



## 곰벵이 유래 밀리타리스 동충하초 열수 추출물의 유전독성평가

조월순<sup>1</sup> · 남병혁<sup>1</sup> · 최유진<sup>1</sup> · 오수정<sup>1</sup> · 강은영<sup>1</sup> · 이상호<sup>2</sup> · 정민호<sup>1</sup>

<sup>1</sup>동아대학교 임상시험연구센터, <sup>2</sup>서귀포시 농업기술센터

## Genotoxicity Study of Water Extract of *Cordyceps militaris* Grown Upon *Protuetja dreujtarsis*

Wol Soon Jo<sup>1</sup>, Byung Hyouk Nam<sup>1</sup>, Su Jung Oh<sup>1</sup>, Yoo Jin Choi<sup>1</sup>,  
Eun-Young Kang<sup>1</sup>, Sang Ho, Lee<sup>2</sup> and Min Ho Jeong<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dong-A University Medical Science Research Center, Clinical Research Center, Busan 602-714  
<sup>2</sup>Seo Gwi Po Agricultral Technique Center, Jeju-do 697-943, Korea

Received June 30, 2007; Accepted July 24, 2007

Water extract of *Cordyceps militaris* grown upon *Protuetja dreujtarsis* (CMPD) was examined for the genetic toxicity-bacterial mutagenicity, chromosome aberration, and micronucleus formation. For mutagenicity assay, bacterial reversion test with *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA 1537, and *E. coli* WP2uvrA were performed. The extract at the concentrations of 50~5,000 µg/plate did not induce mutagenicity at all. Chromosome aberration test was performed by using Chinese lung (CHL) cells. There was no significant chromosome aberration in CHL cells with S-9 mixture at the concentrations of 312.5~1,250 µg/ml of the extract and without S-9 mixture at the concentrations of 1.2~19.5 µg/ml of the extract. For micronucleus test, ICR mice were treated with the extract at the dose of 0.5, 1, and 2 g/Kg. The frequencies of the micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) in bone marrow preparations of the extract-treated group were not increased compared to the untreated control group. Taken together, our results show that water extract of CMPD did not induce any harmful genotoxicity.

**Key words:** *Cordyceps militaris* extract, *Protuetja dreujtarsis*, Mutagenicity of *Salmonella*, Chromosome aberration, Micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE).

### 서 론

동충하초는 겨울에는 곤충의 몸에 있다가 여름에 풀처럼 나타나는데 유래한 말이다. 감염된 곤충으로부터 대형의 신장된 형태의 직립된 병을 가진 유색의 자낭자좌를 형성하는 것에 의해 최초로 곤충에 감염하는 균류로서 인식되었다(Lee, 1998). 즉, 동충하초균은 곤충의 몸에 침입하여 죽게 한 다음 그 기주의 양분을 이용하여 겨울에 자실체를 형성하면서 자라나며, 숙주특이성을 가지고 있어 이것에 따라 이름을 명명하기도 한다. 예로부터 동충하초는 증류본초와 본초 비요를 비롯한 중의학문헌에 보폐보

신(補肺補腎), 지혈화담(止血化痰), 비정익기(秘精益氣) 등의 효능이 있으며(Jo, 1998), 맛은 달(甘)고 따뜻(溫)하며, 향(香)이 있는 것으로 기록되어 있다(Bae et al., 1998).

동충하초는 분류학상으로 자낭균아문 핵균강 맥각균목 Clavicipitaceae과에 속하며, *Cordyceps*속으로 흔히 불린다. *Cordyceps*속은 200균종 이상의 다수 균종으로 구성되는 속으로 지중생의 균류 및 다양한 곤충류의 기생성을 나타낸다. 현재 우리나라에서는 70여종의 자생 동충하초가 보고되고 있으며, 눈꽃동충하초(*Cordyceps japonica*)와 밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*)를 식품으로 인정하고 있다. 곰벵이동충하초는 제주자생 '흰점박이꽃무지풍뎡이(*Protuetja dreujtarsis*)'인 곰벵이를 기주로 이용하여 자실체를 형성한 것이다. 밀리타리스를 포함한 동충하초는 항염증, 항균, 항종양, 면역증강 등 외부물질에 대한 보호작용, 자양강장, 정력증강, 항피로, 운동능력

Correspondence to: Min Ho Jeong, Dong-A University Medical Science Research Center, Clinical Research Center, Busan 602-714, Korea  
E-mail: mhjeong@dau.ac.kr

항상, 노화방지, 수명연장 등 기초대사활성 증강작용, 그리고 동맥경화 억제, 콜레스테롤과 중성지방 저하, 혈당강화, 고혈압 치료 등 질병억제 및 완화작용 등 다양한 기능을 보유하고 있는 것으로 알려져 있다(Park et al., 2002; Lee et al., 2004; Kim et al., 2005). 또한 곰팡이도 간보호 효과 뿐만 아니라 항암효과를 나타내는 것으로 알려져 있다(Park et al., 1998; Liang, 1990). 따라서 곰팡이를 기주로 하여 자란 밀리타리스 동충하초로부터 얻은 추출물은 이전 연구를 통해 간보호 효과를 나타내었으며, 현재 간기능개선 기능성 식품으로 개발 중에 있다. 이에 본 연구에서는 제주산 곰팡이로부터 자란 동충하초 균주로부터 얻은 열수추출물의 생체내 안전성 확보를 위한 기초자료로 유전 독성에 대한 평가를 실시하였다. 유전독성평가는 식품의약품안전청고시 제2005-60호(10.21)의 "의약품등의독성시험기준" 및 비임상관리 기준에 따라 미생물복귀 돌연변이시험, 염색체이상시험 및 소핵시험을 실시하였다.

## 재료 및 방법

**시료 및 시약.** 곰팡이유래 밀리타리스 동충하초 열수추출물(CMOD)은 갈색고형분말로 서귀포시 농업기술센터에서 제공받았다. 지표성분으로 코디세핀 함량을 측정하였으며, 시험 물질은 시료 1g당 4.62 mg의 코디세핀을 함유한 로트로 4°C에서 냉장보관하였다. 시험물질조제는 당일에 멸균된 3차증류수에 용해시켜 사용하였다. 세균 배양을 위해 Nutrient Broth(Sigma) 및 Vogel-Bonner minimal glucose agar plate를 사용하였으며, 세포배양을 위해 Eagles MEM(Gibco BRL), trypsin-EDTA(Gibco BRL), fetal bovine serum(FBS, Gibco BRL)과 colcemide(Gibco BRL)를 사용하였다. S-9 혼합액 제조를 위해 S-9(MOLTOX™)은 Molecular Toxicology사, Cofactor는 Oriental Yeast사로부터 구입하여 사용하였다.

### 미생물복귀돌연변이시험(Bacterial reverse Ames test).

**시험용 균주 및 배양조건.** 시험에 사용한 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA 1537 및 *E. coli* WP2uvrA 균주는 Molecular Toxicology사로부터 구입하였다. 이들 균주는 본 시험에 앞서 histidine 요구성, crystal violet 감수성, UV 감수성, 항생제 내성 및 자연 복귀돌연변이 빈도등의 형질확인시험을 통해 유전적인 특성을 확인하였다.

**시험물질, 양성대조물질의 조제 및 농도.** 시험물질인 곰팡이유래 밀리타리스 동충하초 열수추출물(CMPD)은 시험당일 멸균된 3차증류수에 각 농도별로 희석하여

5,000 µg/plate를 최고농도로 1,000, 500, 100 및 50 µg/plate의 5단계로 농도를 설정하였다. 각 균주에 대한 양성 대조물질인 Sodium azide( $\text{NaN}_3$ )는 멸균된 3차증류수에 녹여 사용하였으며, 9-amino acridine(9-AA) 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl), acrylamide(AF-2)는 DMSO에 용해하여 사용하였다. 음성대조물질로 DMSO와 멸균된 3차증류수를 사용하였다.

**복귀돌연변이시험.** 본시험은 OECD guideline for the testing of chemicals(OECD, 1993a)에 준하여 Ames (Ames et al., 1975; Maron et al., 1983)의 방법에 따라 비교적 유전독성에 대한 민감도가 높은 preincubation 방법으로 복귀돌연변이시험을 실시 하였다. 본 시험에 앞서 시험물질인 CMPD는 5,000 µg/plate를 최고농도로하여 1,000, 500, 100 및 50 µg/plate의 5단계농도로 5균주 모두에 대한 농도설정 시험을 직접법(-S9)과 대사활성화법(+S9)에 따라 실시하였으며, 균의 생육저해가 나타나지 않는 농도를 본시험의 최고농도로 설정하였다. 본시험에서는 각 균주를 nutrient broth(Sigma)에 접종하여 37°C에서 12~14시간 진탕배양한 후 배양액 0.1 ml, 각 농도단계별 시험물질 0.05 ml, 인산완충용액(0.1 M phosphate buffer, pH 7.4) 0.5 ml을 첨가하여 37°C에서 30분간 preincubation 을 실시하였다. 이때 직접법의 경우 S-9 혼합액 대신 인산완충용액 0.5 ml을 넣어주었고, 대사활성화 법에서는 S-9 혼합액 0.5 ml을 첨가하였다. 배양종료 후 Top agar 2 ml을 첨가하여 잘 혼합한 다음 Vogel Bonner minimal glucose agar plate에 증충하여 37°C 배양기에서 48시간 배양하였고, 이후 복귀돌연변이 콜로니수를 계측하였다. 균의 생육저해와 시험물질의 침전, 분출을 육안 및 실체현미경을 통해 관찰하였으며, 각 농도당 3개의 plate를 사용하여 복귀돌연변이원성 콜로니수의 평균치를 구하였다. 시험물질을 처리한 모든균에서 복귀돌연변이 콜로니수가 용매대조균에 비해 용량의존성을 보이며, 현저한 증가를 보이는 경우 돌연변이 유발성이 있는 것으로 판정하였다(Ames et al., 1975). 본시험과 동일한 과정을 통해 재확인시험을 실시하였다.

### 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험.

**세포 및 배양조건.** 본 시험에 사용한 Chinese hamster lung(CHL) fibroblast 세포주는 ATCC에서 구입하였으며, 5%  $\text{CO}_2$  배양기에서 37°C로 배양하였다. 사용배지는 10% FBS 및 penicillin과 streptomycin을 포함한 Eagles MEM 배지에서 단층배양하였으며, 배양된 세포는 2~3일 마다 0.5% trypsin-EDTA을 이용하여 계대배양하였다. 이들 세포의 chromosome number는 25개이며, 세포주기는 15~18시간이다.

**시험물질 및 대조물질:** 시험물질인 균벵이유래 밀리타리스 동충하초 열수추출물(CMPD)은 농도설정시험과 염색체이상시험을 위해 시험당일 멸균된 3차 증류수에 각 농도별로 희석하여 사용하였다. 양성대조물질은 Mitomycin C(MMC)와 Cyclophosphamide(CPA)를 멸균된 3차 증류수에 용해하여 사용하였으며, 음성대조물질로 멸균된 3차 증류수를 사용하였다.

**농도설정시험:** 본시험의 최고농도를 결정하기 위하여 MTT 및 MI(Mitotic index) 시험에 따라 세포독성시험을 실시한 다음 50% 세포증식을 억제하는 농도(IC<sub>50</sub>) 및 50% 세포분열억제지수(MI<sub>50</sub>) 농도를 산출하였다. MTT방법에 따른 농도설정 시험에서는 최고농도 5,000 µg/ml로부터 7단계로 시험을 실시하였고, MI시험은 IC<sub>50</sub>값을 최고농도로하여 4단계로 농도를 설정하였으며, 시험과정은 염색체이상 시험과 동일하게 진행하였다.

**염색체이상 시험:** 시험물질(CMPD)의 염색체이상 여부를 확인하기 위하여 IC<sub>50</sub>값 및 MI<sub>50</sub>값을 근거로하여 최고농도로부터 공비 2로 3단계 설정하였으며, 3~4일간 배양한 CHL 세포에 시험물질(CMPD) 및 양성대조물질을 각 농도별로 처리하였다. S-9혼합액이 없는 직접법의 경우 시험물질 처리시간을 6시간(6-S)과 24시간(24-S) 반응시켰으며, S-9 혼합액이 존재하는 대사활성화법의 경우 S-9 혼합액을 첨가하여 6시간 추가배양(6+S)한 다음 정상배지로 교체한 후 18시간 동안 추가배양하였다. 세포 회수 2시간 전에 colcemide(Gibco, USA)를 10 µg/ml 농도로 처리한 후 1% trypsin-EDTA를 사용하여 세포를 떼어낸 다음 원심분리하여 세포를 회수하였다.

**표본의 제작 및 판독:** 회수한 세포에 75 mM KCl저장액(37°C)을 30분간 처리한 후 고정액(methanol : glacial acetic acid=3 : 1)으로 4회 반복하여 고정시켜 slide를 완전하게 건조시켰다. 이들을 5% Giemsa 용액으로 염색한 다음 현미경으로 관찰하였다. MI<sub>50</sub>값을 확인하기 위하여 각 농도당 1,000개의 세포로부터 중기세포수를 확인하였으며, 염색체이상시험에서는 농도별 200개의 중기세포를 1,000배에서 이미지 프로그램(AxioVision program)으로 염색체를 촬영한 후 판독을 실시하였다. 염색체이상은 크게 구조이상(structural aberration)과 수적이상(numerical aberration)으로 분류하였고, 구조이상은 gap(chromatid and chromosome gap), ctb(chromatid break), cte(chromatid exchange), csb(chromosome break), cse(chromosome exchange)으로 구분하여 판정하였다. 염색체이상의 수가 통계학적으로 유의성 있게 용량 의존적으로 증가하거나 하나이상의 용량단계에서 재현성 있는 양성반응을 나타낼 경우를 양성으로 판정하였다.

### 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험.

**실험동물:** 생후 7주된 수컷 ICR 마우스를 (주)코아텍으로부터 구입하여, 1주간 순화시키면서 일반증상을 관찰하고 체중을 측정하였으며, 순화기간이 끝나고 시험실시 하루 전 건강한 동물을 군당 5마리로 배분하여 군분리하였다. 실험동물은 Polycarbonate cage(마우스: 폭 20 cm, 길이 26 cm)에 넣은 다음 SPF 구역(온 습도 범위: 19~25°C, 40~60%, 기류속도: 13~18 cm/초, 환기횟수: 10~20회/hr, 기압차: 2~10 mmH<sub>2</sub>O, 명암 cycle: 07:00 점등~19:00 소등, 조도: 150~300 Lux)에서 사육하면서 자외선 멸균된 정제수와 실험동물용 사료(샘타코)를 자유섭식시켰다.

**시험물질 및 대조물질:** 본시험에서 시험물질(CMPD) 투여량은 단회독성에서 LD<sub>50</sub>을 고려하여 사망 동물이 없는 최고농도 2,000 mg/kg(body weight)로부터 공비2로 3단계농도로 설정하였고, 시험당일 멸균된 3차증류수에 용해하여 사용하였다. 양성대조물질로 Cyclophosphamide(Sigma, USA) 70 mg/ml, 음성대조군으로 멸균된 3차증류수를 사용하였다.

**소핵시험:** 균벵이유래 밀리타리스 동충하초 열수추출물(CMPD)을 1일 1회 총 2회 경구 투여하였으며, 양성대조물질은 1회 복강으로 주사하였다. 투여 후 24시간째 골수를 채취하여 도말표본을 제작하였고, 광학현미경하에서 관찰하여 2,000개의 다염 성적혈구(PCE)에서 소핵(MNPCE) 출현빈도수를 계수하였다. 골수검체제작은 Schmid(1975)의 방법에 따라 실시하였으며, 개체당 2매의 도말검체를 제작하였다. 각 동물로부터 적출한 대퇴골로부터 26 게이지 주사침을 사용, 3 ml 우태아혈청(GIBCO, USA)으로 골수를 씻어내려 현탁하여 1,000 rpm으로 5분간 원심분리하였다. 상등액을 제거하고, 침전된 골수세포를 슬라이드글라스에 도말하여 고정한 후 5% Giemsa(Muto Pure Chemacals)로 염색하여 1,000배의 배율로 검정하였다.

**통계학적 분석.** 염색체이상시험 및 소핵시험에서 Scheffe test 및 Dunnett's test를 실시하였으며, 각 시험군을 음성대조군과 비교하여 유의성을 평가하였다(p < 0.05).

## 결과 및 고찰

**미생물복귀돌연변이 시험(Bacterial reverse Ames test).** 균벵이유래 밀리타리스 동충하초 열수추출물(CMPD)의 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 및 *E. coli* WP2uvrA 균주를 이용한 복귀돌연변이시험(Ames test)은 대사활성계의 존재(+S9)와 부재하(-S9)에서 수행하였다. 시험물질(CMPD)은 멸균된 3차

중류수에 희석하여 처리하였으며, 농도설정시험에서 5,000 µg/plate를 최고농도로하여 1,000, 500, 100 및 50 µg/plate로 5단계로 실시하였다. 그 결과 최고농도 5,000 µg/plate을 포함한 모든 농도단계에서 생육저해 및 세포독성을 나타내지 않았다(data not shown). 따라서 본시험에서는 5,000 µg/plate를 최고농도로 결정하였으며, 농도설

정시험과 동일한 농도단계로 조제하여 음성 및 양성대조군과 함께 대사활성화법 적용유무(S9 유무)에 따라 본시험을 실시하였다. 사용된 시험물질 (CMPD)은 각 농도별 처리군에서 TA98, TA100, TA1535, TA1537 및 *E. coli* WP2uvrA의 5 균주를 사용한 직접법(-S9)과 대사활성화법(+S9) 모두에서 음성대조군과 비교할 경우 변이원성콜

**Table 1.** Mutagenicity of the extract of CMPD with *Protuetja dreujfarsis* (Main test)

S-9 Mix	Test materials (µg/plate)	Number of colonies/plate (Mean ± SD)				
		Base substitution			Frameshift	
		TA100	TA1535	<i>E. coli</i>	TA98	TA1537
Without S-9 mix	DW	123 ± 0.6	15 ± 2.3	37 ± 7.1	21 ± 1.2	13 ± 1.5
	50	114 ± 9.8	14 ± 2.1	41 ± 7.5	22 ± 1.5	15 ± 1.7
	100	114 ± 9.6	15 ± 3.5	37 ± 6.0	24 ± 1.0	12 ± 2.1
	500	110 ± 17.0	20 ± 2.6	42 ± 4.5	25 ± 2.1	16 ± 2.1
	1,000	108 ± 8.7	21 ± 1.7	49 ± 3.5	26 ± 1.2	14 ± 1.5
	5,000	146 ± 11.4	18 ± 4.0	45 ± 5.6	24 ± 1.7	14 ± 3.0
Positive control (µg/plate)	AF-2 0.01		NaN3 0.5	AF-2 0.01	AF-2 0.1	9-AA 80
		520 ± 13.7	160 ± 12.5	354 ± 23.3	212 ± 15.4	175 ± 9.5
with S-9 mix	DW	115 ± 5.5	16 ± 3.0	41 ± 1.5	33 ± 5.1	12 ± 2.1
	50	121 ± 12.1	20 ± 3.2	40 ± 5.1	30 ± 8.5	11 ± 1.7
	100	122 ± 20	16 ± 3.6	39 ± 8.1	30 ± 3.6	13 ± 3.1
	500	127 ± 15.9	16 ± 2.3	56 ± 1.2	28 ± 5.3	15 ± 2.5
	1,000	125 ± 7.2	17 ± 3.2	55 ± 1.5	27 ± 4.5	14 ± 1.5
	5,000	148 ± 21.6	18 ± 2.5	50 ± 6.7	29 ± 1.0	13 ± 1.5
Positive control (µg/plate)	2-AA 1.0		2-AA 2.0	2-AA 10	2-AA 0.5	2-AA 2.0
		499 ± 71.8	118 ± 12.5	292 ± 21.5	209 ± 22.8	192 ± 23.6

**Table 2.** Mutagenicity of the extract of CMPD with *protuetja dreujfarsis* (Reconfirmation test)

S-9 Mix	Test materials (µg/plate)	Number of colonies/plate (Mean ± SD)				
		Base substitution			Frameshift	
		TA100	TA1535	<i>E. coli</i>	TA98	TA1537
Without S-9 mix	DW	121 ± 1.5	15 ± 1.2	34 ± 4.6	24 ± 2.5	9 ± 1.0
	50	118 ± 7.8	13 ± 2.5	36 ± 6.7	26 ± 1.7	8 ± 0.6
	100	117 ± 9.5	12 ± 1.5	37 ± 11.1	24 ± 2.0	8 ± 2.1
	500	134 ± 18.6	22 ± 0.6	36 ± 5.5	28 ± 2.6	7 ± 1.5
	1,000	128 ± 15.9	15 ± 2.5	45 ± 7.0	28 ± 2.3	8 ± 2.0
	5,000	141 ± 19.6	18 ± 4.5	45 ± 2.5	28 ± 2.5	9 ± 1.0
Positive control (µg/plate)	AF-2 0.01		NaN3 0.5	AF-2 0.01	AF-2 0.1	9-AA 80
		469 ± 27.6	115 ± 5.6	313 ± 11.5	163 ± 9.0	153 ± 20.8
with S-9 mix	DW	115 ± 10.3	14 ± 2.3	36 ± 0.6	26 ± 3.8	14 ± 4.0
	50	129 ± 1.5	15 ± 2.5	30 ± 2.5	30 ± 2.6	16 ± 3.1
	100	127 ± 12.7	10 ± 1.5	38 ± 5.1	35 ± 3.8	14 ± 3.8
	500	136 ± 18.7	17 ± 1.5	46 ± 5.5	35 ± 4.6	15 ± 3.1
	1,000	149 ± 5.6	17 ± 3.6	49 ± 2.5	36 ± 1.0	15 ± 3.2
	5,000	143 ± 11.6	19 ± 3.0	47 ± 2.6	36 ± 7.0	10 ± 1.0
Positive control (µg/plate)	2-AA 1.0		2-AA 2.0	2-AA 10	2-AA 0.5	2-AA 2.0
		496 ± 19.1	115 ± 8.9	409 ± 21.4	179 ± 12.7	222 ± 18.7

로니의 생성 수치는 증가하지 않았으며, 용량의존성도 확인되지 않았다(Table 1). 이를 근거로하여 본시험과 동일한 과정으로 재확인시험을 실시하였으며, 유사한 결과를 나타내었다(Table 2). 따라서 곰팡이유래 밀리타리스 동충하초 열수추출물(CMPD)은 최고농도 5,000 µg/plate 이하에서 사용균주들로부터 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 나타났다.

**염색체이상시험.** 곰팡이유래 밀리타리스 동충하초 열수추출물(CMPD)은 Chinese hamster 유래의 lung cell (CHL)을 이용하여 직접법(-S9)과 대사활성화법(+S9)의 염색체이상시험을 실시하였다. MTT에 의한 1차농도설정시험을 통해 50% 세포증식억제능을 나타내는 농도 (IC<sub>50</sub>)값을 확인하였다. 그 결과 직접법(-S9)에서 시험물질을 6시간 처리한(6-S) 조건에서 IC<sub>50</sub>값은 312.5 µg/ml이며, 24시간 처리한 조건(24-S)에서는 78.1 µg/ml로 확인하였다. 또한 S9혼합물이 존재하는 대사활성화계 (+S9)에서 시험물질(CMPD)을 6시간 처리한 조건(6+S)에서 IC<sub>50</sub>값은 5,000 µg/ml 농도로 결정하였다(Table 3). 이들 IC<sub>50</sub>값을 근거로하여 2차농도설정시험인 MI(Mitotic index) 시험을 실시하여 50% 세포분열억제지수(MI<sub>50</sub>)값을 확인하였으며,

**Table 3.** IC<sub>50</sub> of the extract of CMPD on CHL cells

Test materials	hr	S-9 Mix	Treatment (µg/ml)	Inhibition (%)	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
DW		-	0	100	
Extract	6 (6-S)	-	5,000	30	312.5
		-	1,250	42	
		-	625	47	
		-	312.5	51	
		-	78.1	64	
		-	19.5	80	
Extract	6 (6+S)	-	9.8	98	5,000
		+	0	100	
		+	5,000	62	
		+	1,250	78	
		+	625	80	
		+	312.5	85	
Extract	24 (24-S)	-	78.1	95	78.1
		-	19.5	102	
		-	9.8	110	
		+	0	100	
		+	5,000	12	
		+	1,250	20	
Extract	24 (24+S)	-	625	25	78.1
		-	312.5	30	
		-	78.1	51	
		-	19.5	62	
		-	9.8	71	
		+	0	100	

**Table 4.** MI<sub>50</sub> by mitotic index in CHL cell in the the presence and absence of S-9 mix for the extract of CMPD

Test materials	hr	S-9 Mix	Treatment (µg/ml)	Mitotic index	Inhibition (%)	MI <sub>50</sub> (µg/ml)
DW		-	0	32.4	100	-
Extract	6 (6-S)	-	312.5	13.0	40	19.5
		-	78.1	14.8	45	
		-	19.5	17.0	52	
		-	9.8	27.9	86	
Extract	6 (6+S)	+	0	32.5	100	-
		+	5,000	15.2	46.7	1,250
		+	1,250	16.9	52	
		+	625	29.0	89.2	
+	312.5	31.8	97.8			
Extract	24 (24-S)	-	0	23.8	100	-
		-	78.1	8.9	37.3	4.9
		-	19.5	9.9	41.6	
		-	9.8	11.2	47	
Extract	24 (24+S)	-	4.9	12	50	
		+	0	23.8	100	4.9
		+	5,000	15.2	46.7	
		+	1,250	16.9	52	

\*MI (mitotic index) = Mitotic Metaphase number/Total number of cell (1,000 cells) × 100 (Kannan *et al.*, 2006).

\*Inhibition (%) = (MI of treatment/MI of control) × 100.

이를 근거로 본시험의 최고농도를 결정하였다. 그 결과 직접법(-S9)에서 시험물질을 6시간 처리한(6-S) 조건에서 MI<sub>50</sub>값은 19.5 µg/ml이며, 24시간 처리한 조건(24-S)에서는 4.9 µg/ml로 확인하였다. 또한 S9혼합물이 존재하는 대사활성화계(+S9)에서 시험물질을 6시간 처리한 조건(6+S)에서 MI<sub>50</sub>값은 1,250 µg/ml 농도로 결정하였다(Table 4). 즉 S-9 혼합액이 존재하지 않는 조건(6-S, 24-S)에서 곰팡이유래 밀리타리스 동충하초 열수추출물(CMPD)을 낮은 농도로 처리한 경우에는 세포독성이 높게 나타났으나, S-9 혼합액이 존재하는 경우 (6+S)는 높은 농도 (1,250 µg/ml)에서도 세포독성이 낮게 나타났다. 이러한 사실은 다양한 간효소들을 포함한 S-9 혼합액(간균질액)에서 독성을 나타내는 물질이 대사됨으로서 독성이 감소된 것으로 보여진다. 따라서 염색체이상시험에서는 MI<sub>50</sub>값을 근거로하여 각 조건별 최고농도를 결정하였으며, 공비2로 3단계로 실시 하였다. 즉 6+S 조건의 경우 1,250, 625, 312.5 µg/ml와 6-S 조건하에서는 19.53, 9.77, 4.88 µg/ml, 24-S에서는 4.88, 2.44, 1.22 µg/ml의 농도로 각각 실시하였으며, 사용한 시험물질의 농도별로 염색체 표본을 제작하여 판독을 실시하였다. Table 5에서와 같이 직접법인 6-S, 24-S 조건과 대사활성화계인 6+S 조건에서 음성대조군의 염색체이상 빈도는 gap 포함 유무에 상관없이 1~4.5% 범위로 나타났으며, 양성대조물질(MMC)에 의한 염색체이상 빈도는 20.5~29%로 음성대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다

**Table 5.** Effect of the extract of CMPD on chromosomal aberration of CHL cells

Treatment			Chromosome aberrations/200 cells				Total aberrations (%)	Extra aberrations (PP+ER)
Compound/S-9 mix	hr	Con. ( $\mu\text{g/ml}$ )	Chromatid type		Chromosome type			
			ctb	cte	csb	cse		
DW		0	1	1	0	0	*1	0
Extract (without S-9 mixture)	6 (6-S)	19.5	2	4	0	0	3	1
		9.8	1	9	0	0	5	0
		4.9	2	5	0	0	3.5	0
MMC		0.5	33	99	3	0	*67.5	1
DW		0	1	6	0	0	*3.5	0
Extract (with S-9 mixture)	6 (6+S)	1,250	2	3	0	1	3	0
		625	0	3	1	1	2.5	0
		312.5	4	4	0	0	4	0
CPA		10	10	26	1	4	*20.5	0
DW		0	1	3	0	0	*2	0
Extract (without S-9 mixture)	24 (24-S)	4.9	2	4	0	1	3.5	0
		2.4	2	4	0	0	3	0
		1.2	0	8	0	0	4	0
MMC		0.5	13	28	0	6	*23.5	0

Con.: concentration, ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break cse: chromosome exchange, MMC: mitomycin C, CPA: Cyclophosphamide, PP: polyploidy, ER: endoreduplication.

\*Significantly different from the control at  $P < 0.05$ .

**Table 6.** Effect of the extract of CMPD on micronucleus formation in ICR mice

Compound	Route	Dose (mg/kg)	No. of mice	Sampling time (hr)	MNPCE (Mean $\pm$ SD)	PCE/PCE+NCE (Mean $\pm$ SD)
DW	oral	0	5	24	*0.27 $\pm$ 0.06	0.44 $\pm$ 0.04
CPA	i.p.	70	5	24	*5.24 $\pm$ 0.96	0.37 $\pm$ 0.05
Extract	oral	2,000	5	24	0.21 $\pm$ 0.11	0.44 $\pm$ 0.06
	oral	1,000	5	24	0.17 $\pm$ 0.03	0.42 $\pm$ 0.07
	oral	500	5	24	0.17 $\pm$ 0.09	0.38 $\pm$ 0.08

MNPCE: PCE with one or more micronuclei, PCE: Polychromatic erythrocyte, NCE: Normochromatic erythrocyte, CPA: Cyclophosphamide.

\*Significantly different from the control at  $P < 0.05$ .

( $p < 0.05$ ). 반면에 시험물질(CMPD)의 각 농도단계에서는 전체적으로 S-9 혼합액의 유무에 상관없이 3~4.5% 염색체이상 빈도를 나타내었다. 따라서 굼벵이 유래 밀리타리스 동충하초 열수추출물(CMPD)은 모든 농도에서 용량의존성도 나타나지 않았으며, 통계적인 유의성도 없는 것으로 보아 본 실험조건 하에서 염색체 이상을 유발하지 않는 것으로 나타났다.

**소핵시험.** 굼벵이유래 밀리타리스 동충하초 열수추출물(CMPD)의 단회독성 결과자료로부터 LD<sub>50</sub>값을 근거로 하여 2,000 mg/kg(body weight)을 본시험의 최고용량으로하여 공비2로 1,000 및 500 mg/kg(body weight)으로 3단계로 설정하였다. 시험물질(CMPD)은 1일 1회 2일간 경구투여하였으며, 최종 투여로부터 약 24시간 후에 부

검하여 골수검체를 제작한 다음 이들로부터 소핵빈도 및 세포독성을 평가하였다. 본시험에서는 각 농도당 2,000개의 다염성적혈구(Polychromatic Erythrocyte, PCE) 중에 나타나는 소핵다염성적혈구(Micronucleated Polychromatic Erythrocyte, MNPCE)의 수를 계수하였다. 그 결과 시험물질(CMPD)의 용량별 투여군에서 MNPCE의 빈도가 음성대조군과 비교하여 증가하지 않았으며, 용량의존적으로 재현성 있는 증가도 보이지 않았다. 특히, 시험물질(CMPD) 농도단계에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의성이 나타나지 않았다. 또한 세포독성을 나타내는 총적혈구중 다염성적혈구(PCE/(PCE+NCE)) 비율에 있어서는 모든 시험물질 투여군에서 음성대조군과 거의 유사하였으며, 용량상관성도 나타나지 않았고 통계학적으로 유의성도 없었다. 반면에 양성대조물질(CPA) 투여군의

소핵빈도에서는 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의하여( $P < 0.05$ ) 현저한 증가가 관찰되었고, 이는 본 시험이 적합하게 수행되었음을 알 수 있었다(Table 6). 부검시 투여군간 체중을 비교한 결과 시험물질 투여군의 체중은 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다(data not shown). 그러므로 곰벵이 유래 밀리타리스 동충하초 열수추출물(CMPD)은 본 시험에 사용한 농도범위에서 마우스의 골수세포에서 소핵을 유발하지 않는다는 사실을 알 수 있었다.

이상의 결과들을 종합해 보면, 본 연구를 통해 간기능 개선에 효과를 나타내는 곰벵이유래 밀리타리스 동충하초 열수추출물(CMPD)은 미생물복귀돌연변이시험, 염색체이상시험 및 소핵시험의 조건하에서 유전독성을 유발하지 않는 것으로 확인하였다.

### 감사의 글

이 논문은 2006년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원(KRF-2005-003-04-001)을 받아 연구된 것으로 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

- Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975). Methods for detecting carcinogens & mutagens with the salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.*, **31**, 347-364.
- Bae, S.Y. and Keun, L.J. (1998). A bibliographical study on the origin of Chinese Caterpillar Fungus, *Kor. J. Herbol-ogy*, **13**, 181-187.
- Jo, J.S. (1998). Study on the origin of Chinese caterpillar fungus. *The Journal of East-West Medicines*, 671-680.
- Kim, H.S., Roh, Y.J. and Choe, M. (2005). *Cordyceps militaris* increases hepatic glucokinase activities, *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.*, **34**, 158-161.
- Lee, H.M., Lee, Y.J. and Park, T.S. (2004). Tumor growth inhibitory and immunomodulatory activities of cordyceps militaris water extracts in ICR mice bearing sarcoma-180 solid tumor. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.*, **33**, 59-65.
- Lee, J.D. (1998). Mycology 3rd edition, *Gu-duck publishing company*.
- Liang, Z.Q. (1990). Anamorph of and *Cordyceps militaris* artificial culture of its fruitbody, *Southwest China J. Agri. Sc.*, **3**, 1-6.
- Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised methods for the Ames Salmonella assay: a review. *Mutat. Res.*, **436**, 113-122.
- OECD (1993a): "OECD guideline for the testing of chemicals. Documents 471, Genetic toxicology: Salmonella thphimuriun, Reverse Mutation assay". Organization for Economic Co-operation and Development, Paris, France.
- Park, C.S., Kwon, C.J., Choi, M.A., Park, G.S. and Choi, K.H. (2002). Antibacterial activities of *Cordyceps* spp., mugwort and pine needle extracts, *Kor. J. Food Preserv.*, **9**, 109-113.
- Schmid, W. (1975). The micronucleus test. *Mutat. Res.*, **31**, 9-15.
- 식품의약품안전청고시 제2005-60호 (2005). 의약품등의독성시험 기준 유전독성시험.