

Effect of Cordycepin-increased *Cordyceps militaris* Powder on Tissues Lipid Peroxidation and Antioxidative Activity in Carbon Tetrachloride-induced Hepatic Damage in Rats

Hee-Young Ahn¹, Kyu-Rim Park¹, Yu-Ra Kim², Jae-Young Cha³ and Young-Su Cho^{2*}

¹Department of Medical Biosciences, Graduate School, Dong-A University, Busan 604-714, Korea

²Department of Biotechnology, Dong-A University, Busan 604-714, Korea

³Technical Research Institute, Daesun Distilling Co, Ltd, Busan 619-951, Korea

Received June 7, 2013 / Revised July 24, 2013 / Accepted July 25, 2013

This study aimed to evaluate the protective effect of cordycepin-increased *Cordyceps militaris* strain on carbon tetrachloride (CCl₄)-induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats. Male Sprague-Dawley rats were randomly divided into five groups (*n*=6) based on six dietary categories: normal (N), CCl₄ control (C), CCl₄ plus *Paecilomyces japonica* (CPJ) (3%, w/w), CCl₄ plus *C. militaris* (CCM) (3%, w/w), and CCl₄ plus cordycepin-increased *C. militaris* (CCMa) (3%, w/w). The activities of the liver marker enzymes ALT, AST, and LDH and the levels of lipid peroxidation were increased in the CCl₄-treated groups, but these parameters were significantly decreased in the CCMa group. The TBARS content in the liver homogenate, microsome, and mitochondrial fractions of the C group was significantly elevated compared with the N group. However, in the CCl₄-treated groups, CCMa group was significantly lowered in the TBARS levels of hepatic homogenate and microsomal fractions. The C group showed a significant decrease in the levels of plasma and hepatic glutathione, whereas they were significantly increased in the CCMa group. Accordingly, cordycepin-increased *C. militaris* may be an ideal animal model for studying hepatoprotective effects.

Key words : *Cordyceps militaris*, *Paecilomyces japonica*, cordycepin, carbon tetrachloride (CCl₄), hepatotoxicity

서 론

간장은 인체에 있어서 가장 큰 장기 중 하나로서 생활하는 데 필수조직이며, 영양소의 대사기능, 해독기능, 순환 조절 기능에 관여하고 있다[9]. 장기 중 간 손상의 원인으로는 알코올, 흡연 외에도 바이러스에 의한 감염, 독물 또는 약제에 의한 중독, 영양장애 및 순환장애에서 스트레스 같은 신변의 원인 등 여러 가지를 들 수 있다. 한편, 사염화탄소는 유지, 고무 등의 용제에 이용되는 xenobiotics의 하나로서 microsomal mixed function oxidase에 의해 생성되는 trichloromethyl radical이 막의 지질과산화 반응 촉진 및 막구조와 기능 파괴 등을 초래하여 간손상을 유발시키는 화학 물질로 알려져 있다. 따라서 간의 단백질 합성과 글리코겐 저장량을 저하시키고 aspartate aminotransferase (AST) 및 alanine amino-

transferase (ALT)의 이탈을 일으켜 간세포의 괴사 및 섬유화 등이 보고되었으며[14] 투여방법, 경로 및 횟수에 따라 급성간염, 지방간, 간 경변 등의 간질환의 유발이 가능하기 때문에 투여 물질을 효과를 밝히는데 있어서 실험적으로 많이 이용되고 있다.

동충하초는 겨울에 곤충의 애벌레, 번데기, 성충에 포자가 침입하여 기주 안에서 내성균핵을 만든 후 온도와 습도가 높아지면 밖으로 자실체를 형성하는 버섯의 일종으로 전 세계적으로 약 300여 종이 보고되어 있으며 국내에는 약 70여 종이 보고되고 있다. 그 중에서 대표적인 동충하초 속으로는 완전세대 자낭균류(Ascomycetes)의 맥각균과(Clavicipitaceae)에 속하는 *Cordyceps*속과 불완전균류의 *Paecilomyces*속, *Torrubiella*속 및 *Podonectria*속이 대표적이다[14]. 동충하초에는 cordycepin, ergosterol, myriocin, polysaccharide 및 glycoprotein 등 다양한 생리활성 물질들이 함유되어 있으며[26], 특히, cordycepin (3'-deoxyadenosine)은 동충하초의 주요 생리활성 성분으로 nucleoside의 대사물질로 핵산계 항생제로서, 주로 *C. militaris* 및 *C. sinensis* 등의 자실체에 존재하고 있다. 아데노신 리보오스 잔기의 3번째 탄소에 산소가 결합된 구조 (Fig. 1)로 항당뇨 작용[27], 고지질혈증 개선작용[11] 및 혈소판 응집억제 작용[8] 등이 보고되었다. 우리나라의 경우 번데

*Corresponding author

Tel : +82-51-200-7586, Fax : +82-51-200-7505

E-mail : choys@dau.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

기 동충하초가 식품원료로 인정되면서 다양한 식품 개발과 더불어 재배 농가의 확대와 함께 번데기 동충하초의 코디세핀 함량 제시가 중요시 되고 있다. 또한 동충하초는 항균효과, 항종양, 항당뇨, 면역기능증가, 신장 기능의 보호 및 회복효과, 생체 산화방지, 자양강장효과가 있는 것으로 밝혀져 고지혈증, 심혈관계 질환, 당뇨병, 신장병, 호흡기계 질환, 성기능장애 등에 임상적으로 활용되고 있다[15]. 그러나 지방간을 비롯한 간 질환에 대한 동충하초의 개선효과에 관한 연구는 미진한 것으로 사료된다.

본 연구에서는 눈꽃 동충하초(*Paecilomyces japonica*)와 번데기 동충하초(*Cordyceps militaris*) 그리고 동충하초의 주요 생리활성 물질인 Cordycepin 함량을 육종에 의해 높은 번데기 동충하초(JLM0636)가 사염화탄소로 간손상을 유발시킨 흰쥐에 있어서 간장의 보호 효과에 대해 검토하고자 간기능 관련 효소 활성, 과산화 지질 농도 및 항산화 활성에 미치는 영향을 검토하였다.

재료 및 방법

실험동물, 식이조성 및 사육조건

실험동물은 6주령의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 ㈜대한 바이오링크(충북 음성, 한국)로부터 구입하여 온도 22±2℃, 습도 50±5%, 명암주기 12시간(명주기: 07:00~19:00)이 자동 설정된 동물 사육실에서 사육하였다. 식이 조성은 전보[6]에 준해서 조제하였으며, 육종에 의해 Cordycepin 함유량을 높은 *C. militaris* (JLM0636), *P. japonica*와 *C. militaris* 분말을 청원농산(김해, 경남)에서 제공받아 각각 3% 식이에 첨가 하였다.

본 실험에서는 체중이 동일하게 난괴법으로 분류하여 정상군(N), 사염화탄소 투여 대조군(C), 사염화탄소+*P. japonica* 투여군(CPJ), 사염화탄소+*C. militaris* 투여군(CCM), 사염화탄소+Cordycepin 고탍유 *C. militaris* (JLM0636) 투여군(CCM α)으로 나누어, 식이와 물은 4주간 자유섭취시켰다. 정상군(N)을 제외한 대조군 및 *P. japonica*, *C. militaris* 및 육종에 의해 Cordycepin 함유량을 높은 *C. militaris* (JLM0636) 투여군은 사염화탄소와 올리브유를 1:1 비율로 섞어 체중 100 g당 0.1 ml를 해부하기 48시간 전, 24시간 전 두번에 걸쳐 복강 주사하여 간 손상을 유발하였다. 사육 기간 중 식이 섭취량은 매일 측정하였고, 체중은 3일에 한번씩 일정한 시간에 측정하였다. 본 연구는 동아대학교 동물실험윤리심의위원회의 승인(승인번호: DIACUC-승인-11-24)을 받아 진행하였다.

동물실험, 시료 채취 및 분석시료 조제

동물실험은 4주간 각 군별로 조제사료를 급여하면서 사육한 후, 실험 최종일 12시간 이상 절식시킨 후 디에틸에테르로 가볍게 마취시켜 해부하였다. 개복 후 복부 대동맥으로부터 채혈하여 혈액을 채취하고, 약 30분간 실온에 방치시킨 후

3,000 rpm에서 20분간 원심분리 하여 혈청을 얻어 혈청 효소 분석에 제공하였다. 채혈 후 각 조직을 적출하여 차가운 0.9% 생리식염수로 세척하고 여과지로 물기를 제거한 후 무게를 측정하고 분석시료로 제공 하였다.

혈청 효소 분석

혈청 중의 간장의 손상 상태를 파악하는 몇몇 효소로 알려진 aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP) 그리고 lactate dehydrogenase (LDH) 활성은 의료전문수탁검사기관인 네오딘의학연구소(서울, 한국)에 의뢰하여 분석하였다.

각 조직의 분획 조제 및 과산화지질 측정

각 조직으로부터 homogenate 분획 조제는 조직을 일정량 취해 250 mM sucrose를 함유한 homogenate 용액을 4 배량 첨가하여 마쇄 균질액을 제조하였다. 분획한 homogenate 생체막의 과산화지질 함량은 전보의 방법[28]에 준하여 정량하였다. 즉, 각 조직 homogenate 분획 용액 1 ml에 각각 thio-barbituric acid (TBA) 시약 2 ml를 가하여 잘 혼합하고, 수조 상에서 30분간 가열한 후 실온에서 방냉하여 3,000 rpm으로 10분간 원심분리 한 상등액을 535 nm에서 흡광도를 측정하였다. 과산화지질 함량은 malondialdehyde를 nmol/g으로 나타내었다.

미네랄 함량 측정

각 조직의 미네랄 함량은 A.O.A.C. 분석 방법에 준하여 측정하였다[1]. 즉, 간 조직 1 g을 각 550℃ 회화로에서 3시간 회화시킨 후 6 N HCl에 용해시켜 완전히 산분해시켜 수욕상에서 산을 완전히 제거하고, 이 건고물에 3 N HCl를 가하여 Whatman No. 4 여과지로 여과하여 원소 종류에 따라 각각 일정비율로 희석하여 원자흡광 분광광도계(AAnalyst 300, Perkin Elmer, Norwalk CT, USA)를 이용하여 측정하였다.

Glutathione 함량 측정

Glutathione 함량은 각 조직의 homogenate 분획 0.2 ml에 3차 증류수 0.3 ml과 0.4% sulfosalicylic acid 0.5 ml를 가하여 혼합하고 원심분리 시킨 뒤 상등액 0.3 ml에 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) 발색시약을 첨가하여 412 nm 흡광도에서 측정하여 glutathione의 표준 검량 곡선에 의해 함량을 산출하였으며 간 조직 g당 mg으로 표시하였다[2].

통계처리

실험으로부터 얻어진 결과치는 one-way ANOVA 검정에 의한 평균치와 표준오차(mean±SE)로 표시하였으며, 각 실험군 간의 유의성 검증은 Duncan's multiple range test로 하였다[10].

결과 및 고찰

체중, 식이 및 음료 섭취량 변화

사염화탄소를 처리하여 간독성을 유도한 흰쥐에 Cordycepin 고함유 *C. militaris* (JLM0636) (CCM α 군) 분말이 미치는 영향을 알아보기 위해 대조군인 *P. japonica* (CPJ 군)와 *C. militaris* (CCM 군) 분말과 함께 3% 농도를 4주간 기본식에 첨가하여 투여하였다. 체중증가량은 정상군(N 군)이 가장 높게 나타났고, 사염화탄소 투여군(C 군)은 정상군에 비해 낮게 나타났다. 하 등[12]의 연구에서도 사염화탄소 투여군이 정상군에 비하여 체중이 감소하였다고 보고하여 본 실험결과와 일치하였다. CPJ 군, CCM 군, CCM α 군의 체중증가량은 복강투여의 스트레스로 인해 감소하는 경향을 보였고, CCM 군에서 체중이 감소한 것에 비해 CCM α 군에서는 유의적으로 증가하여 Cordycepin이 체중증가에 어느정도 영향을 미치는 것으로 사료된다. 식이 섭취량은 N 군과 C 군은 큰 유의적인 차이가 없지만 CCM α 군, CPJ 군, CCM 군 순으로 섭취량이 감소하는 경향을 보였다. Koh [23]는 *C. militaris* 분말을 수컷 흰쥐에 5주간 섭취시킨 결과 정상군에 비해 실험군에서 식이 섭취량이 감소한다고 보고하였으며, Koh와 Choi [24]의 연구에서도 고지방 식이에 *P. japonica* 3% 수준으로 5주간 급여한 결과 식이 섭취량이 감소한다고 보고 하였다. 한편, 음료수 섭취량은 유의적인 차이가 없었으나, CCM α 군에서 가장 많

이 섭취하였다(Table 1).

각 장기의 무게

각 장기의 무게는 Table 2에 나타내었다. 간장의 무게는 N 군이 높았고 사염화탄소를 투여한 C 군에 비해 CPJ 군, CCM 군 및 CCM α 군에서 감소하였다. 그러나 체중 100 g 당 간장의 상대무게를 측정된 결과, N 군, C 군, CPJ 군, CCM 군 및 CCM α 군에서 3.11%, 3.24%, 3.19%, 3.20% 및 3.11%로 나타나 C 군이 N 군에 비해 유의하게 높았으며, CPJ 군과 CCM 군에 보다는 CCM α 군이 3% 수준에서 유의적으로 감소하였다. 이러한 결과는 사염화탄소에 의하여 간독성이 유발된 흰쥐군의 체중당 간 중량비가 정상군에 비해 유의하게 증가되었다고 보고한 김 등[21]의 연구와 일치하며 이러한 간 손상은 본 연구에서 CCM α 군은 N 군과 가까운 상대 무게 수치를 보여 간 중량에 어느 정도 영향을 미치는 것으로 사료된다. 한편, 각 조직에서 CCM 군의 무게가 다소 낮게 측정되었는데, 이는 CCM 군의 체중이 작게 측정되어 이러한 결과가 나타난 것으로 사료된다. 이외의 다른 군에서 신장, 심장, 비장의 무게는 유의적인 차이가 없었고, 고환 주위 지방과 신장 주위 지방에서 CCM 군과 CCM α 군이 감소되어 차이를 보였다. 사염화탄소 투여 흰 쥐에 동충하초를 투여하였을 때, 지질 대사에 개선 효과를 가지고 있다고 보고되어[16], CCM과 CCM α의 투여로 지질 개선에 유효하게 작용한 것으로 추측된다.

Table 1. Effect of CPJ, CCM and CCMα on body weight, food intake and water consumption in carbon tetrachloride-induced hepatic damage in rats

Groups	N	C	CPJ	CCM	CCMα
Initial weight (g)	129.58±3.08 ^a	129.17±2.17 ^a	128.6±1.03 ^a	128.58±1.43 ^a	128.92±1.83 ^a
Final weight (g)	296.67±9.71 ^a	266.42±10.42 ^b	232.4±5.33 ^{cd}	212.07±4.57 ^c	253.64±8.22 ^{bd}
Weight gain (g)	167.08±8.55 ^a	137.25±8.85 ^b	103.8±5.03 ^c	84.29±4.78 ^c	128.79±6.45 ^b
Food intake (g/day)	13.79±0.56 ^b	12.97±0.36 ^{ac}	11.31±0.27 ^{bd}	10.38±0.38 ^b	12.09±0.51 ^{cd}
Water consumption (ml/day)	30.68±1.38 ^a	28.10±2.03 ^a	25.88±1.08 ^a	28.23±1.80 ^a	31.38±1.67 ^a

Values are mean±S.E, n=6. Values with different letters are significantly different at p<0.05.

N: Normal, C: CCl₄, CPJ: CCl₄+*Paecilomyces japonica*,

CCM: CCl₄+*Cordyceps militaris*, CCMα: CCl₄+Cordycepin-enriched *Cordyceps militaris*

Table 2. Effect of CPJ, CCM and CCMα on the tissue absolute weight in carbon tetrachloride-induced hepatic damage in rats

Groups	N	C	CPJ	CCM	CCMα
Liver	9.22±3.08 ^a	8.59±0.29 ^a	7.41±0.12 ^{bc}	6.95±0.22 ^b	7.64±0.15 ^c
Kidney	2.06±0.05 ^a	1.84±0.05 ^a	1.55±0.06 ^c	1.60±0.06 ^c	2.20±0.07 ^a
Heart	1.08±0.07 ^a	0.94±0.04 ^b	0.86±0.02 ^b	0.69±0.03 ^c	0.94±0.02 ^b
Spleen	0.79±0.06 ^a	0.72±0.06 ^{ab}	0.68±0.06 ^{ab}	0.58±0.03 ^b	0.78±0.02 ^a
Testis	3.11±0.14 ^a	3.09±0.12 ^a	3.04±0.18 ^a	2.80±0.06 ^a	2.83±0.13 ^a
Epididymal fat pad (g)	4.20±0.31 ^a	4.83±0.28 ^a	4.07±0.45 ^a	2.32±0.15 ^b	2.93±0.32 ^b
Perirenal fat pad (g)	3.84±0.26 ^a	3.52±0.35 ^{ab}	2.96±0.29 ^b	1.66±0.11 ^c	1.85±0.22 ^c

Values are mean±S.E, n=6. Values with different letters are significantly different at p<0.05.

Abbreviations are the same as Table 1.

혈청 중 AST, ALT, ALP 및 LDH 활성

사염화탄소 투여로 인해 간 기능 지표인 혈청의 AST, ALT, ALP 및 LDH는 Fig. 1에 나타내었다. 혈청 AST와 ALT의 활성도의 증가는 사염화탄소에 의해 간의 세포막이 손상됨에 따라 투과성이 증가하여 부종 및 지질대사의 저해로 간장 실질 세포의 장애가 발생하여 혈중으로 방출이 촉진되어 나타나는 것으로 알려져 있어[33], 간장 손상 지표의 중요한 단서가 된다. 본 실험에서 AST와 ALT는 사염화탄소를 단독 투여한 C군에서 활성이 증가하였고, CCMa군에서 AST 활성 수치가 낮아짐을 확인하였으며, ALT 활성은 CPJ군, CCM군 및 CCMa군이 C군보다 낮았으나, 각 군마다 유의적인 차이는 나타나지 않았다. Jung 등[19]은 상황버섯의 열수 추출물이 사염화탄소에 의해 증가된 혈청의 AST, ALT를 감소시킨다고 보고하였으며, Jo 등[17]은 급성 간손상 유발 모델에서 굼벵이 유래 밀리타리스 동충하초의 열수 추출물이 AST, ALT 활성을 저하시켜 간 보호에 유효한 물질로 보고하였다. ALP는 담도계 폐색 또는 간 질환 등에 의해 그 활성이 증가되는 효소로, ALP 활성은 각 군마다 차이가 없었다. 급성 간염, 초기 간암 등에서 현저하게 증가되는 효소[32]로 알려져 있는 LDH 활성은 사염화탄소 투여에 의해 C군은 유의적으로 증가함에 반해, CCMa군에서는 정상수준으로 감소하였음을 확인하였다. 이상과 같이 CCMa군은 사염화탄소에 의하여 증가된 간질환 효소들의 활성을 유의하게 감소시킨 것으로 보아 간 기능 개선 제품 소재로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

각 조직의 과산화지질 농도 변화

세포 내에서는 산화적 스트레스로 인해 free radical 생성이 증가되고 항산화 능력이 감소되면 지질과산화물이 생성되는데, 사염화탄소와 같은 독성물질 등의 여러 가지 인자에 의하여 생성된 oxygen radical과 반응한 불포화지방산은 불포화지방산의 radical이 되고 산소와 결합하여 hydroxyperoxide를 생성하며 trien 이상의 불포화지방산은 hydroperoxide, endoperoxide 및 polyperoxide 등과 같은 지질과산화물이 생성되어 malondialdehyde (MDA)로 분해된다[18]. 지질과산화의 최종산물인 MDA의 농도가 증가되어 세포에 산화적 손상이 일어나게 되면 생리적 기능 저하에 의해 간 질환 등의 여러 가지 질병을 초래하여 노화나 유전적 장애의 원인이 되는 것으로 알려져 있으며, 이러한 지질과산화 반응은 사염화탄소와 같은 독성물질 등에 의한 간 손상의 가장 중요한 기전으로 세포 내 free radical 생성의 증가 및 항산화적 방어력의 감소로 인해 야기되는 산화적 스트레스의 증가에 기인한다고 하였다[30]. 따라서 항산화 활성과 free radical 생성 억제제는 사염화탄소로부터 유도된 간손상으로 부터 간을 보호하는 중요한 요인이 된다[3].

과산화지질의 지표로서 TBARS 함량을 측정된 결과, 사염화탄소로 간손상을 유발시킨 간 조직의 homogenate, mitochondria 및 microsome 분획에서 과산화지질 농도가 증가하였다(Fig. 2). 이는 사염화탄소를 투여함으로써 간조직의 지질과산화물 함량이 현저하게 증가했다고 보고한 Noll 등[29]

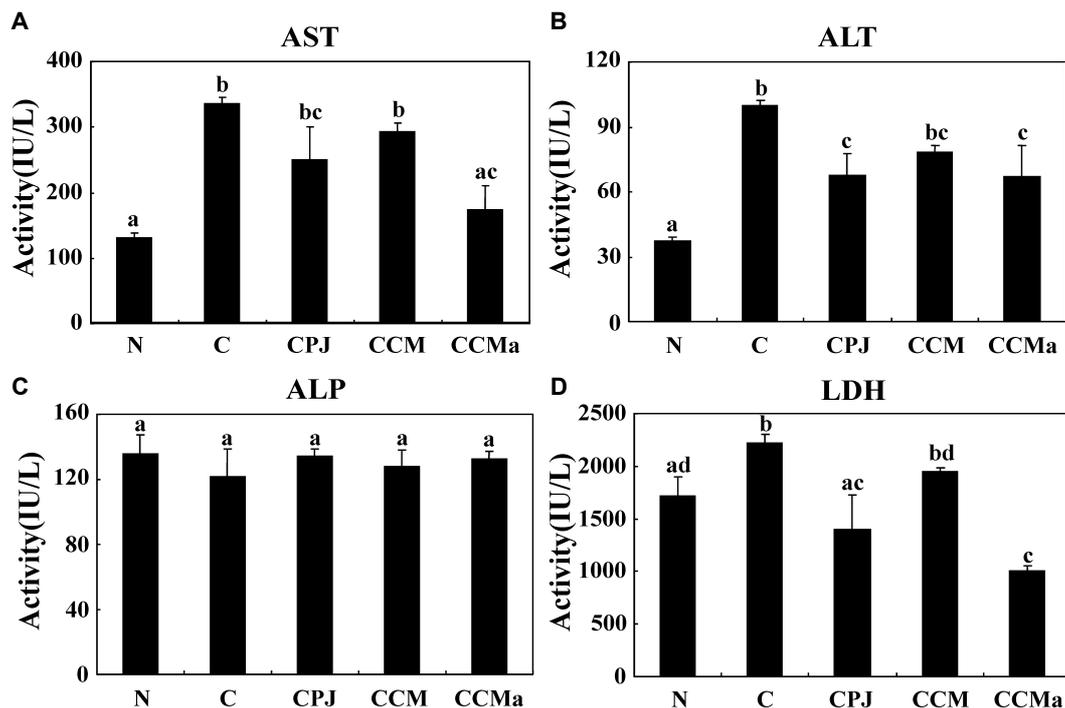


Fig. 1. Effect of CPJ, CCM and CCMa on the serum enzyme activities of AST (A), ALT (B), ALP (C) and LDH (D) in carbon tetrachloride-induced hepatic damage in rats. Values are mean \pm S.E, n=6. Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$. Abbreviations are the same as Table 1.

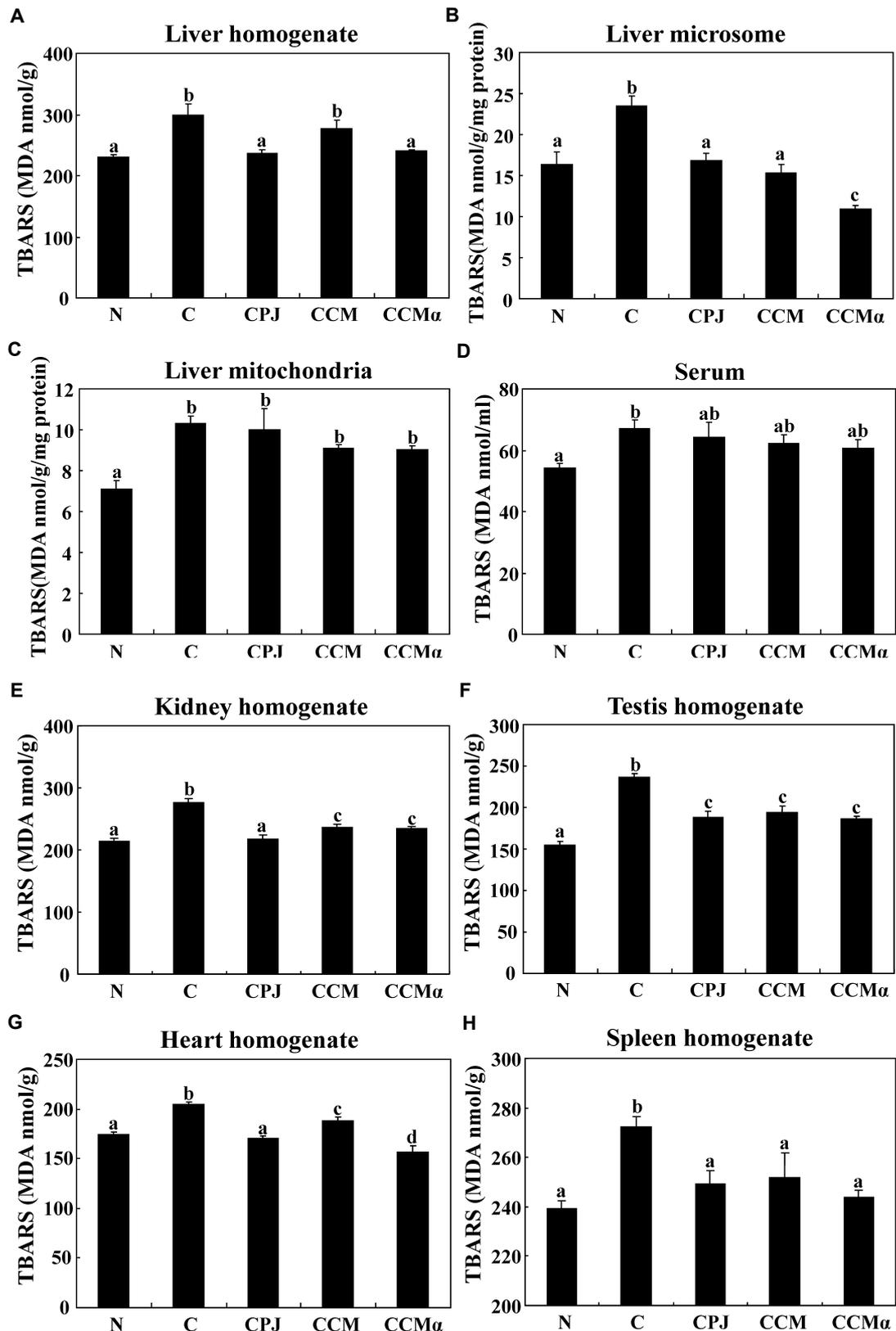


Fig. 2. Effect of CPJ, CCM and CCM α on TBARS (A, B, C, D, E, F, G, H) in carbon tetrachloride-induced hepatic damage in rats. Values are mean \pm S.E, n=6. Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$. Abbreviations are the same as Table 1.

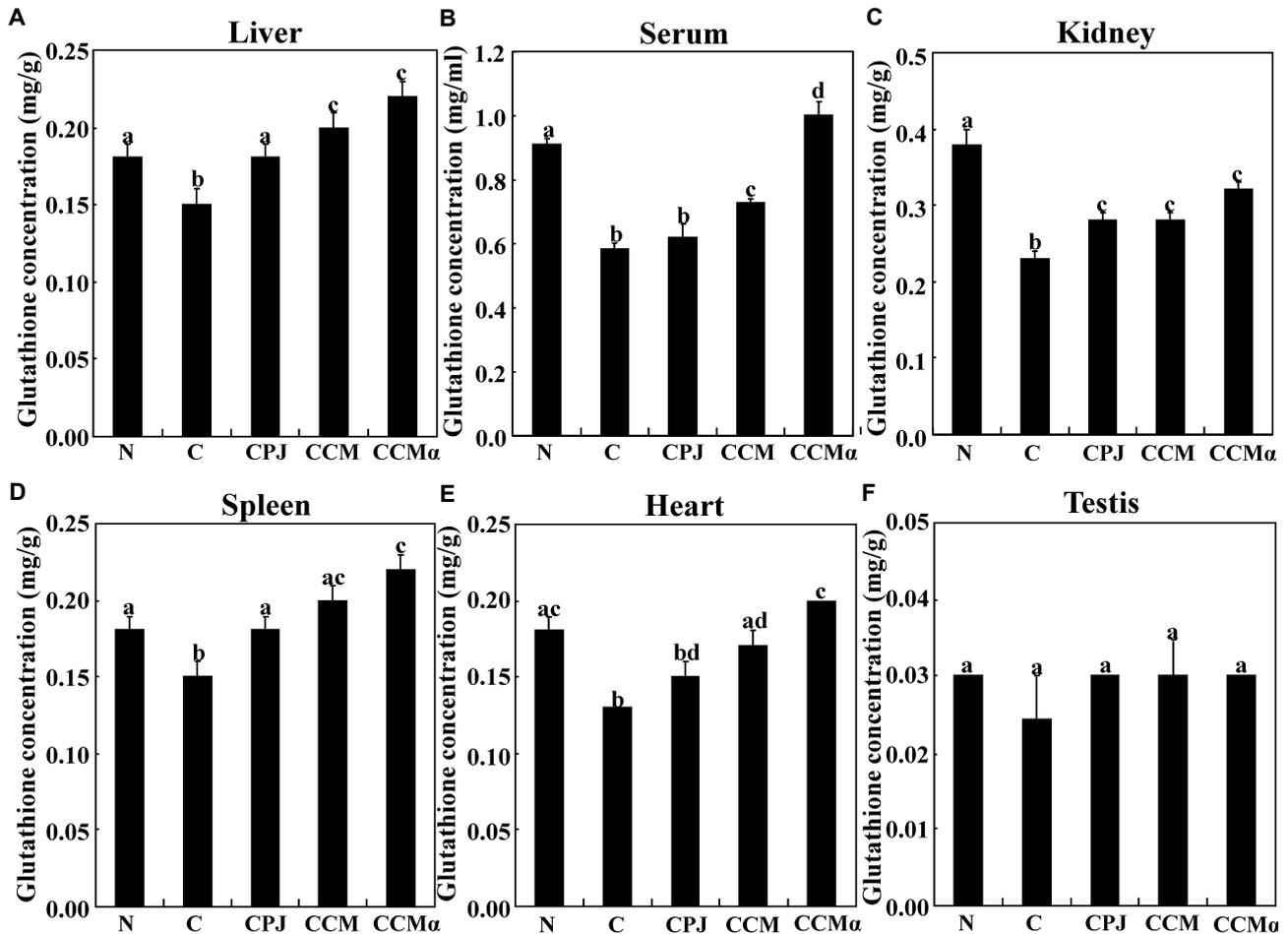


Fig. 3. Effect of CPJ, CCM and CCM α on the glutathione concentration (A, B, C, D, E, F) in carbon tetrachloride-induced hepatic damage in rats. Values are mean \pm S.E, n=6. Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$. Abbreviations are the same as Table 1.

의 연구결과와도 일치하였다. 사염화탄소 투여 흰쥐에 CCM α 의 식이 첨가로 간 조직의 분획들에서 과산화지질 농도가 감소하였고, mitochondria 분획에서는 감소하는 경향을 보였다. 이러한 결과는 CCM α 분말이 간 조직에서 항산화 효과가 있다는 것으로 사료된다. 혈중 과산화 지질 농도 역시 사염화탄소 투여에 의해 증가하였고, CPJ, CCM, CCM α 의 식이첨가로 유의적으로 감소하였다. 한편, 신장, 고환, 심장, 비장 조직 중에서의 과산화지질 함량은 CPJ군, CCM군, CCM α 군에서 N군과 가까운 TBARS 함량을 보였다(Fig. 3). 따라서, 사염화탄소 유발 간손상에 의해 증가된 과산화지질 함량이 CPJ, CCM, CCM α 의 식이첨가로 감소됨을 확인하였고, 그 중 CCM α 군에서 가장 감소된 결과를 나타내는 것을 미루어보아 cordycepin이 과산화지질 생성 억제 및 예방에 영향을 미칠 것으로 사료된다.

미네랄 함량 측정

간장, 신장, 고환 및 혈청의 미네랄 함량을 측정된 결과를

Table 3에 나타내었다. 아연은 생체 필수 미량원소로서 고등동물의 세포분열과 단백질 합성에 관여한다[22]. 생체 내 항산화 물질로도 잘 알려져 있는 아연 농도는 간장과 혈청에서 N군 보다 C군에서 유의적으로 감소하였으나, CCM α 군에서는 사염화탄소 투여에 의해 감소된 아연 농도가 다소 회복되는 결과를 보여 과산화지질 농도의 감소에 어느정도 영향을 미친것으로 여겨 진다. 그러나 신장과 고환 조직 내에서 아연 농도는 각 실험 군 간에 통계적으로 유의적인 차이는 인정되지 않았다.

간장, 고환 조직과 혈청의 비헴철 함량은 N군에 비해 C군에서 유의적인 증가를 보여 과산화지질 농도와 밀접한 상관관계를 나타내었다. C군에서 유의적인 증가를 보인 간장, 고환 조직과 혈청의 비헴철 함량은 CCM α 군에서는 유의적으로 감소함으로서 이들 역시 밀접한 상관관계가 있음을 확인하였다. 그러나 신장 조직에서는 이러한 영향은 관찰되지 않아 각 조직간에 차이가 있었다. 한편, 필수 미량원소인 철은 지방산화

Table 3. Effect of CPJ, CCM and CCMa on the nonheme iron and zinc concentration of in carbon tetrachloride-induced hepatic damage in rats

	N	C	CPJ	CCM	CCMa
Liver					
Zn	0.41±0.00 ^a	0.38±0.01 ^{ac}	0.46±0.02 ^b	0.35±0.02 ^c	0.40±0.01 ^a
Fe	0.75±0.01 ^a	1.04±0.14 ^a	1.03±0.14 ^a	0.91±0.07 ^a	0.82±0.01 ^a
Kidney					
Zn	0.31±0.03 ^a	0.25±0.01 ^a	0.28±0.03 ^a	0.30±0.05 ^a	0.34±0.05 ^a
Fe	0.53±0.01 ^a	0.60±0.03 ^a	0.57±0.07 ^a	0.50±0.06 ^a	0.49±0.05 ^a
Testis					
Zn	0.28±0.06 ^a	0.22±0.01 ^a	0.27±0.01 ^a	0.26±0.03 ^a	0.25±0.01 ^a
Fe	0.10±0.01 ^a	0.19±0.01 ^b	0.18±0.04 ^{bc}	0.15±0.01 ^{ab}	0.12±0.01 ^{ac}
Serum					
Zn	0.05±0.01 ^{ab}	0.04±0.00 ^a	0.04±0.01 ^a	0.04±0.00 ^{ab}	0.07±0.01 ^b
Fe	0.03±0.01 ^a	0.05±0.01 ^{ab}	0.06±0.00 ^b	0.04±0.01 ^{ab}	0.03±0.01 ^a

Values are mean±S.E, n=3. Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

Abbreviations are the same as Table 1.

를 촉진시키는 물질로 알려져 있으며, 체내 H₂O₂를 제거하는 catalase의 구성 성분으로 체내의 비타민 C의 함량과 H₂O₂의 농도 차에 의해 과산화지질 반응에 영향을 미침으로서 생체 내 과산화지질 반응을 조사하는데 있어서 비헴철 함량 측정은 중요한 요인으로 시사되어 있다[7].

조직 및 혈중 Glutathione 농도 변화

Glutathione (GSH)는 glutathione peroxidase를 위한 기질로서 과산화물을 무독화 시켜 .OH 생성을 억제하는 작용 이외에, 세포 내 환원제로서 촉매 및 물질대사를 포함한 세포 내 수송, disulfide exchange 반응 촉진, 외인성물질의 대사과정 중에 생기는 활성산소종과 친전자성 대사물질들의 무독화 등의 기능이 있다[13]. 간장 조직에서의 glutathione은 L-glutamate, L-cysteine 및 glycine으로 구성된 non-protein thiol tripeptide의 항산화 물질로 최근의 연구에서 동물 간장 조직에서 독성제거 반응을 통한 항산화 방어계에서 중요한 역할을 하는 것으로 잘 알려져 있다[5]. GSH는 사염화탄소에 의한 반응성이 큰 유독한 대사물질을 제거하는데 상당한 역할을 한다고 알려져 있는데, 특히 GSH가 혈액으로 유출될 때 간의 세포괴사가 시작되고 산화적 스트레스가 있는 조건에서 미토콘드리아의 GSH 방혈은 세포의 생사와 관련하여 중요한 결정요인이 된다[20]. 본 실험에서 사염화탄소 투여는 간 조직 및 혈중의 GSH 농도를 낮춘다. 그러나 사염화탄소 투여에 의한 간 조직 및 혈중 GSH농도의 감소는 CPJ, CCM, CCMa의 식이 첨가로 인해 정상군 수준으로 회복되는 것으로 나타났다 (Fig. 4). 특히, CCMa군에서 높은 GSH 함량을 보여 과산화지질 농도의 감소와 함께 항산화 활성의 증가와 밀접한 관련성을 가지는 것으로 보였다. 이전의 연구에서도 glutathione 고함유 효모 투여가 사염화탄소 투여로 인한 간 손상을 효과적으로 막는 것을 보고한 바 있다[31]. 본 실험에서도 CCMa의

식이 첨가에 의해 간장 세포내 glutathione 농도가 높아지는 결과를 얻음으로서 이를 뒷받침 하고 있다. 사염화탄소 유발 간손상 흰쥐에 CCMa 분말 급여 후 과산화 지질 농도의 감소는 항산화 활성의 증가와 밀접한 관련이 있는 것으로 사료되며, 간장질환 개선효과에도 영향을 미칠 것으로 보인다.

감사의 글

본 연구는 동아대학교 연구비 지원에 의해 이루어졌습니다.

References

1. A.O.A.C. 1975. Official methods of analysis. 12th ed., Association of official analytical chemists. Washington DC, USA.
2. Beutler, E., Duron, O. and Kelly, B. M. 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* **61**, 882-888.
3. Borek, C. 2001. Antioxidant health effects of aged garlic extract. *J Nutr* **131**, 1010-1015.
4. Brattin, W. J., Glende E. A. J. and Recknagel, R. O. 1985. Pathological mechanisms in carbon tetrachloride hepatotoxicity. *J Free Radic Biol Med* **1**, 27-38.
5. Buang, Y., Wang, Y. M., Cha, J. Y., Nagao, K. and Yanagita, T. 2005. Dietary phosphatidylcholine alleviates fatty liver induced by orotic acid. *Nutrition* **21**, 867-873.
6. Cha, J. Y., Ahn, H. Y., Heo, S. J., Park, S. H., Jeong, Y. K. and Cho, Y. S. 2011. Improvement effect of cordycepin-enriched *Cordyceps militaris* JLM 0636 powder against orotic acid-induced fatty liver in rats. *J Life Sci* **21**, 1274-1280.
7. Chiba, H., Takasaki, M., Masuyama, R., Uehara, M., Kanke, Y., Suzuki, K. and Goto, S. 1998. Time course of change in hepatic lipid peroxide level in iron-deficient rats. *J Jpn Soc Nutr Food Sci* **51**, 201-206.

8. Cho, H. J., Cho, J. Y., Rhee, M. H., Kim, H. S., Lee, H. S., and Park, H. J. 2007. Inhibitory effects of cordycepin (3'-deoxyadenosine), a component of *Cordyceps militaris*, on human platelet aggregation induced by thapsigargin. *J Microbiol Biotechnol* **17**, 1134-1138.
9. Diehl, A. M. 1993. Effects of alcohol on liver regeneration. *Alcohol Health Res W* **17**, 279-283.
10. Duncan, D. B. 1957. Multiple range test for correlated and heteroscedastic means. *Biometrics* **13**, 164-176.
11. Guo, P., Kai, Q., Gao, J., Lian, Z. Q., Wu, C. M., Wu, C. A. and Zhu, H. B. 2010. Cordycepin prevents hyperlipidemia in hamsters fed a high-fat diet via activation of AMP-activated protein kinase. *J Pharmacol Sci* **113**, 395-403.
12. Ha, T. Y., Cho, I. J. and Lee, H. Y. 2001. Effect of Cassia tora ethanol extracts on carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. *Korea J Food Sci Technol* **33**, 789-794.
13. Hidaka, I., Hino, K., Korenaga, M., Gondo, T., Nishina, S., Ando, M., Okuda, M. and Sakaida, I. 2007. Stronger Neo-Minophagen C, a glycyrrhizin-containing preparation, protects liver against carbon tetrachloride-induced oxidative stress in transgenic mice expressing the hepatitis C virus polyprotein. *Liver Int* **27**, 845-853.
14. Illana, E. C. 2007. *Cordyceps sinensis*, a fungi used in the Chinese traditional medicine. *Rev Iberam Micol* **24**, 259-262.
15. Ji, D. B., Ye, J., Li, C. L., Wang, Y. H., Zhao, J. and Cai, S. Q. 2009. Antiaging effect of *Cordyceps sinensis* extract. *Phytother Res* **23**, 116-122.
16. Jin, Y. X., Yoo, Y. S., Han, E. K., Kang, I. J. and Chung, C. K. 2008. *Artemisia capillaries* and *Paecilomyces japonica* simulate lipid metabolism and reduce hepatotoxicity induced by carbon tetrachloride in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **37**, 548-554.
17. Jo, W. S., Nam, B. H., Oh, S. J., Choi, Y. J. and Kang, E. Y. 2008. Hepatic protective effect and single-dose toxicity study of water extract of *Cordyceps militaris* grown upon *Protactia dreujtarsis*. *Korean J Food Sci Technol* **40**, 106-110.
18. Johansson, I. and Ingelman-Sundberg, M. 1985. Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation dependent on an ethanol-inducible form of rabbit liver microsomal cytochrome P-450. *FEBS Lett* **183**, 265-269.
19. Jung, M. E., Ham, S. S., Nam, S. M., Kang, I. J., Kim, S. J. and Chung, C. K. 2001. Biochemical and histological effects of *Phellinus linteus* methanol extract on liver lipid metabolism of rats fed CCl₄ and high fat. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **30**, 331-337.
20. Kaplowitz, N., Aw, T. Y. and Ookhtens, M. 1985. The regulation of hepatic glutathione. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **25**, 715-744.
21. Kim, S. Y., Kim, H. P., Lee, M. K. and Byun, S. J. 1993. The effect of betain on the CCl₄-induced hepatotoxicity in rats. *Yakhak Hoeji* **37**, 538-541.
22. Kirchgessner, M., Roth, H. P. and Weigand, E. 1976. In trace elements in human health and disease. *Academic Press New York* 189.
23. Koh, J. B. 2002. Effect of Mycelium of *Cordyceps militaris* on growth, lipid metabolism and protein levels in male rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **31**, 685-690.
24. Koh, J. B. and Choi, M. A. 2003. Effect of *Paecilomyces japonica* on lipid metabolism in rats fed high fat diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **32**, 238-243.
25. Lee, E. W., He, P., Kawagishi, H. and Sugiyama, K. 2000. Suppression of D-galactosamine-induced liver injury by mushroom in rats. *Biosci Biotech Biochem* **64**, 2001-2002.
26. Lee, J. S., Kwon, J. S., Won, D. P., Lee, J. H., Lee, K. E., Lee, S. Y. and Hong, E. K. 2010. Study of macrophage activation and structural characteristics of purified polysaccharide from the fruiting body of *Cordyceps militaris*. *J Microbiol Biotechnol* **20**, 1053-1060.
27. Li, S. P., Zhang, G. H., Zeng, Q., Huang, Z. G., Wang, Y. T., Dong, T. T. and Tsim, K. W. 2006. Hypoglycemic activity of polysaccharide, with antioxidation, isolated from cultured *Cordyceps mycelia*. *Phytomedicine* **13**, 428-433.
28. Manninen, V., Tenkanen, L., Koskinen, P., Huttunen, J. K., Manntari, M., Heinonen, O. P. and Frick, M. H. 1992. Triglycerides and LDL-cholesterol concentrations on coronary heart disease risk in the Helsinki Heart Study. *Circulation* **85**, 37-45.
29. Noll, T. and Groot, H. 1984. The critical steady state hypoxic conditions in carbon tetrachloride induced lipid peroxidation in rat liver microsomes. *Biochem Biophys Acta* **795**, 356-361.
30. Plaa, G. L. and Witschi, H. 1976. Chemicals, drugs, and lipid peroxidation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **16**, 125-141.
31. Shon, M. H., Cha, J. Y., Lee, C. H., Park, S. H. and Cho, Y. S. 2007. Protective effect of administrated glutathione-enriched *Saccharomyces cerevisiae* FF-8 against carbon tetrachloride (CCl₄)-induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats. *Food Sci Biotechnol* **16**, 967-974.
32. Sugiyama, Y. and Yamamoto, K. 1998. The protective effect of glutathione-enriched yeast extract on acetaminophen-induced liver damage in rats. *J Jpn Soc Nutr Food* **51**, 189-193.
33. Takeda, Y., Ichihara, A., Tanioka, H. and Inoue, H. 1964. The biochemistry of animal cells. I. The effect of corticosteroids on leakage of enzymes from dispersed rat liver cells. *J Biol Chem* **239**, 3590-3596.

초록 : Cordycepin 이 사염화탄소 유발 간손상 흰쥐의 조직 과산화 지질 농도 및 항산화 활성에 미치는 영향

안희영¹ · 박규림¹ · 김유라² · 차재영³ · 조영수^{2*}

(¹동아대학교 대학원 의생명과학과, ²동아대학교 생명공학과, ³대선주조(주)기술연구소)

눈꽃 동충하초, 번데기 동충하초, Cordycepin 고함유 번데기 동충하초 분말을 식이 중에 각각 3% 수준으로 첨가하여 4주간 흰쥐에 급여한 후, 해부하기 2일 전에 2회 사염화탄소를 복강주사하여 급성 간손상을 일으켜 임상생화학적 특성 및 조직 내 항산화 활성 및 간 조직에 미치는 영향을 검토하였다. 체중 증가량과, 식이 섭취량 및 음료섭취량은 각 실험군 모두 감소하는 경향을 보였다. 간 손상 임상 지표인 AST, ALT, LDH 활성도 각 실험군 모두 유의적으로 감소하였으나, 그 중 Cordycepin 고함유 번데기 동충하초 분말을 투여한 군에서 가장 낮은 활성을 보였다. 각 조직과 혈청의 과산화지질(TBARS)을 측정된 결과 Cordycepin 고함유 번데기 동충하초는 높은 과산화지질 억제작용을 나타내어 조직 내 항산화 물질로 잘 알려진 glutathione 농도 또한 모든 조직과 혈청 내에서 높은 함량을 보였다. 미네랄 함량 측정결과 지방의 산화를 촉진하는 비헬철과 항산화 성분인 아연이 정상 수준까지 회복되는 경향을 보였다. 이상의 실험결과 Cordycepin 고함유 번데기 동충하초는 사염화탄소로 유발된 간 독성을 저하시키며 혈청과 간지질 대사를 개선하는 효과가 있는 것으로 사료되며 향후 간 기능 개선과 지질대사 개선효능을 가지는 건강식품 개발의 소재로 활용될 가능성이 높은 것으로 판단되어진다.