

# 동충하초 균사체를 이용한 법제 유향의 항산화활성 및 항염증 효과

조화은<sup>1</sup> · 김혜자<sup>1</sup> · 최윤희<sup>1</sup> · 이기남<sup>1,3</sup> · 정명수<sup>2,3\*</sup>

1: 원광대학교 한의학전문대학원, 2: 원광대학교 한의과대학, 3: 원광대학교 한국전통의학연구소

## Study on the Anti-oxidative Activity and Anti-inflammatory Effects of Processed Sulfur with Cordyceps Militaris Mycelium

Hwa Eun Cho<sup>1</sup>, Hae Ja Kim<sup>1</sup>, Yun Hee Choi<sup>1</sup>, Ki Nam Lee<sup>1,3</sup>, Myong Soo Chong<sup>2,3\*</sup>

1: Professional Graduate School of Oriental Medicine, 2: College of Oriental Medicine,  
3: Research Center of Traditional Korean Medicine, Wonkwang University

The purpose of this study was evaluated physiological activity of processed sulfur with *Cordyceps militaris* mycelium that antioxidative and antiinflammatory effects. Proliferation of processed sulfur (PS) with *Cordyceps militaris* mycelium was increased in dose-dependent manner. In organic sulfur contents of *Cordyceps militaris* mycelium fortified processed sulfur, CM+PSH (CM+3000 ppm of PS) was significantly higher than other groups. However, CM+PSL (CM+1500 ppm of PS) was almost changed organic sulfur. Content of total polyphenol compounds was similarity to CM, CM+PSL and CM+PSH. The EDA (electron donating ability) and SOD-like activity was increased in dose-dependent manner and the activity of CM were significantly higher than CM+PSL and CM+PSH. We examined cytotoxicity, nitric oxide production of Raw 264.7 cell and inhibition of HT 1080 cell by MTT assay. CM, CM+PSL and CM+PSH do not have any toxic effects in macrophages (Raw 264.7). And CM+PSL and CM+PSH inhibited the production of nitrite in Raw 264.7 cells activated with LPS. The antitumor effects of processed sulfur with *Cordyceps militaris* mycelium on HT 1080 cell was indicated a significantly inhibition activity. These results suggested that processed sulfur with *Cordyceps militaris* mycelium have activities of antioxidant, antiinflammatory effects.

Key words : processed sulfur, *cordyceps militaris*, antioxidative, cytotoxicity, antiinflammatory, Raw 264.7 cell, HT 1080 cell

### 서 론

최근 식생활의 향상과 의학의 발달로 인간의 평균 수명이 연장되고 있는 반면에 문명의 발달에 따른 환경의 오염, 스트레스 및 운동 부족이 원인이 되어 만성 퇴행성 질환과 노인성 질환 등은 증가되고 있다<sup>1)</sup>. 이에 최근 천연물질 중 암 예방 성분이나 생리활성 조절물질 및 식품 중 기능성 성분을 찾아내어 이를 건강의 유지와 증진을 위해 활용하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다<sup>2-4)</sup>.

유향(硫黃, Sulfur, S)은 硫黃鑛이나 硫黃鑛物을 채취하여 加

\* 교신저자 : 정명수, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학

· E-mail : neurokid@wku.ac.kr · Tel : 063-850-6912

· 접수 : 2008/12/15 · 수정 : 2009/02/10 · 채택 : 2009/04/01

熱融解한 다음 상층의 液狀硫黃을 취하여 냉각한 것으로 텔루늄(Te), 셀레늄(Se) 등을 함유 한다. 한의학적 효능은 여러 문헌에 補火助陽, 濇脾通便, 殺蟲止痒으로 外用 시 疥癬, 禿瘡, 陰疽, 惡瘡 등을 치료하고, 內服 시 陽痿尾冷, 虛喘冷哮, 虛寒便秘 등을 치료하는 것으로 나타나 있다<sup>5)</sup>. 그러나 유향은 인체에 직접적으로 투여될 경우 독성이 강하기 때문에 炮製를 해서 사용하는데 방법으로는 豆腐製, 蘿蔔製, 豬腸製<sup>6)</sup> 등이 있다. 또한 동물을 이용하는 방법으로는 오리에 유향을 투여하여 오리를 통해 사람에게 유익하게 藥製化 하여 민간요법으로 예전부터 사용해왔다. 그러나 유향을 동물에게 섭취 시키는 것 역시 지나칠 경우 동물에게 병을 초래할 수 있다는 보고들도 있다<sup>7,8)</sup>. 따라서 유향을 동물에게 투여하여 그 독성을 분해해 사용하는 유향오리와 같은 방법 외에 보다 유향의 안전성을 고려한 법제 방법이 필요하다고

생각된다.

번데기 동충하초(*Cordyceps militaris*)는 나비목(Lepidoptera)의 유충 또는 번데기를 기주로 하여 인공재배가 활발하게 이루어지고 있는 한약자원이다. 최근 항염증, 항균, 항종양, 면역증강 등 외부물질에 대한 보호 작용, 자양강장, 정력증강, 항피로, 운동능력 향상, 노화방지, 수명연장 등 기초대사활성 증강 작용, 그리고 동맥경화 억제, 콜레스테롤과 중성지방 저하, 혈당강하, 고혈압 치료 등의 질병억제 및 완화 작용 등 다양한 생리활성이 알려지면서<sup>9-14</sup> 의약분야 뿐 아니라 건강기능 소재로서도 널리 이용되어지고 있다.

본 연구에서는 유용한 한의학적 효능에도 불구하고 안전성의 문제로 외면되고 있는 유향의 안전성을 확보하고 유용성을 제고시키기 위한 방안연구의 일환으로 蘿菴製를 변형하여 제조한 법제 유향을 동충하초 균사체에 유입시켜 항산화 활성 및 대식세포(RAW264.7 cell)에서의 세포독성, NO 생성 능력에 의한 항염증 활성, 인간유래 섬유성육종암세포(HT1080 cell)에서의 항암 활성에 미치는 영향 등을 연구하여 결과를 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 원료 및 균주

본 실험에 사용된 유향(硫黃)은 세광화학(주)에서 구입하였으며, 동충하초(*Cordyceps militaris*)균주는 전북농업기술원에서 분양받아 계대 배양 후 실험에 사용하였다. 또한 균주배양에 사용한 배지는 Potato Dextrose Broth(PDB)배지를 사용하였다.

### 2. 시료 제조

#### 1) 법제 유향 강화 배지 제조

동충하초 균사체 배양배지는 전통적인 법제 방법 중의 하나인 蘿菴製의 방법을 변형하여 만든 법제유향(Processed sulfur; PS)을 0, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000 ppm의 농도로 PDB배지에 각각 용해, 분산시키기 위하여 2,450 MHz(1 kw)의 microwave로 10분간 처리하여 법제유향 함유 PDB배지(PDB + PS medium)를 제조한 다음 121℃에서 20분간 멸균한 후 배지로 사용하였다.

#### 2) 배양 및 시료 제조

각 농도의 법제유향 함유 배지(PDB+PS medium)에 동충하초 균사체 전배양액을 각각 5%(v/v)씩 접종하여 24℃에서 14일간 진탕(170 rpm) 압배양 한 후 회수하여 증류수로 3회 세척, 동결 건조하여 시료로 사용하였다. 각 농도별 법제유향 함유 PDB 배지에서 동충하초 균사체를 배양한 배양물을 각각 CPS-0, CPS-500, CPS-1500, CPS-2000, CPS-2500 및 CPS-3000으로 명명하였다.

### 3. 균사체량 측정

균사체 농도는 건조중량(Dry cell weight, DCW)을 기준으로 측정하였으며, 건조 균사체량은 동충하초 균사체 배양액을 여과

하여 증류수로 3회 세척하여 재 여과 및 원심분리한 후 동결 건조하여 측정하였다.

### 4. 균사체의 유향 함량 측정

균체 내 유향 함량 측정은 Lee 등의 방법<sup>15</sup>을 변형하여 수행하였다. 동결 건조 시료를 170℃ microwave에서 2-5분간 건조시킨 후 시료 0.2 ~ 0.3 g에 KNO<sub>3</sub> 5 ml를 가하여 45℃로 overnight 시킨 다음 95℃에서 5시간 분해하였다. 분해액을 최종으로 10 ml로 정용한 후 여과지(watman, No.6)로 여과하여 ICP-AES (Inductively coupled plasma atomic emission spectrometer, Optima 3300DV, Perkin-Elmer, USA)로 분석하였다.

### 5. 총 폴리페놀 화합물 함량 측정

총 폴리페놀 화합물 함량은 Folin-Denis법<sup>16</sup>을 응용하여 측정하였다. 즉, 각 추출물 시료는 1 µg/ml 농도로 희석하여 2 N Folin 시약 200 µl를 첨가하고 잘 혼합하여 3분간 방치하였다. 여기에 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2 ml를 첨가하여 실온에서 1시간동안 방치한 후 ELISA reader(Bio-Tek Instruments Inc, USA)를 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 총 폴리페놀 화합물은 tannic acid를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다. Tannic acid를 이용한 표준곡선은 tannic acid의 최종농도가 0, 37.5, 75, 150, 300 µg/ml이 되도록 하여 위와 같은 방법으로 725 nm에서 흡광도를 측정하여 작성하였다.

### 6. 전자공여능 측정

전자공여능 측정은 Blois 방법<sup>17</sup>에 준하여 각 추출물의 DPPH(α-α-Diphenyl-β-picrylhydrazyl radicals)에 대한 수소공여 효과로 측정하였다. 일정 농도의 추출물 시료에 4.0×10<sup>-4</sup> M DPPH 용액을 150 µl가하고, 혼합하여 실온에서 70분간 반응시켰다. 이 반응액을 525 nm에서 흡광도를 측정하였으며 전자공여 효과는 시료 첨가 전·후의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

### 7. SOD 유사활성 측정

SOD 유사활성 측정은 각 추출물 시료를 농도별로 희석한 후 SOD assay kit(Dojindo Molecular Technologies, Inc, USA)를 450 nm에서 흡광도를 측정하여 kit의 계산법을 이용하여 super-oxide anion radical(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)의 소거 활성율을 측정하였다.

### 8. Nitric Oxide(NO) 농도의 측정

Nitric Oxide(NO) 생성 유도 효과 측정은 Lee 등<sup>18</sup>의 방법을 응용하여 측정하였다. 즉, rat 유래 대식세포주인 Raw 264.7 세포로부터 일산화질소(nitric oxide NO) 생산의 지표로서 배양 상층액 내에 안정된 NO 산화물인 NO<sub>2</sub>를 Griess 반응으로 측정하여 540 nm에서 측정 후 아질산염의 표준커브로부터 계산하였다.

### 9. MTT 분석

세포독성 및 암세포 증식억제 효과 측정은 Lee 등<sup>18</sup>의 방법

을 응용하여 측정하였다. 즉, 대식세포주인 Raw 264.7 세포에 대한 세포독성과 인간 유래 섬유성육종암세포인 HT 1080 세포에 대한 증식 억제효과를 보기 위해 밀집세포의 미토콘드리아 탈수소 효소에 의해 자주빛 formazan 생성물로 변하는 MTT 환원을 바탕으로 MTT 분석법으로 측정했다. HT 1080 세포와 Raw 264.7 세포 각각 RPMI-1640 배지를 이용  $1 \times 10^7$  cell/ml의 밀도로 현탁하여 24 well plate에 500  $\mu$ l씩 분주한 후 3시간 incubation 하였으며 여기에 각각의 농도로 희석한 추출시료 5  $\mu$ l 넣어 처리한 후 24시간 배양하였다. 배양 후 MTT 용액을 각 plate에 20  $\mu$ l 첨가하고 다시 2시간 동안 배양하여 MTT가 환원되도록 하였다. 배양 종료 후 MTT-formazan 생성물은 DMSO를 이용하여 용해하여 570 nm에 흡광도를 측정하였다.

10. 통계처리

모든 자료의 통계분석은 SPSS program을 이용하여 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)로 검정하여 평균  $\pm$  표준오차로 나타내었으며, 유의성 검정은 Duncan's multiple range test에 따라  $p < 0.05$  수준에서 검정하였다.

결 과

1. 균사체량 측정

법제유황 강화 배지에서 배양한 동충하초 균사체량은 법제 유황을 넣지 않은 0 ppm 농도 배지에서의 균체량이 0.55 g로 나타난데 반해 500 ppm 농도 배지의 균체량은 0 ppm 농도의 균체량과 유의적인 차이 없이 0.52 g로 나타났다. 그러나 1000 ~ 2500 ppm 농도 배지에서의 동충하초 균사체량은 각각 0.58 ~ 0.61 g로 균 간 유의적인 차이 없이 0 ppm보다 높게 나타났으며, 3000 ppm 농도 배지에서의 균사체량은 유의적으로 가장 높은 0.74 g로 나타났다. 따라서 법제유황 1000 ~ 2500 ppm 농도의 시료군 간에는 균체량 증식에 큰 변화를 보이지 않아 1500 ppm 농도에서 자란 동충하초 균사체와 균체량이 가장 높았던 3000 ppm의 동충하초 균사체를 선정하여 각각 CM + PSL, CM + PSH라 명명하여 법제유황을 넣지 않은 0 ppm 동충하초 균사체 시료인 CM과 함께 본 실험의 시료로 사용하였다(Fig. 1).

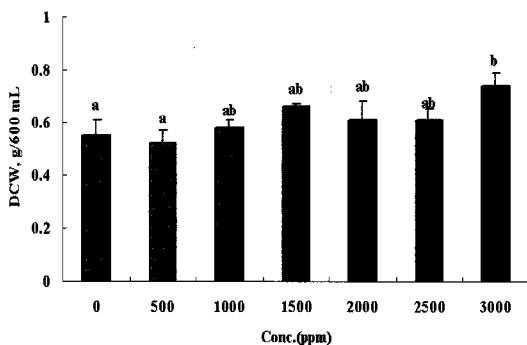


Fig. 1. Effect of processed sulfur concentration on the *Cordyceps militaris* mycelium growth. Values are mean  $\pm$  SE of triplicate determinations. Means with different superscripts within a table are significant different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

2. 균사체 내 유황 함량

법제유황 강화 동충하초 균사체 내의 유황 함량을 측정할 결과, 저농도 법제유황 강화 동충하초 균사체(CM+PSL)는 3,985.60 ppm, 고농도 법제유황 강화 동충하초 균사체(CM+PSH)는 3,532.80 ppm로 동충하초 균사체(CM)의 1,483.50 ppm보다 유의적으로 황의 함량이 높게 나타났다. 또한, 첨가한 법제 유황 대비 유기 유황으로의 변환율은 법제 유황을 넣지 않은 CM에서 1.48, CM+PSH 1.18인 반면 CM+PSL 2.66로 나타났다(Table 1).

Table 1. Organic sulfur contents of processed sulfur with *Cordyceps militaris* mycelium

	Sulfur (ppm)	Converting ratio
CM	1483.50 $\pm$ 174.70 <sup>a</sup>	1.48
CM + PSL	3985.60 $\pm$ 4.60 <sup>b</sup>	2.66
CM + PSH	3532.80 $\pm$ 82.40 <sup>b</sup>	1.18

Values are mean  $\pm$  SE of triplicate determinations. Means with different superscripts within a table are significant different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test. CM : *Cordyceps militaris* mycelium of PDB culture, CM + PSL : CM + 1500 ppm of processed sulfur culture, CM + PSH : CM + 3000 ppm of processed sulfur culture.

3. 총 폴리페놀 화합물 함량

법제 유황 강화 동충하초 균사체의 총 폴리페놀 화합물 함량은 동충하초 균사체(CM)는 36.13  $\mu$ g/ml로 가장 높은 함량을 보였으며 농도별 법제유황 강화 동충하초 균사체에서 각각 CM+PSL는 34.21, CM+PSH는 34.64  $\mu$ g/ml로 나타났다(Table 2).

Table 2. Total polyphenolic compounds contents in processed sulfur with *Cordyceps militaris* mycelium ( $\mu$ g/ml)

Conc. (mg/ml)	CM	CM + PSL	CM + PSH
Total polyphenolic compounds	36.13 $\pm$ 0.50 <sup>b</sup>	34.21 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>	34.64 $\pm$ 0.61 <sup>ab</sup>

Values are mean  $\pm$  SE of triplicate determinations. Means with different superscripts within a table are significant different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test. Abbreviated words of experimental groups are same as table 1.

4. 전자공여능

법제 유황 강화 동충하초 균사체의 1, 5, 10, 20 mg/ml 농도에서 전자공여능(Electron donating ability, EDA)은 1 mg/ml의 농도에서 CM 9.26%, CM+PSL 6.63% 및 CM+PSH 6.01%로 CM에서 유의적으로 높게 나타났다. 5 mg/ml의 농도에서는 유의적인 차이 없이 각 시료 모두 15.49 ~ 13.03%로 나타났으며, 10 mg/ml 농도에서는 CM 25.77%, CM+PSH 23.24% 및 CM+PSL 19.08%의 순으로 나타났다. 한편, 20 mg/ml 농도에서 CM+PSH가 43.49%로 가장 높았으며 CM 40.92%, CM+PSL 37.24%의 순으로 나타났다(Table 3).

Table 3. Electron donating abilities in processed sulfur with *Cordyceps militaris* mycelium (%)

Conc. (mg/ml)	1	5	10	20
CM	9.26 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	15.49 $\pm$ 0.95	25.77 $\pm$ 0.44 <sup>c</sup>	40.92 $\pm$ 0.66 <sup>b</sup>
CM + PSL	6.63 $\pm$ 0.55 <sup>a</sup>	12.74 $\pm$ 1.47	19.08 $\pm$ 0.50 <sup>a</sup>	37.24 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>
CM + PSH	6.01 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	13.03 $\pm$ 0.27	23.24 $\pm$ 0.54 <sup>b</sup>	43.49 $\pm$ 0.69 <sup>c</sup>

Values are mean  $\pm$  SE of triplicate determinations. Means with different superscripts within a table are significant different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test. Abbreviated words of experimental groups are same as table 1.

5. SOD 유사활성

법제 유황 강화 동충하초 균사체의 1, 5, 10, 20 mg/ml 농도

에서 SOD 유사활성능(Superoxide dismutase-like activity)은 1 mg/ml의 농도에서 유의적인 차이 없이 각각 CM 9.91%, CM+PSL 11.70% 및 CM+PSH 7.20%로 나타났다. 5 mg/ml의 농도에서는 유의적으로 CM이 가장 높은 43.53%를 보인 반면, CM+PSL 34.30% 및 CM+PSH 13.30% 순으로 나타났으며, 10 mg/ml 농도에서도 마찬가지로 CM이 59.36%로 유의적으로 가장 높게 나타났다. 또한 20 mg/ml 농도에서 CM이 75.25%로 가장 높은 활성을 보였다(Table 4).

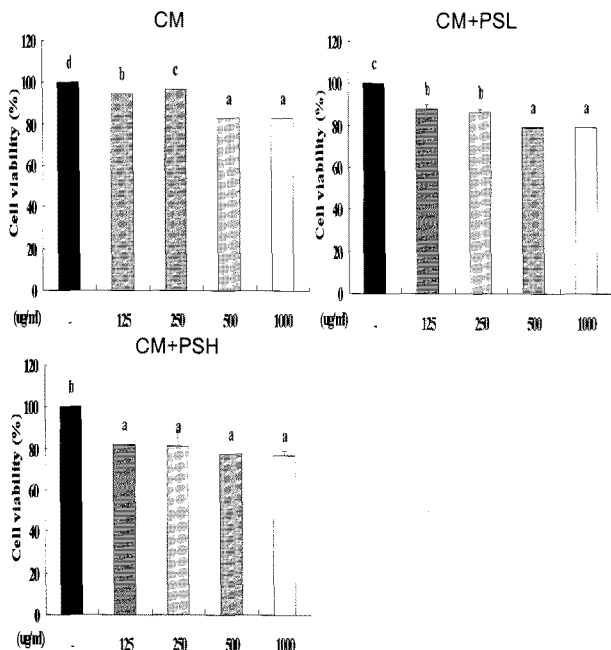
**Table 4.** SOD-like activities of processed sulfur with *Cordyceps militaris* mycelium (%)

Conc. (mg/ml)	1	5	10	20
CM	9.91 ± 5.36	43.53 ± 0.80 <sup>c</sup>	59.36 ± 1.97 <sup>d</sup>	75.25 ± 1.35 <sup>e</sup>
CM + PSL	11.70 ± 0.74	34.30 ± 0.55 <sup>b</sup>	35.84 ± 4.56 <sup>b</sup>	53.39 ± 4.86 <sup>c</sup>
CM + PSH	7.20 ± 0.80	13.30 ± 2.96 <sup>a</sup>	34.67 ± 3.02 <sup>a</sup>	46.92 ± 0.12 <sup>a</sup>

Values are mean ± SE of triplicate determinations. Means with different superscripts within a table are significant different at p<0.05 by Duncan's multiple range test. Abbreviated words of experimental groups are same as table 1.

6. 대식세포(Raw 264.7)에 대한 세포독성

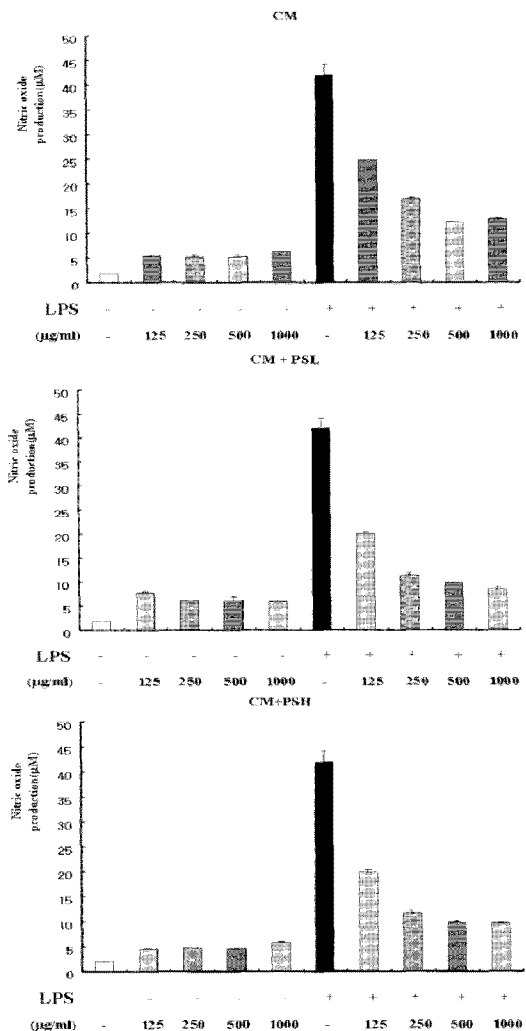
법제 유향 강화 동충하초 균사체의 세포독성을 측정하기 위하여 대식세포(Raw 264.7)에 각 시료를 농도 의존적으로 처리하여 24시간 후에 세포의 생존율을 측정한 결과, 무처리군의 세포 생존도 100%를 기준으로 125, 250, 500 및 1000 µg/ml 농도에서 유의적인 차이를 보였다. 즉, CM은 94.17, 96.60, 82.87 및 82.80%의 생존율을 보인 반면, 법제유향 강화시킨 동충하초 균사체에서 CM+PSL은 88.00, 86.60, 78.93 및 78.73%였으며 CM+PSH는 81.80, 81.07, 77.67 및 77.00%로 측정되었다. 즉, 대식세포에서는 125 ~ 1000 µg/ml 농도에서 실험군 모두 75% 이상의 세포생존율을 나타내어 독성이 거의 없는 것으로 나타났다(Fig. 2).



**Fig. 2.** Effect of processed sulfur with *Cordyceps militaris* mycelium on cytotoxicity in Raw 264.7 cell. Different superscripts indicate significant difference by Duncan's multiple range test(p<0.05). Abbreviated words of experimental groups are same as table 1.

7. NO 생성에 미치는 영향

법제유향 강화에 따른 동충하초 균사체의 항염증 효과에 미치는 영향을 조사하기 위하여 Raw 264.7 세포에서 LPS에 의한 NO 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 각 시료군을 125, 250, 500 및 1000 µg/ml 농도로 전 처리하고 LPS로 자극하였다. 24시간 후에 세포 상층액에서 NO의 생성을 측정하고, 무처리 대조군에서는 NO의 생성이 2.01 µM로 거의 생성되지 않은 반면, LPS 처리 후 세포가 활성화됨으로써 40.60 µM 농도로 현저히 증가하였다. LPS로 자극한 대조군에 비해 CM, CM+PSL 및 CM+PSH 모두 농도 의존적으로 NO 생성이 유의적으로 감소하였다. 즉, 125, 250 µg/ml 농도에서 CM은 24.81, 16.93 µM인 반면 CM+PSL과 CM+PSH는 각각 20.10, 12.33 µM과 19.87, 12.96 µM로 유의적으로 낮게 나타났다. 500 µg/ml 농도에서는 LPS로 자극한 대조군이 40.60 µM인 반면 CM 11.47 µM, CM+PSL 9.84 µM 및 CM+PSH 8.64 µM로 각 실험군 간 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 한편, 1000 µg/ml 농도에서 CM 11.75 µM인 반면 CM+PSL과 CM+PSH는 각각 9.88, 9.77 µM로 유의적으로 낮게 나타났다(Fig. 3).



**Fig. 3.** Inhibition of LPS-induced NO production by processed sulfur with *Cordyceps militaris* mycelium in Raw 264.7 cell. Abbreviated words of experimental groups are same as table 1.

8. HT 1080(fibrosarcoma cell, 섬유육아종) Cell의 증식 억제 효과  
 법제유황 강화 동충하초 균사체에 대한 HT 1080(fibrosarcoma cell, 섬유육아종)세포의 MTT assay에 의한 항암 활성의 결과, 무처리군의 세포생존도 100%를 기준으로 각 시료는 125, 250, 500 및 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 암세포 증식 억제 효과를 보였다. 125  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 CM과 CM+PSL은 각각 90.31, 88.37%로 유의적으로 낮은 세포 생존율을 보였으며, 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서는 각각 88.02, 91.40 및 89.73%의 세포 생존율을 보였으나 각 구간 유의적인 차이는 볼 수 없었다. 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서는 무처리 대조군에 비해 CM, CM+PSL 및 CM+PSH 각각 84.81, 88.68 및 85.78%의 유의적으로 낮은 세포 생존율을 보였으며 1,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 역시 무처리 대조군에 비해 세 실험군 모두에서 유의적으로 낮은 세포 생존율을 보였다(Fig. 4).

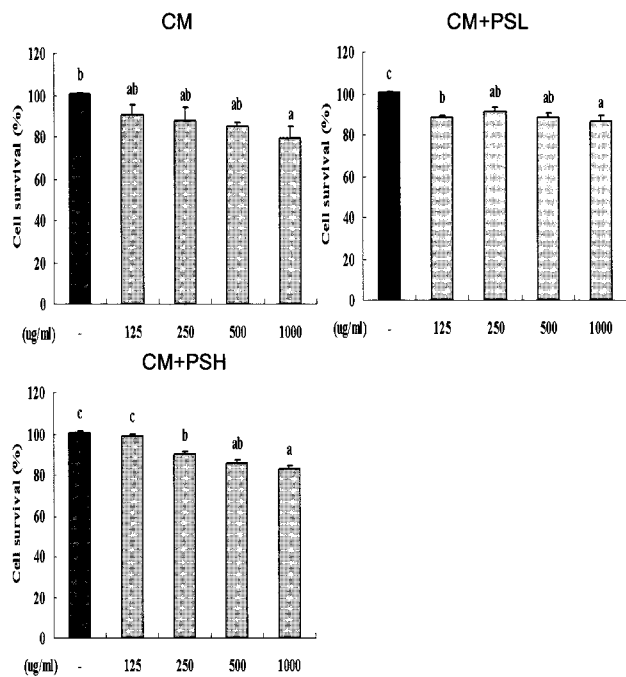


Fig. 4. Cytotoxic effect of processed sulfur with *Cordyceps militaris* mycelium on HT1080 cell. Different superscripts indicate significant difference by Duncan's multiple range test( $p < 0.05$ ). Abbreviated words of experimental groups are same as table 1.

## 고찰

광물성 약재는 《神農本草經》에 41종, 《本草綱目》에 375종, 《東醫寶鑑》에 143종, 대한약전의 한약규격집 주해서<sup>19)</sup>에 34종이 수록되어 여러 질병의 치료에 활용되어 왔음에도 불구하고 식물성, 동물성 약재에 비해 관련 연구가 매우 미미해 광물성 약재에 대한 인식이 점차 사라져가고 있는 추세이다.

광물성 약재인 유황은 性이 溫 하고 毒이 있어 內服할 때는 신중히 사용해야 하고 마땅히 법제를 하여 사용하도록 하고 있어 현대에서는 매우 국한적으로 사용되고 있으며 그로 인해 유황의 여러 효능에도 불구하고 內服에 대한 연구는 매우 제한적인 수준에 그치고 있다. 유황의 法製에 관해서는 《證類本草》에

火煉, 燒煉하는 製法과 《三因極病證方論》에 猪腸內煮製法, 《普濟方》의 羅菴製, 《醫學入門》의 豆腐中煮 등의 제법이 기록되어 있으나 현대에는 羅菴製, 豆腐中煮, 猪腸內煮 등의 방법이 사용되고 있다<sup>20)</sup>. 본 실험에서는 유황의 법제 방법 중에서 羅菴製를 변형한 것으로 羅菴子의 5종의 한약재와 煎湯한 후 침지, 회수하여 가열하여 완전히 용융시킨 뒤 건조해 사용하는 방법을 사용하였다. 그러나 이 방법들이 유황의 독을 완전히 해독시키는 것에 대해서는 실험적으로 증명된 바는 없다. 따라서 유황을 동물에게 투여하여 그 독성을 분해해 사용하는 유황오리와 같은 2차적인 방법 등 유황의 안전성을 고려한 보다 안전한 법제 방법에 대한 고려가 필요하다.

본 연구에서는 법제유황을 동충하초 균사체에 유입시킨 후 이들의 융합으로 얻어진 법제유황 동충하초 균사체의 안전성과 생리활성을 알아보고자 *in vitro* 분석으로 항산화 활성 및 대식세포(Raw 264.7 cell)에서의 MTT assay에 의한 세포독성, NO 생성능에 의한 항염증 활성, 인간유래 섬유육종암세포(HT 1080 cell)에서 MTT assay에 의한 항암활성을 측정하였다.

법제 유황 무첨가 배지(PDB 배지) 및 법제 유황 농도별 첨가 배지에서 동충하초를 배양한 결과, 법제 유황 무첨가 배지에서 자란 동충하초 균사체는 0.55 g/600 ml인 반면 법제 유황이 500 ~ 3000 ppm의 농도로 첨가되어진 배지에서 자란 동충하초 균사체는 농도 의존적으로 증가하여 0.52 ~ 0.74 g/600 ml로 나타났는데 이는 동충하초가 성장하면서 법제유황을 이용하고자 당, 산, 단백질 등의 유기물들을 결합시켜 그 질량이 증가하기 때문으로 사료된다. 이에 따라 법제유황 농도별 강화 동충하초 균사체에 있어 무첨가 배지에서 자란 동충하초 균사체(CM), 1500 ppm농도에서 자란 동충하초 균사체(CM+PSL) 및 3,000 ppm농도에서 자란 동충하초 균사체(CM+PSH)를 선정하여 본 실험에 사용하였다.

각 시료의 황 함량을 ICP 질량분석 방법으로 실험한 결과, 법제유황 무첨가배지에서 자란 CM의 경우 1,483 ppm으로 나타난 반면, CM+PSL과 CM+PSH는 각각 3,985, 3,532 ppm으로 나타났다. 이는 동충하초 균사체가 배양액 내의 법제유황을 흡수하여 생체 내에서 유기화 함으로써 유기 법제유황이 생합성 된 것으로 판단된다. 특히 유기 황으로의 전환율은 3,000 ppm 농도에서의 동충하초 균사체보다 1,500 ppm 농도에서 2배 정도의 전환율이 높게 나타났다. 즉, 적정 농도에서 전환율이 높음을 알 수 있었으며, 이에 대한 동충하초 균사체 내의 유기 황 생합성 과정에 대한 기전은 향후 더욱 연구되어야 할 것이다.

페놀성 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로 항산화, 항균 활성 등의 생리활성 기능을 나타내며<sup>21,22)</sup>, 일반적으로 항산화 활성을 나타내는 물질은 페놀성 화합물이 작용하는 것으로 알려져 있다. 한편, 전자공여능은 DPPH radical 소거법을 이용하는데, 항산화 효과를 볼 때 기본적으로 이용되는 물질로써 짙은 청색이 항산화 물질에 의해 환원됨에 따라 탈색되는 정도를 흡광도를 이용하여 측정한다<sup>23)</sup>. Superoxide dismutase(SOD)는 생체내의 superoxide radical을 산소로 산화시켜주는 천연 항산화제인데 분자량이 큰 단백질 물

질로 생체 내 흡수율 등의 문제점이 있어 최근에는 SOD 유사능을 가지고 있는 저분자 물질의 연구가 진행되고 있으며 특히 항산화 기능과 연관이 있는 SOD유사능을 갖는 물질은 SOD와 결합된 phenol류 인 것으로 Nice 등<sup>24)</sup>이 보고하고 있다.

법제 유향 강화 동충하초 균사체의 항산화 분석 결과, 총 폴리페놀 화합물 함량은 CM이 36.13  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 가장 높게 함유되었으며, 법제유향 강화 동충하초 균사체 CM+PSL과 CM+PSH는 34.21, 34.61  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 함량을 보였다. 전자공여능은 1, 5, 10 20 mg/mL농도에서 농도 의존적으로 활성이 증가하였으며 CM, CM+PSL 및 CM+PSH는 10, 20 mg/mL농도에서 시료 군 간 차이를 보였다. 즉 10 mg/mL농도에서 CM은 25.77%로 가장 높은 활성을 보였으며, CM+PSH, CM+PSL의 순으로 나타났으며, 20 mg/mL농도에서는 CM+PSH가 43.49%로 가장 높은 활성을 보였다. SOD 유사활성은 전자공여능과 마찬가지로 농도 의존적으로 농도가 높아짐에 따라 활성능은 높게 나타났으며, 특히 CM은 75.25%로 가장 높은 활성을 보였다.

대식세포는 체내로 유입된 암세포 등 이물질질을 비특이적으로 탐식, 소화하여 NO(nitric oxide),  $\text{H}_2\text{O}_2$ (hydrogen peroxide) 등의 세포독성 물질을 분비하여 암세포 등을 파괴하는 면역세포이다. 또한 대식세포는 암세포를 탐식하는 과정에서 IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  등의 cytokine과 phosphatase 등의 효소를 분비하여 체내 면역체계를 조절하며 각종 염증반응이나 조절작용에도 관여하는 중요한 면역기관으로<sup>25)</sup>, 대식세포의 활성화 지표인 NO 생성능과 연계하여 대식세포의 활성능 및 면역활성 나아가 항암활성 등에 관하여 많은 보고가 되어 있다<sup>26,27)</sup>.

본 연구에서는 Raw 264.7 cell을 이용하여, 법제 유향 무침가 동충하초 균사체(CM)과 농도별 강화 동충하초 균사체(CM+PSL, CM+PSH)를 농도 의존적으로 처리하여 24시간 후에 세포 생존율을 측정할 결과, 실험군 모두 75% 이상의 세포 생존율을 나타내어 대식세포에 대한 세포독성은 그리 높지 않은 것으로 나타났다.

활성산소종의 일종인 NO는 short-lived free radical로서 혈관 내 항상성을 유지시키고 뇌에서 신호전달 및 항암, 세포 독성 등에 관여하는 세포신호 전달자이며, LPS 자극에 의해 대식세포로부터 L-arginine으로부터 iNOS에 의해 NO free radical이 생성되면, 산소와 쉽게 결합하여 peroxynitrite(ONOO-)를 형성하고 pro-oxidant molecule인 NO가 다량 생성되는데 이들은 손상된 조직이나 세포에 세포독성을 통해 염증반응을 나타내게 된다<sup>28-30)</sup>. 본 연구에서 LPS에 의해 활성화된 Raw 264.7 대식세포가 과도하게 생성하는 NO 생성을 농도 의존적으로 모든 시료에서 유의적으로 낮은 활성을 보였으며 특히, 법제 유향을 첨가하지 않은 동충하초 균사체(CM)보다 법제유향 강화 동충하초 균사체(CM+PSL, CM+PSH)에서 유의적으로 감소시키는 것으로 나타났다. 이는 법제유향의 처리로 인해 대식세포에서의 과도한 NO 생성을 효과적으로 억제하였기 때문에 법제 유향 강화 동충하초 균사체가 iNOS 유전자 발현 역시 억제시키는 것으로 보여진다. 따라서 NO의 과도한 생성을 효과적으로 억제시킴으로써 항염증 효과를 나타내며, 이런 법제 유향 강화 동충하초 균사체를 통해

다양한 염증성 질환 개선을 위한 다각적인 연구가 필요할 것으로 판단된다. 한편, 법제유향 강화 동충하초 균사체에 대한 HT 1080(fibrosarcoma cell, 섬유육아종) 세포의 MTT assay에 의한 항암 활성측정 하였는데, 암세포의 경우 대사과정에서 미토콘드리아의 탈수소 효소 작용에 의해 노란색 수용성 MTT tetrazolium을 자주색을 띠는 비수용성의 MTT formazan으로 환원시킨다. MTT formazan의 흡광도는 550 nm근처 파장에서 최대가 되며, 이는 대사적으로 왕성한 세포의 농도를 반영하는 것이다<sup>31)</sup>. 본 연구 결과, 무처리군의 세포 생존도 100%를 기준으로 CM 및 CM+PSL, CM+PSH는 모든 농도에서 유의적으로 암세포 증식 억제 효과를 보였으나 향후 여러 가지 암 세포주에 대한 항암활성을 확인할 필요가 있을 것으로 사료된다.

## 결론

동충하초 균사체에 유입시킨 법제유향(processed sulfur, PS)의 생리활성을 평가하고자 항산화 활성 및 대식세포(Raw 264.7 cell)에서의 세포독성, NO 생성능에 의한 항염증 활성, 인간유래 섬유성육종암세포(HT 1080 cell)에서의 항암활성에 미치는 영향을 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

법제유향 강화 배지에서 동충하초 균사체를 배양하여 총 균사체량을 측정할 결과, 농도 의존적으로 균사체량의 증식은 유의적으로 증가함을 알 수 있었다. 법제유향 강화 동충하초 균사체 내 유기 유향 함량을 측정할 결과, 대조군인 CM보다 법제유향 농도 별 동충하초 균사체 CM + PSL, CM + PSH에서 유의적으로 높았고, 1500 ppm에서 균주 내에 축적된 대부분의 황이 유기 유향으로 전환된 반면, 3000 ppm에서 전환율이 낮았다. 총 폴리페놀 함량은 CM, CM+PSL 및 CM+PSH 모두 유사하게 나타났으며, 전자공여능과 SOD 유사활성능은 농도에 비례하여 높게 나타났으며, 농도가 높을수록 CM에서 유의적인 차이로 높은 활성능을 보였다. 동충하초 균사체 및 법제유향 강화 동충하초 균사체의 세포독성을 조사한 결과, 대식세포(Raw 264.7)에 대한 세포 생존율은 대조군의 세포생존율 100%를 기준으로 시료 군 간 큰 차이는 나타나지 않았으나, 모든 농도에서 유의적으로 75% 이상의 높은 세포 생존율을 나타내어 독성이 없는 것으로 나타났다. 항염증 활성에 미치는 영향을 조사하기 위해 대식세포(Raw 264.7)에서 LPS에 의한 NO 생성에 대한 효과를 실험한 결과, LPS로 자극한 대조군에 비해 CM+PSL과 CM+PSH에서 농도 의존적으로 억제함을 알 수 있었다. 인간 유래 섬유성육종암 세포(HT 1080)에 대한 증식억제능을 확인 한 결과 대조군의 세포 생존율 100%를 기준으로 시료 군 간 큰 차이는 나타나지 않았으나, CM 및 CM+PSL, CM+PSH는 모든 농도에서 유의적으로 암세포 증식 억제 효과를 보였다.

이상의 결과를 종합해 보면 법제 유향의 약리적 효능을 가진 동충하초 균사체에 유입시킨 법제유향의 항산화 효과는 동충하초 균사체만 배양한 실험군에 비해 다소 낮은 활성을 보였으나, 대식세포의 세포독성 및 NO 생성능, 항암활성에서는 유용한 효과가 있음을 확인하였다. 또한 법제 유향의 독성에 대한 안전

성도 일부 확인하였으며, 향후 지속적인 실험과 면밀한 연구 검토 후 법제 유행의 다양한 활용이 가능할 것으로 판단된다.

## 참고문헌

1. In National Statistical Office. Annual report on the cause of death statistics. Republic of Korea, 2001.
2. Kim, S.W. and Kim, E.S. Studies on the immunomodulating effects of polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* on macrophage. *J Korean Soc Food Sci Nutri* 26: 148-153, 1997.
3. Ryu, H.S., Kim, H.S. Effect of Zingiber Officinal Roscoe extracts on mice immune cell activation. *Korean J Nutri* 37: 23-30, 2004.
4. Park, J.C., Ok, M., Cha, J.Y. and Cho, Y.S. Isolation and identification of the high-glutathione producing *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 from korean traditional rice wine and optical producing conditions. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 46: 348-352, 2003.
5. 본초학교수공저. 본초학 6판. 서울, 영림사, pp 639-640, 1991.
6. 김성은, 서영배. 법제 유행이 실험적 골 질환에 미치는 영향. *대한동의병리학회지* 10(1):79-87, 1996.
7. Barretine, B.F., Ruffin, B.G. Salt and gypsum as regulators of cottonseed meal intake. *Miss.State Univ. Agri Sta Inform Cheet*. p 587, 1958.
8. Bouchard, R. and H.R. Conrad. Sulphur requirement of lactating dairy cows. H. Utilization of sulphates, molasses and lignin-sulfonate. *J Dairy Sci* 56: 142, 1973.
9. Park, C.S., Kwon, C.J., Choi, M.A., Park, G.S. and Choi, K.H. Antibacterial activities of *Cordyceps* spp, Mugwort and pine needle extracts. *Korean J of Food Preservation* 29: 121-131, 2002.
10. Lee, S.H., Ko, S.S., Youn, Y.J. and Lee, J.I. Effect of *Cordyceps militaris* on maximal aerobic power and recovery of fatigue. *JKSSPE* 6(2):187-193, 2002.
11. Kim, M.N., Oh, S.W., Lee, D.S. and Ham, S.S. Antioxidative and antimutagenic effect of the ethanol extract from *Cordyceps militaris*. *Korean J Postharvest Sci Technol* 8(1):109-117, 2001.
12. Kim, J.H., Cho, M.R., Ryu, C.R. and Chae, W.S. Effect of *Cordyceps militaris* mycelia (CMM) oral administration and herbal acupuncture at BL13, LU4 on asthma induced by ovalbumin in rats. *The Journal of Korean Acupuncture & Moxibution Society* 19(2):39-50, 2002.
13. Kim, S.J., Lim, D.K., Park, C.W., Cerbo, R.M., Hyung, S.W., Lee, K.K., Kim, J.O. and Ha, Y.L. Inhibition of free radical-induced lipid oxidation by the extract from submerged liquid culture of mushrooms in the medium containing mulberry tree powders. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33(2):255-261, 2004.
14. Kim, H.S., Roh, Y.J. and Choe, M. *Cordyceps militaris* increases hepatic glucokinase activities. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34(2):158-161, 2005.
15. Lee, S.T., Lee, Y.H., Choi, Y.J., Lee, S.D., Lee, C.H., Han, J.S. Growth characteristics and germanium absorption of rice plant with different germanium concentration in soil. *Korean J Environ Agri* 24(1):40-44, 2005.
16. AOAC. Official Methods of Analysis, 8th ed, Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C., U.S.A. p 144, 1985.
17. Blois, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *J Agric Food Chem* 25: 103-107, 1977.
18. Lee, B.G., Kim, S.H., Zee, O.P., Lee, K.R., Lee, H.Y., Han, J.W., Lee, H.W. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in Raw 264.7 macrophages by two-carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*. *Eur Pharmacol* 406: 301-309, 2000.
19. 지형춘, 이상인. *대한약전의 한약규격집주해*. 서울, 한국메디컬인텍스사, p 89, 1988.
20. 김기영, 송호준. *한약포제학*. 서울, 신일상사, pp 515-516, 1992.
21. Azuma, K., Kakayama, M., Koshica, M., Lppoushi, K., Kohata, K., Yamaguchi, Y., Ito, H., Higashio, H. Phenolic antioxidants from the leaves of *Corchorus olitorius* L. *J Agric Food Chem* 47: 3963-3966, 1999.
22. Ham, S.S., Hong, J.K., Lee, J.H. Antimutagenic effects of juices from edible Korean wild herbs. *J Food Sci Nutr* 2: 155-161, 1997.
23. Lee, Y.S. Antioxidative and physiological activity of extracts of *Angelica dahurica* Leaves. *Korean J Food Preserv* 14(1):78-86, 2007.
24. Nice, D.J., Robinson, D.S., Holden, M.A. Characterization of a heat stable antioxidant co purified with the superoxide dismutase activity from dried peas. *Food Chem* 52: 393-397, 1995.
25. Yamada, H., Kiyohara, H., Cyong, J.C., Otsuka, Y. Purification and characterization of complement activation acidic polysaccharide from the roots of *Lithospermum euchromum royale*. *International J Immunopharmacology* 8: 71-82, 1986.
26. Park, K.M., Kim, Y.S., Jeong, T.C., Joe, C.O., Shin, H.J., Kee, Y.H., Nam, K.Y., Park, J.D. Nitric oxide in involved in the immunomodulating activities of acidic polysaccharide from *Panax ginseng*. *Planta Medica* 67: 122-126, 2001.
27. Park, J.D. Recent studied on the chemical constituents of Korean ginseng(*Panax ginseng* CA Meyer). *Korean J*

- Gingseng Sci 20: 389-396, 1996.
28. Nathan, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. FASEB J 6: 3051-3064, 1992.
  29. Epe, B., Ballmaier, D., Roussyn, I., Brivida, K., Sies, H. DNA damage by peroxynitrite characterized with DNA repair enzyme. Nucleic acids Res 24: 4105-4110, 1996.
  30. Palmer, R.M., Ashtom, D.S., Moncada, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. Nature 333: 664-666, 1988.
  31. Park, J.G., Kramer, B.S., Steinber, S.M, Carmichael, J., Collins, J.M., Minna, J.D. and Gazdar, A.F. Chemosensitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines using a tetrazolium-based colorimetric assay. Cancer Res 47: 5875-5879, 1987.