

벤조피렌으로 유발된 흰쥐 간독성에 대한 번데기동충하초 배양액의 회복효과

조성준¹ · 이태희¹ · 김진만¹ · 한영환^{2*}

¹동국대학교 대학원 생명과학과, ²동국대학교 과학기술대학 생명과학과

번데기동충하초의 간독성 회복 효과를 HaM/ICR 계열의 흰쥐를 이용하여 검정하였다. 벤조피렌 복강주사시, 혈중의 aspartate aminotransferase (AST) 및 alanine aminotransferase (ALT)의 효소활성과 간조직의 lipid peroxide (LPO) 농도는 대조군과 비교시 급격히 증가하여 간독성을 유발하였다. 그러나, 벤조피렌 대조군과 비교시, 번데기 동충하초 배양액의 경구 투여시 AST와 ALT의 효소활성 및 LPO 농도는 감소하였으며, 벤조피렌에 유도된 간조직의 glutathione 농도 및 glutathione S-transferase 효소활성은 증가하여 간독성을 회복하였다. 실험결과는 번데기 동충하초 균사체 배양액이 벤조피렌 유발 간독성에 대해 회복 효과가 있음을 보여준다.

Key words □ *Cordyceps militaris*, hepatic damage, mouse, recovery

동충하초는 곤충기생균(entomopathogenic fungi)으로 자낭균강(Ascomycetes), 맥각균목(Clavicipitales), 맥각균과(Clavicipitaceae)에 속한다. 곤충의 유충, 번데기, 성충에 침입하여 기주 내에 내핵균핵을 만든 후 주로 여름철에 자실체를 형성한다. 전세계에 약 300여 종이 알려져 있으며 한국에는 약 80여 종이 보고되고 있다(9, 10). *Cordyceps* 속의 *C. sinensis*, *C. militaris*, *C. martialis*, *C. ophioglossoides*, *C. sobolifera*, *C. hawkesii*와 *Beuveria bassiana*, *Paecilomyces tenuipes* 등이 항암, 결핵, 천식, 자양강장, 마약중독 해독제 등의 한약재로 중국 및 동아시아 지역에서 사용되고 있다.

번데기동충하초(*C. militaris*)는 나비목(Lepidoptera)의 유충 또는 번데기를 기주로 하여 주황색의 곤봉형 자좌를 형성하는 곤충기생균의 일종이며 자낭각은 반돌출형이며 원통형의 자낭안에 실모양의 자낭포자들이 존재한다(10). 현재까지 번데기동충하초와 관련된 약리학적 연구는 항암(5, 6, 7, 11), 항돌연변이(2), 항혈청응고(8), 항고지혈증(4) 및 항세균(1)과 관련된 연구가 수행되어 왔다.

본 연구는 벤조피렌(benzo(α)pyrene)으로 간독성이 유발된 흰쥐에 대해 번데기동충하초 균사체 배양액의 간독성 회복 효과를 검정하기 위하여, 혈중의 aspartate aminotransferase (AST) 및 alanine aminotransferase (ALT) 효소활성과 간조직의 lipid peroxide (LPO), glutathione (GSH)의 농도 및 glutathione S-transferase (GST) 효소활성을 측정하여 간독성 회복을 검정하였다.

AST 및 ALT kit는 영동제약(주)로부터, GST assay kit 및 LPO assay kit는 Cayman Chem (USA)로부터 구입하였다. 5-5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, EDTA 및 벤조피렌은 Sigma Co. (USA)로부터 구입하여 사용하였다.

HaM/ICR 계열의 7주령 웅성 흰쥐를 사용하였다. 항생제 무침

가 사료를 식이하여, 12시간 간격의 light-dark cycle을 유지되는 항온실(23±1°C, 습도 50~60%)에서 수행되었다. 5마리의 흰쥐를 1개의 군으로 대조군, 동충하초 균사체 배양액 투여군, 벤조피렌 투여 간독성 유발군, 번데기동충하초 균사체 배양액-벤조피렌 동시 투여군으로 나누어 수행하였다. 번데기동충하초 균사체 배양액은 흰쥐 kg 체중 당 50 mg의 비율로 5주간 경구투여하였다. 벤조피렌의 간독성 유발은 채혈 24시간 전에 흰쥐 kg 체중당 0.3 mg의 비율로 복강주사하였다.

번데기동충하초(*C. militaris* KCTC 6064)는 유전자은행으로부터 분양받아 사용하였다. 균사체 배양은 24°C에서 GYM 액체 배양매지(glucose 1.0%, yeast extract 0.5%, malt extract 0.5%)를 사용하여 진탕배양(120 rpm)하였다. 30일 배양 후 균사체 배양액을 여과지(Whatman No. 2, Toyo)로 여과한 다음, 배양 여액을 동결건조(Clean-vac 12, BioTron)한 후 마쇄하여 시료(CFD)로 사용하였다.

혈중 AST와 ALT 효소활성을 측정하기 위하여, 에테르로 질식된 흰쥐의 좌심방으로부터 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 실온에서 60분간 방치한 후, 4°C, 15,000 rpm으로 15분간 원심분리(Supra 25K, USA)한 상등액을 사용하였다. 실험은 영동제약(주)의 분석방법에 따라 AST 및 ALT kit를 이용하여 측정하였다. 효소활성은 혈청 ml당 Karmen unit로 표시하였다.

간조직의 LPO, GSH의 함량과 GST 효소활성을 측정하였다. 4 배의 인산완충용액(0.1 M, pH 7.4)에서 간조직을 homogenizer로 파쇄(4°C, 2,500 rpm×10분)한 다음, 14,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상등액을 얻어 사용하였다. GST 활성은 Habig 등(3)의 방법을 사용하였다. 실험 결과는 평균값±표준편차로 표시하였으며, 유의성은 SPSS program (SPSS Inc., USA)을 사용하여 분석하였다. P<0.05를 유의성 값으로 인정하였다.

AST 및 ALT는 간세포에 존재하는 효소로, 각 효소의 측정치는 간세포의 염증 정도를 판단하는 기준이 된다. 본 실험은 벤조

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-54-770-2213, Fax: 82-54-770-2515
E-mail: yhhan@dongguk.ac.kr

Table 1. Effect of *C. militaris* culture broth on the activities of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) in serum of mouse.

Group	AST*	ALT*
	Karmen unit/ml of serum	
Control	0	38.4±2.5
BP ^a	177.4±5.1 ^c	220.4±10.8
CFD ^b	0	17.2±1.7
CFD+BP	136.4±5.1	88.8±3.4

^a BP, 0.3 mg of benzo(α)pyrene per kg mouse body weight was intraperitoneally injected at 24 h before sacrifice.

^b CFD, 50 mg of CFD was orally administrated for 5 weeks.

^c Mean±standard deviation for 5 mice

* P<0.01

피렌에 의하여 간손상이 유발된 흰쥐의 번데기동충하초 배양액에 의한 간독성 회복의 영향을 AST 및 ALT 효소활성으로 비교하였다.

벤조피렌을 단독 투여한 흰쥐의 AST (177.4 Karmen unit) 및 ALT (220.4 Karmen unit) 측정치는 대조군의 AST (0 Karmen unit) 및 ALT (38.4 Karmen unit)과 비교시 높은 효소활성으로 벤조피렌에 의해 간독성이 유발됨을 보여주었다(Table 1). 그러나, CFD 투여군에서의 AST 및 ALT는 각각 0 및 17.2 Karmen unit로 대조군과 동일하거나 낮은 수치를 보여주어, CFD에 의한 간독성은 유발되지 않음을 보여주었다. 또한 CFD와 벤조피렌 동시 투여시, 벤조피렌 단독 투여군과 비교시 낮아짐을 보여 간독성이 회복됨을 나타내었다.

GSH는 글루탐산, 시스틴과 글리신으로 구성되어 있으며 GST 효소의 기질로서 중요한 역할을 한다. GSH는 세포 내에서 다양한 기능을 가지고 있으며, 특히 외부 독성물질의 세포내 유입시 직접 반응하거나 GST 효소의 작용에 의해 독성물질과 결합하여 독성을 약화시키는 기능을 담당한다. LPO의 측정치가 높거나 GSH의 측정치가 낮아짐은 간의 손상을 의미한다.

벤조피렌 처리군의 LPO 및 GSH 측정치는 310.2 및 184.7 μmol/g으로 정상 대조군의 측정치 29.7 및 380.1 μmol/g과 비교시 LPO 값은 증가하였고 GSH 값은 낮아져 벤조피렌이 간독성을 유발함을 알 수 있었다(Table 2). CFD 처리군의 LPO 및 GSH 측정치는 0 및 209.9 μmol/g으로 간독성을 유발하지 않음을 나타내었다. CFD-벤조피렌 처리군의 측정치는 벤조피렌 처리군과 비교시 CFD에 의해 어느 정도 간독성이 회복되는 효과가 있음을 보여주었다.

GST는 유리기를 소거하여 반응성이 높은 활성산소들로부터 세포를 보호하는 기능이 있다. GST 효소는 체내에 유입된 독성물질을 무독성 물질로 변환시키는 효소로 체내의 GST 효소활성이 낮을 경우 간의 손상을 의미한다.

벤조피렌 단독 처리시, GST 효소활성은 31.6 μmol/min/ml로 대조군의 50.3 μmol/min/ml과 비교시 낮아져 간독성이 유발되었음을 알 수 있다(Table 2). CFD 투여군의 GST 효소활성은 64.3 μmol/min/ml로 대조군과 비교시 높은 활성을 보여 주었다.

Table 2. Effect of *C. militaris* culture broth on the level of lipid peroxide (LPO) and glutathione (GSH), and the activity of glutathione S-transferase (GST) in liver of mouse

Group	Concentration	Activity		
	(μmol/g of tissue)	LPO*	GSH**	GST**
Control	29.7±1.6	380.1±6.6	50.3±0.1	
BP ^a	310.2±2.9	184.7±8.1	31.6±2.4	
CFD ^a	0	209.9±3.2	64.3±0.2	
CFD+BP	41.3±4.2	206.1±0.2	52.3±1.8	

^a BP and CFD, see in Table 1

* P<0.05

** P<0.001

CFD-벤조피렌 병용 투여군의 52.3 μmol/min/ml의 결과는 벤조피렌에 의해 유발된 간독성이 CFD에 의해 회복됨을 보여 주었다.

LPO, GSH의 농도와 AST, ALT 및 GST 효소활성의 실험결과, 번데기동충하초 배양액은 간독성을 유발하지 않음은 물론, 벤조피렌에 의해 유발된 흰쥐의 간독성을 회복시킴을 나타내었다.

참고문헌

- Ahn, Y.J., S.J. Park, S.G. Lee, S.C. Shin, and D.H. Choi. 2000. Cordycepin: selective growth inhibitor derived from liquid culture of *Cordyceps militaris* against *Clostridium* spp. *J. Agr. Food Chem.* 48, 2744-2748.
- Cho, M.A., D.S. Lee, M.J. Kim, J.M. Sung, and S.S. Ham. 2003. Antimutagenicity and cytotoxicity of cordycepin isolated from *Cordyceps militaris*. *Food Sci. Biotechnol.* 12, 472-475.
- Habig, W.H., M.J. Pabst, and W.B. Jakoby. 1974. Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139.
- Kim, H.S., Y.J. Roh, and M. Choe. 2005. *Cordyceps militaris* increases hepatic glucokinase activities. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 34, 158-161.
- Lee, H.M., Y.J. Lee, and T.S. Park. 2004. Tumor growth inhibitory and immunomodulatory activities of *Cordyceps militaris* water extracts in ICR mice bearing sarcoma-180 solid tumor. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 33, 59-65.
- Lee, H., Y.J. Kim, H.W. Kim, D.H. Lee, M.K. Sung, and T. Park. 2006. Induction of apoptosis by *Cordyceps militaris* through activation of caspase-3 in leukemia HL-60 cells. *Biol. Pharm. Bull.* 29, 670-674.
- Lim, H.W., Y.M. Kwon, S.M. Cho, J.H. Kim, G.H. Yoon, S.J. Lee, H.W. Kim, and M.W. Lee. 2004. Antitumor activity of *Cordyceps militaris* on human cancer cell line. *Kor. J. Pharmacogn.* 35, 364-367.
- Nam, Y.S., Y.H. Jo, K.S. Kim, and J.W. Hyun. 2001. Antifibrotic effect of extracellular biopolymer from submerged mycelial cultures of *Cordyceps militaris* on liver fibrosis induced by bile duct ligation and scission in rats. *Arch. Pharmacol. Res.* 24, 327-332.
- Sung, J.M. 1996. Insect-born fungi of Korea. Kyo-Hak Pub. Co. Ltd. Seoul, Korea.
- Sung, J.M., H.K. Lee, Y.S. Choi, Y.Y. Kim, S.H. Kim, and G.H. Sung. 1997. Distribution and taxonomy of entomopathogenic fungal species from Korea. *Kor. J. Mycol.* 25, 239-252.

11. Yoo, H.S., J.W. Shin, J.H. Cho, C.G. Son, Y.W. Lee, S.Y. Park, and C.K. Cho. 2004. Effects of *Cordyceps militaris* extract on angiogenesis and tumor growth. *Acta Pharmacol. Sin.* 25, 657-665.

(Received October 29, 2009/Accepted December 14, 2009)

ABSTRACT: Effect of Culture Broth of *Cordyceps militaris* on Recovery of Mice Hepatic Damage Caused by Benzo(α)pyrene-Treatment

Sung-Jun Jo¹, Tae-Hee Lee¹, Jin-Man Kim¹, and Yeong-Hwan Han^{2*} (¹Department of Biology, Graduate School, Dongguk University, Gyeongju 780-714, Republic of Korea, ²Department of Life Science, College of Science Technology, Dongguk University, Gyeongju 780-714, Republic of Korea)

The hepatoprotective effect of *Cordyceps militaris* culture broth was determined using HaM/ICR strain mice. Compared to control, the intra-peritoneal injection of benzo(α)pyrene (B(α)P) remarkably increased the activities of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) in the serum and the level of lipid peroxide (LPO) in liver tissue, which mean the liver was damaged by B(α)P. However, compared to B(α)P, oral administration of *C. militaris* culture broth showed decrement of AST, ALT, and LPO activities and increment GST activity and GSH level in liver tissue. These suggest that *C. militaris* culture broth recovered hepatic damage induced by B(α)P.