroxyl radical의 함량은 상기 반응에서 salicylic acid로부터 hydroxyl radical에 의해서 생성된 2,3-dihydroxy benzoic acid 양을 nmole로 나타내었다.

10) DPPHL radical 정량

DPPHL의 정량은 Blois 등의 방법²⁶⁾에 준하여 실시하였다. DMSO 일정량에 drug 0.1 ml와 DPPHL 50 μl를 가하여 실온에서 30분간 방치시킨 다음 그 반응

액을 파장 516 nm에서 흡광도를 측정하여 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl 이 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazin으로 환원되는 정도를 측정하여 활성을 산정하였다.

11) 단백질 정량

단백질의 정량은 Lowry 등의 방법²⁷⁾에 준해 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 행하였다. 한편 실험 결과의 유의성 검증은 Student's t-test를 이용하여 상호 비교하였다.

실험 성적

1. 시험관내에서 과산화지질 반응에 미치는 영향

冬蟲夏草 CSB, CSM, CMB 및 CMM 추출물 농도를 증가시켜 가면서 37℃에서 일정시간동안 반응시킨 뒤 과산화지질의 함량을 관찰한 결과, CSB, CSM, CMB 및 CMM 투여군 모두에서 과산화지질의 함량 변화를 관찰할 수 없었다 (Fig. 1).

2. 시험관내에서 xanthine oxidase 활성에 미치는 영향

冬蟲夏草 CSB, CSM, CMB 및 CMM 추출물을 농도별로 시험관내에 첨가시키면서 xanthine oxidase 활

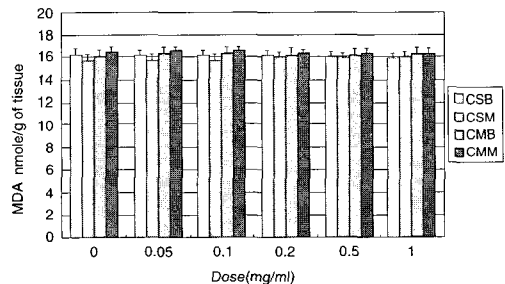


Fig. 1. Effect of the extract of Cordyceps sinensis and Cordyceps militaris on the content of hepatic lipid peroxide in vitro. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean ± SE for 3 separated experiments.

CSB : Cordyceps sinensis Broth, CSM : Cordyceps sinensis Mycelia
CMB : Cordyceps militaris Broth, CMM : Cordyceps militaris Mycelia

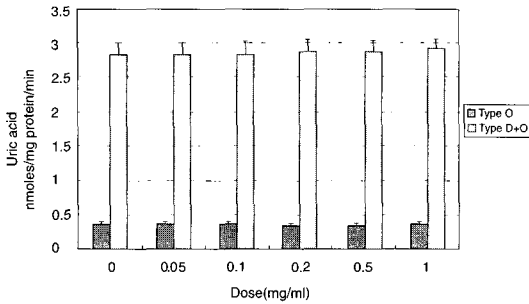


Fig. 2-1. Effect of the extract of CSB (CSB : *Cordyceps sinensis* Broth) on the hepatic xanthine oxidase activity *in vitro*. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean \pm SE for 3 separated experiments.

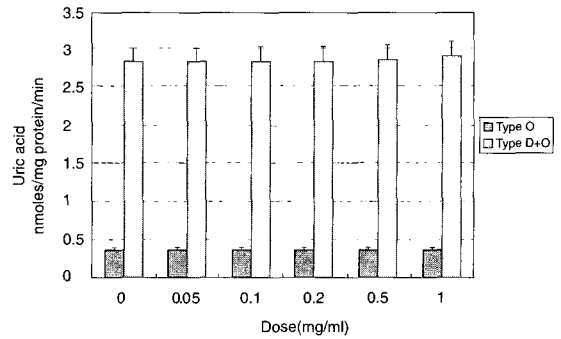


Fig. 2-2. Effect of the extract of CSM (CSM : *Cordyceps sinensis* Mycelia) on the hepatic xanthine oxidase activity *in vitro*. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean \pm SE for 3 separated experiments.

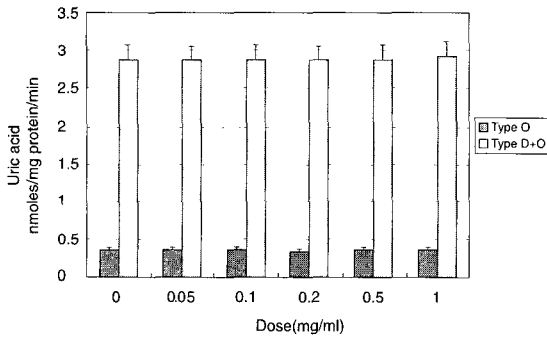


Fig. 2-3. Effect of the extract of CMB (CMB : *Cordyceps militaris* Broth) on the hepatic xanthine oxidase activity *in vitro*. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean \pm SE for 3 separated experiments.

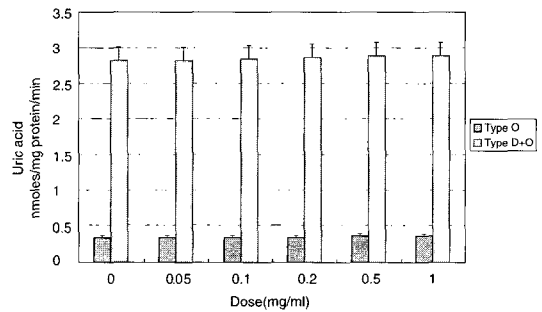


Fig. 2-4. Effect of the extract of CMM (CMM : *Cordyceps militaris* Mycelia) on the hepatic xanthine oxidase activity *in vitro*. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean \pm SE for 3 separated experiments.

성을 관찰한 결과, 첨가 농도를 1.0 mg/ml까지 증가 시켜도 xanthine oxidase 활성에는 아무런 영향을 미치지 않았다 (Fig. 2-1, 2-2, 2-3, 2-4).

3. 시험관내에서 xanthine oxidase 형전환에 미치는 영향

冬蟲夏草 CSB, CSM, CMB 및 CMM 추출물을 농도별로 시험관내에 첨가시키면서 xanthine oxidase의 형전환비를 관찰한 결과, 첨가 농도를 1.0 mg/ml까지 증가시켜도 xanthine oxidase 형전환에는 아무런 영향을 미치지 않았다 (Fig. 3).

4. Hydroxyl radical 소거효과에 미치는 영향

冬蟲夏草 CSB, CSM, CMB 및 CMM 추출물을 첨가한 모든 시험관에서 hydroxyl radical의 소거효과가 관찰되었다. 첨가 농도가 0.2 mg/ml되게 하였을 때 CSB에서만 유의성 있는 소거효과가 관찰되었으며, 0.5 mg/ml 이상의 첨가 농도에서는 CSB, CSM, CMB 및 CMM 모두에서 유의성 있는 hydroxyl radical 소거효과가 관찰되었다. 또한 균사체와 배양체를 비교하였을 때 균사체보다는 배양체의 소거효과가 강하게 나타남을 알 수 있었다 (Fig. 4).

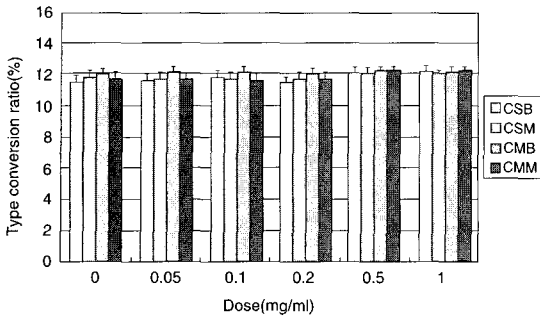


Fig. 3. Effect of the extract of *Cordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris* on the type conversion of hepatic xanthine oxidase *in vitro*. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean \pm SE for 3 separated experiments.
 CSB : *Cordyceps sinensis* Broth, CSM : *Cordyceps sinensis* Mycelia
 CMB : *Cordyceps militaris* Broth, CMM : *Cordyceps militaris* Mycelia

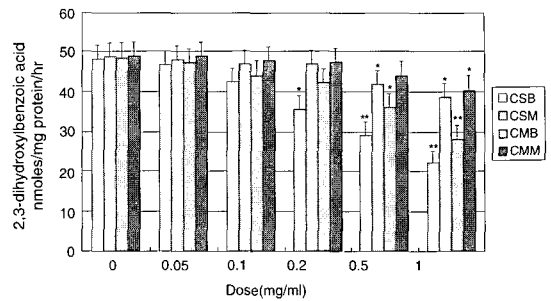


Fig. 4. Effect of the extract of *Cordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris* on the hydroxyl radical scavenging *in vitro*. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean \pm SE for 3 separated experiments. Significantly different from control.
 CSB : *Cordyceps sinensis* Broth, CSM : *Cordyceps sinensis* Mycelia
 CMB : *Cordyceps militaris* Broth, CMM : *Cordyceps militaris* Mycelia.
 * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$

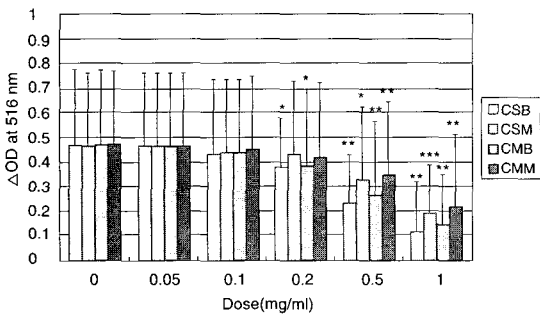


Fig. 5. Effect of the extract of *Cordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris* on the DPPHL radical scavenging *in vitro*. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean \pm SE for 3 separated experiments. Significantly different from control.
 CSB : *Cordyceps sinensis* Broth, CSM : *Cordyceps sinensis* Mycelia
 CMB : *Cordyceps militaris* Broth, CMM : *Cordyceps militaris* Mycelia
 * : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$

5. DPPHL radical 소거효과에 미치는 영향

冬蟲夏草 CSB, CSM, CMB 및 CMM 추출물을 농도별로 시험관내에 첨가시켰을 때 첨가 농도가 0.05 mg/ml, 0.1 mg/ml 일 경우 별다른 효과를 나타내지 않았으나, 첨가량이 0.2 mg/ml에서는 CSB와 CMB에서

유의성 있는 free radical 소거효과가 관찰되었다. 첨가량이 0.5 및 1.0 mg/ml 일 경우는 CSB, CSM, CMB 및 CMM 추출물에서 소거효과가 더욱 강하게 나타났다. 또한 배양체의 소거효과가 균사체보다 더욱 현저하게 나타났다 (Fig. 5).

6. 과산화지질 함량에 미치는 영향

정상군의 경우 과산화지질의 함량이 16.4 nmole이었으나, CCl₄ 투여군은 34.7 nmole로 정상군에 비해 약 112% 정도 현저한 과산화지질 함량증가 현상이 관찰되었다. 그러나 CCl₄ · 冬蟲夏草 투여군의 경우 CSB 투여군은 24.5 nmole, CSM 투여군은 28.1 nmole, CMB 투여군은 26.8 nmole, CMM 투여군은 30.4 nmole로 CCl₄ 투여군에 비해서 각각 29%, 19%, 23%, 12% 정도의 유의성 있는 과산화지질 감소효과가 관찰되었는데, 균사체보다는 배양체에서 더 강한 효과가 나타났다 (Fig. 6).

7. Xanthine oxidase 활성에 미치는 영향

정상군이 0.33 nmoles인데 비하여 CCl₄ 투여군의

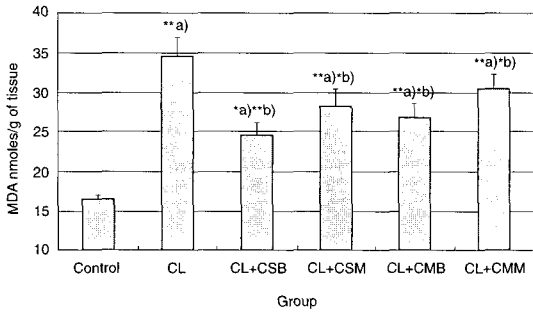


Fig. 6. Effect of the extract of *Cordyceps sinensis* and *militaris* on the content of hepatic lipid peroxide in CCl₄-treated rats. Rats were received with *Cordyceps sinensis* and *militaris* extract (200 mg/kg, p.o.) daily for 10 days and killed 16 hrs after CCl₄ (50 mg/kg) treatment. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean ± SE for 5 animals. a) Significantly different from control, b) Significantly different from CCl₄-treated group. * : P<0.05, ** : P<0.01
 CL : CCl₄-treated group, CSB : *Cordyceps sinensis* Broth, CSM : *Cordyceps sinensis* Mycelia
 CMB : *Cordyceps militaris* Broth, CMM : *Cordyceps militaris* Mycelia

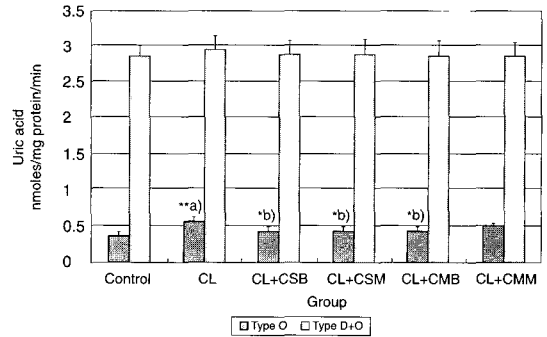


Fig. 7. Effect of the extract of *Cordyceps sinensis* and *militaris* on the hepatic xanthine oxidase activity in CCl₄-treated rats. Rats were received with *Cordyceps sinensis* and *militaris* extract (200 mg/kg, p.o.) daily for 10 days and killed 16 hrs after CCl₄ (50 mg/kg) treatment. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean ± SE for 5 animals. a) Significantly different from control, b) Significantly different from CCl₄-treated group. * : P<0.05, ** : P<0.01
 CL : CCl₄-treated group, CSB : *Cordyceps sinensis* Broth, CSM : *Cordyceps sinensis* Mycelia
 CMB : *Cordyceps militaris* Broth, CMM : *Cordyceps militaris* Mycelia

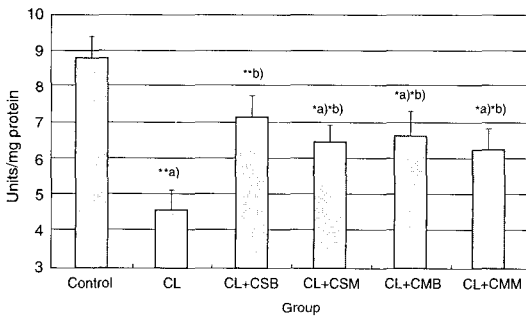


Fig. 8. Effect of the extract of *Cordyceps sinensis* and *militaris* on the hepatic superoxide dismutase activity in CCl₄-treated rats. Rats were received with *Cordyceps sinensis* and *militaris* extract (200 mg/kg, p.o.) daily for 10 days and killed 16 hrs after CCl₄ (50 mg/kg) treatment. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean ± SE for 5 animals. a) Significantly different from control, b) Significantly different from CCl₄-treated group. * : P<0.05, ** : P<0.01
 CL : CCl₄-treated group, CSB : *Cordyceps sinensis* Broth, CSM : *Cordyceps sinensis* Mycelia
 CMB : *Cordyceps militaris* Broth, CMM : *Cordyceps militaris* Mycelia
 CL : CCl₄-treated group, CSB : *Cordyceps sinensis* Broth, CSM : *Cordyceps sinensis* Mycelia

경우 0.56 nmole로 효소 활성이 약 70% 정도 현저하게 증가되었다. CCl₄ · 冬蟲夏草 투여군의 경우는 xanthine oxidase 활성이 CSB 투여군은 0.40 nmole, CSM 투여군은 0.44 nmole, CMB 투여군은 0.44 nmole, CMM 투여군은 0.49 nmole로 CCl₄ 투여군의 0.56 nmole에 비해 각각 28%, 21%, 21%, 12% 정도의 유의성 있는 효과를 보였는데, 군사체보다는 배양체에서 강한 효과가 나타났다 (Fig. 7).

8. Superoxide dismutase 활성에 미치는 영향

정상군은 8.74 unit인데 비하여 CCl₄ 투여군은 4.57 unit으로 약 48% 정도의 현저한 활성 감소 현상이 관찰되었다. CCl₄ · 冬蟲夏草 투여군의 경우 효소활성이 CSB 투여군은 7.13 unit, CSM 투여군은 6.44 unit, CMB 투여군은 6.62 unit, CMM 투여군은 6.24 unit으로 정상군 수준으로 유의성 있게 회복되는 경향을 보였는데, 배양체에서 군사체보다 강한 효과가 나타났다 (Fig. 8).

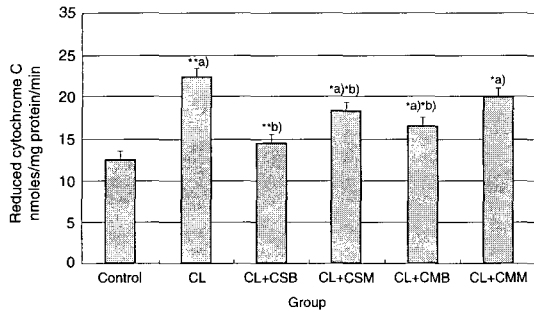


Fig. 9. Effect of the extract of *Cordyceps sinensis* and *militaris* on the hepatic superoxide radical content in CCl₄-treated rats. Rats were received with *Cordyceps sinensis* and *militaris* extract (200 mg/kg, p.o.) daily for 10 days and killed 16 hrs after CCl₄ (50 mg/kg) treatment. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean ± SE for 5 animals. a) Significantly different from control, b) Significantly different from CCl₄-treated group. * : P<0.05, ** : P<0.01
 CL : CCl₄-treated group. CSB : *Cordyceps sinensis* Broth, CSM : *Cordyceps sinensis* Mycelia
 CMB : *Cordyceps militaris* Broth, CMM : *Cordyceps militaris* Mycelia

9. Superoxide anion radical 소거작용에 미치는 영향

정상군은 12.47 nmoles인데 비하여 CCl₄ 투여군의 경우는 22.39 nmoles로 정상군에 비해 유의성 있는 함량 증가현상이 관찰되었다. CCl₄ · 冬蟲夏草 투여군의 경우 CSB 투여군은 14.71 nmole, CSM 투여군은 18.45 nmole, CMB 투여군은 16.77 nmole, CMM 투여군은 20.16 nmole로 CCl₄ 투여군의 22.39 nmoles에 비해 각각 34%, 17%, 25%, 9% 정도의 유의성 있는 효과가 관찰되었다 (Fig. 9).

고 찰

생체의 과산화 반응은 체내의 생화학 반응 과정 중에 생성되는 free radical이 세포의 다가불포화지방산을 공격함으로써 연쇄적으로 산화가 촉진되어 다량의 과산화물이 생성되는 것으로, 세포의 기능을 현저하게 저하시키거나 세포를 죽게 한다²⁸⁾. Free

radical은 다양한 질병을 유발시키지만 한편으로는 체내에서 미생물을 제거시켜 병원성 미생물로 인한 감염성 질환을 예방하기도 한다²⁹⁾. 체내의 과도한 free radical은 세포손상을 유발시켜 중추신경계 질환, 심근경색, 급성 신부전, 갑상선 기능항진증 등을 발생시킬 수 있다^{30,31)}.

冬蟲夏草는 冬蟲夏草菌의 子實體와 그 宿主 및 蛾科 곤충인 蟲草蝠蝠蛾 (*Hepialus armoricanus Oberthur*) 등으로 구성된 幼蟲屍體의 복합체이다. 원래는 박쥐나방과의 유충에서 나온 *Cordyceps sinensis*를 지칭하는 것이나, 오늘날에는 곤충 뿐만 아니라 거미, 균류 등에서 나오는 버섯을 총칭해서 冬蟲夏草라 한다¹¹⁻¹²⁾. 약리작용으로는 기관지 확장 · 진정 · 최면 · 항균 · 동물의 장관 · 자궁 · 심장 등의 근육이완 · 정맥내 투여에 의한 비특이적 혈압하강 · 항암 및 노화 방지 작용 등이 있다¹³⁻¹⁵⁾. 임상에서는 만성 신염 · 위경련 · 폐암 · 유선암 · 임파암 · 전립선암 등의 기타 腫瘤 및 體質虛弱者 등 다양하게 사용되고 있다¹¹⁻¹⁵⁾.

이에 著者は 冬蟲夏草의 菌絲體와 培養濃縮液을 투여하여 CCl₄로 유도된 간독성 상태에서 항산화 효과에 미치는 영향을 살펴보고자 하였다.

Free radical에 의한 과산화반응은 세포막의 구성성분인 인지질과 활성산소의 반응으로 지질막의 과산화화가 유발되어 세포손상을 유발시킨다²⁸⁾. 이때 조직 중의 과산화지질의 함량을 측정함으로써 세포손상의 정도를 나타내는 척도로 사용한다. 이를 근거로 시험관내에 冬蟲夏草 *Cordyceps sinensis* 및 *Cordyceps militaris*의 균사체와 배양체 추출물을 농도별로 첨가시킨 뒤 과산화지질의 함량변화를 관찰한 결과 두 종류의 冬蟲夏草 균사체 및 배양체 모두에서 별다른 변화가 나타나지 않았다. 따라서 冬蟲夏草 *Cordyceps sinensis* 및 *Cordyceps militaris*의 균사체와 배양체 추출물은 생체외에서는 전혀 반응을 나타내지 않고 체내에서 어떠한 반응을 거친 다음에 활성을 나타내는 것으로 생각된다.

Free radical은 xanthine oxidase의 산화반응에 의해서 생성되어진다³²⁾. Xanthine oxidase는 체내의 정상

상태에서는 dehydrogenase (type D) 형태로 존재하다가 병태생리조건이 부여되면 oxidase (type O) 형태로 변화한다. Dehydrogenase 형태에서 oxidase 형태로의 변환을 형 전환이라 하는데, 형 전환이 많아지면 oxygen free radical의 생성이 많아진다³³⁾. 冬蟲夏草 추출물의 시험관내 농도를 증가시키면서 xanthine oxidase 활성과 형 전환비의 변화를 관찰한 결과 두 종류 冬蟲夏草 *Cordyceps sinensis* 및 *Cordyceps militaris*의 균사체와 배양체 추출물 모두에서 활성 및 형 전환비의 변화를 관찰할 수 없었다. 이는 冬蟲夏草가 체외에서는 활성을 나타내지 않고 체내에서 강한 활성을 나타내기 때문으로 생각된다.

冬蟲夏草의 항산화반응이 어떤 메카니즘에 의해서 나타나는 지를 확인하고자 다음 실험을 행하였다. Hydroxyl radical은 xanthine oxidase의 산화반응에 의해서 생성되는 oxygen free radical중 활성이 강하여 독성이 가장 크게 나타나는 free radical이다. 시험관내에 冬蟲夏草 *Cordyceps sinensis* 및 *Cordyceps militaris*의 균사체와 배양체 추출물을 농도별로 첨가시킨 뒤 hydroxyl radical의 scavenging 효과에 미치는 冬蟲夏草의 효능을 검토한 결과 *Cordyceps sinensis* 및 *Cordyceps militaris*의 균사체와 배양체 모두에서 강한 radical scavenging 효과가 관찰되었다. 작용의 강도는 *Cordyceps sinensis* 배양체, *Cordyceps militaris* 배양체, *Cordyceps sinensis* 균사체, *Cordyceps militaris* 균사체의 순이었다. 또 다른 free radical의 일종인 DPPHL radical scavenging 실험에서도 두 종류 冬蟲夏草의 균사체와 배양체 모두에서 강한 scavenging 효과가 관찰되었는데, 이 경우도 배양체가 균사체의 효능보다 더 강하게 나타났다. 이는 冬蟲夏草의 항산화작용이 직접적인 free radical의 소거效能에 의해 나타난 것으로 생각된다.

CCl₄를 투여하여 oxygen free radical의 생성 조건을 항진시킨 모델동물을 만든 다음 冬蟲夏草를 일정 기간 투여한 후 간조직 중에서 과산화지질 함량, xanthine oxidase 활성, superoxide dismutase 활성 및 superoxide radical scavenging 효과 등을 관찰한 결과, CCl₄ 투여군에서 현저하게 증가되던 과산화지질의

함량이 冬蟲夏草 투여에 의해서 유의성 있게 정상수준으로 감소되었으며, oxygen free radical 생성효소인 xanthine oxidase의 활성도 유의성 있게 정상수준으로 감소되었다. 이러한 결과는 冬蟲夏草가 체내에서 oxygen free radical의 생성을 저해시키는 작용에 의해서 항산화작용을 나타내는 것으로 생각된다.

Xanthine oxidase에 의해서 생성된 free radical은 독성이 강하므로 반드시 해독반응을 거쳐 독성을 줄이는 반응 메카니즘이 존재하게 되는데 이 해독효소 중의 하나가 superoxide dismutase이다³⁴⁾. Superoxide dismutase는 생성된 oxygen free radical을 독성이 훨씬 약한 hydrogen peroxide로 변화시킨다³⁵⁾. CCl₄ 투여군에서 현저하게 억제되던 superoxide dismutase의 활성이 冬蟲夏草의 투여로 유의성 있게 정상수준으로 회복되었다. Superoxide radical을 직접 정량한 실험에서는 CCl₄ 독성군에서 함량이 현저하게 증가되었으나, 冬蟲夏草의 투여에 의해서 정상화되었다. 이는 冬蟲夏草가 체내에서 독성물질의 작용에 의하여 비정상적으로 증가한 oxygen free radical의 농도를 저하시켜 free radical에 의해서 야기될 수 있는 독성을 경감시킨 것으로 사료된다.

이상으로 冬蟲夏草는 직접적인 free radical의 강한 소거작용을 지니고 있으며, 생체내에서는 free radical의 생성을 억제시키고 free radical 소거효소의 활성을 증가시켜 해독을 촉진시키므로서 free radical에 의해서 생길 수 있는 많은 질병을 예방할 수 있을 것으로 생각된다.

결론

冬蟲夏草가 肝障害시에 세포손상을 예방하는 지를 검토하기 위해 CCl₄를 투여하여 인위적으로 만든 독성모형에서 free radical의 소거에 미치는 영향을 관찰하였다.

시험관내에서 冬蟲夏草는 지질과산화 반응, xanthine oxidase 활성과 형 전환비에 대해서 아무런 영향을 미치지 않았다. Hydroxyl radical과 DPPHL radical에 대해서 농도 의존적으로 소거효과를 나타

내었으며, 작용 강도는 *Cordyceps sinensis* 배양체, *Cordyceps militaris* 배양체, *Cordyceps sinensis* 균사체, *Cordyceps militaris* 균사체의 순이었다. CCl₄ 투여에 의해 간장중의 과산화지질의 함량, xanthine oxidase 활성, superoxide radical은 유의성 있게 증가되었으나 冬蟲夏草 투여에 의하여 유의성 있게 감소되었다. Superoxide dismutase 활성은 CCl₄ 투여에 의해 유의성 있게 억제되었으나 冬蟲夏草 투여에 의해서 유의성 있게 증가되었다.

이상의 모든 실험성적들을 종합하여 볼 때 冬蟲夏草는 직접적인 free radical의 강한 소거작용을 지니고 있으며, 생체내에서는 free radical의 생성을 억제시키고 동시에 superoxide dismutase 활성을 증가시켜 해독을 촉진함으로써 free radical에 의해서 생길 수 있는 肝障害를 예방할 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Larry WO and Terry BO. Free radicals, aging and degenerative disease. Alan R. Liss. Inc. 1986:325-371.
2. Tappel AL. Lipid peroxidation damage to cell components. *Fed. Proceeding*, 1973;32:1870-1874.
3. Floyd RA. Fole of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB. J.* 1990;4:2587-2597.
4. Batteli NG, Lorenzoni E and Stirpe F. Milk xanthine oxidase type D (dehydrogenase) and type O (oxidase) : Purification and interconversion and some properties. *Biochem. J.* 1973;131:191-198.
5. Ross D. Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents : Mechanism of free radical induced toxicity and glutathione dependent protection. *Pharmacol. Ther.* 1988;37(2):231-239.
6. McCord JM. Free radical and inflammation : Protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science.* 1974;185:529-531.
7. Aebi H. La catalase erythrocytaire. In: Masson and Cie, eds. Exposes Annuels de Biochimie Medicale. 29 ieme serie.Paris. 1969:139-164.
8. Little C and O'Brien PJ. An intracellular GSH-peroxidase with lipid peroxide substrate. *Biochem.*

- Biophys. Res. Comm.* 1968;31:145-150.
9. Kamokawa A, Ohta S, Tatsugi A, Kumasaka M and Shinoda M. Experimental Production of Various Types of Cholestasis and the Effects of Cystemine. *YAKUGAKU ZASSHI.* 1986;106(8):709.
10. McCay PB, Lai EK, Poyer JL, DuBose CM and Jansen EG. Oxygen and Carbon-centered free radical formation during carbon tetrachloride metabolism, *J. Biol. Chem.* 1984;259:2135.
11. 신길구. 신씨본초학. 서울:수문사. 1988:143-144.
12. 江蘇新醫學院. 中藥大辭典. 上海:上海科學技術出版社. 1978:497-498.
13. 王浴生. 中藥藥理與應用. 北京:人民衛生出版社. 1983:357-360.
14. 鬱仁存. 中醫腫瘤學(下). 北京:北京科學出版社. 1997:213-214.
15. 육창수. 漢藥의 藥理·成分·臨床應用. 서울:癸丑文化社. 1982:710-712.
16. 張淑蘭 外. 冬蟲夏草及人工蟲草菌絲抗小鼠 Lewis 肺癌的研究. *中藥通報.* 1987;12(2):53.
17. 祝希媛 外. 人工培養冬蟲夏草菌粉對細胞免役的抑制作用. *中西醫結合雜誌.* 1990;10(8):485-487.
18. 이구형. 冬蟲夏草가 hydrocortisone으로 유발시킨 陽虛 動物模型에서 抗酸化 作用에 미치는 影響. 東國大學校 大學院 碩士學位論文. 1989.
19. 禹大潤, 李泰均, 文振榮, 林鍾國, 朴元煥, 南景琇. 人工膜과 Rat의 肝細胞를 이용한 血府逐瘀湯의 抗酸化作用에 關한 研究. *大韓韓醫學會誌.* 1996;17(1):465-477.
20. Diaz-Gomez MI, De Castro CR and Dacosta N. Species differences in carbon tetrachloride induced hepatotoxicity : The role of carbon tetrachloride activation and of lipid peroxidation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1975;34:102-114.
21. Stirpe F and Della Corte E. The regulation of rat liver xanthine oxidase : Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J. Biol. Chem.* 1969;244:3855-3863.
22. Martin JP, Daily M, Sugarman E. Negative and positive assays of superoxide dismutase based on hematoxylin autooxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 1987;255:329-336.
23. Ohkawa H, Ohishi N, Yaki K. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal.*

- Biochem.* 1979;95:351-358.
24. Azzi A, Montecucco C and Richter C. The use of acetylated ferricytochrome c for the detection of superoxide radicals produced in biological membranes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1975;65:597-603.
 25. Richmond R, Halliwell B, Chauhan J and Darbre A. Superoxide dependent formation of hydroxyl radicals : Detection of hydroxyl radicals by the hydroxylation of aromatic compounds. *Anal. Biochem.* 1981;118:328-335.
 26. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 1958;181:1199-1200.
 27. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951;193:265-275.
 28. Pryor WA, Stanley TP and Blair E. Autoxidation of polyunsaturated fatty acids(II), *Lipids*, 1976;11:370-379.
 29. Oyanagui Y. Inhibition of superoxide anion production in macrophage by antiinflammatory drugs. *Biochem. Pharmacol.* 1976;25:1473-1480.
 30. Pryor WA. Free radical in biology : Involvement of radical reaction in aging and carcinogenesis in medicinal chemistry. Amsterdam:Elsevier. 1977:331-361.
 31. Barry H. Oxidants and human disease : Some new concepts. *FASEB. J.* 1987;1:358-364.
 32. Beauchamp C and Fridovich I. A mechanism for the production of ethylene from methional : The generation of the hydroxyl radical by xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* 1970;245:4641-4646.
 33. Batteli NG, Lorenzoni E and Stirpe F. Milk xanthine oxidase type D (dehydrogenase) and type O (oxidase) : Purification and interconversion and some properties. *Biochem. J.* 1973;131:191-198.
 34. McCord JM and Fridovich L. Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 1967;244:6049-6055.