

동충하초가 사염화탄소로 유발된 간 손상 및 간암세포증식에 미치는 영향

김 산* · 황충연 · 김남권 · 박민철 · 김 진

원광대학교 한의과대학 외관과교실

Effects of Cordyceps militaris on CCl₄ - Induced Liver Damage and Cancer Cell (HepG2 Cell) Growth

San Kim, Choong yeon Hwang, Nam kwen Kim, Min cheul Park, Jin Kim

Department of Ophthalmology Otolaryngology and Dermatology, Oriental Medical Collage, Wonkwang University

Cordyceps militaris has been known as a Chinese traditional medicine for the treatment of tuberculosis, asthma, kidney disease, debility and fatigue etc. This study was attempted to investigate the therapeutic effect of C. militaris extract on the cytotoxic activity of HepG2, human hepatocellular carcinoma cells and the liver damage induced by carbon tetrachloride in SD rats. C. militaris extracts inhibited significantly the proliferation of HepG2 cells in vitro. Carbon tetrachloride(CCl₄) caused a significant an increase in liver weight, serum aspartate aminotransferase(AST) and alanine aminotransferase(ALT) activity, alkaline phosphatase(ALP), serum thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), microsomal TBARS, and decrease in microsomal detoxification enzymes (cytochrome P-450, P-450 reductase, cytochrome b5, b5 reductase). TBARS and ALP in serum pretreated with C. militaris extracts (300mg/kg/day, 600mg/kg/day) was significantly reduced compared to control group(CCl₄). Cytochrome b5 and b5 reductase activities were significantly increased in CM300 (300 mg/kg/day) and CM600 group(600 mg/kg/day), and cytochrome P-450 reductase was significantly increased in CM300 group. Pretreatment (100, 300, and 600 mg/kg/day for 7 days) of C. militaris with CCl₄ was significantly inhibited the accumulation microsomal TBARS and the significantly increased in the cytochrome P-450 activity. These results suggested that C. militaris (300mg/kg/day for 7 days) has appreciable therapeutic effect on CCl₄ induced hepatotoxicity.

Key words : Cordyceps militaris, CCl₄, HepG2 Cell

서 론

아시아 지역은 지방간과 간암, 간경변 등을 포함한 간·담도 질환이 많이 발생하는 지역이다. 특히 우리 나라는 간암이나 간경변의 발생률이 외국에 비해 상당히 높은 편이다. 현대 의학의 눈부신 발전에도 불구하고 간암이나 간경변에 대한 특효약이나 효과적인 치료법이 제시되지 않아 치료에 어려움을 겪고 있다¹⁻²⁾. 한의학에서는 肝積, 肝癰 등의 명칭으로 간암과 유사한 질환에 대해 언급하고 있으며 치료 방법으로는 疏肝理氣, 活血化瘀, 清熱利濕, 益氣健脾, 疏肝健脾 등의 방법을 활용

하고 있다³⁾. 간암에 대한 치료 방법으로는 현대 의학에서 수술요법, 화학요법, 방사선요법, 면역요법 등이 있지만 만족할 만한 치료 효과를 얻지 못하고 있으며 특히 화학요법은 부작용이 심하고 간암자체가 화학요법에 저항성이 높다는 점으로 인해 최근에는 부작용이 적은 생약을 활용한 항암 활성 물질의 탐색이 활발히 진행되고 있다⁴⁻⁵⁾. 본 실험에 사용한 동충하초는 동충초 또는 충초라고도 불리며 다양한 곤충기생성 균류가 주로 곤충에 침입하여 이를 기주로 자실체를 형성하거나 충체상에 포자과를 형성하는 버섯의 일종으로 곤충이나 거미 등에 기생하여 발생한 자실체와 기생유충의 사체를 건조한 것이다⁶⁻⁸⁾. 효능으로는 결핵, 천식, 해독, 자양강장제 등으로 쓰이고 있으며 또한 성교불능과 유정, 관절 통증에도 사용된다⁹⁻¹⁰⁾. 冬蟲夏草에 대한 연구로는 Chen¹¹⁾은 冬蟲夏草와 冬蟲夏草균의 배양

* 교신저자 : 김 산, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의과대학
E-mail : erkimsan@korea.com Tel : 02-919-8006
· 접수: 2002/05/14 · 수정: 2002/06/20 · 채택 : 2002/07/24

된 군사가 mouse 면역계에 유의한 효과가 있음을 보고하였고, Zhang¹²⁾은 冬蟲夏草와 冬蟲夏草균의 배양된 군사의 수침액이 식세포계의 기능을 향상시키고 macrophage의 생성을 증가시킨다고 보고하였다. 또 김¹³⁾은 冬蟲夏草(Cordyceps sinensis)가 사염화탄소로 유발된 간 손상을 개선시키는 효과가 있다고 보고하였으며, Tang¹⁴⁾은 humoral immunity에 대한 조절효과가 정상 mouse에서는 없음을 보고하였다. 또 심 등¹⁵⁾은 눈꽃 冬蟲夏草(Paecilomyces japonica)가 streptozotocin(STZ)으로 당뇨가 유도된 마우스에서 완만한 효능 및 면역증강효과가 나타낸다고 보고한 바 있다. 이에 저자는 冬蟲夏草(Cordyceps militaris)가 간 기능에 미치는 영향을 알아보기 위하여 冬蟲夏草 추출액이 HepG2 세포주의 증식에 미치는 영향을 조사하였고 동충하초 추출액을 1주일간 흰쥐에 투여한 후 사염화탄소(CCl₄)를 복강주사하여 간 손상을 유발시킨 후 24시간 후에 간 손상 및 혈액상의 변화를 관찰하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험물질의 조제

실험물질인 冬蟲夏草(Cordyceps militaris)는 서울 경동시장에서 구입한 제품을 사용하였으며, 冬蟲夏草를 잘게 썰은 다음 3시간 동안 전탕하여 얻은 추출액은 거즈로 거른 다음 3,000 rpm으로 20분 동안 원심분리하여 얻어진 상등액을 다시 filter paper로 여과하였다. 이러한 추출액을 50℃ 하에서 Rotary evaporator로 진공농축과정을 거친 다음 동결건조기로 완전 건조를 하였다. 시료는 사용시까지 냉동 보관하였다.

2. 세포배양

실험에 사용한 human hepatocellular carcinoma인 HepG2 세포는 한국세포주은행으로부터 분양받아 가온 불활성화시킨 10% fetal bovine serum (FBS), 100 units/ml penicillin, 그리고 100 mg/ml streptomycin이 첨가된 RPMI 배지상에서 온도 37℃ 및 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다.

3. HepG2 세포주의 증식에 미치는 영향

HepG2 세포주의 증식에 미치는 冬蟲夏草의 영향을 알아보기 위하여 Mosmann의 방법¹⁶⁾을 일부 변형한 MTT assay를 수행하여 세포 생존율을 측정하였다. 즉 HepG2 세포를 1×10⁵ cells/ml의 농도로 24 well cell culture plate에 약재처리 24시간 전에 분주하여 배양하였다. 冬蟲夏草의 물추출물을 5, 10, 20, 50, 100, 150, 200, 300, 500 µg/ml 농도로 처리한 후 24, 48, 72시간 배양하였다. 배양된 세포는 0.5% MTT 용액을 well 당 20 µl를 약재처리된 plate에 첨가하여 3시간동안 방치하여 Formazan이 형성되게 하였다. MTT 용액이 포함된 배양액을 제거하고 각 well 당 0.1% isopropanol 150 µl를 첨가하여 30분간 배양한 후 ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 세포의 viability를 결정하였다.

4. 실험동물의 사육조건

생후 6주 경과한 180~200g의 Sprague-Dawley (SD)계 흰쥐 수컷만을 선별하여 사용하였다. 동물사육실의 조건은 conventional system으로 온도 23±1℃, 습도 55±5%, 배기 10~18 회/hr, 형광등 명암 12 hr cycle, 조도 300~500 Lux의 사육 환경에서 렛트용 폴리카보네이트 사육상자 (240W×400L×180H mm)에 2마리씩 넣어 사육하였다. 실험동물의 사료는 신촌사료(주) 제품의 고형사료 (조단백질 22% 이상, 조지방 4.5% 이상, 조섬유 6% 이하, 조회분 8% 이하, 칼슘 0.7% 이상, 인 0.5% 이상)를 사용하였으며 깔짚은 삼육(SAM) 제품의 버드나무승으로 만든 것을 사용하였다. 음수는 멸균된 수돗물을 자유롭게 섭취하도록 하였다.

5. 실험물질 투여

조제된 冬蟲夏草(Cordyceps militaris) 시료는 막자로 분말화하여 체중 kg 당 100, 300, 600 mg에 해당하는 농도로 체중 kg 당 5 ml 용량씩 각각 투여하였다. 정상군 및 대조군에서는 생리식염수를 동량 투여하였다.

6. 간독성 유발

冬蟲夏草 추출물(100, 300, 600 mg/kg) 및 생리식염수를 7일 동안 경구 투여한 흰쥐에 사염화탄소(CCl₄)를 복강투여하여 간 손상을 유도하였다. 즉 사염화탄소는 corn oil에 1:1 (V/V)의 비율로 혼합하여 체중 kg 당 1 ml의 용량을 복강주사하여 간 독성을 유발시켰다.

7. 실험군

정상군은 독성물질 투여나 실험물질의 균질액을 급여하지 않고 생리식염수만을 경구투여하면서 정상적인 사육조건으로 사육하였으며, CCl₄ 단독 투여군(CCl₄)인 대조군은 생리식염수를 경구투여하면서 독성물질인 사염화탄소만을 단독 투여하였다. 冬蟲夏草 추출물 투여군인 CM100, CM300, 그리고 CM600 실험군들은 각각 체중 kg 당 100 mg, 300 mg, 600 mg에 해당하는 농도로 1일 1회씩 7일 동안 각각 경구 투여하였다. 冬蟲夏草 추출물의 최종 투여 후 사염화탄소를 체중 kg 당 1 ml의 용량을 복강주사로 투여하였다. 사염화탄소의 투여 직후 절식시켰으며 투여 24시간 후 혈액과 간을 적출하였다. 각 실험군의 동물 수는 각각 8마리씩 사용하였다.

8. 체중 및 간 무게 측정

체중은 매일 측정하였으며, 실험동물은 20% urethane으로 마취한 다음 심장천자로 채혈하였다. 채혈 후 회복하여 간을 적출하였고 간의 무게를 측정하였으며 체중 당 간 무게비를 환산하였다. 적출한 간은 사용할 때까지 -70℃에 냉동 보관하였다.

9. 혈액의 생화학적 검사

채취한 혈액은 실온에서 30분간 방치한 후 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 혈청의 glucose,

creatinine, BUN, uric acid, cholesterol, triglyceride, total protein, albumin 그리고 alkaline phosphatase (ALP)를 자동분석기(Hitachi-7150, Hitach medical Co.)로 측정하였다.

10. 혈청의 AST와 ALT 활성도 측정

채취한 혈액은 실온에서 30분간 방치한 후 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 혈청의 aspartate aminotransferase (AST)와 alanine aminotransferase(ALT)의 활성도는 자동분석기 (Hitachi-7150, Hitach medical Co.)로 측정하였다.

11. 혈청의 TBA 반응성물질의 함량측정

Thiobarbituric acid (TBA) 반응성물질의 함량은 Suematsu 등¹⁷⁾의 방법에 따라 측정하였다. 즉 20% acetic acid 1.5 ml, 8.1% SDS 0.225 ml, 증류수 0.075 ml, 1.2% TBA 용액 1 ml, 그리고 흰 쥐의 혈청 0.2 ml을 혼합하였다. 그 용액을 30분 동안 100℃로 가온한 다음 532 nm에서 흡광도를 측정하고 TBA 반응성물질의 함량을 결정하였다.

12. 간 조직의 Cytosol 및 Microsome 분리

Bansal 등의 방법¹⁸⁾에 따라 적절한 흰쥐의 간을 잘게 썰고 5배의 150 mM KCl을 함유한 30 mM Hepes 완충액(pH 7.4)으로 희석하여 균질화한 다음 원심분리관에 넣고 700 g로 20분 동안 원심분리하였다. 그 상등액을 원심분리관에 취하고 2차로 11,000 g로 30분 동안 고속원심분리하여 상등액을 얻었으며 pellet은 제거하였다. 2차 원심분리한 상등액을 다시 3차 105,000 g로 60분 동안 초고속원심분리하여 상등액을 세포질 분획을 얻었다. 그리고 pellet은 130 mM KCl이 함유한 Hepes 완충액으로 씻어낸 다음 다시 초고속원심분리(105,000 g, 60분)하여 얻은 pellet을 같은 완충액으로 재균질화하여 microsome 분획을 얻었다. microsome 과 세포질 분획을 분리하는 전 과정은 4℃하에서 수행하였으며 시료는 -70℃에 보관하면서 각종 실험에 사용하였다.

13. 단백질 정량

Bovine serum albumin (BSA)을 표준물질로 사용하여 Lowry 등의 방법¹⁹⁾에 따라 단백질 농도를 측정하였다.

14. 간 조직의 TBA 반응성물질의 함량측정

Microsomal membrane의 지질과산화도를 비교하기 위하여 0.1 mM NADPH와 ADP-Fe²⁺ (0.5 mM ADP, 0.02 mM Fe²⁺)를 첨가하고 시험관에서 microsome을 넣은 후 각각 37℃에서 10, 30 그리고 60분간 반응시켰다. 반응액은 Suematsu 등¹⁷⁾의 방법에 따라 532 nm에서 흡광도를 측정으로 TBA 반응성물질의 함량을 결정하였다.

15. 간의 이물질대사효소 활성측정

Cytochrome P-450 정량: Cytochrome P-450의 정량은 Omura와 Sato의 방법²⁰⁾으로 0.1 M 인산염 완충액(pH 7.5)으로

간 microsome 단백질이 1.0 mg/ml의 농도가 되도록 희석하여 측정하였다. 분광광도계의 기준 및 시료 cuvette에 희석한 microsome액을 각각 1 ml 씩 주입한 다음 Na₂S₂O₄ 1 mg을 첨가하여 baseline을 결정하였다. 시료 cuvette에 CO 가스를 30초간 bubbling한 후 450 nm와 490 nm에서의 흡광도차이를 관찰하였으며, 밀리몰흡광계수는 91 mM-1cm-1을 이용하여 P-450 함량을 계산하였다. NADH cytochrome P-450 reductase의 활성도 측정: NADH cytochrome P-450 reductase의 활성도는 William과 Kamin의 방법²¹⁾에 따라 분광광도계의 기준 및 시료 cuvette에 200 nM cytochrome c 0.3 ml와 간 microsome의 단백질이 0.25 mg/ml의 농도가 되게 만든 희석액을 0.3 ml 넣고 0.5 M 인산염 완충액(pH 7.7)으로 총 용량을 1.5 ml로 한 다음 37℃에서 분광광도계의 흡광도를 baseline으로 맞추었다. 시료 cuvette에 0.1 μ mole의 NADPH 0.1 ml을 첨가하고 550 nm에서 3분간 흡광도 변화를 측정하였다. 흡광도의 차이로부터 밀리몰흡광계수 21 mM-1cm-1을 이용하여 cytochrome c의 환원속도를 계산하였다. Cytochrome b5 정량: Cytochrome b5 함량은 Omura와 Sato의 방법²⁰⁾에 따라 분광광도계의 기준 및 시료 cuvette에 간 microsome의 단백질이 1 mg/ml의 농도가 되도록 만든 희석액을 각각 995 μ씩을 주입한 다음 baseline을 결정하였다. 그리고 시료 cuvette에 다시 30 mM NADH 5 μ를 첨가하고 426 nm와 409 nm에서 흡광도의 차이를 측정하였으며, 밀리몰흡광계수는 185 mM-1cm-1을 이용하여 cytochrome b5의 함량을 정하였다.

NADH cytochrome b5 reductase의 활성도 측정: Mihara와 Sato의 방법²²⁾에 따라 분광광도계의 기준 및 시료 cuvette에 0.1 M 인산염 완충액(pH 7.5) 0.85 ml, 40 mM potassium ferricyanide 0.05 ml을 주입하였다. 그리고 간 microsome 단백질이 1 mg/ml가 되게 만든 희석액 0.05 ml을 넣어 혼합한 후 37℃에서 분광광도계의 흡광도를 baseline으로 맞추었다. 이 시료 cuvette에 4 mM NADH 0.05 ml을 첨가하고 420 nm에서 potassium ferricyanide의 환원속도로 3분간 흡광도의 차이를 측정하고 밀리몰흡광계수 1.02 mM-1cm-1을 이용하여 계산하였다.

16. 통계학적 분석

실험결과는 각 군의 평균(Mean)±표준편차(SD)로 표기하였으며, 정상군 및 대조군과 PBE 식이군과의 상호비교는 Student's t-test로 유의성을 검정하여 P<0.05 이하의 경우 유의한 차이가 있다고 판정하였다.

결 과

1. HepG2 세포주의 증식에 미치는 영향

본 실험에서 human hepatocellular carcinoma인 HepG2의 세포사멸에 대한 冬蟲夏草의 물추출물의 효과를 알아보기 위하여 추출물을 10, 20, 100, 150, 200, 300 및 500 μg/ml 농도로 증가시키면서 세포 배양배지에 처리하여 24, 48 및 72시간 동안 세포를 배양하였다. 그림 2에서 보여지듯이 약제처리 후 24시간과 48시간에서는 10~200 μg/ml까지는 세포사멸을 유도하는 효과가

관찰되지 않았으나 300 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 95%와 90%의 세포사멸이 확인되었으며, 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서 89%와 86%의 세포사멸이 일어났음을 보여주었다. 72시간에서는 24시간 및 48시간과는 달리 100 $\mu\text{g/ml}$ 까지는 큰 영향이 없었으나 200 $\mu\text{g/ml}$ 부터 세포사멸에 유의적인 영향을 나타내어 300 $\mu\text{g/ml}$ 에서 82%, 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서 72%로 유의적인 세포사멸이 확인되었다. 冬蟲夏草는 HepG2 세포에 처리시간 및 처리농도에 의존적으로 세포의 증식에 영향을 미치는 것으로 확인되었다(Fig. 1).

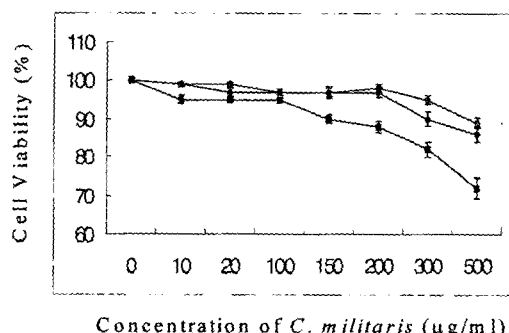


Fig. 1. Induction of concentration-dependent cell death in HepG2 cells by *C. militaris*. Cells were incubated for 24, 48 and 72 hr at 37°C with the 10, 20, 100, 150, 200, 300 and 500 $\mu\text{g/ml}$ concentrations of *C. militaris* extracts. Cell viability by MTT assays was measured as described in Materials and Methods. Results were expressed as the mean \pm SD of three experiments and presented as a percentage of control values. (○) cell incubation for 24hr, (●) cell incubation for 48hr, (■) cell incubation for 72hr.

2. 체중 및 간의 중량변화

冬蟲夏草 및 사염화탄소 투여한 경우 정상군에 비해 체중의 유의적인 변화는 관찰되지 않았으며, 사염화탄소 단독 투여군인 대조군(CCl_4) 및 모든 冬蟲夏草 투여군에서는 정상군에 비해 간 무게 및 체중 당 간 무게비가 모두 증가하였다. 그러나 冬蟲夏草 100 mg/kg에서는 정상군에 비해 유의적인 증가를 나타낼 뿐 대조군에 비해 유의적인 감소가 관찰되지 않았으나 300 mg/kg 및 600 mg/kg에서는 사염화탄소 단독 투여군에 비해 유의적인 감소를 나타내어 정상군과 유사한 수준으로 회복되었다. 따라서 사염화탄소의 투여는 외형적으로 간의 비대 증상을 나타내는데, 冬蟲夏草가 이러한 간 비대 증상의 완화효과가 있음을 확인할 수 있었다.

3. 혈액의 생화학적 변화

冬蟲夏草 및 사염화탄소 투여가 신장 및 배설기능에 미치는 효과를 알아보기 위하여 혈청의 creatinine, BUN(blood urea nitrogen) 및 uric acid 함량의 변화를 측정하였다. 혈청 creatinine과 uric acid의 함량을 측정된 결과 대조군 및 冬蟲夏草 투여군(CM100, CM300, CM600) 모두에서는 사염화탄소의 독성에 의한 변화가 관찰되지 않았을 뿐만 아니라 冬蟲夏草의 병행 투여에 따른 변화도 관찰되지 않아 대조군과 유사한 수준을 나타내었다. 그러나 BUN는 사염화탄소의 독성에 의해 대조군(14 mg/ml) 및 CM600(13 mg/ml)은 정상군(9.9 mg/ml)에 비해 유의적인 증가를 나타내었으며, CM100(11 mg/ml)과 CM300(11 mg/ml)은 사염화탄소에 의한 독성으로 증가된 대조군에 비해

유의한 감소 양상을 나타내어 정상적인 수준으로 회복되었다. 사염화탄소 단독 투여군 및 冬蟲夏草 투여한 모든 실험군은 혈청 중 total protein 및 albumin의 함량이 정상군과 유사한 수준을 유지하였다. 마찬가지로 지질대사 및 심혈관 질환과 연관성이 높은 triglyceride와 cholesterol 함량을 측정된 결과 triglyceride는 모든 실험군에서 정상군에 비해 유의한 증감이 관찰되지 않았으나 cholesterol에서는 정상군에 비해 사염화탄소 및 冬蟲夏草 투여군 모두 감소하였다. 冬蟲夏草 투여군은 사염화탄소에 단독 노출된 대조군에 비해 증가하는 경향은 나타내었으나 정상군의 수준에는 미치지 못하였다. 그 외에 glucose가 사염화탄소 단독투여군에서 유의적으로 감소를 나타내었을 뿐 다른 실험군에서는 통계적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았으며 冬蟲夏草 투여에 따른 특이적인 변화는 관찰되지 않았다.

4. 혈청중 Aminotransferase (AST, ALT)의 활성도 변화

冬蟲夏草의 투여가 혈청의 간 기능 지표효소인 aspartate aminotransferase (AST)와 glutamic pyruvic transaminase (ALT) 활성에 미치는 영향을 살펴본 결과는 그림 2과 같다. 정상군의 AST와 ALT활성은 115와 43 IU/L인데 반해 사염화탄소 단독 투여군은 1,736와 698 IU/L으로 높은 증가현상이 관찰되었다. 이는 사염화탄소에 의해 간 손상이 유발되어 AST와 ALT가 현저히 유도됨을 알 수 있다. 冬蟲夏草와 사염화탄소를 투여한 모든 실험군들에서 AST의 활성이 각각 1383, 1321 및 1388 IU/L로 대조군인 사염화탄소 단독 투여군에 비해 유의한 감소를 나타내었으나 정상군의 수준까지 회복되지는 못하였다. 또한 冬蟲夏草와 사염화탄소를 투여한 모든 실험군들에서 ALT의 활성도 각각 443, 220 및 408 IU/L으로 대조군인 사염화탄소 단독 투여군에 비해 유의적인 감소를 나타내었으나 AST와 마찬가지로 정상군의 수준까지는 회복되지 못하였다. 冬蟲夏草를 투여한 실험군들(CM100, CM300, CM600) 중에 체중 kg당 冬蟲夏草 300 mg을 투여한 CM300 실험군이 AST와 ALT 모두 대조군에 비해 가장 뚜렷한 감소를 나타내어 정상군과 가장 유사한 활성 수준을 나타내었다(Fig. 2).

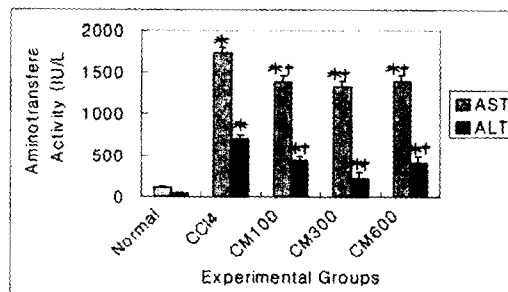


Fig. 2. Effects of *Cordyceps militaris* on AST and ALT in the serum of carbon tetrachloride induced hepatic injury in rats. Oral injection with hot water extracts of *Cordyceps militaris* (CM100: *C. militaris* extracts 100 mg/kg body weight, CM300: *C. militaris* extracts 300 mg/kg body weight, CM600: *C. militaris* extracts 600 mg/kg body weight) mixed in saline were administered for 7 days. Normal and control animals were saline treatment. The values are expressed as mean \pm SD of eight rats in each group. *: Significantly different from the normal group ($p < 0.05$). #: Significantly different from the CCl_4 group ($p < 0.05$).

5. 혈청 및 Liver Microsome의 TBA 반응성 물질의 함량변화

혈청과 liver microsome의 지질과산화 지표로서 TBA (thiobarbituric acid) 반응성 물질의 함량을 비교 측정하였다. 사염화탄소 단독 투여군은 0.242 unit으로 정상군(0.222 unit)에 비해 TBA반응성 물질의 함량이 정상군의 109.0%의 차이를 나타내어 유의한 증가를 보여주었다. 반면 冬蟲夏草 처리군 중 CM300과 CM600은 사염화탄소의 투여로 증가된 MDA 함량이 유의적으로 감소되어 정상군의 수준에 이르렀으나 저농도의 冬蟲夏草 처리군(CM100)에서는 정상군과 대조군에 비해 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 간 조직의 microsome 분획에서 지질과산화반응은 NADPH와 ADP-Fe²⁺를 첨가하여 지질과산화 반응을 인위적으로 유도하여 반응시간 경과에 따른 MDA 함량 변화로 비교 측정하였다. 모든 실험군은 반응시간의 증가에 따라 MDA 함량이 증가하였으며, 반응 60분 경과시 정상군의 MDA 함량은 단백질 mg 당 13.2 nmole을 나타낸 반면 사염화탄소의 단독 투여군인 대조군은 60분 반응시 MDA 함량이 단백질 mg 당 18 nmole로 사염화탄소의 독성에 의해 급격한 증가가 확인되었다. 반면 冬蟲夏草를 투여한 실험군들은 대조군에 비해 반응 60분 경과시 0.81~0.86배의 수준으로 유의한 감소를 나타내어 정상군과 유사한 수준으로 감소시켰으나 정상군과 비교해 볼 때 유의적인 차이를 나타내었다(Fig. 3). 따라서 冬蟲夏草가 항산화 작용으로 인해 혈청 및 간 조직의 지질과산화를 억제하는 효과가 있는 것으로 판단된다.

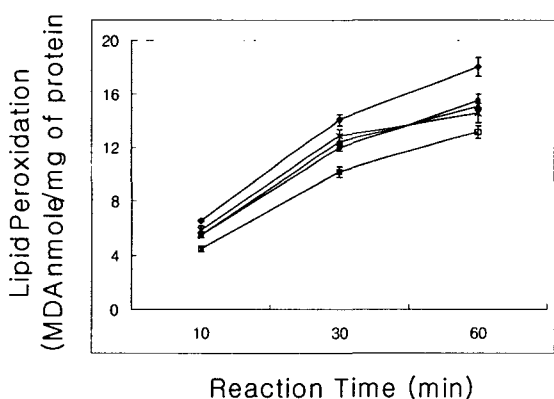


Fig. 3. Time-dependent lipid peroxidation of liver microsomes in carbon tetrachloride exposed male rats. Lipid peroxidation was measured as described in Materials and Methods. Liver microsome fractions were prepared by centrifugation according to the method of Bansal et al.²⁵. The values are expressed as mean±SD of eight rats in each group. *: Significantly different from the normal group (p<0.05). †: Significantly different from the CCl₄ group (p<0.05). (◆: CCl₄ group, ●: CM100, ▲: CM600, ×: CM300, □: normal group)

6. 간의 이물질대사효소의 변화

간 독성물질인 사염화탄소는 lipid peroxidation 및 liver necrosis를 유발하며 cytochrome P-450의 destruction으로 P-450의 함량이 현저히 감소되는데, 본 연구 결과에서도 사염화탄소의 단독투여군인 대조군(0.44 nmole/mg protein)은 정상군(0.79 nmole/mg protein)에 비해 유의한 감소가 확인되었다. 반면 冬蟲夏草의 투여군들에서는 대조군에 비해 모두 유의한 증가를 나

타내었는데, 300 mg/kg의 농도까지는 冬蟲夏草의 농도에 의존적으로 회복되는 양상을 나타내었으나 600 mg/kg을 투여한 CM600 실험군은 대조군에 비해 유의한 증가를 나타내어 정상군과 유사한 수준으로 회복되었으나 300 mg/kg을 투여한 CM300 실험군에 비해 증가정도는 낮았다(Fig 4). 사염화탄소 단독 투여군인 대조군의 마이크로솜 P-450 reductase의 활성도는 정상군(42 nmole/min/mg protein)에 비해 18 nmole/min/mg protein으로 현저히 감소하는 양상을 나타내었다. 반면 冬蟲夏草 투여군들에서는 대조군에 비해 증가되었으나 冬蟲夏草 300 mg/kg을 투여한 CM300 실험군에서만 유의한 차이가 확인되었다. 마찬가지로 cytochrome b5와 b5 reductase의 활성에서도 사염화탄소를 단독 투여한 경우에는 정상군에 비해 유의한 감소양상을 나타내었다(Table 1).

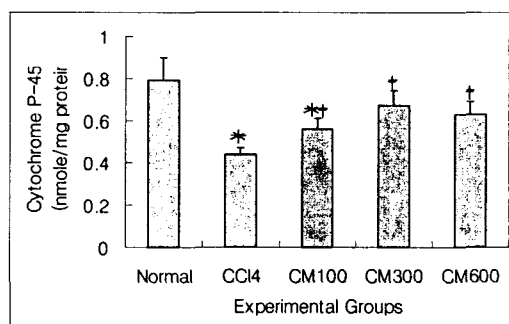


Fig. 4. Effects of Cordyceps militaris on liver microsomal cytochrome P-450 in CCl₄ induced hepatic injury in rats. Oral injection with hot water extracts of Cordyceps militaris (CM100: C. militaris extracts 100 mg/kg body weight, CM300: C. militaris extracts 300 mg/kg body weight, CM600: C. militaris extracts 600 mg/kg body weight) mixed in saline were administered for 7 days. Liver microsome fractions were prepared by centrifugation according to the method of Bansal et al.²⁵. The values are expressed as mean±SD of eight rats in each group. *: Significantly different from the normal group (p<0.05). †: Significantly different from the CCl₄ group (p<0.05).

Table 1. Effects of Cordyceps militaris on liver microsomal cytochrome b5 and b5 reductase in CCl₄ treated rats.

Experimental Groups	Enzyme Activity	
	Cytochrome b ₅ ^a	b ₅ reductase ^b
Normal	0.18±0.01	2.4±0.3
CCl ₄	0.07±0.01*	1.5±0.2*
CM100	0.09±0.03*	1.8±0.4*
CM300	0.12±0.04*†	2.2±0.6†
CM600	0.10±0.04*†	1.9±0.4†

Oral injection with hot water extracts of Cordyceps militaris (CM100: C. militaris extracts 100 mg/kg body weight, CM300: C. militaris extracts 300 mg/kg body weight, CM600: C. militaris extracts 600 mg/kg body weight) mixed in saline were administered for 7 days. Normal and control animals were saline treatment. Liver microsome fractions were prepared by centrifugation according to the method of Bansal et al. 25). The values are expressed as mean±SD of eight rats in each group. *: Significantly different from the normal group (p<0.05). †: Significantly different from the CCl₄ group (p<0.05). a: nmole/mg of protein, b: μmoles/min/mg of protein

사염화탄소의 독성으로 감소된 효소의 활성은 冬蟲夏草의 투여시 100 mg/kg을 투여한 CM100을 제외하고는 모두 회복되는 양상을 나타내었는데, cytochrome b5는 체중 kg당 300 및 600 mg의 冬蟲夏草 투여군에서 각각 0.12 nmole/mg protein 및 0.10 nmole/mg protein으로 정상군(0.18 nmole/mg protein)과도 유의한 차이를 보였으나 다소 회복됨을 확인 할 수 있었으며,

cytochrome b5 reductase는 300 mg/kg과 600 mg/kg의 冬蟲夏草를 투여한 실험군에서 각각 2.2 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ protein 및 1.9 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ protein으로 대조군(1.5 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ protein)에 비해 유의한 증가를 나타내어 정상 발생군(2.4 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ protein)의 수준으로 회복되었다(Table 1).

고 찰

예로부터 중국에서 불로장생의 비약으로 알려진 冬蟲夏草는 곤충을 기주하여 자실체를 발생하는 버섯으로 현재 전세계적으로 수백 여종이 알려져 있다. 모든 종의 冬蟲夏草가 약용으로 쓰이는 것은 아니고 그 중에서 자낭균문(Ascomycota), 핵각균강(Pyrenomycetes), 맥각균목(Clavicipitales), 맥각균과(Clavicipitaceae) 冬蟲夏草속(Cordyceps)의 冬蟲夏草가 이용되며 이들은 한국을 비롯한 중국에서 결핵, 천식, 자양강장제 등의 한약재로 널리 이용되어 왔다^{6-9,23}. 또한 冬蟲夏草(Cordyceps militaris)는 항균효과²⁴, 면역증강 및 항암효과²⁵⁻²⁷, 혈당강하¹⁵, 항산화효과^{28,29}, 항돌연변이³⁰ 등의 다양한 효능이 여러 연구자들에 의해 밝혀졌다. 冬蟲夏草의 주성분으로는 수분(10.8%), 단백질(25.3%), 지방(8.4%), 조섬유(18.5%), 탄수화물(28.9%), 각종 아미노산 등을 함유한다. 지방은 포화지방산이 13.0%, 불포화지방산이 82.2% 함유하며⁹⁻¹⁰, 이외에도 guanic acid의 이성체인 cordyceptic acid, cordycepin, vitamin B12가 포함되어 있다^{10,31}. 자실체를 형성하는 일부 冬蟲夏草는 고대로부터 중국에서 인체의 활력을 보하는 불로장생의 비약으로 인식되어 왔으며, 특히 전통적인 한방에서 이용되고 있는 대표적인 冬蟲夏草는 박쥐나방의 유충(Hepialus armoricanus)을 기주로 자실체를 형성하는 Cordyceps sinensis로서 매우 다양한 약물활성을 발현한다는 사실이 입증되고 있다³². 그러나 한의서 및 민간요법 등에서 자양강장의 효능이 탁월한 것으로 알려져 많은 사람들이 이용하고 있으나 이와 관련된 연구는 冬蟲夏草가 간의 항섬유화(antifibrotic effect)와 혈청의 aminotransferase (AST, ALT)를 감소시키는 연구결과 이외에는 간기능과 관련된 세부적인 연구가 없는 실정이다. 따라서 冬蟲夏草의 항암효과 및 간 기능 회복효과를 규명하기 위하여 冬蟲夏草의 HepG2 세포에 대한 항암효과 및 사염화탄소로 간 손상을 유도하여 간 기능 관련효소들의 변화를 조사하였다. Xu 등²⁵ 및 Nakamura 등²⁷의 보고에 따르면 冬蟲夏草(C. sinensis)가 B16 melanoma cell에 대해 강한 세포독성을 나타내므로 암 치료제로의 활용 가능성을 시사한 것과 마찬가지로 본 연구에서도 冬蟲夏草가 human hepatocellular carcinoma cell인 HepG2의 증식에 억제효과를 나타내었는데, 실험물질 처리 후 24시간과 48시간에서는 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서, 72시간에서는 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서 HepG2 cell의 성장을 억제하였다(Fig. 1). 이러한 항암효과에 대해서는 앞으로 구체적인 연구가 진행되어야만 어떤 기전에 의해 항암작용을 나타내는지 알 수 있으며, 간암 치료제로의 활용가능성도 판단할 수 있을 것으로 생각된다. 사염화탄소(carbon tetrachloride, CCl₄)는 과거 수십 년 전부터 삼푸나 마취제, 공업용 유기용제, 왁스 등의 세척제, 방화제, 냉동제 등 많은

부분에서 사용되어 왔으나 사염화탄소의 독성이 보고된 이래 사용이 제한되어 왔다. 사염화탄소는 free radical mechanism에 의해 간손상이 유발되므로³³ 간질환 연구에 많이 이용되고 있다. 사염화탄소 (CCl₄)는 간독성 유발물질 중 잘 알려진 화학물질로써 초기에 endoplasmic reticulum의 mixed function oxidase (MFO) system에 의해 trichloromethyl (CCl₃·) free radical로 대사되며 독성 중간대사산물인 trichloromethyl (CCl₃·), trichloromethylperoxy (CCl₃O₂·), 혹은 chlorine (Cl·) free radical들은 지질이나 단백질과 공유결합을 형성하여 막 손상이나 간 괴사와 같은 간 손상이 2차적으로 수반된다^{34,35}. 따라서 본 연구에서는 간 독성물질로 잘 알려진 사염화탄소를 1회 복강투여하여 간 손상을 유도하였으며 사염화탄소의 투여 전에 7일 동안 실험물질인 冬蟲夏草(Cordyceps militaris)의 물 추출물을 경구투여하여 冬蟲夏草의 간 기능 회복에 미치는 영향을 조사하였다. 생체내에서 간은 영양물질들의 물질대사를 담당하는 동시에 해독작용을 담당하는 중요한 장기이다. 간 기능과 관련된 aminotransferase들은 아미노기 전이 반응을 촉매하는 효소의 총칭으로 체내에 널리 존재하는 효소이다. AST와 ALT는 모든 장기에 존재하나 AST의 경우 간, 심장, 골격근에 많이 존재하는 반면 ALT는 간세포 특이성이 높은 것이 특징이다. 혈청 AST와 ALT 활성은 간세포의 변성이나 괴사를 반영하는 효소로서 간 조직 손상시 다량 혈중으로 유출된다³⁶. 간 기능이 손상되면 총 단백질 또는 albumin 수치가 감소하고 AST, ALT 및 ALP가 상승하며, bilirubin 및 γ -GTP 활성 등이 증가한다고 알려져 있다^{37,38}. 본 연구에 독성 유도물질로 사용된 사염화탄소는 사람에게 치명적인 간 손상을 주는 물질로 독성작용에 대한 많은 경우들이 이미 보고된 바 있고³⁹ 사람의 장기중 주로 간과 신장의 손상이 오지만 특히 간 손상은 치명적이다. 본 연구에서 사염화탄소의 단독 투여군은 정상군에 비해 혈청 중 간기능의 지표인 AST와 ALT의 활성도가 각각 11.2배와 16배로 증가되었으나 冬蟲夏草 투여군들에서는 사염화탄소 단독 투여군인 대조군에 비해 유의한 감소가 관찰되었다 (Fig. 2). CM100, CM300 그리고 CM600에서 AST는 대조군에 비해 각각 0.80, 0.76 및 0.80배로 유의한 감소를 나타내었으나 정상군의 수준에는 미치지 못하였다. 그리고 CM100, CM300 그리고 CM600에서 ALT는 대조군에 비해 각각 0.64, 0.32 및 0.58배로 유의한 감소를 나타내었으나 AST와 마찬가지로 정상군의 수준에는 미치지 못하였다. 그러나 冬蟲夏草의 투여시 AST보다는 간세포에 특이성이 높은 ALT가 현저한 감소양상을 나타내었다. 冬蟲夏草를 투여한 실험군들(CM100, CM300, CM600) 중에 체중 kg당 冬蟲夏草 300 mg을 투여한 CM300 실험군이 AST와 ALT 모두 대조군에 비해 가장 뚜렷한 감소를 나타내어 정상군과 가장 유사한 활성 수준을 나타내었다 (Fig. 2). 또한 간 기능과 연관성이 높은 ALP도 정상군이 531 IU/L인데 반해 대조군은 727 IU/L으로 1.37배 증가되어 간독성이 유발되었을 확인할 수 있었으며, 冬蟲夏草 투여군들(CM100, CM300, CM600)에서는 CM100 실험군을 제외하고 CM300 및 CM600에서 대조군에 비해 유의한 감소양상을 나타내었다. 이러한 결과는 사염화탄소의 투여시 일반적으로 혈청내 효소들

(AST, ALT, ALP 등)의 활성도가 급격히 증가되었으며^{40,41}, 간 기능 향상효가가 있는 것으로 알려진 중국 전통한약재 *Fructus schisandrae*⁴², *Swertia chirata*⁴¹ 그리고 *Teucrium stocksianum*⁴³의 투여로 증가된 이들 효소의 활성이 회복된다고 보고한 결과와 일치하였다. 이러한 결과를 종합해 볼 때 冬蟲夏草는 혈청의 간기능 지표들(AST, ALT 및 ALP)에서 사염화탄소의 독성에 의해 증가된 이들의 활성을 낮추므로써 손상된 간의 회복에 도움을 주며 나아가 개선시킬 수 있는 가능성이 있다고 생각된다. 그 외에도 신독성과 연관된 BUN에서는 사염화탄소에 의해 유의한 변화가 관찰되었으나 일부 冬蟲夏草 투여군들(CM100 및 CM300)에서 회복되는 양상이 관찰되었으며, 지질대사와 관련된 cholesterol의 수준도 대조군 및 모든 冬蟲夏草 투여군들에서 정상군에 비해 유의한 감소가 확인되었다. 이러한 변화와 관련성이 있는 지질대사 및 심혈관 질환에 대해서는 앞으로 이에 대한 연구를 더 수행해 보아야 어떤 판단을 할 수 있을 것으로 생각된다. 주로 간조직의 *microsome*에 존재하는 hemoprotein인 cytochrome P-450 효소계는 독성물질의 해독에 가장 중요한 역할을 하는 해독효소인 monooxygenase 반응을 촉매하는 효소군으로서 흡수, 침투된 방대한 종류의 xenobiotic chemical 뿐만 아니라 소수성인 여러 생체물질들의 대사에 관여하는 *microsome* 전자전달계의 최종 산화효소로 친유성 생리물질의 기질을 산화시켜 외부물질을 불활성화 물질로 무독화시킨다^{44,45}. 수컷 wistar rat에서 CCl₄를 투여한 경우 cytochrome P-450과 b5가 모두 감소되었으나 eugenol을 처리한 경우 이들 phase I component의 감소를 유의하게 억제하였고 CCl₄에 의해 유도된 *microsomal lipid*에 대한 손상 및 TBARS의 축적에 의한 peroxidative damage에 대해 보호효과를 나타내었다⁴⁶. 또한 송악(*Hedera rhombea*) 추출물의 투여시 사염화탄소의 독성으로 감소되었던 cytochrome P-450의 isozyme인 7-ethoxyresorufin-O-deethylation(EROD) 및 7-benzyloxyresorufin-O-dealkylation(BROD)의 활성이 회복됨을 보고하였으며⁴⁷, eugenol의 투여는 사염화탄소로 감소되었던 cytochrome P-450과 cytochrome b5의 활성이 유의적으로 회복된다고 보고한 바 있다⁴⁶. 마찬가지로 본 연구에서도 이물질대사효소인 cytochrome P-450의 활성도가 사염화탄소의 단독 투여시 유의적인 감소를 나타내었으나 冬蟲夏草의 투여로 인해 점차 증가되어 대조군과 유의적인 차이를 나타내었다(Fig. 4). 이러한 결과는 冬蟲夏草의 투여가 cytochrome P-450의 활성을 유의적으로 회복시킨다는 것을 확인 할 수 있었다. 반면 cytochrome P-450 reductase의 활성도는 사염화탄소 단독 투여군인 대조군에서 정상군(42 nmole/min/mg protein)에 비해 현저히 감소하였으며, 冬蟲夏草 투여로 대조군에 비해 전반적으로 증가가 관찰되었으나 冬蟲夏草 300 mg/kg을 투여한 CM300 실험군에서만 유의한 차이를 나타내었다. 또한 cytochrome b5와 b5 reductase의 활성에서도 사염화탄소를 단독 투여한 경우에는 정상군에 비해 유의한 감소양상을 나타내었으며, 사염화탄소의 독성으로 감소된 효소의 활성은 100 mg/kg을 투여한 실험군을 제외하고는 冬蟲夏草의 투여시 회복되는 양상을 나타내었는데, cytochrome b5는 체중 kg당 300 및 600 mg의

冬蟲夏草 투여한 실험군들에서는 각각 0.12 nmole/mg protein 및 0.10 nmole/mg protein으로 대조군(0.07 nmole/mg protein) 뿐만 아니라 정상군(0.18 nmole/mg protein)과도 유의한 차이를 나타내어 미소한 회복양상만이 확인 할 수 있었으며, cytochrome b5 reductase는 300 mg/kg과 600 mg/kg의 冬蟲夏草를 투여한 실험군들에서는 각각 2.2 μ mole/min/mg protein 및 1.9 μ mole/min/mg protein으로 대조군(1.5 μ mole/min/mg protein)에 비해 유의한 증가가 확인되었으며 정상군(2.4 μ mole/min/mg protein)의 수준까지 회복되었다(Table 1). 간의 이물질대사효소의 측정결과를 비교해 볼 때 冬蟲夏草 실험군들에서 유의적인 변화가 관찰되었는데, 이는 冬蟲夏草가 항산화 효과가 탁월하므로^{28,29} 지질과산화물 생성을 억제하는 동시에 free radical의 소거작용으로 정상적인 이물질대사효소 수준을 유지하게 되는 것으로 판단된다. 본 연구에서 사용된 투여농도들 중에 체중 kg당 冬蟲夏草 300mg을 경구투여한 실험군에서는 이물질대사효소 수준이 손상된 간 기능을 충분히 회복시키는 정도의 기대할 만한 수준인 것으로 확인되었다. 이러한 결과들을 종합해 볼 때 한 방 및 민간요법에서 많이 사용되는 冬蟲夏草(*Cordyceps militaris*)는 간암세포(HepG2 cell)에 대해 성장억제효과를 나타낼 뿐만 아니라 손상된 간 기능의 회복작용을 나타내었다. 특히 본 실험에서 사용된 농도들 중에 체중 kg당 冬蟲夏草 300 mg의 투여시 손상된 간 기능의 회복에 가장 좋은 것으로 판단된다.

결 론

간암세포(HepG2)에서의 항암효과 및 사염화탄소로 간 손상을 유도한 흰쥐에서 冬蟲夏草 추출물의 간 기능 회복효과를 측정 한 결과, 冬蟲夏草는 HepG2 세포의 증식을 유의성있게 억제하였고, 사염화탄소의 투여는 간 무게, 혈청의 thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), 마이크로솜의 TBARS, 혈청 aspartate aminotransferase (AST) 와 alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP)등을 유의성있게 증가시켰으며, 이물질대사효소들(cytochrome P-450, P-450 reductase, b5, b5 reductase)은 유의성있게 감소시켰다. 冬蟲夏草 추출물 투여는 CM300실험군(300mg/kg/day) 및 CM600실험군(600mg/kg/day) 투여군에서 대조군에 비해 혈청의 TBARS 및 ALP가 유의성있게 감소하였고, Cytochrome b5 and b5 reductase 활성도는 CM300 실험군(300 mg/kg/day) 및 CM600 실험군(600 mg/kg/day)에서 유의한 증가를 보였으며, cytochrome P-450 reductase 활성도는 300 mg/kg/day를 투여한 CM300 실험군에서만 유의성있는 회복이 관찰되었다. 冬蟲夏草를 투여한 모든 실험군들(100, 300, and 600 mg/kg/day, 7 days)에서 cytochrome P-450 활성도는 대조군에 비해 유의성 있는 증가를 나타내었으며, 마이크로솜의 TBARS는 유의성있는 감소를 보였다.

이러한 실험결과는 冬蟲夏草 추출물은 HepG2 세포의 증식을 억제하였고 사염화탄소로 유도된 간 독성에 대하여 해독작용 및 간 기능 개선효과가 인정되어 향후 이에 대한 임상 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 김병주, 간암의 약물요법. 대한소화기병학회잡지, 12(2):113-115, 1980.
2. Henderson, C.A. Therapeutic options for the treatment of colorectal cancer following 5-fluorouracil failure. Semin Oncol., 25:29-38, 1998.
3. 김동희, 김성훈. 간암의 한의학적 치료에 대한 문헌적 고찰. 대한동의병리학회지. 10(1):11-24, 1996.
4. 강성용, 한종현, 조남근. 수종 한약재가 간암세포(HepG2)와 마우스 복강 대식세포에 미치는 영향. 대한본초학회지. 12(1):95-111, 1997.
5. Zheng, C., G. Feng and H. Liang. Bletilla striata as a vascular embolizing agent in interventional treatment of primary hepatic carcinoma. Chin. Med. J. 111(12):1060-1063, 1998.
6. Mains, E.B. North American entomogenous Cordyceps. Mycologia 50:169-222, 1985.
7. Kamata, N., H. Sato and M. Shimazu (1997). Seasonal changes in the infection of pupae of the beech caterpillar, *Quadralcarifera punctatella* (Motsh)(Lep., Notodontidae), by *Cordyceps militaris* Link (Clavicipitales, Clavicipitaceae) in the soil of the Japanese beech forest. J. Appl. Ent., 121:189-197.
8. Sung, J.M., H.K. Lee, Y.J. Yoo, Y.S. Choi, S.H. Kim, Y.O. Kim and G.H. Sung. Classification of *Cordyceps* species based on protein banding pattern. Kor. J. Mycol., 26:1-7, 1998.
9. 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순. 중약대사전. Vol. 3, p. 1093-1095, 1997.
10. 진존인. 도설 한방의약대사전 III(중국약학대전), 강담사, 동경, p. 170, 1982.
11. Chen, D.M. The effects of natural *Cordyceps* and the cultured Mycelia of *Cordyceps sinensis* on murine immune organs and functions of mononuclear phagocyte system. Chin. J. Integr. Trad. West. Med. 5:42-45, 1985.
12. Zhang S.L. Activation of murine peritoneal macrophage by the natural cordyceps and the cultured mycelia of *Cordyceps sinensis*. Chin. J. Integr. Trad. West. Med. 5:45-75, 1985.
13. 김미려. Carbon tetrachloride로 유발된 간 손상에 미치는 백화사설초와 동충하초의 효과. 동서의학, 19(2):52-60, 1994.
14. Tang R.G. Pharmacology of natural cordyceps and cultured mycelia of *Cordyceps sinensis*. 2. Effects on immunologic function. Chin. Trad. Herbal Drugs. 17:214-219, 1986.
15. 심진영, 이연실, 임순성, 신국현, 현진이, 김성연, 이은방. 눈꽃 동충하초의 약물활성. 생약학회지, 31(2):163-167, 2000.
16. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxic assays. J. Immunol. Methods, 65:55-63, 1983.
17. Suematsu, T., T. Kamada, H. Abe, S. Kikuchi, and K. Yagi. Serum lipoperoxide levels in patients suffering from liver disease. Clin. Chim. Acta. 79, 267-770, 1977.
18. Bansal, S.K., J. Love and H.L. Gurtoo. High pressure liquid chromatographic separation of multiple forms of cytochrome P-450. Biochem. Biophys. Res. Commun. 117, 268-274, 1983.
19. Lowry, O.H., H.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275, 1951.
20. Omura, T. and R. Sato. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. J. Biol. Chem. 239, 2370-2378, 1964.
21. William, C.H.Jr. and M. Kamin. Microsomal NADPH cytochrome c reductase of liver. J. Biol. Chem. 237, 578-595, 1962.
22. Mihara, K. and R. Sato, Partial purification of NADH cytochrome b5 reductase from rabbit liver microsomes with detergents and its properties. J. Biochem(Tokyo). 71, 725-735, 1975.
23. Kobayasi, Y. The genus *Cordyceps* and its allies. Sci. Rept. Tokyo Bunrika daikaku Sect B, 5:253-260, 1940.
24. Rottman, F. and A. Guatino. The inhibition of purine biosynthesis de-novo in *Bacillus subtilis* by cordycepin. Biochem. Biophys. Acta, 80:640-647, 1964.
25. Xu, R.H., X.E. Peng, G.Z. Chen and G.L. Chen, Effects of *Cordyceps sinensis* on natural killer activity and colony formation of B16 melanoma. Chin. Med. J. 105(2):97-101, 1992.
26. Kuo, Y.C., C.Y. Lin, W.J. Tsai, C.L. Wu, C.F. Chen and M.S. Shiao. Growth inhibitors against tumor cells in *Cordyceps sinensis* other than cordycepin and polysaccharides. Cancer Invest., 12(6):611-615, 1994.
27. Nakamura, K., Y. Yamaguchi, S. Kagota, Y.M. Kwon, K. Shinozuka, M. Kunitomo. Inhibitory effect of *Cordyceps sinensis* on spontaneous liver metastasis of Lewis lung carcinoma and B16 melanoma cells in syngeneic mice. Jpn. J. Pharmacol. 79(3):335-341, 1999.
28. Yamaguchi, Y., S. Kagota, K. Nakamura, K. Shinozuka, M. Kunitomo. Antioxidant activity of the extracts from fruiting bodies of cultured *Cordyceps sinensis*. Phytother. Res., 14(8):647-649, 2000.
29. Li, S.P., P. Li, T.T. Dong and K.W. Tsim. Anti-oxidation activity of different types of natural *Cordyceps sinensis* and cultured *Cordyceps* mycelia. Phytomedicine, 8(3):207-212, 2001.
30. Kim, M-N., S-W. Oh, D-S. Lee and S-S. Ham. Antioxidative and antimutagenic effects of the ethanol extract from *Cordyceps militaris*. Kor. J. Postharvest Sci. Technol.,

- 8(1):109-117, 2001.
31. 이상인의 5인. 한약침상응용, 정보사, 서울, P 334, 1986.
 32. Zhu, J.S., G.M. Halpern and K. Jones. The scientific rediscovery of an ancient Chinese herbal medicine: Cordyceps sinensis. Part II. Ibid. 4(4): 429-457, 1998.
 33. Horvath, T., E. Karge, T. Javor and W. Klinger. Effects allopurinol, (+)-cyanidanol-3 and dihydroquinoline-type antioxidants on rat hepatic microsomal cytochrome P-450 and monooxygenases. Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol. 25(4), 201-203, 1987.
 34. Brattin, W.J., E.A. Glendo and R.O. Recknagel. Pathological mechanisms in carbon tetrachloride hepatotoxicity. J. Free Rad. Biol. Med. 1, 27-28, 1985.
 35. Slater, T.F. Free radical mechanisms in tissue injury. Biochem. J. 222, 1-15, 1984.
 36. Takeda, Y., A. Ichihara, H. Tanioka and H. Inove. The biochemistry of animal cells, the effect of corticosteroids on leakage of enzyme from dispersed rat liver cell. J. Biol. Chem., 239:3590-3596, 1964.
 37. Dinman, B.D., E.A. Hamdin, C.F. Fox, W.J. Frajola W.J. CCl₄ toxicity. III. Hepatostructural and enzyme change. Arch. Environ. Health, 7:630-646, 1963.
 38. Zinkle, J.G., J.G. Vos, J.A. Moore, B.N. Gupta. Hematologic and clinical chemistry effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in laboratory animals. Environ. Health Perspectives, 9:111-118, 1973.
 39. Brucker, J.V., M.F. Mackenzie and S. Muralidhara. Oral toxicity of carbon tetrachloride: Acute, subacute, and subchronic studies in rats. Fund. Appl. Toxicol. 6:16-34, 1986.
 40. Berman, E., D.E. House, J.W. Allis and J.E. Simmons. Hepatotoxic interactions of ethanol with allyl alcohol or carbon tetrachloride in rats. J. Toxicol. Environ. Health 37(1), 161-176, 1992.
 41. Mukherjee, S., A. Sur and B.R Maiti. Hepatoprotective effect of Swertia chirata on rat. Indian J. Exp. Biol. 35(4), 384-388, 1997.
 42. Nagababu, E. and N. Lakshmaiah. Inhibitory effect of eugenol on non-enzymatic lipid peroxidation in rat liver mitochondria. Biochem. Pharmacol. 43, 2393-2400, 1992.
 43. Rasheed, R.A., B.H. Ali and A.K. Bashir. Effect of Teucrium stocksianum on paracetamol-induced hepatotoxicity in mice. Gen. Pharmacol. 26(2), 297-301, 1995.
 44. Black, S.D. and M.J. Coon. Cytochrome P-450. (P. Ortize de Montellano, eds.), Plenum, New York, 1986.
 45. Portor, T.D. and M.J Coon. Cytochrome P450: Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulation mechenisms. J. Biol. Chem., 266, 13469-13472, 1991.
 46. Kumaravelu, P., D.P. Dakshinamoorthy, S. Subramaniam, H. Devaraj and N.S. Devaraj. Effect of eugenol on drug-metabolizing enzymes of carbon tetrachloride-intoxicated rat liver. Biochem. Pharmacol. 49(11), 1703-1707, 1995.
 47. Hong, Y-S., H-L. Kim, Y-S. Pae and S-S. Park. Chemoprotective effect of methanol extract of Hedera rhombea leaves on the reversal of cytochrome P-450 activities induced by carbon tetrachloride. J. Appl. Pharmacol. 3:245-250, 1995.