

눈꽃동충하초(*Paecilomyces tenuipes*)의 인간 암세포주에 대한 세포독성

심중섭¹ · 민응기¹ · 장해룡 · 이창윤² · 김삼수² · 한영환*

동국대학교 자연과학대학 생물학과, ¹동국대학교 대학원 응용생물학과, ²청도버섯종균미생물연구소

눈꽃동충하초(*Paecilomyces tenuipes* DGUM 32001)의 자실체를 메탄올로 추출하여 인간 암세포주에 대한 세포독성을 조사하였다. 메탄올 추출물의 암세포주에 대한 세포독성은 매우 우수하였다. 메탄올 추출물의 용매 분획 중, 에틸아세테이트 분획에서 가장 우수한 세포독성을 나타내었으며, HeLa, HeLa S3 및 A-431 암세포주에 대한 IC₅₀ 값은 각각 13, 35 및 30 µg/ml이었다. 그러나, 이 분획의 HeLa 암세포주에 대한 세포독성은 apoptosis에 의하지 않음을 알 수 있었다. 배양 균사체의 메탄올 추출물은 A-431 암세포주에 대해 우수한 세포독성을 보여주었다.

Key words □ cytotoxicity, fractionation, MTT assay, *P. tenuipes*

국내외적으로 천연물로부터 부작용이 적고 항암활성이 우수한 항암제 개발에 많은 연구가 이루어져 왔다. 현재 주목을 조직배양하여 taxol을 생산하는 연구 이외에도 약용식물, 버섯, 조류 및 방선균 등을 이용한 신물질의 탐색이 광범위하게 수행되고 있다.

동충하초는 자낭균 버섯으로 약 100여 속과 750여 종이 있으며 국내에는 약 80여 종이 있는 것으로 알려져 왔다. 대표적으로 *Cordyceps*, *Paecilomyces*, *Isaria*, *Torrubiella* 및 *Podonetria* 속 등이 있다. *Cordyceps* 속 중 *C. sinensis*는 중국에서 예로부터 민간 약재로 사용되어 왔다. 동충하초 유래 생리활성 물질로 *C. militaris* 배양액, 균사체 및 자실체에서 분리된 항세균, 항암 및 항바이러스 활성을 띠는 cordycepin(5,6)과 *C. ophioglossoides*의 ophiocordin(4)이 잘 알려져 왔다.

눈꽃동충하초(*P. tenuipes*)는 대표적 불완전 세대형 동충하초로 최근 자실체의 인공배양이 성공하여 널리 보급되고 있다. 눈꽃동충하초 추출물의 항암활성 및 apoptosis 항암기작에 관한 연구(7)와 눈꽃동충하초의 형태학적 및 자실체의 배양학적 특성(1-3)에 보고가 있으나, 여러 종류의 암세포주에 대한 눈꽃동충하초 추출물 및 용매 분획의 항암활성에 관한 연구는 미흡한 실정이다.

이에 본 저자들은 *P. tenuipes* DGUM 32001의 메탄올 추출물과 이 추출물을 단계적으로 용매 분획한 다음, 자궁 경부 암세포주 HeLa와 HeLa S3, 상피암세포 A-431을 대상으로 세포독성을 조사하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 재료

제주도 영실에서 채집한 눈꽃동충하초의 자실체의 자낭 포자

를 PD 한천배지에서 배양한 다음 균사를 분리하여 배양 접종원으로 사용하였다.

암세포주 HeLa, HeLa S3 및 A-431은 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, Seoul)에서 분양하여 계대배양 후 사용하였다. 암세포주 배양용 DMEM 배지는 Gibco-BRL사에서, 눈꽃동충하초 균사체 배양용 PD 배지는 Difco사에서 구입하였다. 자실체 및 균사체의 추출 및 분획용 유기 용매는 국산 특급시약을 사용하였다. 항암활성 측정용 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT)와 dimethylsulfoxide(DMSO)는 Sigma사에서 구입하였다.

자실체의 유도

PD 한천배지에서 자란 균사체를 cork borer(dia, 8 mm)로 5~6개를 떼어내어 200 ml의 PD 액체배지(500-ml 삼각플라스크)에 접종하였다. 접종된 균사는 24°C의 진탕배양기(120 rpm)에서 7일간 배양하였다. 누에번데기(20 g)가 들어있는 polypropylene병(850-ml)에 전 배양된 배양액(10 ml)을 접종 후, 24°C의 항온기에서 10일간 배양하였다. 자실체 형성을 위하여, 형광등(500 lux)이 있는 18°C의 항온기로 옮겨 10일간 배양하였다.

자실체의 메탄올 추출 및 용매 분획

눈꽃동충하초의 자실체(건조중량, 300 g)를 메탄올로 80°C의 추출기에서 1시간 동안 3회 추출하였다. 메탄올 추출액을 진공농축(Eyela Co.)한 다음 동결건조(Ilisin Co.)하였다. 동결건조된 추출물을 증류수에 재 용해시킨 후, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올의 순서로 용매 분획하였다 (Fig. 1).

세포주의 배양

사용된 자궁경부암세포 HeLa와 HeLa S3, 상피암세포 A-431은 10%의 fetal bovine serum과 1%의 항세균 및 항진균 항생제가 첨가된 DMEM(glucose, glutamine 및 pyridoxine) 배지를 사

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 054-770-2213, Fax: 054-770-2515
E-mail: yhhan@mail.dongguk.ac.kr

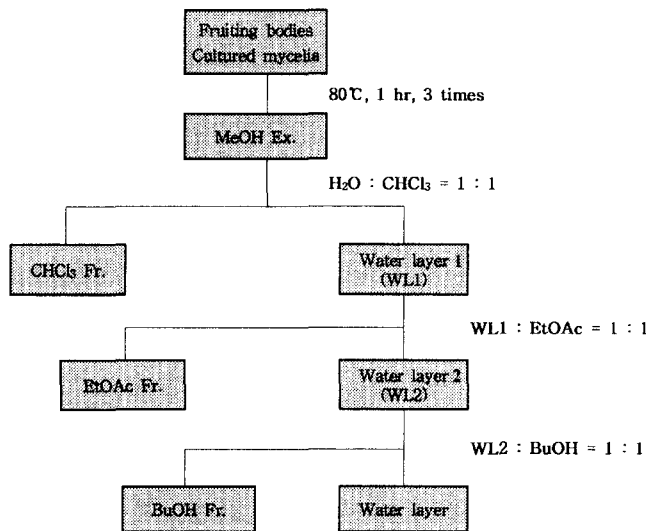


Fig. 1. Procedure for extraction and fractionation of the fruiting bodies and cultured mycelia of *P. tenuipes* DGUM 32001. WL, water layer.

용하여 37°C의 항온기(10% CO₂)내에서 배양하였다.

MTT assay

암세포에 대한 세포독성은 변형된 MTT법(8)을 사용하였다. 대수기에 접어든 암세포를 trypsin으로 처리하여 단일세포 부유액으로 만들었다. Well 당 150 µl의 DMEM 배지가 들어 있는 96-well에 Coulter counter(Coulter, UK)를 이용하여 암세포수의 농도가 3×10³ cells/well이 되도록 조절하여 접종하였다. 암세포 배양 24시간 후에 추출물 및 각 용매 분획을 농도별로 투여하여 3일간 배양하였다. 각 well에 50 µl의 MTT 용액(2.0 mg/µl)을 첨가한 다음, DMSO로 환원된 MTT-formazan을 용해시켰다. Microplate reader(Molecular Devices, California)를 이용하여 형성된 MTT-formazon의 농도를 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. IC₅₀ 값은 암세포의 생존 그래프를 통하여 세포의 50% 생존율에 대한 추출물 및 분획의 농도로서 결정하였다.

결 과

눈꽃동충하초의 동정 및 명명

제주도 영실에서 채집하여 본 실험에 사용한 눈꽃동충하초는 7-8개의 나무가지 모양의 자좌를 형성하였으며, 크기는 25-50 mm이었다. 자좌의 끝에 흰색 포자가 형성되어 있었으며, 포자의 크기는 4.8 µm으로 구형이었다. 눈꽃동충하초의 형태적 특성을 바탕으로 *Paecilomyces tenuipes*로 동정하였으며(2), *P. tenuipes* DGUM 32001로 명명하였다.

눈꽃동충하초 자실체 추출물 및 분획의 암세포에 대한 세포독성

눈꽃동충하초 자실체의 메탄올 추출물을 이용하여 암세포주인 HeLa, HeLa S3 및 A-431에 대해 세포독성을 측정된 결과, 실험한 세 종류의 암세포주에 대해 비슷한 세포독성을 나타내었다

(Fig. 2). 메탄올 추출물의 암세포 독성에 대한 IC₅₀ 값은 HeLa, HeLa S3 및 A-431 암세포주에 대해 각각 102, 105 및 110 µg/ml이었다 (Fig. 2).

클로로포름 및 에틸아세테이트 분획이 조추출물인 메탄올 추출물 보다 더 우수한 세포독성을 보여 주었으며, 에틸아세테이트 분획은 사용한 암세포주 모두에서 가장 우수한 암세포 세포독성을 나타내었다 (Fig. 2). 에틸아세테이트 분획의 각 암세포주에 대한 IC₅₀ 값은 HeLa, HeLa S3 및 A-431에 대해 각각 16, 35 및 30 µg/ml이었다 (Fig. 2).

자실체 및 균사체 추출물의 HeLa 암세포주에 대한 세포독성

암세포주 HeLa에 대해 메탄올 추출물 및 각 용매 분획을

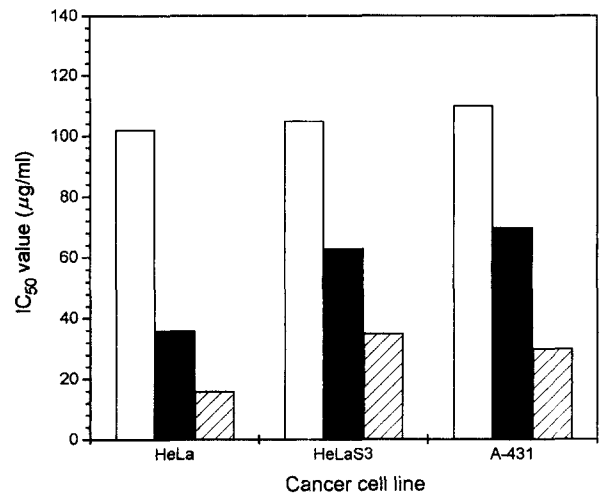


Fig. 2. Cytotoxicity of methanol extract and solvent fractions of the fruiting bodies of *P. tenuipes* DGUM 32001 against cancer cells. Symbol: □, methanol extract; ■, chloroform fraction; ▨, ethyl acetate fraction.

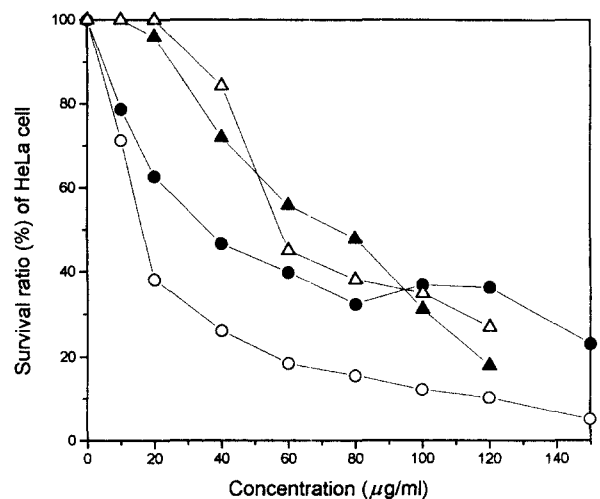


Fig. 3. Relative survival ratio of HeLa cells treated with various solvent fractions from the fruiting bodies and cultured mycelia of *P. tenuipes* DGUM 32001. Symbol: ○ - ○, ethyl acetate fraction; ● - ●, chloroform fraction; △ - △, water layer; ▲ - ▲, butanol fraction.

Table 1. Cytotoxicity of the methanol extract of the fruiting bodies and cultured mycelia of *P. tenuipes* DGUM 32001 against cancer cells

Cell line	IC ₅₀ value (μg/ml)	
	Fruiting body	Mycelia
A-431	110	150
HeLa	102	>200
HeLa S3	105	>200

농도별로 첨가하여 세포독성을 조사하였다. 에틸아세테이트 분획에서 가장 우수한 암세포 세포독성을 나타내었으나, 부탄올 및 잔존 수용매 분획에서의 세포독성은 상대적으로 미흡하였다 (Fig. 3).

배양 균사체를 메탄올로 추출하여 암세포주에 대해 세포독성을 측정하였다. 자실체 추출물과 비교시 균사체 추출물의 HeLa, HeLa S3 및 A-431 암세포주에 대한 세포독성은 상대적으로 낮았다 (Table 1). 그러나 자실체 추출물이 HeLa 암세포주에 대해 세포독성이 가장 우수한 반면, 균사체의 메탄올 추출물에서는 A-431 암세포주에 대해 우수한 세포독성을 보여 주었다 (IC₅₀, 150 μg/ml).

고 찰

진균에 대한 대부분의 항암활성 연구는 β-glucan 등 단백당류에 의한 면역증강 등 간접적 기작에 관한 것으로, 직접적 세포독성에 대한 연구는 미흡한 실정이었다.

암세포주의 *in vitro* 세포 생존율에 관한 본 연구의 결과, 눈꽃동충하초 자실체의 에틸아세테이트 분획은 매우 낮은 농도에서 사용한 각 암세포주에 대해 직접적인 세포독성(IC₅₀ 값은 약 16 μg/ml)이 나타내었다. 에틸아세테이트 분획의 직접적 암세포 독성에 대한 생리활성 물질의 분리, 정제 및 구조 동정은 추후 계속 수행될 연구과제이다.

Park 등(7)의 보고에 의하면 눈꽃동충하초의 에틸아세테이트 분획이 인간 백혈병 세포주인 Jurkat T cell에서 apoptosis를 유도한다는 보고가 있었으나, 본 연구의 자궁경부암 세포주인 HeLa를 대상으로 DNA fragmentation assay를 실시한 결과 apoptosis를 일으키지 않은 것으로 나타났다 (자료 미기재). 이

결과는 사용한 눈꽃동충하초의 strain이 서로 다르다는 것과, 세포독성을 유발하는 생리활성 물질이 암세포의 종류에 따라 작용 기전이 다르다는 것으로 유추된다.

배양 균사체 추출물을 이용한 암세포주 세포독성 실험의 결과, 자실체 추출물과 비교시 HeLa 암세포주에 대한 세포독성이 양호하지 못하였다. 그러나, 균사체를 단시간에 대량으로 배양할 수 있는 액체배양의 효율적 특성을 활용하면, 세포독성의 생리활성 물질을 자실체로부터 생산하는 것 보다 유리할 수 있다. 추후 눈꽃동충하초 균사체의 액체배양을 위한 배지 조성 및 배양 조건, 분리 및 정제 조건에 대한 연구를 추후 수행할 예정이다.

참고문헌

1. 성재모, 김천환, 양권주, 이현경, 김양섭. 1995. 동충하초속균의 분포 및 *Cordyceps militaris*, *C. nutans* 이용에 관한 연구. 한국균학회지 21, 92-105.
2. 성재모, 이현경, 양권주. 1995. 동충하초(*Cordyceps*) 속균의 형태적인 특징과 단백질 pattern에 의한 계통 분류. 한국균학회지 23, 92-104.
3. Ban, K.W., D.K. Park, J.O. Shim, Y.S. Lee, C.H. Park, J.Y. Lee, T.S. Lee, S.S. Lee, and M.W. Lee. 1998. Cultural characteristics for inducing fruiting-body of *Isaria japonica*. *Kor. J. Mycol.* 26, 380-386.
4. Helmut K., K.A. Wilfried, L. Wolfgang, and M. Renate. 1977. Ophiocordin, an antifungal antibiotic of *Cordyceps ophioglossoides*. *Arch. Microbiol.* 113, 121-130.
5. James, L.W. and D.O. William. 1978. Effect of cordycepin triphosphate on *in vitro* RNA synthesis by plant viral replicases. *J. Virol.* 29, 811-814.
6. Marvin, A.R., M. Paul, W. Geogre, C.G. Joseph, and S.J. Robert. 1964. Inhibition of human tumor cells by cordycepin. *Biochim. Biophys. Acta.* 95, 194-204.
7. Park, Y.H., E.K. Moon, Y.K. Shin, M.A. Bae, J.G. Kim, and Y.H. Kim. 2000. Antitumor activity of *Paecilomyces japonica* is mediated by apoptotic cell death. *J. Microbiol. Biotech.* 10, 16-20.
8. Plumb J.A., R. Milroy, and S.B. Kaye. 1989. Effects of the pH dependence of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay. *Cancer Research* 49, 4435-4440.

(Received November 20, 2000/Accepted December 5, 2000)

ABSTRACT: Cytotoxicity Against Human Cancer Cell Lines by *Paecilomyces tenuipes* DUGM 32001

Joong-Sup Shim¹, Eung-gi Min¹, Hae-Ryong Chang, Chang-Yun Lee², Sam-Su Kim² and Yeong-Hwan Han*(Department of Biology, College of Natural Science, Dongguk University, ¹Department of Applied Biology, Graduate School, Dongguk University, Kyongju 780-714, ²Chungdo Mushroom and Spawn, Institute of Microbiology, Chungdo 714-800, Korea)

Paecilomyces tenuipes DUGM 32001, an entomopathogenic fungus, was examined to evaluate *in vitro* cytotoxicity against several human cancer cells. The fruiting bodies of *P. tenuipes* were extracted with methanol and fractioned with some organic solvents *i.e.* chloroform, ethyl acetate, and butanol. The methanol extracts of *P. tenuipes* showed significant cytotoxicity against human cancer cell lines; HeLa, HeLa S3, and A-431. Among the fractions tested, the ethyl acetate fraction had the highest cytotoxicity against three cancer cell lines. The IC₅₀ values of ethyl acetate fraction against HeLa, HeLa S3, and A-431 were 13, 35, and 30 $\mu\text{g/ml}$, respectively. However, cytotoxicity might not be due to apoptosis. The methanol extract of cultured mycelia showed high cytotoxicity against HeLa cell lines.