

누에번데기 및 누에애벌레 밀리타리스동충하초 (*Cordyceps Militaris*) 열수추출물이 Sarcoma-180 세포로 유발한 마우스 복수암에 미치는 영향

이해미 · 양미자 · 박태선[§]

연세대학교 식품영양학과

Inhibitory Effect of *Cordyceps Militaris* Water Extracts on Sarcoma-180 Cell-Induced Ascities Tumor in ICR Mice

Lee, Haemi · Yang, Mija · Park, Taesun[§]

Department of Food and Nutrition, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

ABSTRACT

This study was undertaken to evaluate the antitumor activities of *Cordyceps militaris* of silkworm pupa (CMP) and silkworm larva (CML), as compared with the effect of cordycepin, an active compound found in *Cordyceps militaris*. Antiproliferation effect of the test materials were evaluated in the sarcoma-180 cells using the MTT test. For the in vivo study, ICR mice were inoculated i.p. with 1.0×10^6 sarcoma-180 cells/mouse on Day 0, and were again i.p. injected with one of the following substances from Day 1 to Day 10: saline (control group), 50 mg/kg (CMP50, CML50), 100 mg/kg (CMP100, CML100), or 200 mg/kg (CMP200, CML200) of *Cordyceps militaris* water extracts, or 1 mg/kg (C1), 2 mg/kg (C2), or 4 mg/kg (C4) of cordycepin. Pretreatment of the sarcoma-180 cells with 100 mg/ml, 500 mg/ml, and 1000 mg/ml of CML ($60.1 \pm 2.5\%$, $49.8 \pm 3.7\%$, and $45.4 \pm 0.1\%$ of the value for untreated control cells, respectively) or CMP ($68.3 \pm 2.1\%$, $55.1 \pm 0.9\%$, and $51.4 \pm 3.5\%$ of the value for control cells, respectively) for 48 hrs significantly decreased the survival rate (proliferation) of tumor cells ($p < 0.05$). Body weight of the control mice bearing ascites tumor and injected with saline was 1.4 times of the value for normal animals at day 18. Mice bearing ascites tumor and injected with cordycepin (1, 2, or 4 mg/kg) exhibited a significantly lighter body weight compared with the control mice, while animals injected with CMP or CML (50, 100, or 200 mg/kg) showed a significantly lighter body weight compared with the mice injected with cordycepin. Mice injected with CMP50, CMP100, or CMP200 mg/kg (or CML50, CML100, or CML200 mg/kg) showed a 132% (or 90%), 80% (or 62%), and 68% (or 52%) longer mean survival time, and those treated with C1, C2, or C4 exhibited a 54%, 91% and 80% longer survival time compared to the value for control mice injected with saline. These results indicate that the hot-water extracts of *Cordyceps militaris* of both silkworm pupa and silkworm larva have an anti-proliferation effect of tumor cells as well as the life prolongation effect in mice bearing ascites tumor, which are superior to the activities of cordycepin. (*Korean J Nutrition* 36(10) : 1022~1029, 2003)

KEY WORDS : *cordyceps militaris*, cordycepin, mouse, sarcoma-180, antitumor activity.

서 론

동충하초 (冬蟲夏草)란 겨울 기간동안 곤충의 체내에 서
식하면서 양분을 흡수하여 숙주를 파괴시킨 후, 여름이 되
면 곤충의 몸 밖으로 식물체가 자라나는 모습에서 그 명칭

이 유래되었다. 즉, 동충하초균의 포자 또는 균사가 곤충
또는 균핵에 침입하여 기주 안에 내생균핵을 만든 다음,
밖으로 자실체를 형성하는 것이 바로 동충하초 버섯이다.
식물 분류체계상 동충하초는 자낭균강 (*Ascomycetes*) 맥각
균목 (*Clavicipitales*) 맥각균과 (*Clavicipitaceae*)에 속하며
Cordyceps, *Podonectria*, *Torrubiella* 등의 세가지 종이 있는
데, 그 중 대표적인 것이 *Cordyceps* 종이다.¹⁾ 전 세계적으
로 현재까지 약 800여종의 동충하초균이 알려져 있으며, 이
중 국내에서 채집 및 분류된 것은 78종이다.²⁾ 예로부터 약

접수일 : 2003년 7월 30일

채택일 : 2003년 11월 6일

[§]To whom correspondence should be addressed.

용으로 알려진 동충하초는 *Cordyceps sinensis*이며, 그 외에도 *C. militaris*, *C. sobolifera*, *C. ophioglossoides*, *C. martilis*, *C. hawkesii*, *C. beauveria*, *C. bassiana*, *C. cicade* 및 *C. ophioglossoides* 등이 알려져 있다.³⁾ 동충하초는 일반적으로 균명을 사용하여 명명되나,⁴⁾ 기주 특이성이 낮아 여러 곤충을 기주로 사용 가능하기 때문에 국내에서는 재배되는 기주에 따라 번데기동충하초, 벌동충하초, 누에동충하초, 잠자리동충하초 및 풍뎡이동충하초 등으로 명명되기도 한다. 천연에서 얻을 수 있는 자연산 동충하초는 매우 희귀하여 확보가 어렵고, 따라서 다양한 종류의 동충하초가 인공 재배되고 있으며 이에 관한 성분 및 효능연구가 진행되고 있다.

버섯류를 포함한 담자균류는 영양소가 풍부할 뿐만 아니라, 다양한 생물학적 기능을 나타내 우수한 건강기능식품 소재로의 가능성이 제시되었으며,⁵⁻⁷⁾ 그 중에서도 항암활성에 관한 연구가 다수 보고되어 있다. 구름버섯, 표고버섯, 느타리버섯 등의 자실체 열수추출물은 sarcoma-180 종양세포에 대한 항암효과를 나타냄이 발표된 바 있고,⁸⁾ 상황버섯의 항암활성 및 면역활성을 나타내는 유효성분으로 β -glucan성 다당류가 제시된 바 있다.⁹⁾ 버섯류에 속하는 동충하초의 성분으로는 일반적인 5대 영양성분 (예를 들어, 밀리타리스동충하초의 경우 수분, 6.4% ; 조단백, 75.1% ; 조지방, 3.9% ; 탄수화물, 5.5% ; 회분, 5.1%을 함유하는 것으로 보고¹⁰⁾되어 있음) 이외에 cordycepin, cordycepic acid, ophiocordin, ergosteryl- β -D-glucopyranoside, 2,2-dihydroergosteroyl- β -glucopyranoside, glucan 및 복합다당류 등이 알려져 있으나, 유효성분에 대한 연구는 아직까지 미진한 상태이다. 동충하초의 효능에 관하여 중국에서는 예로부터 해독, 결핵균 및 폐렴균의 억제, 기관지 확장, 평활근 억제 및 혈압강하 등의 작용이 있는 것으로 알려져 왔고, 임상적으로 허약증상, 만성 기관지염, 거담과 천식, 폐결핵, 빈혈 및 병후 허약 등에 주로 이용되어져 왔다.¹¹⁻¹³⁾ 최근에는 동충하초 추출물 뿐 아니라 동충하초에서 분리된 다당류 및 cordycepin (3'-deoxyadenosine) 성분들의 생리활성이 활발히 보고되고 있다.¹⁴⁻¹⁹⁾

국내 식품공전 상에 분류되어 있는 “식품원재료 분류표”에 의하면 식품으로 사용할 수 있는 동충하초의 종류로는 눈꽃동충하초 (*Paecilomyces japonica*/*Paecilomyces tenuipes*)와 밀리타리스동충하초 (*Cordyceps militaris*)가 있다. 이중 *Cordyceps militaris*는 *Cordyceps* 속군 특유의 생리활성물질인 cordycepin 성분을 다량 함유하고, 항균, 항암, 면역기능 증강 및 마약중독에 대한 해독기능 등의 효능을 나타내는 것으로 알려져 있다.²⁰⁾ Oh 등¹⁰⁾은 기주로 누에에

벌레 또는 번데기를 사용하여 인공 재배된 *Paecilomyces tenuipes*의 성분을 분석한 결과, 같은 종류의 동충하초라 할지라도 재배되는 기주에 따라 영양성분 및 cordycepin 함량이 달라질 수 있음을 제시하였다. 본 연구는 기주로 누에번데기 (silkworm pupa) 또는 누에애벌레 (silkworm larva)를 이용하여 인공 재배된 밀리타리스동충하초의 항암활성을 평가하고자 시도되었으며, 아울러 이들의 효능을 밀리타리스동충하초의 주요 유효성분으로 알려진 cordycepin 과 비교하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 이용된 밀리타리스동충하초 시료는 (주)머슈빌 (성남시, 한국)로부터 제공받아 사용하였다. 누에번데기 밀리타리스동충하초 (*Cordyceps militaris* of silkworm pupa)는 냉동상태의 누에번데기를 원형의 플라스틱 용기에 분주한 후 액체종균을 접종하여 재배하였고, 누에애벌레 밀리타리스동충하초 (*Cordyceps militaris* of silkworm larva)는 누에애벌레에 액체종균을 접종하여 배양·재배하였다. 재배된 동충하초를 95℃에서 6시간 동안 열수 추출하여 여과하는 과정을 2차례 반복한 후 동결 건조하였다. 파우더상태의 동충하초 시료를 일정 농도의 멸균된 증류수에 용해시키고, 0.4 μ m filter를 통해 여과시킨 후 사용하였다. 비교 표준품으로 이용된 cordycepin (3'-deoxyadenosine)은 Sigma사 (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

2. Cordycepin 농도 분석

동충하초 시료의 cordycepin 농도 분석은 Cunningham 등²¹⁾의 방법을 이용하여 실시하였다. 동충하초 시료를 90℃에서 6시간 동안 끓인 후 여과하고, 2배 부피의 아세톤을 가한 후 4℃에서 24시간 동안 방치하였다. 5,000 \times g에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 수거하여 용매를 완전히 증발시키고, 증류수를 가하여 용해시킨 후 0.45 μ m filter를 사용하여 여과하였다. 시료의 cordycepin 함량은 Alltima C18 (Shimatzu, Japan) column이 장착된 HPLC를 이용하여 260 nm에서 측정하였다.

3. MTT 테스트

밀리타리스동충하초 추출물의 세포독성을 평가하기 위하여 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 테스트²²⁾를 실시하였다. MTT 테스트는 살아있는 세포의 미토콘드리아 내 탈수소효소가 노

란색의 수용성 물질인 MTT에 의해 formazan으로 전환된 양을 나타내며, 생존하는 세포수와 비례한다. 본 연구에서 이용된 암 세포주는 sarcoma-180으로 한국 세포주은행에서 분양받아 사용하였다. 동결상태의 세포주를 해동시킨 후, 10% fetal bovine serum (FBS), 100 units/ml penicillin과 100 μ g/ml streptomycin이 함유된 RPMI 1640 (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA) 배지를 사용하여 95% O₂와 5% CO₂ 가스가 공급되는 37°C 배양기에서 배양하였다. Sarcoma-180 세포주를 5 × 10⁵ cell/ml 농도가 되도록 각 well에 첨가하여 24시간 동안 배양시킨 후, 10, 50, 100, 500, 그리고 1000 μ g/ml 농도의 누에번데기동충하초 및 누에애벌레동충하초 열수추출물 시료 또는 0.2, 1, 2, 10, 그리고 20 μ g/ml 농도의 cordycepin 시료를 첨가하고 48시간 동안 배양하였다. 여기에 MTT 용액 (5 mg/ml) 20 μ l을 첨가하고 4시간 동안 배양시켜 formazan을 형성시켰다. Aspirator를 이용하여 조심스럽게 배양액을 제거하고, DMSO 150 μ l를 첨가하여 formazan을 녹인 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

아래의 공식에 준해 세포생존율을 산출하였으며, 생존 세포율은 중복 측정된 3회 반복실험의 평균값으로 제시하였다.

$$\text{세포생존율 (\%)} = \frac{\text{시료로 처리된 세포의 흡광도}}{\text{대조세포의 흡광도}} \times 100$$

4. 실험동물 및 암 유발

총 88마리의 수컷 ICR계 마우스 (18~22 g body wt)를 대한실험동물센터로부터 구입하여 일반 고형사료 (삼양 유지사료사)로 사육하면서 1주일간 실험실 환경에 적응시켰다. 사육실의 온도는 22 ± 2.0°C, 그리고 습도는 55 ± 5.0%를 유지하였으며, 명암주기는 12시간으로 조절하였다. 실험실 환경에 적응된 실험동물을 다음과 같이 11군 (n = 8)으로 분류하여 40일간 사육하였으며, 3일 간격으로 실험동물의 체중을 측정하였다.

정상군 (normal group, N)의 경우 암세포를 투여하지 않은 채 생리식염수만을 복강투여하였고, 대조군 (control group, C)의 경우에는 암세포를 투여한 후 생리식염수를 투여하였다. 마우스에게 복강암을 유발시키기 위하여 0.2 ml (1.0 × 10⁶ cells/mouse)의 sarcoma-180 세포 부유액을 복강 내에 주사하였다. 복강 내 암세포를 이식하고, 24시간이 경과한 후부터 10일간 연속적으로 생리식염수 또는 0.2 ml의 밀리타리스동충하초 추출물 또는 cordycepin 용액을 복강 내에 투여하였다: 누에번데기 밀리타리스동충

하초50군 (CMP50), 누에번데기 밀리타리스동충하초100군 (CMP100) 및 누에번데기 밀리타리스동충하초200군 (CMP200)의 경우 암세포를 투여한 후 각각 50 mg/kg, 100 mg/kg 및 200 mg/kg의 누에번데기 밀리타리스동충하초 (*Cordyceps militaris* of silkworm pupa) 추출물을 복강 투여하였다. 누에애벌레 밀리타리스동충하초50군 (CML50), 누에애벌레 밀리타리스동충하초100군 (CML100) 및 누에애벌레 밀리타리스동충하초200군 (CML200)의 경우 암세포를 투여한 후 각각 50 mg/kg, 100 mg/kg 및 200 mg/kg의 누에애벌레 밀리타리스동충하초 (*Cordyceps militaris* of silkworm larva) 추출물을 복강 투여하였다. 또한 비교 표준품으로 이용된 cordycepin 1군 (C1), cordycepin 2군 (C2) 및 cordycepin 4군 (C5)의 경우 암세포를 투여한 후 각각 1 mg/kg, 2 mg/kg 및 4 mg/kg의 cordycepin을 복강 투여하였다.

4. 수명연장 실험

복강 내에 암세포를 이식한 이후부터 40일간 생존 여부를 관찰하였으며, 다음 공식에 준해 수명연장백분율 (prolongation ratio, %)을 산출하였다.²³⁾

수명연장백분율 (%)

$$= \frac{\text{실험군의 평균수명(일)} - \text{대조군의 평균수명(일)}}{\text{대조세포의 흡광도}} \times 100$$

5. 통계처리

모든 자료의 통계분석은 SAS (Statistical Analysis system) PC package를 사용하여 실시하였고, 분석 수치는 mean ± SEM으로 제시하였다. 농도를 달리한 두가지 종류의 동충하초 열수추출물 또는 cordycepin의 효과는 one way ANOVA (analysis of variance)에 의해 p < 0.05 수준에서 유의성을 평가하였으며, 통계적 유의성이 관찰된 경우 각 실험군의 평균값의 차이는 Duncan's multiple range test에 의해 검증하였다. 한편, 다양한 농도의 누에번데기동충하초, 누에애벌레동충하초, 또는 cordycepin으로 처리한 sarcoma-180 세포주와 대조세포에서 관찰된 세포 생존율의 차이에 대한 유의성은 Student's t-test에 의해 p < 0.05 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

1. MTT 테스트

본 실험에 이용된 동충하초 열수추출물의 cordycepin 함량을 측정된 결과, 누에번데기동충하초 시료의 경우 0.2%,

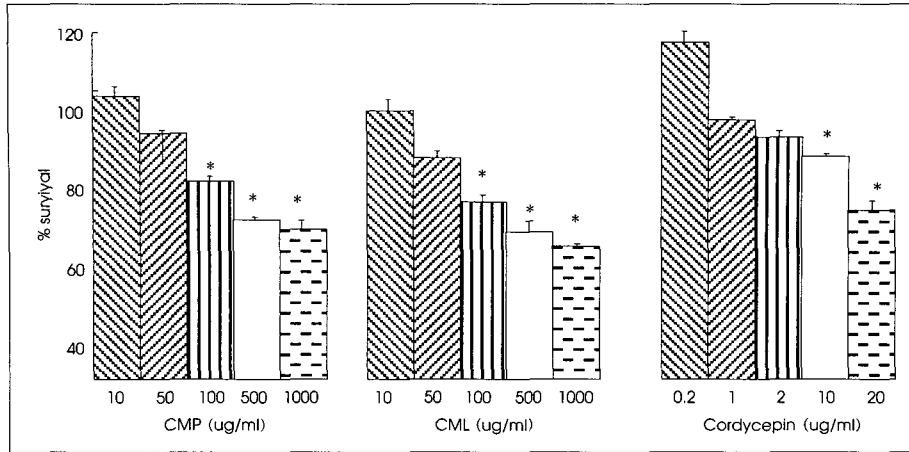


Fig. 1. Antiproliferation effect of *Cordyceps militaris* or cordycepin in sarcoma-180 cells. Values are mean \pm SEM from three independent experiments performed in duplicate. Percentage of viable cells observed in cells treated with *Cordyceps militaris* or cordycepin was normalized to the value for untreated control cells as a 100%. *: Significantly different from the value for untreated control cells by Student's t-test at $p < 0.05$. A: Sarcoma-180 cells were treated with *Cordyceps militaris* of silkworm pupa (CMP). B: Sarcoma-180 cells were treated with *Cordyceps militaris* of silkworm larva (CML). C: Sarcoma-180 cells were treated with cordycepin.

그리고 누에애벌레동충하초 시료의 경우 0.4%의 cordycepin이 검출되었다. Sarcoma-180 세포주에 누에번데기 동충하초, 누에애벌레동충하초 및 cordycepin을 농도를 달리하여 48시간동안 처리한 후 MTT 테스트를 실시한 결과가 Fig. 1에 제시되어 있다. 100 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$ 및 1000 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 누에번데기 동충하초 시료로 종양세포를 전처리한 결과, 세포생존율이 대조세포의 각기 $68.3 \pm 2.1\%$, $55.1 \pm 0.9\%$ 및 $51.4 \pm 3.5\%$ 수준으로 유의하게 감소하였다 ($p < 0.05$). 또한 누에번데기동충하초와 같은 농도의 누에애벌레동충하초로 종양세포를 전처리한 결과 세포생존율이 대조세포의 각기 $60.1 \pm 2.5\%$, $49.8 \pm 3.7\%$, $45.4 \pm 0.1\%$ 로 유의하게 감소하였다 ($p < 0.05$). 따라서 본 실험에 사용된 두가지의 밀리타리스 동충하초는 모두 농도 의존적으로 sarcoma-180 세포의 분열을 억제하였다.

Cordycepin을 0.2~20 $\mu\text{g/ml}$ 범위에서 농도를 달리하여 종양세포에 전처리한 결과, 10 $\mu\text{g/ml}$ 및 20 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 세포생존율이 대조세포의 $75.1 \pm 0.5\%$ 및 $57.2 \pm 0.9\%$ 로 유의하게 감소하였다 ($p < 0.05$) (Fig. 1). 본 연구에서 이용된 동충하초 시료의 cordycepin 함량은 누에번데기동충하초의 경우 0.2%, 그리고 누에애벌레동충하초의 경우 0.4%임을 감안할 때, MTT 테스트에서 유의적인 효과를 나타낸 cordycepin 농도 (10 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$)는 500 $\mu\text{g/ml}$ 및 1000 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 사용된 동충하초 시료에 함유된 cordycepin 농도의 5~10배에 해당됨을 알 수 있다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 누에번데기동충하초 및 누에애벌레동충하초 열수추출물의 암세포 성장 억

제능은 cordycepin 단일성분에 의한 효과보다 더 우수한 것으로 생각된다.

Kim 등²⁴⁾은 *Cordyceps militaris* 열수추출물을 인체 폐암 세포주 (A549), 유방암세포주 (MCF-7) 및 간암 세포주 (Hep3B)에 처리한 결과, 70% 이상의 세포증식 억제효과를 관찰하였다. 아울러 마우스 폐암 세포주 (LLC)와 인체 흑색종세포주 (B16)를 대상으로 *cordyceps sinensis* 추출물을 30 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 48시간동안 처리한 결과 대조세포에 비해 생존세포수가 각각 84%와 69% 감소된 반면, cordycepin (1 $\mu\text{g/ml}$)으로 48시간동안 처리한 경우에는 두 세포주에서 모두 세포증식 억제효과가 나타나지 않았음이 발표되었다.²⁵⁾ 이밖에도 cordycepin 성분은 인체 lymphoblast 세포주 (WI-L2)에서 핵산의 methylation을 저해하였고,²⁶⁾ 인체 혈액암 세포주 (U937)의 세포분화를 촉진시킴으로 세포분열이 억제된 것으로 나타난 연구결과 등²⁷⁾을 종합해 볼 때, cordycepin의 암세포 성장 억제능은 세포주에 따라 상이하게 나타남을 알 수 있다.

2. 복강암 유발 동물의 체중변화

Sarcoma-180 세포를 복강 내에 이식받은 후 누에번데기 동충하초 및 누에애벌레동충하초 추출물 또는 cordycepin을 10일간 복강 투여받은 마우스의 체중변화가 Fig. 2에 제시되어 있다. 본 실험에서 18일까지 체중변화를 측정할 이유는 18일째에 대조군이 모두 사망하였기 때문이다. 대조군의 경우 sarcoma-180 세포를 이식한 후 10일째부터 체중이 급격히 증가하기 시작하였으며, 18일째에는 $41 \pm 0.5\text{g}$ 으로 나타나 정상군 ($30 \pm 0.6\text{g}$)의 약 1.4배에 달하였

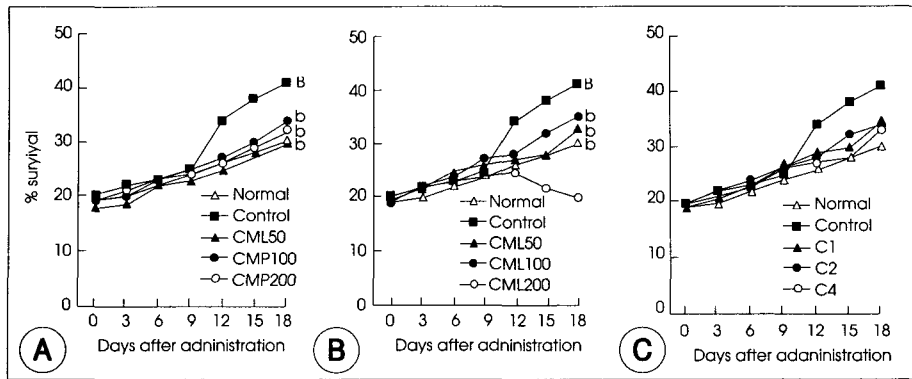


Fig. 2. Effect of *Cordyceps militaris* or cordycepin administration on body weight gain of ICR mice bearing sarcoma-180 ascites tumor. The treatment continued for 10 days following the i.p. injection of 1×10^6 sarcoma-180 cells. Different alphabets at 18 days after administration indicate significant difference among 11 experimental groups by one way ANOVA at $p < 0.05$. A: *Cordyceps militaris* of silkworm pupa (CMP) injected group, CMP50: *Cordyceps militaris* of silkworm pupa (50 mg/kg body wt), CMP100: *Cordyceps militaris* of silkworm pupa (100 mg/kg body wt), CMP200: *Cordyceps militaris* of silkworm pupa (200 mg/kg body wt). B: *Cordyceps militaris* of silkworm larva (CML) injected group, CML50: *Cordyceps militaris* of silkworm larva (50 mg/kg body wt), CML100: *Cordyceps militaris* of silkworm larva (100 mg/kg body wt), CML200: *Cordyceps militaris* of silkworm larva (200 mg/kg body wt). C: Cordycepin injected group, C1: Cordycepin (1 mg/kg body wt), C2: Cordycepin (2 mg/kg body wt), C4: Cordycepin (4 mg/kg body wt).

Table 1. Effects of *Cordyceps militaris* (CM) or cordycepin administration on the life span of ICR mice bearing sarcoma-180 ascites tumor

Sample	Dose (mg/kg/d, i.p.)	Survival time (days)	Prolongation ratio ¹⁾ (%)
Control	Saline	14.3 ± 0.7 ^c	-
CMP	50	33.2 ± 6.0 ^a	132
	100	25.7 ± 5.3 ^{ab}	79.7
	200	27.0 ± 4.5 ^{ab}	88.8
CML	50	27.1 ± 4.4 ^{ab}	89.5
	100	26.2 ± 2.6 ^{ab}	83.2
	200	21.8 ± 3.4 ^{bc}	52.4
Cordycepin	1	22.0 ± 5.8 ^{bc}	53.8
	2	27.3 ± 5.3 ^{ab}	90.9
	4	24.8 ± 4.5 ^{bc}	73.4

Values are mean ± SEM of 8 rats per group.

Different alphabets in the same column indicate significant difference among 11 experimental groups by one way ANOVA at $p < 0.05$. The treatment continued for 10 days following the i.p. injection of 1×10^6 sarcoma-180 cells.

¹⁾ Prolongation ratio (%): $\frac{\text{Survival time of treated mice} - \text{Survival time of control mice}}{\text{Survival time of control mice}} \times 100$

CMP: *Cordyceps militaris* of silkworm pupa
 CML: *Cordyceps militaris* of silkworm larva

다. 한편, 복강내에 종양세포를 이식받은 후 10일간 cordycepin을 투여받은 군의 18일째 체중증가량은 식염수를 투여받은 대조군에 비해 유의하게 더 적었으며 ($p < 0.05$), 누에번데기동충하초 및 누에애벌레동충하초 추출물을 투여받은 군의 체중증가량은 cordycepin을 투여받은 군에 비해 더 적게 나타났다 ($p < 0.05$). 동충하초추출물 또는 cordycepin을 투여받은 군에서 대조군에 비해 체중증가폭이 더 적게 나타난 것은 복수암의 성장이 저해되었기 때문인 것으로 사려되며, 아울러 cordycepin 단일성분에 비해 동충하초 열수추출물은 더 우수한 복수암 성장 저해효과를 나

타내는 것으로 생각된다. 한편, 누에애벌레동충하초를 200 mg/kg 수준으로 투여받은 군의 경우 15일째부터 체중이 복수암을 이식받지 않은 정상군보다도 오히려 더 낮은 수준으로 감소하기 시작하여, 18일째는 유의적으로 감소하였다 ($p < 0.05$). 이와 같은 체중감소 현상이 누에애벌레동충하초의 독성에 의한 것인 지는 본 연구의 결과만으로 판정하기 어렵고, 앞으로 유효섭취량 및 최대안전섭취량에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

3. 수명 연장효과

동충하초 추출물이 복강암이 유발된 마우스의 수명연장효

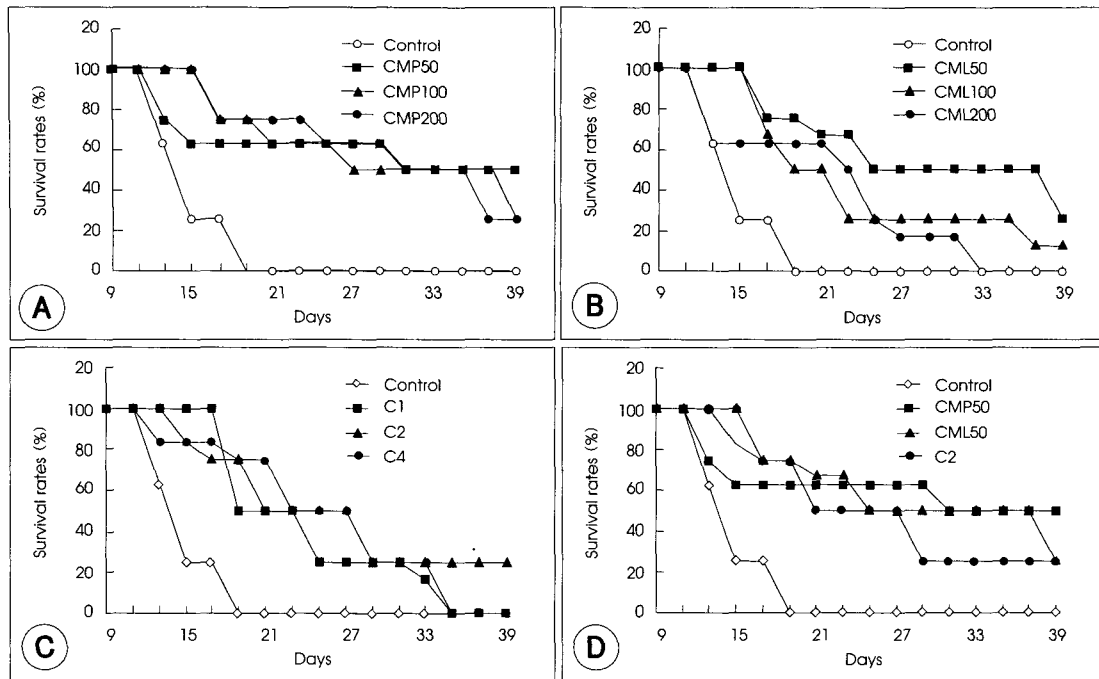


Fig. 3. Effect of *Cordyceps militaris* or cordycepin administration on the survival rate of ICR mice bearing sarcoma-180 ascites tumor. The treatment continued for 10 days following the i.p. injection of 1×10^6 sarcoma-180 cells. A: *Cordyceps militaris* of silkworm pupa (CMP) injected group. CMP50: *Cordyceps militaris* of silkworm pupa (50 mg/kg body wt) (n = 8), CMP100: *Cordyceps militaris* of silkworm pupa (100 mg/kg body wt) (n = 8), CMP200: *Cordyceps militaris* of silkworm pupa (200 mg/kg body wt) (n = 8). B: *Cordyceps militaris* of silkworm larva (CML) injected group. CML50: *Cordyceps militaris* of silkworm larva (50 mg/kg body wt) (n = 8), CML100: *Cordyceps militaris* of silkworm larva (100 mg/kg body wt) (n=8), CML200: *Cordyceps militaris* of silkworm larva (200 mg/kg body wt) (n = 8). C: Cordycepin injected group. C1: Cordycepin (1 mg/kg body wt) (n = 8), C2: Cordycepin (2 mg/kg body wt) (n = 8), C4: Cordycepin (4 mg/kg body wt) (n = 8). D: Comparison of CMP50, CML50, and C2 injected group.

과에 미치는 효과는 Table 1에 나타난 바와 같다. 암세포를 이식받은 후 식염수를 투여받은 대조군의 경우 평균 생존일수는 14.3 ± 0.7 일로 나타났다. 한편 50 mg/kg (CMP50), 100 mg/kg (CMP100) 및 200 mg/kg (CMP200)의 누에번데기동충하초 추출물을 투여받은 군의 평균 생존일수는 33.2 ± 6.0 일, 25.7 ± 5.3 일 및 27.0 ± 4.5 일로 나타나, 대조군에 비해 각기 132%, 80% 및 89% 유의하게 증가되었다. 또한 50 mg/kg (CML50), 100 mg/kg (CML100) 및 200 mg/kg (CML200)의 누에애벌레동충하초 추출물을 투여받은 군의 평균 생존일수는 생리식염수를 투여받은 대조군에 비해 90%, 83% 및 52% 유의적으로 증가되었다. 따라서 누에번데기 또는 애벌레동충하초 열수추출물 모두 50 mg/kg의 농도로 투여된 경우 가장 뛰어난 수명 연장효과를 나타냈으며, 이 농도에서 누에번데기동충하초는 누에애벌레동충하초에 비해 복강암을 이식받은 마우스의 수명을 연장시키는 효과가 더 우수한 경향을 보였다 ($p > 0.05$). Cordycepin 투여군의 경우 1 mg/kg (C1), 2 mg/kg (C2) 및 4 mg/kg (C4) 농도에서 평균 생존일수가 22.0 ± 5.8 일, 27.3 ± 5.3 일 및 24.8 ± 4.5 일로 나타나, 대조군에 비해 각기 54%, 91% 및 73% 유의적으로 증가하였다 ($p <$

0.05). Cordycepin군의 경우에는 2 mg/kg/d 농도에서 가장 우수한 수명 연장효과를 나타냈고, 동충하초 추출물에 함유된 cordycepin 함량의 5~10배에 해당되는 양이 투여되었음에도 불구하고 cordycepin은 동충하초 추출물에 비해 수명연장효과가 더 적었음을 알 수 있다. 실험 종료일까지 복강암이 유발된 마우스의 생존율을 살펴보면 (Fig. 3), 대조군의 경우 중앙세포를 이식하고 18일째에, CML200군은 33일째에, 그리고 C1군과 C4군의 경우에는 35일째에 모두 사망하였다. 실험 종료일인 40일째까지 군당 총 8마리의 실험동물 중 CMP50군의 경우 4마리가, CMP100군, CMP200군, CML50군 및 C2군의 경우에는 각기 2마리가, 그리고 CML100군의 경우에는 1마리가 생존하였다.

동충하초가 암세포를 이식받은 ICR 마우스의 수명연장에 미치는 효과를 평가한 선행 연구결과들을 살펴보면, 섬유성 육종세포를 복강 내에 이식받은 ICR 마우스에게 *Cordyceps sinensis* 열수추출물을 투여한 결과 대조군에 비해 평균수명이 312% 유의하게 증가되었다.²⁸⁾ 아울러 sarcoma-180 세포를 이식받은 흰쥐에게 *Cordyceps ophioglossoides*를 투여한 결과, 유의적인 수명연장효과가 나타났음이 보고된 바 있다.²⁹⁾ 항종양효과를 나타내는 동충하초

의 유효성분에 관하여는 학자에 따라서 다양한 의견이 제기되고 있다. 인체 혈액암 세포주 (ML-1)를 대상으로 한 실험에서 cordycepin 성분이 DNA 및 RNA 합성을 저해하고, 암세포 분열을 억제하였음이 발표되었으며,³⁰⁾ 그 외에도 동충하초의 항종양효과를 나타내는 유효성분으로 galactomannan기를 함유한 물질³¹⁾ 및 글루칸 성분³²⁾ 등이 제시된 바 있다. 한편, Kuo 등³³⁾은 동충하초 분획물을 K562, Vero, Wish, Calu-1, Raji 등의 다양한 종양세포주에 처리한 결과 cordycepin 또는 다당류가 포함되지 않은 분획에서 강력한 종양세포 분열 억제효과가 나타났음을 확인하고, 동충하초의 항종양 성분으로 cordycepin 또는 다당류를 제외한 제3의 물질을 제안한 바 있다.

본 연구의 결과에서 기주를 달리하여 재배된 밀리타리스 동충하초 추출물이 in vitro 실험 및 복수암을 유발시킨 흰쥐에서 cordycepin 단일성분에 비해 암세포 성장저해효과 및 수명연장효과가 더 우수하게 나타난 점으로 미루어 볼 때, cordycepin 뿐 아니라 동충하초에 포함된 다른 성분들의 복합작용에 의해 항종양 효과가 나타났을 것으로 추측된다. 아울러 동충하초의 항종양 활성은 직접적인 암세포 분열 억제효과 뿐 아니라 숙주의 면역기능 증진을 통해 간접적으로 발현될 가능성이 있으므로 앞으로 이에 대한 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

요약 및 결론

본 연구에서는 누에번데기 또는 누에애벌레를 기주로 하여 인공 재배된 밀리타리스동충하초의 항암활성을 평가하고자, in vitro 및 sarcoma-180 세포주를 이식받은 ICR 마우스모델에서 암세포증식 억제효과 및 수명 연장효과를 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다. 100 µg/ml, 500 µg/ml 및 1000 µg/ml 농도의 누에애벌레동충하초 (또는 누에번데기동충하초) 시료로 종양세포를 전처리한 결과, 세포생존율이 대조세포의 각기 60.1 ± 2.5% (또는 68.3 ± 2.1%), 49.8 ± 3.7% (또는 55.1 ± 0.9%) 및 45.4 ± 0.1% (또는 51.4 ± 3.5%)로 유의하게 감소하였다 (p < 0.05). 한편, 10 µg/ml 및 20 µg/ml 농도의 cordycepin 단일성분으로 종양세포를 전처리한 결과, 세포생존율이 대조세포의 75.1 ± 0.5% 및 57.2 ± 0.9%로 유의하게 감소하였다 (p < 0.05). Sarcoma-180 세포를 이식받은 대조군의 체중은 복수암이 성장함에 따라 10일째부터 급격히 증가하기 시작하여 18일째에는 정상군의 약 1.4배에 달하였다. 한편, 복강내에 종양세포를 이식받은 후 10일간 cordycepin (1 mg/kg, 2 mg/kg 및 4 mg/kg)을 투여받은 군의 체중

증가량은 식염수를 투여받은 대조군에 비해 유의하게 더 적었으며 (p < 0.05), 누에번데기동충하초 및 누에애벌레동충하초 추출물 (50 mg/kg, 100 mg/kg 및 200 mg/kg)을 투여받은 군의 체중증가량은 cordycepin을 투여받은 군에 비해 더 적게 나타났다 (p < 0.05). 동충하초추출물 또는 cordycepin이 복강암이 유발된 마우스의 수명연장에 미치는 효과를 측정된 결과, 50 mg/kg, 100 mg/kg 및 200 mg/kg 농도의 누에번데기동충하초 (또는 누에애벌레동충하초) 추출물을 투여받은 군의 평균 생존일수는 대조군에 비해 각기 132% (또는 90%), 80% (또는 62%) 및 68% (또는 52%) 유의하게 증가되었다. Cordycepin을 투여받은 군의 경우 1 mg/kg, 2 mg/kg 및 4 mg/kg 농도에서 평균 생존일수가 대조군에 비해 각기 54%, 91% 및 80% 유의적으로 증가하였다 (p < 0.05). 이상의 연구결과로부터 누에번데기 및 누에애벌레동충하초 열수추출물은 두가지 모두 매우 우수한 암세포 성장억제효과 및 수명 연장효과가 있음을 알 수 있다.

■ 감사의 글

본 연구는 2002년도 산학협동재단 및 (주)머슈빌의 연구비 지원에 의해 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

Literature cited

- 1) Kobayasi Y. Keys to the taxa of the genera Cordyceps and Torubiella. *Trans Mycol Soc Japan* 23: 329-364, 1982
- 2) 성재모. 한국의 동충하초. 교학사, 서울, 1996
- 3) Su CH, Wang HH. Phytocordyceps, a new genus of the Clavicipitaceae. *Mycotaxon* 26: 337-344, 1986
- 4) Kobayasi Y, Shimizu D. Iconography of vegetable wasps and plant worms. Hoikusha Publishing Company Ltd, Osaka, pp. 280-295, 1983
- 5) Wasser SP, Weis AL. Therapeutic effects of substance occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. *Critical Rev Immunol* 19: 65-96, 1999
- 6) Chang R. Functional properties of edible mushrooms. *Nutr Rev* 54(11) : S91-S93, 1996
- 7) Park MH, Oh KY, Lee BW. Anticancer activity of *Lentinus edodes* and *Pleurotus ostreatus*. *Korean J Food Sci Technol* 30(3) : 702-708, 1998
- 8) Kim BK, Park EK, Shim MJ. Studies on constituents of higher fungi of Korea, antineoplastic activities of *Coriolus versicolor* (Fr.) Qel, *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kummer and *Lentinus edodes* (Berk) Sing. *Arch Pharm Res* 2: 145-149, 1979
- 9) Lee JW, Baek SJ, Bang KW, Kang SW, Kang SM, Kim BY, Ha IS. Biological activities of polysaccharide extracted from the fruit body and cultured mycelia of *Phellinus linteus* IY001. *Kor J Food Sci Technol* 32: 726-735, 2000
- 10) Oh SW, Kim SH, Song HN, Han D. Comparative chemical com-

- positions of four kinds of Tochukaso. *Korean J Food Sci Technol* 35(1) : 15-22, 2003
- 11) Liang YL, Liu Y, Yang JW, Liu CX. Studies on pharmacological activities of cultivated *Cordyceps sinensis*. *Phytotherapy Res* 11: 237-241, 1997
 - 12) Zhu JL, Liu C. Modulating effects of extractum semen Persicae and cultivated *Cordyceps hyphae* on immuno-dysfunction of inpatients with posthepatic cirrhosis. *Chin J Integr Med* 12(4) : 207-210, 1992
 - 13) Su CH, Wang HH. *Phytocordyceps*, a new genus of the clavicipitaceae. *Mycotaxon* 26: 337-344, 1986
 - 14) Weng SC, Chou CJ, Lin LC, Tsai WJ, Kuo YC. Immunomodulatory functions of extracts from the Chinese medicinal fungus *Cordyceps cicadae*. *J Ethnopharmacol* 83(1-2): 79-85, 2002
 - 15) Ohmori T, Tamura K, Wakaiki A, Kawanishi G, Tsuru S, Yado-mae T, Nomoto K. Dissociation of a glucan fraction (CO-1) from protein-bound polysaccharide of *Cordyceps ophioglossoides* and analysis of its antitumor effect. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 36(11) : 4512-4518, 1998
 - 16) Zhao-Long W, Xiao W, Wei-Ying C. Inhibitory effect of *Cordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris* on human glomerular mesangial cell proliferation induced by native LDL. *Cell Biochem Funct* 18(2) : 93-97, 2000
 - 17) Koh JH, Kim KM, Kim JM, Song JC, Suh HJ. Antifatigue and antistress effect of the hot-water fraction from mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Biol Pharm Bull* 26(5) : 691-694, 2003
 - 18) Kim HW, Kim YH, Fu CX, Nam KS, Lee SJ, An HS, Jeong EH, Yun SH, Sung SK, Lee SJ, Hyun JW. In vitro antitumor activity of ergosterol peroxide isolated from *Cordyceps militaris* on cancer cell lines from Korean patients. *Kor J Mycol* 29(1) : 61-66, 2001
 - 19) Shim JY, Lee YS, Lim SS, Shin KH, Hyun JE, Kim SY, Lee EB. Pharmacological activities of *Paecilomeces japonica*, a new type *Cordyceps* sp. *Kor J Pharmacogen* 31(2) : 163-167, 2000
 - 20) Ying J, Mao X, Ma Q, Zong Y, Wen H. Icons of medical fungi from china. Science Press, Beijing, China, pp.60-85, 1987
 - 21) Cunningham KG, Hutchinson SA, Manson W, Spring FS. Cordycepin, a metabolic product from cultures of *Cordyceps militaris*. Part I. Isolation and characterization. *J Chem Soc* 51: 2299-2300, 1951
 - 22) Carmichael J, Degraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based automated colorimetric assay. Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 47: 936-949, 1987
 - 23) Goldin R, Pet R. The causes of cancer, quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst* 66: 1192-1308, 1981
 - 24) Kim MN, Cui CB, Lee DS, Lee DS, Ham SS. Cytotoxicity and antigenotoxic effects of *Cordyceps militaris* extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30(5) : 921-927, 2001
 - 25) Nakamura K, Yamaguchi Y, Kagota S, Kwon YM, Shinozuka K, Kunitomo M. Inhibitory effect of *Cordyceps sinensis* on spontaneous liver metastasis of Lewis lung carcinoma and B16 melanoma cells in syngeneic mice. *Jpn J Pharmacol* 79: 335-341, 1999
 - 26) Kredich NM. Inhibition of nucleic acid methylation by cordycepin - in vivo synthesis of S-3'-deoxyadenosylmethionine by WI-L2 human lymphoblast. *J Biol Chem* 255: 7380-7385, 1980
 - 27) Chen YJ, Shiao MS, Lee SS, Wang SY. Effect of *Cordyceps sinensis* on the proliferation and differentiation of human leukemic U937 cells. *Life Sci* 60(25) : 2349-2359, 1997
 - 28) Yoshida J, Takamura S, Yamaguchi N, Ren LJ, Chen H, Koshimura S, Suzuki S. Antitumor activity of an extract of *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. against murine tumor cell lines. *Jpn J Exp Med* 59(4) : 157-161, 1989
 - 29) Ohmori T, Tamura K, Tsuru S, Nomoto K. Antitumor activity of protein-bound polysaccharide from *Cordyceps ophioglossoides* in mice. *Jpn J Cancer Res* 77(12) : 1256-1263, 1986
 - 30) Craig RW, Frankfurt OS, Sakagami H, Takeda K, Bloch A. Macromolecular and cell cycle effects of different classes of agents inducing the maturation of human myeloblastic leukemia (ML-1) cells. *Cancer Res* 44(6) : 2421-2429, 1984
 - 31) Miyazaki J, Oikawa N, Yamada H. Studies on fungal (*Penicillium chrysogenum*) polysaccharides. XX. Galactomannan of *Cordyceps sinensis* (Lepi doptera). *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 25: 3324-3330, 1977
 - 32) Yamada H, Kawaguchi N, Ohmori T, Takeshita Y, Taneya S, Miyazaki T. Structure and antitumor activity of an alkali-soluble polysaccharide from *Cordyceps ophioglossoides*. *Carbohydr Res* 125(1) : 107-115, 1984
 - 33) Kuo YC, Lin CY, Tsai WJ, Wu CL, Chen CF, Shiao MS. Growth inhibitors against tumor cells in *Cordyceps sinensis* other than cordycepin and polysaccharides. *Cancer Invest* 12: 611-618, 1994