대한한방내과학회지 제21권 2호(2000년 10월)
Korean J.Orient.Int. Med. 2000;21(2):309-318

冬蟲夏草의 抗突然變異 活性에 관한 硏究

박성호, 서운교, 정지천

동국대학교 한의과대학 내과학교실

A Study on Antimutagenic Activity of the Extracts from *Paecilomyces japonica*

Park Sung-Ho, Seo Un-Kyo, Jeong Ji-Cheon

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dongguk University

The fruiting bodies of Paecilomyces japonica been used for an anticancer and immuno-stimulating agent as an oriental medicine. Antimutagenecity test with SOS chromotest and antioxidant test with NBT method were carried out using the concentrated culture broth, the extract of mycelia, and that of fruiting bodies. Among the sample extracts tested, the extract of fruiting bodies was most effective to antimutagenecity against the mutagens tested such as MNNG, ethidium bromide (EtBr), 2-aminofluorene (AF) and nitrofluorene (NF). Antimutagenic activity of all the extracts were very effective against mutagen, MNNG. When the extracts were added to certain concentration, antimutagenic acivity was enhanced against mutagen, MNNG and NF. Antioxidant activity of the extract from fruiting bodies was highest. However, its activity was very low, compared to ascorbic acid.

Key Word : *Paecilomyces japonica*, antimutagenecity, the concentrated culture broth, mycelia, fruiting bodies, MNNG, nitrofluorene(NF),

I. 緖 論

腫瘍이란 조직의 자율적인 과잉적 성장이며, 이것은 개체에 대해서 의의가 없거나 害가 되면서 정상조직을 파괴하는 기능을 가지고 있다. 原因으로는 화학물질, 바이러스, 암유전자, 유전성 등이 있다[1-3].

腫瘍과 突然變異는 서로 밀접한 상관관계가 있는데 현재까지 알려진 發癌物質의 85% 이상은 突然變異原이며 非發癌性物質의 경우에도 10% 이하가 突然變異原으로 작용한다는 연구결과가 있다[4].

최근 천연물의 抗突然變異 活性에 대한 관심이 증가하면서 이에 관한 연구가 많이 보고되고 있는데 食用植物[5-6] 및 藥用植物[7-9]의 抗突然變異 活性에 관한 연구가 진행되고 있고, 突然變異 억제 성분으로는 flavonoid[4,10-11]에 대한 연구가 대부분을 차지하고 있으며 기타 성분[4]에 관한 보고도 있다. 지금까지 천연물로부터 抗突然變異 活性을 검색하기 위하여 개발된 여러 가지 방법 중에서 Ames test[12-13]가 가장 많이 사용되어 왔으며 抗突然變異 活性을 보다 정확히 측정하기 위하여 최근에는 SOS chromotest[14]도 병행되어 사용하고 있다.

腫瘍과 관련된 韓方 病證으로는 積聚, 癭瘤, 癥瘕, 痃癖, 噎膈, 反胃, 石瘕, 石疽, 石癰, 乳癌, 癮疹[15-21]이 있고 治法으로는 益氣健脾, 滋陰補血, 養陰生津, 溫補脾腎 등의 扶正法과 活血化瘀, 淸利濕熱, 化痰散結, 通絡止痛 등의 祛邪法이 응용되고 있다[21-22]. 현재 抗癌에 유효한 효과가 있다고 알려진 補益劑로는 人蔘, 黃芪, 沙蔘, 麥門冬 등[19-23]이 있다.

冬蟲夏草는 麥角菌科(Clavicipitaceae)의 冬蟲夏草菌이 박쥐나방과 곤충인 蟲草蝙蛾(*Hepialus armoricanus* O.) 등의 幼蟲에 기생하여 자란 子實體와 幼蟲을 건조한 것으로 補虛損, 益精氣, 滋肺補腎 등의 효능[24-25]과 抗癌, 抗酸化, 免疫機能 增强作用 등이 있어 抗癌劑, 각종 성인병(폐, 신장, 생식기병)의 치료제, 정력 강장제 및 식용으로 사용되고 있다[26-29].

冬蟲夏草를 이용한 抗癌效果에 관한 연구로는 Lewis 肺癌細胞 억제[30], Sarcoma-180의 억제[24] 등에 대한 보고가 있으며, 백혈병 환자의 NK세포 활성[31]에도 유효한 효과가 있다고 보고되었다.

교신저자 : 서운교 (경기도 성남시 분당구 수내동 87-2 동국대학교 분당한방병원 내과학교실, 전화 : 054)748-9753, 019-548-9753, 031)710-3700, E-mail : tiger39@nownuri.net)

이에 저자는 雪花冬蟲夏草의 培養濃縮液, 菌絲體 및 子實體抽出物의 抗突然變異 活性을 실험하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實驗 材料 및 方法

1. 材料

1) 使用 菌株 및 試藥

① 冬蟲夏草 및 細菌 菌株

사용한 菌株는 동국대학교 자연과학대학 생물학과 미생물실험실에서 分離하여 사용중인 雪花冬蟲夏草(Paecilomyces japonica DGUM 32001)를 사용하였다. 抗突然變異 試驗에 사용된 細菌 Salmonella typhim urium TA100(hisG46 rfa-uvrB)은 한국과학기술연구원 생명공학연구소 유전자은행으로부터 分讓받아 사용하였다. SOS chromotest를 위하여 사용한 *Escherichia coli* PQ37 (*sfi*A:: Mud(Ap *lac*)*cts lac*Δ U169 *mal*$^+$, *uvr*A, *gal*E *gal*Y, PhoC, *rfa*)는 동국대학교 자연과학대학 생물학과 미생물실험실로부터 입수 사용하였다.

Ames test를 利用한 冬蟲夏草의 antimutagenecity 實驗은 營養源으로 아미노산 histidine을 生合成할 수 없어 최소한천배지에서 스스로 生長할 수 없는 S. typhimurium TA100 細菌 菌株를 利用하였다. 각 突然變異原에 의하여 生成되는 復歸變異株 colony 수를 決定하여, 冬 蟲夏草 각 抽出物이 어느 정도 突然變異를 抑制하여 復歸變異株의 出現을 抑制하는가의 方法을 活用하여 隨行하였다.

② 使用 試藥

突然變異 誘發物質로 사용되는 2-aminofluorene(AF), ethidium bromide(EtBr), nitrofluorene(NF), N-methyl-N' -nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG)는 Fluka사 제품을 購入하였으며 蒸溜水에 녹여 사용하였다. β-galactosidase, alkaline phosphatase, EDTA, cyanide, ascor bic acid, o-nitrophenyl-β -galactoside, p-nitrophenyl phosphate, sodium dodecyl sulfate, β-mercaptoethanol, nitrobenzene tetrazolium과 緩衝溶液에 必要한 試藥은 Sigma사 제품을, 培地製造에 必要한 試藥은 Difco사 제품을 購入하여 사용하였다.

2) 機器 및 裝置

冬蟲夏草의 菌絲體 및 子實體의 抽出·濃縮을 위하여 減壓濃縮機는 Eyela사의 Rotary evaporator(NE-1S)를 사용하였고, Ilsin사의 Bondiro(FD 5505)을 利用하여 凍結乾燥하였다. 培地의 製造, 滅菌培養, 시료의 抽出을 위하여 사용한 器機는 國産製作器機를 사용하였다. 細菌 生長 測定用 分光光度計는 日本 Shimadzu사 제품 UV-160A spectrophotometer를 사용하였다.

2. 方法

1) 冬蟲夏草의 菌絲體 및 子實體 培養

① 冬蟲夏草 菌絲體(mycelia)의 液體培養

준비된 10 *ml*의 冬蟲夏草 胞子溶液(104 spores/*ml*)을 100 *ml* GYT 액체배지(250-*ml* 삼각플라스크, 조성: glucose 5%, yeast extract 0.5%, tryptone 0.2%)에 接種하여 27℃에서 10일간 진탕배양하였다. 準備된 액체種菌 100 *ml*을 20 *l* 의 水桶 배양기에 接種하여 27℃에서 10일간 定置培養하였다. 水桶 배양기에는 에어펌프로부터 濾過器(milipore ψ=0.2 ㎛)를 通過한 除菌 空氣가 배양기 내의 液體배지에 酸素가 充分히 供給되도록 하였다.

② 冬蟲夏草의 子實體(fruiting body) 培養

種菌甁(polyethylene, 용량: 800-*ml*)에 購入한 약 100개의 누에번데기를 넣은 후, 121℃에 20분간 滅菌하였다. 滅菌한 누에 번데기 위에 준비된 冬蟲夏草 胞子溶液을 분주하여 感染시켰다. 누에번데기 상의 冬蟲夏草 菌絲體 배양은 27℃에서 약 20일간 隨行하였다. 子實體 發生을 誘導하기 위하여 菌絲體 배양된 冬蟲夏草를 24℃로 온도를 낮추어 준 다음, 螢光燈의 光源을 사용하여 子實體 發柄를 誘導하였다. 자실체 發柄를 20일간 더 수행한 후 子實體와 菌絲體가 感染되어 있는 누에번데기를 sample 試料의 製造를 위하여 사용하였다.

2) 冬蟲夏草 菌絲體, 菌絲體 培養濃縮液 및 子實體의 試料 製造

① 冬蟲夏草 菌絲體 試料의 製造

液體 培養된 培養液을 두겹의 거즈(gauze)로 濾過한 후, 걸러진 菌絲體를 蒸溜水로 2~3회 洗滌하였다. 回收된 菌絲體를 24시간 동안 凍結(-20℃)한 다음 凍結된 菌絲體를 凍結乾燥機(-50℃, 9 ㎜Torr)로 乾燥하였다. 乾燥된 30 g의 菌絲體에 蒸溜水 1 *l* 를 混合한 다음, 121℃에서 3시간 동안 물 抽出하였다. 抽出物을 濾過紙(Toyo filter, No. 2)로 濾過한 후, 그 濾液을 재차 減壓濃縮하여 菌絲體 抽出 試料를 얻어 이를 試驗에 사용하였다.

② 冬蟲夏草 培養 濃縮液 試料의 製造

液體 培養된 培養液을 두겹의 거즈(gauze)로 여과한 후, 濾液을 遠心分離하여 胞子와 殘存하는 菌絲體를 除去하였다. 상등액을 減壓濃縮하여 배양 濃縮液을 얻은 후, 24시간 동안 凍結(-20℃)

하였다. 凍結된 濃縮試料를 凍結乾燥機(-50℃, 9 mmTorr)를 사용하여 乾燥한 후, 試料로 사용하였다.

③ 冬蟲夏草 子實體 試料의 製造

收穫한 子實體 100 g에 蒸溜水 1 *l*와 混合한 후, 121℃에서 3시간 동안 熱水 抽出하였다. 抽出한 다음, 濾過紙를 사용하여 濾液을 얻어 減壓濃縮 후, 凍結乾燥하였다. 그 이외의 모든 過程은 菌絲體 抽出 試料의 製造 方法과 同一하다.

3) 冬蟲夏草 抽出物의 antigenotoxicity 活性 測定

사용한 SOS chromotest는 Quillardet 등의 方法[14]을 變形하여 隨行하였다.

① 試驗 細菌의 培養

前 培養된 1.0 *ml*의 E. coli PQ37을 100 *ml*의 LB medium(組成; bacto yeast extract 0.5%, bacto tryptone 1.0%, NaCl 1.0%)에 接種하여 37℃에서 4시간 동안 660 nm에서의 濁度가 0.8~0.9에 이르도록 진탕배양하였다.

② Antigenotoxicity 活性의 測定

시험관에 培養된 E. coli PQ37 培養液 600 *μl*, 各 突然變異原(1.0 mg/*ml*) 30 *μl*, 各 冬蟲夏草 抽出物(10 mg/*ml*)을 0, 100, 300, 500 *μl*를 添加한 후 SOS 反應을 誘導하였다. 37℃에서 2시간 동안 定置한 후, β-galactosidase와 alkaline phosphatase 酵素 活性을 測定하였다.

● β-galactosidase 酵素 活性

β-galactosidase 酵素 活性은 2.7 *ml*의 B 緩衝液(조성; Na_2HPO_4 16.1 g, NaH_2PO_4 5.5 g, KCl 0.75 g, $MgSO_4$ 0.25 g, SDS 1.0 g, β-mercaptoethanol 2.7 *ml*, 蒸溜水 1,000 *ml*, pH 7.0)을 넣어 37℃에서 10분간 定置하여 온도를 均一化시킨 다음, 0.6 *ml*의 o-nitrophenyl-β-galactoside 용액(ONPG 4.0 mg/*ml* in phosphate buffer (pH 7.4))을 添加하여 10분간 發色反應을 維持하였다. 2.0 *ml*의 2.0 M Na_2CO_3 용액을 添加하여 反應을 停止시킨 후, 420 nm에서의 吸光度를 測定하였다.

● Alkaline phosphatase 酵素 活性

Alkaline phosphatase 酵素 活性은 B 緩衝液 대신에 P 緩衝液(組成: Tris · base 121 g, SDS 1.0 g, 蒸溜水 1,000 *ml*, pH 8.8)을 ONPG 溶液 대신에 p-nitrophenyl phosphate 溶液(PNPP 4.0 mg/*ml*)을 사용한 方法 이외에는 β-galactosidase 測定과 同一하게 隨行하였다. 酵素反應의 停止를 위하여 1.0 *ml*의 2.5 M HCl를 添加한 다음 10분 동안 반응을 定置, 1.0 *ml*의 2.0 M Tris-HCl buffer를 添加하였다.

● 酵素 活性(unit)의 決定

各 酵素의 活性(unit)은 反應이 終了된 후 測定한 420 nm에서의 吸光度 값에 1000을 곱한 후 反應時間으로 나눈 값을 1 unit로 하였다.

● R 및 induction factor(IF)의 決定

Ratio(R) 값은 β-galactosidase unit를 alkaline phosphatase unit로 나눈 값으로 定義하였다. SOS 反應의 誘導程度를 나타내는 誘導指數(induction factor; IF)는 抽出物 試料를 添加한 試驗區의 각 濃度別 R 값(Rc)을 抽出物 試料가 添加되지 않은 R 값(Ro)으로 나눈 값으로 定義하였다.

4) 冬蟲夏草 抽出物의 Ames test에 의한 抗突然變異 活性의 測定

Maron과 Ames의 方法[12-13]을 變形하여 사용하였다.

① 試驗 細菌의 培養

24시간 동안 前 培養된 S. typhimurium TA100 1.0 *ml*을 100 *ml*의 LB medium에 接種하였다. 37℃에서 4시간 진탕배양한 후, 1/10로 稀釋하여 사용하였다.

② 抗突然變異(antimutagenecity) 活性의 測定

滅菌된 cap tube에 稀釋된 100 *μl*의 菌株液, 520 *μl*의 0.2 M phosphate buffer(pH 7.4), 各各 0, 100, 300, 500 *μl*의 菌絲體, 培養濃縮液 및 子實體(10 mg/*ml*), 50 *μl*의 突然變異原 溶液(1.0 mg/*ml*)을 混合한 다음, vortex하여 37℃에서 30분간 定置하였다. 이 混合液에 200 *μl*의 HB 溶液을 添加한 후 3초간 vortex하였다. 이 混合한 溶液에 45℃의 2.0 *ml* TA를 添加하였다. 上記에 製造된 最終 混合液을 미리 製造된 20 *ml*의 MGA 寒天培地에 골고루 塗抹하였다. 塗抹된 寒天培地를 37℃에서 48시간 培養한 후, 復歸 Colony수(revertant CFU/plate)를 測定하였다.

5) 冬蟲夏草 抽出物의 細菌에 대한 細胞毒性(cytotoxicity) 實驗

試驗에 사용된 S. typhimurium TA100 및 E. coli PQ37에 대한 冬蟲夏草 菌絲體, 培養濃縮液, 子實體 抽出物의 細胞毒性(cytotoxicity)을 測定하였다. LB medium에 4시간 동안 前 培養한 S. typhimurium TA100을 1/104배로 稀釋하였다. 各 抽出物이 濃度別로 添加된 LB agar plate(0~2.5 mg/tube)에 稀釋된 細菌液 100 *μl*를 塗抹하여 24시간 동안 培養하였다.

6) 冬蟲夏草의 抗酸化 活性

抗酸化 活性의 測定은 Winterbourn의 NBT法[32]을 變形 사용하였다.

① 抗酸化 活性의 測定

1.0 *ml* photo-cell에 870 *μl*의 40

mM Tri-HCl(pH 7.5) buffer, 66㎕의 EDTA/cyanide, 33 ㎕의 NBT를 混合하였다. 混合液에 33 ㎕의 각 冬蟲夏草 試料(1.0 ㎎/㎖)을 넣은 다음 3회 混合하였다. 混合液에 一定한 光源(白熱燈(110V, 60W), L = 22 ㎝, 4,400 lux)를 照射하였다. 抗酸化 活性度는 光照射 후 光酸化(photo-activation)에 起因하는 活性酸素에 의한 色度變化를 560 ㎚에서 1분 간격으로 6분간 測定하였다. 光酸化 活性度는 1분당 吸光度의 增加量으로 決定하였다.

② 試料의 抗酸化 活性度(antio xidant activity, AOA)의 決定

試料의 抗酸化 活性度(unit)는 蒸溜水가 添加된 대조구(blank)의 抗酸化 活性度를 sample이 添加되었을 때의 抗酸化 活性度(sample)로 나눈 값에서 1을 뺀 값으로 決定하였다. 旣存에 抗酸化 活性이 優秀한 것으로 알려진 ascorbic acid(vitamin C)를 사용하여, 各 抽出物의 抗酸化 活性度와 比較하였다.

III. 實驗 成績

1. 冬蟲夏草 抽出物의 抗突然變異 效果

突然變異原 MNNG, EtBr, AF, NF에 대한 冬蟲夏草 抽出物의 抗突然變異 效能을 SOS chromotest를 利用한 antigenotoxicity 試驗과 Ames의 方法을 利用한 antimutagenecity 試驗을 隨行하였다.

Table 1. Activities of β-galactosidase and alkaline phosphatase for antigenotoxicity of mutagen (MNNG). The concentrated culture broth from P. japonica DGUM 32001 was used as the extract.

Conc. of extract (㎕/tube)	Unit of color effect	β-Galactosidase (Unit)		Alkaline phosphatase (Unit)	
		Activity measured	Activity calculated	Activity measured	Activity calculated
0	0	29.87±1.71	29.87	7.72±0.23	7.72
100	2.8	17.10±0.22	14.30	10.71±0.39	7.91
300	3.0	19.81±1.10	16.81	25.54±2.77	22.54
500	4.2	21.87±2.03	17.67	22.27±3.51	18.07

Table 2. Activities of β-galactosidase and alkaline phosphatase for antigenotoxicity of mutagen (EtBr). The concentrated culture broth from P. japonica DGUM 32001 was used as the extract.

Conc. of extract (㎕/tube)	Unit of color effect	β-Galactosidase (Unit)		Alkaline phosphatase (Unit)	
		Activity measured	Activity calculated	Activity measured	Activity calculated
0	0	12.87±1.9	12.87	20.73±2.25	20.73
100	4.2	16.67±1.2	12.47	25.17±1.79	20.97
300	5.1	21.07±0.3	15.97	25.50±2.77	20.40
500	6.2	24.20±0.3	18.00	22.27±3.51	16.07

Table 3. Activities of β-galactosidase and alkaline phosphatase for antigenotoxicity of mutagen (2-aminofluorene). The concentrated culture broth from P. japonica DGUM 32001 was used as the extract.

Conc. of extract (㎕/tube)	Unit of color effect	β-Galactosidase (Unit)		Alkaline phosphatase (Unit)	
		Activity measured	Activity calculated	Activity measured	Activity calculated
0	0	10.93±0.3	10.93	9.87±1.55	9.87
100	4.6	12.33±1.3	7.73	14.67±3.93	10.07
300	5.3	11.47±0.9	6.17	15.73±3.53	10.43
500	6.2	14.00±0.7	7.80	19.03±2.21	12.83

1) SOS chromotest를 利用한 antigenotoxicity 實驗

SOS chromotest를 利用한 冬蟲夏草 antigenotoxicity 實驗은 420㎚ 波長에서 β-galactosidase 및 alkaline phosphatase 酵素 活性의 測定時 冬蟲夏草 粗抽出物이 갖고 있는 色度가 精製된 試藥과 달리 抽出物의 添加比率만큼 增加하는 傾向이 나타났다. 酵素活性의 結果에 影響을 주는 色度增加(color effect)를 排除하기 위하여 各 抽出物의 添加比率에 該當하는 色度의 測定値를 排除한 다음 각 酵素의 酵素活性을 決定하였다.

突然變異原 MNNG에 대한 冬蟲夏草 抽出物의 抗突然變異 效能은 子實體를 사용하였을 때 가장 優秀하였고 (induction factor (IF) = 0.24), 培養濃

Table 4. Activities of β-galactosidase and alkaline phosphatase for antigenotoxicity of mutagen (nitrofluorene). The concentrated culture broth from P. japonica DGUM 32001 was used as the extract.

Conc. of extract (μl/tube)	Unit of color effect	β-Galactosidase (Unit)		Alkaline phosphatase (Unit)	
		Activity measured	Activity calculated	Activity measured	Activity calculated
0	0	16.37±0.65	16.37	16.40±0.46	16.40
100	3.5	15.23±0.38	11.73	16.40±1.42	12.90
300	4.2	17.20±0.10	13.00	19.63±1.29	15.43
500	4.9	18.73±0.47	13.83	22.20±1.15	17.30

Table 5. Activities of β-galactosidase and alkaline phosphatase for antigenotoxicity of mutagen (MNNG). The extracted mycelia from P. japonica DGUM 32001 was used as the extract.

Conc. of extract (μl/tube)	Unit of color effect	β-Galactosidase (Unit)		Alkaline phosphatase (Unit)	
		Activity measured	Activity calculated	Activity measured	Activity calculated
0	0	26.70±1.21	26.70	6.85±0.42	6.85
100	3.1	15.92±1.11	12.82	9.79±0.41	6.69
300	3.8	14.59±1.59	10.79	10.10±0.52	6.30
500	5.1	14.28±0.72	9.18	10.39±0.57	5.29

Table 6. Activities of β-galactosidase and alkaline phosphatase for antigenotoxicity of mutagen (nitrofluorene). The extracted mycelia from P. japonica DGUM 32001 was used as the extract.

Conc. of extract (μl/tube)	Unit of color effect	β-Galactosidase (Unit)		Alkaline phosphatase (Unit)	
		Activity measured	Activity calculated	Activity measured	Activity calculated
0	0	15.67±1.19	15.67	15.37±1.16	15.37
100	5.3	13.55±0.92	8.25	13.83±0.31	8.53
300	7.0	14.80±0.28	7.80	16.60±1.70	9.60
500	8.8	15.50±1.02	6.70	16.85±0.50	8.05

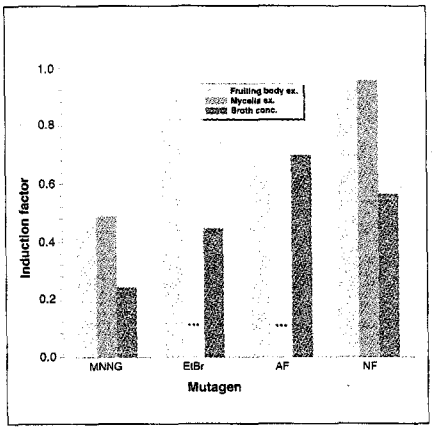

Fig. 1. Induction factors of extracts from the concentrated culture broth, mycelial extract, and fruiting-body extract in Paecilomyces japonica DGUM 32001. The final concentration of extracts was 100 μl per tube. ***; data not available.

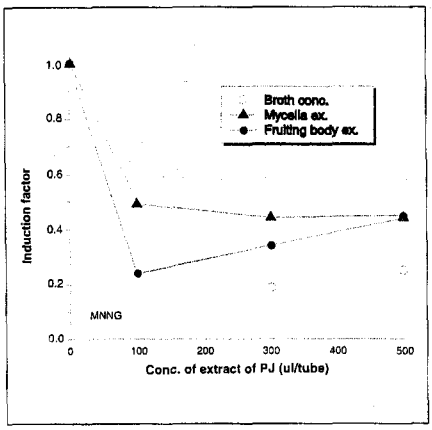

Fig. 2. Induction factor of extracts from the concentrated culture broth, mycelial extract, and fruiting-body extract in Paecilomyces japonica DGUM 32001 against mutagen MNNG.

縮液과 菌絲體抽出物에서는 각각 0.47 및 0.49로 거의 類似하게 나타났다 (Fig. 1, Table 1, Table 5, Table 7). 冬蟲夏草 培養濃縮液의 添加比率을 달리하여 突然變異原 MNNG에 대한 抗突然變異 效能을 測定하였다(Fig. 2, Table 1, Table 5, Table 7). 培養濃縮液을 反應液 tube 당 100, 300, 500 μl 增加하여 添加時 IF가 각각 0.47, 0.19, 0.25로 減少함을 나타내었으며, 이 결과는 添加된 培養濃縮液의 增加에 의하여 抗突然變異 活性이 增加함을 나타내었다. 菌絲體抽出物을 比率別로 增加하여 添加하였을 때, 100 μl 添加 이후의 抗突然變異 活性은 거의 類似하게 나타났다(각각, 0.49, 0.44, 0.45). 이 결과는 菌絲體抽出物을 100 μl 이상 添加하여도 突然變異原 MNNG에 대해 抗突然變異 效果가 미약함을 意味한다. 子實體抽出物을 比率別로 添加하였을 때, 100 μl 添加時 IF가 0.24로 減少하였으며,

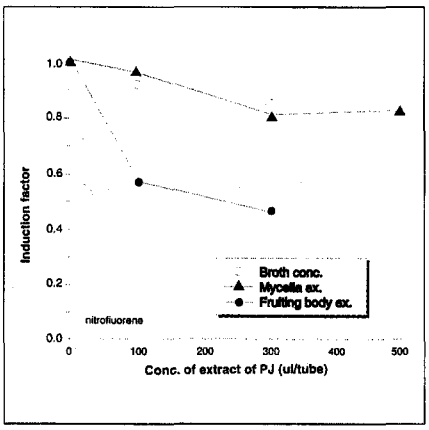

Fig. 3. Induction factor of extracts from the concentrated culture broth, mycelial extract, and fruiting-body extract in Paecilomyces japonica DGUM 32001 against mutagen nitrofluorene.

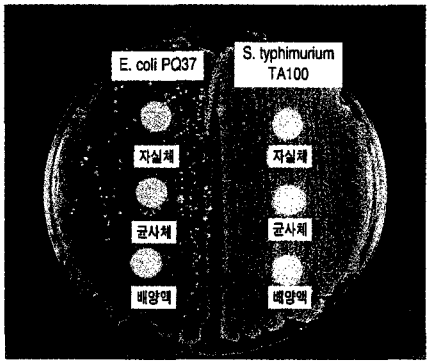

Fig. 4. No cytotoxicity of extracts from *Paecilomyces japonica* DGUM 32001 against E.*coli* PQ37 and S. *typhimurium* TA100.

300 ㎕ 이상 添加時 增加(각각 IF = 0.34, 0.44)하여 抗突然變異 效能이 減少하는 것으로 나타났으나, 이는 子實體 抽出物의 色度 影響에 의한 酵素活性의 測定이 어렵기 때문으로 파악된다.

突然變異原 EtBr에 대한 冬蟲夏草 抽出物의 抗突然變異 效能은 子實體에서 가장 優秀하였고(IF = 0.44), 培養濃縮液에서는 미약한 정도의 效果(IF = 0.95)를 보여주었다(Fig. 1, Table 2, Table 8).

Table 7. Activities of β-galactosidase and alkaline phosphatase for antigenotoxicity of mutagen (MNNG). The fruiting-bodies extract from P. japonica DGUM 32001 was used.

Conc. of extract (㎕/tube)	Unit of color effect	β-Galactosidase (Unit)		Alkaline phosphatase (Unit)	
		Activity measured	Activity calculated	Activity measured	Activity calculated
0	0	30.08±1.42	30.08	8.12±0.18	8.12
100	5.0	18.51±2.72	13.51	20.19±0.81	15.19
300	9.2	29.89±2.73	20.78	25.90±0.45	16.70
500	14.8	36.18±3.31	21.38	28.07±2.10	13.27

Table 8. Activities of β-galactosidase and alkaline phosphatase for antigenotoxicity of mutagen (EtBr). The fruiting-bodies extract from P. japonica DGUM 32001 was used.

Conc. of extract (㎕/tube)	Unit of color effect	β-Galactosidase (Unit)		Alkaline phosphatase (Unit)	
		Activity measured	Activity calculated	Activity measured	Activity calculated
0	0	12.43±1.10	12.43	9.37±0.80	9.37
100	6.1	11.70±2.23	5.6	15.60±1.28	9.50
300	10.9	14.57±1.46	3.67	21.47±1.44	10.57
500	15.7	13.77±1.36	N/C	19.30±0.78	3.60

Table 9. Activities of β-galactosidase and alkaline phosphatase for antigenotoxicity of mutagen (2-aminofluorene). The fruiting-bodies extract from P. japonica DGUM 32001 was used.

Conc. of extract (㎕/tube)	Unit of color effect	β-Galactosidase (Unit)		Alkaline phosphatase (Unit)	
		Activity measured	Activity calculated	Activity measured	Activity calculated
0	0	10.93±0.3	10.93	9.87±1.55	9.87
100	5.2	12.33±1.3	7.73	14.67±3.93	10.07
300	9.3	11.47±0.9	6.17	15.73±3.53	0.43
500	5.8	14.00±0.7	7.80	19.03±2.21	12.83

突然變異原 AF에 대한 冬蟲夏草 抽出物과 抗突然變異 效能은 子實體抽出物과 培養濃縮液에서 類似(각각, IF = 0.69, 0.69)하여 미약한 정도의 效果를 보여주었다(Fig. 1, Table 3, Table 9).

突然變異原 NF에 대한 冬蟲夏草 抽出物의 抗突然變異 效能은 子實體를 사용하였을 때 가장 優秀하였고(IF = 0.56), 培養濃縮液 및 菌絲體抽出物에서는 類似(IF = 0.91 및 0.95)하게 나타났다(Fig. 1, Table 4, Table 6, Table 10). 이 결과는 突然變異原 NF에 대한

Table 10. Activities of β-galactosidase and alkaline phosphatase for antigenotoxicity of mutagen (nitrofluorene). The fruiting-bodies extract from P. japonica DGUM 32001 was used.

Conc. of extract (μl/tube)	Unit of color effect	β-Galactosidase (Unit)		Alkaline phosphatase (Unit)	
		Activity measured	Activity calculated	Activity measured	Activity calculated
0	0	14.90±1.30	4.90	13.60±1.73	13.60
100	4.7	14.80±1.30	10.10	20.93±0.59	16.23
300	10.2	14.63±2.28	4.43	19.07±1.08	8.87
500	15.5	13.60±1.31	N/C	17.17±0.81	1.67

Table 11. Antioxidant activities of extracts from P. *japonica* DGUM 32001

Extract (1.0 mg/ml)	Antioxidant activity (Unit)
Ascorbic acid	14.5
Broth concentrated	0.24
Mycelia extract	0.67
Fruiting-body extract	1.21

抗突然變異 活性이 MNNG와 比較시 相對的으로 적음을 나타내었다. 冬蟲夏草 培養濃縮液의 添加比率을 달리 하여 突然變異原 NF에 대한 抗突然變異 效能을 測定하였다(Fig. 3, Table 4,6,10). 培養濃縮液과 菌絲體抽出物을 反應液 tube 당 100, 300, 500 μl 增加하여 添加時 IF가 培養濃縮液에 대해 0.91, 0.84, 0.80으로, 菌絲體抽出物에 대해 0.95, 0.79, 0.81로 減少함을 나타내었으며, 이 결과는 添加된 培養濃縮液 및 菌絲體抽出物의 增加에 의하여 抗突然變異 活性이 增加함을 나타내었다. 子實體抽出物을 比率別로 添加하였을 때, 100 μl와 300 μl 添加時 IF 0.81 및 0.80으로 一定하게 減少하였다. 이는 100 μl 이상 子實體抽出物을 添加하여도 抗突然變異 活性에는 큰 影響이 없음을 意味한다.

2) Ames test를 利用한 antimutagenicity 實驗

冬蟲夏草 각 粗抽出物을 사용하여 復歸變異株의 生成率을 測定한 結果, 最小寒天培地 平板 당 出現한 colony의 수가 過度하게 나타났다. 이 결과는 冬蟲夏草 각 抽出物 중에 過度하게 添加되어 있는 것으로 判斷되는 histidine의 添加에 의하여 營養要求株의 營養回復에 의한 것으로 파악되었다.

3) 抽出物의 細胞毒性 實驗

사용한 冬蟲夏草 各 粗抽出物의 E. coli PQ37 菌株에 대한 細胞毒性을 隨行하였다. E. coli PQ37 菌株를 寒天平板培地 상에 塗抹한 다음, 각 濃度別 抽出物을 적신 濾過紙를 平板培地 위에 位置하여 培養한 結果, 각 抽出物의 어떠한 濃度에서도 試驗한 E. coli PQ37에 대하여 細胞毒性이 없었다(Fig. 4). 이 結果는 冬蟲夏草 각 抽出物의 抗突然變異 活性이 抽出物의 細胞毒性에 의하여 誘發되지 않았음을 意味한다.

2. 冬蟲夏草 抽出物의 抗酸化 效果

各各의 培養濃縮液, 菌絲體 및 子實體 抽出物의 濃度를 1.0 mg/ml로 주어 試驗하였을 때, 抗酸化 活性은 각각 0.24, 0.67, 1.21로 子實體 抽出物이 가장 優秀한 것으로 나타났다. 抗酸化物인 ascorbic acid와 比較時 各 抽出物의 抗酸化 效能은 1.7%, 4.6%, 8.3%로 抗酸化 效果는 미약하였으나, 試驗한 抽出物이 粗抽出物임을 勘案하여 冬蟲夏草 抽出物 중 抗酸化에 關聯된 物質의 持續的 硏究의 必要性이 提起되었다(Table 11).

IV. 考 察

생물의 유전적 다양성은 기본적으로 突然變異라는 유전적 변화에 있고 이러한 突然變異가 生殖細胞에 발생한다면 그 자손이 심각한 病이나 기형으로 사망할 수도 있으며 皮膚나 肝 등과 같은 體細胞에 생긴 突然變異는 그 細胞를 死滅시키거나 癌을 유발할 수도 있다. 특히 突然變異는 腫瘍과 밀접한 상관관계가 있으며 현재까지 알려진 發癌物質의 85% 이상은 突然變異原이고 非發癌性物質의 경우에도 10% 이하가 突然變異原으로 작용한다는 연구결과도 있듯이 돌연변이와 腫瘍은 밀접한 관계가 있다[4,33].

腫瘍과 관련이 있는 韓醫學的 病因으로는 《靈樞》[18]에서는 "積之始生, 得寒乃生, 厥乃成積也.", "熱氣淳盛, 下陷肌膚, 筋髓枯, 內連五臟, 血氣竭, 當其癰下, 筋骨良肉皆無餘, 故命曰疽."라 하여 寒, 熱과 같은 外邪에 原因이 있다고 하였으며

《難經正義》[34]에서는 積聚를 氣之積과 氣之聚라 하여 人體의 氣機와 관련된 것으로 보았고 《中藏經語釋》[35]에서는 "夫癰疽瘡腫之所作也. 皆五臟六腑蓄毒不流則生矣. 非獨因榮衛壅塞而發者也."라 하여 五臟六腑에 蓄積된 毒素가 發病 原因이 된다고 하였다. 《景岳全書》[20]에서는 그 原因을 七情, 勞倦, 飮食, 方術 等으로 보았다. 現代中醫書[21-22]에서는 正虛邪實, 氣滯血瘀, 臟腑失調, 痰濕結聚, 熱毒內結 等으로 보아 扶正法으로 益氣健脾, 滋陰補血, 溫補脾腎 等, 祛邪法으로는 理氣活血, 活血祛瘀, 淸熱解毒, 軟堅散結, 化痰去濕, 以毒攻毒 等의 治療法이 사용되고 있다.

현재까지 抗癌效果가 있는 藥材를 이용한 實驗으로는 抗癌效果 및 免疫機能에 관한 것으로 나뉘어지는데 韓方治法으로 살펴보면 祛邪法에 해당하는 活血祛瘀의 藥物과 扶正法에 해당하는 補益劑가 主를 이룬다[23].

그 중 補益劑를 이용한 抗癌效果에 관한 것으로는 韓[23]이 益氣養陰시키는 韓藥 中 肺腺癌 SPC-A-1細胞의 억제율을 살펴본 결과 北沙蔘이 44.28%, 人蔘이 22.56%, 黃芪가 12.25%, 麥門冬이 17.53%로 나타났다고 보고하였다.

冬蟲夏草의 화학적 성분은 수분 10.84%, 조단백질 25-32%, 다당체 28.9%, 조지방 8.4%, 회분4.1% 비타민 B12 등으로 구성되어 있으며 그 중 다당체는 疾病으로부터 人體를 防禦하는데 대단히 중요한 역할을 하는 물질로서 免疫力을 增加시키고 癌을 抑制하거나 老化防止에 관여하며 또한 키닉산(Quinic acid)의 이성체로 알려진 cordycepin이란 물질은 핵산물질로서 細胞의 遺傳情報에 관여하면서 退化된 免疫機能을 活性化시켜 正常細胞가 癌細胞로 되는 것을 防止하는 작용을 한다[36]. 冬蟲夏草를 이용한 항암다당류의 분리는 1989년에 Ohmori 등이 冬蟲夏草의 일종인 Cordyceps ophio glossoides의 배양액으로부터 분리된 단백다당체가 癌細胞에 직접적인 毒性을 나타냄을 보고하였는데, 평균 분자량이 33,000이었고, 그 구조는 β-1,6 사슬을 갖는 β-1,3-D-glucan임을 밝혔다[37-38].

冬蟲夏草의 抗癌作用에 대한 보고로는 常[24]이 冬蟲夏草의 성분중cordycepin이라는 核酸物質이 癌細胞의 세포분열을 억제하고 子實體와 菌絲體 모두 mouse 대식세포의 貪食力을 향상시킨다고 하였으며, 石[39]은 비특이성 면역반응을 갖추고 있을 뿐 아니라 抗癌能力을 높여주어 腹水癌을 가진 mouse의 활동시간을 연장시킨다고 하였다. 張 等[30]은 天然 및 人工 冬蟲夏草의 菌絲體가 Lewis 폐암세포의 성장과 전이 억제효과가 있다고 하였으며, 劉[31]는 정상인 뿐만아니라 백혈병 환자의 NK 細胞를 활성시켜 免疫機能을 강화시키는 것으로 보고하였다.

본 실험은 冬蟲夏草의 培養濃縮液, 菌絲體 및 子實體 抽出物의 抗酸化 및 抗突然變異 효과에 대하여 알아보았다. NBT法을 사용한 抗酸化 活性의 실험結果, 培養濃縮液, 菌絲體 및 子實體 抽出物의 抗酸化 活性은 미약한 정도로 나타났다. 冬蟲夏草 各 抽出物의 突然變異原 MNNG, EtBr, AF, NF에 대한 冬蟲夏草 各 抽出物의 抗突然變異 效能을 SOS chromotest를 利用한 antigenotoxicity 試驗과 Ames의 方法을 利用한 antimutagenecity 試驗을 隨行하였다. MNNG 突然變異原에 대한 冬蟲夏草 抽出物의 抗突然變異 效能은 SOS chromotest 결과, 子實體를 사용하였을 때 가장 優秀하였고 培養濃縮液과 菌絲體抽出物에서 類似하게 나타났다. EtBr 突然變異原에 대한 冬蟲夏草 抽出物의 抗突然變異 效能은 子實體에서 가장 優秀하였고 培養濃縮液에서는 미약한 정도의 效果를 보여주었다. AF 突然變異原에 대한 冬蟲夏草 抽出物의 抗突然變異 效能은 子實體抽出物과 培養濃縮液에서 類似하여 미약한 정도의 效果를 나타내었다. NF 突然變異原에 대한 冬蟲夏草 抽出物의 抗突然變異 效能은 子實體를 사용하였을 때 가장 優秀하였고 培養濃縮液 및 菌絲體抽出物에서는 類似한 결과를 보여주었다. 이 결과는 突然變異原 NF에 대한 抗突然變異 活性이 MNNG와 比較시 相對的으로 적음을 나타내었다.

사용한 冬蟲夏草 各 粗抽出物의 細胞毒性을 隨行한 結果 E. coli PQ37 菌株에 대한 細胞毒性이 없었다. 이 結果는 冬蟲夏草 각 抽出物의 抗突然變異 活性이 抽出物의 細胞毒性에 의하여 誘發되지 않았음을 意味하였다.

冬蟲夏草 抽出物 중 抗突然變異 物質의 濃度에 비하여 營養源 histidine이 過度하게 流入된 것으로 實驗의 성격상 이와 같이 精製되지 않은 抽出物은 Ames法을 利用하여 抗突然變異 活性을 測定하기에는 不適合한 것으로 判明되었다.

冬蟲夏草 抽出物의 抗突然變異 效能의 測定을 위하여, 抽出物을 分離·精製하여 Ames法을 活用한 抗突然變異 試驗을 隨行하거나, 또는 冬蟲夏草 粗抽出物을 癌細胞가 誘導된 생쥐를 利用한 in vivo 實驗을 隨行하여 抗突然變異 活性을 決定하여야 할 것으로 判斷되었다.

본 실험의 結果, 冬蟲夏草의 子實體, 菌絲體 및 培養濃縮液의 抗酸化 活性은 미약하였으나 抗突然變異 活性에서는 子實體가 가장 우수하였으며 일정한 농도 이상에서의 菌絲體 및 培養濃縮液의

抗突然變異 活性도 유의한 결과를 나타냄으로써 이것이 冬蟲夏草 子實體의 代用으로 이용할 수 있을 것으로 생각된다.

추후 冬蟲夏草 抽出物의 抗突然變異 효능의 측정을 위하여, 抽出物을 分離, 精製한 후 癌細胞가 유도된 생쥐를 이용한 in vivo 實驗을 隨行하여 藥理效能을 결정하는 實驗이 필요한 것으로 사료된다.

V. 結 論

雪花冬蟲夏草(Paecilomyces japonica)를 液體 및 固體 培養한 후, 培養濃縮液, 菌絲體 및 子實體 抽出物을 사용하여 SOS chromotest를 利用한 抗突然變異 活性과 NBT法을 利用한 抗酸化 活性을 測定하였다.

1. 子實體抽出物의 抗突然變異이 效能이 MNNG, EtBr, AF, NF 등 모든 突然變異原에 대하여 가장 優秀하였다.

2. MNNG이 突然變異原으로 사용되었을 때 培養濃縮液, 菌絲體抽出物, 子實體抽出物 모두에서 優秀한 抗突然變異 活性을 나타내었다.

3. MNNG와 NF를 突然變異原으로 사용하였을 때 培養濃縮液 및 菌絲體抽出物의 抗突然變異 活性은 類似하였다.

4. MNNG와 NF를 突然變異原으로 사용하여 冬蟲夏草 抽出物의 添加比率을 增加시켰을 때 抗突然變異 活性이 增加하였으나, 一定 水準 以上의 添加比率에서는 活性이 一定하게 維持되었다.

5. Ames法을 利用한 冬蟲夏草 抽出物의 抗突然變異 活性은 各 抽出物의 分離 · 精製가 先決條件으로 把握되었다.

6. 冬蟲夏草 각 抽出物의 抗酸化 活性은 子實體抽出物, 菌絲體抽出物, 培養濃縮液의 順으로 優秀하였으나, 對照群으로 사용된 ascorbic acid에 比하여 미약하였다.

VI. 參考文獻

1. Yoghitoshi, Yawara : 내과진단학, 제일의학사, 1994; 8-9.
2. 서울대학교 의과대학 : 종양학, 서울대학교 출판부, 1996; 1-3, 43-82, 137-138.
3. Geoffrey M.Cooper : Elements of human cancer, Jones and barlett publishing Inc., 1992; 7: 240-259.
4. Nakamura, Y. et al. : S-methyl methane thiosulfonate, a new antimutagenic compound isolated from Brassica oleracea L. var. botrytis. Biol. Pharm. Bull., 1993; 16: 207.
5. 서정숙 외 : 식용식물의 항변이원에 관한 연구, 생약학회지, 1990; 21: 88.
6. 이 성 외 : 쑥 추출물의 항돌연변이 활성효과, Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol, 1996; 24: 105-110.
7. 김창민 외 : 개너삼의 성분 및 생물활성에 관한 연구, 생약학회지, 1990; 21: 137.
8. Sakai, Y. et al. : Antimutagenicity of extracts from crude drugs in chinese medicines. Mut. Res., 1986; 174: 1.
9. Kakinuma K. et al. : J. Agri. Biol. Chem., 1984; 48: 1647.
10. Kim, H.K. et al. : Effects of antimutagenic flavonoid, galangin on benzo(a)pyrene metabolism in mice. Kor. Biochem. J., 1991; 24: 141.
11. Wattenberg, L.W : Inhibition of neoplasia by dietary constituents. Cancer Res., 1983; 43: 2448.
12. Ames, B.N. et al. : Methods for detecting carcinogesn and mutagens with Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. Mutat. Res., 1975; 31: 347-364.
13. Maron, D.M. et al. : Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mut. Res., 1983; 113: 173-215.
14. Quillardet, P. : The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. Mut. Res., 1985; 147: 65-78.
15. 巢元方 : 巢氏諸病源候論, 大星文化社, 1992; 147, 222, 149-150.
16. 康明吉 : 濟衆新編, 杏林書院, 1975; 181.
17. 李克光 主編 : 金匱要略, 人民衛生出版社, 1989; 316.
18. 郭靄春 : 黃帝內經靈樞校注語譯, 天津科學技術出版社, 1989; 386-387, 439, 555.
19. 楊宝印 : 癌症的中藥治療, 河北科學技術出版社, 1992; 4-6.
20. 張介賓 : 景岳全書 雜證模選讀, 重廣大學出版社, 1988; 88, 90, 101, 94-95.
21. 買堃 : 癌瘤防治研究, 成輔社, 1984; 25, 27-29.
22. 郁仁存 外 : 腫瘤研究, 上海科學技術出版社, 1991; 95-133, 156-157.
23. 韓明權 外 : 24味中藥對人肺腺癌細胞核酸和蛋白質及細胞周期的影響觀察, 中國中西醫結合雜誌, 1995; 15(3): 147-149.
24. 常敏毅 : 抗癌本草, 湖南科學技術出版社, 1987; 118-119.
25. 錢伯文 :抗癌中藥的臨床效用, 上海翻譯出版公司, 1987; 106-107.
26. 曾美玉 : 中國常用中藥材, 科學出版社, 1995; 1108-1113.
27. 顔正華 主編 : 中藥學, 人民衛生出版社, 北京, 1991; 776-779.
28. 王本祥 主編 : 現代中藥藥理學, 天津科學技術出版社, 1997; 1250-1254
29. 林通國 :實用臨證中藥指南, 四川科學技術出版社,1990; 1085-1088.
30. 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): 53-54.
31. 劉超盧 外 : 冬蟲夏草對白血病NK細胞影響的體外研究, 中國中西醫結合雜誌, 1992; 12(5): 267-269.
32. Winterbourn, C. C. et al. : The estimation of red cell superoxide di -smutase activity, J. Lab. Clin. Med., 1975; 85: 337.
33. 이광웅 외 : 생명과학의 이해, 을유문화사, 1996; 136, 142.
34. 葉霖 : 難經正義, 人民衛生出版社, 1989; 98.
35. 李聰甫 : 中藏經語釋, 人民衛生出版社, 1990; 77-78.
36. 성재모 외 : 동충하초균의 형태적인 특징과 단백질 Pattern에 의한 계통 분류. 한국균학회지. 1995; 23(1): 92-104.
37. Yamada, H : Structure and antitumor activity of an alkali-soluble polysaccharide from Cordyceps ophiolossoides. Carbohydr. Res., 125(1): 107-115.
38. Ohmori, T. : The correlation between molecular weight and antitumor activity of galactosaminoglycan (CO-N) from Cordyceps ophioglossoides. Chem. Pharm. Bull.(Tokyo), 1989; 37(5):

1337-1340.
39. 石洪 : 抗癌本草, 長沙, 湖南科學技術出版社, 1987; 118-119