

밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*)의 면역 활성화에 미치는 영향

강인순 · 김혜주* · 이태호* · 권용삼* · 손미원* · 김채균#

인하대학교 의과대학 약리학교실, *동아ST(주) 연구본부

(Received February 12, 2014; Revised March 11, 2014; Accepted March 24, 2014)

Effects of *Cordyceps militaris* on Immune Activity

In Soon Kang, Hyeju Kim*, Tae Ho Lee*, Yong Sam Kwon*, Miwon Son* and Chaekyun Kim#

Department of Pharmacology and Toxicology, Inha University School of Medicine, Incheon 400-712, Korea

*Research Institute, Dong-A ST Co., Ltd., Gyeonggi 446-905, Korea

Abstract — In order to determine the functional benefits of *Cordyceps militaris* in the immune system, we examined the immunomodulatory activities of *C. militaris* using an immunocompromised C57BL/6 mice, mouse spleen cells, RAW 264.7 macrophage cells, and A549 lung carcinoma cells. Mice were injected intraperitoneally with an immunosuppressive drug, cyclophosphamide, and then administered orally with 30, 100 and 300 mg/kg of 50% ethanol extract of *C. militaris* (CME 30, CME 100 and CME 300) for 14 days. CME increased splenocyte proliferation and natural killer (NK) cell activity compared to 3% hydroxypropyl methylcellulose-treated control mice. CME also increased the production of Th1 cytokines, IL-2 and TNF- α in spleen cells isolated from CME-injected mice and *in vitro*, which suggested the enhanced cellular immunity in response to CME. CME also increased splenocyte proliferation, NK cell activity, and IL-2 and TNF- α production compared to 1 μ M methotrexate-treated spleen cells *in vitro*. We examined whether *C. militaris* regulates the production of inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. CME inhibited LPS-induced NO production and iNOS expression in a dose dependent manner, while COX-2 expression was remained unchanged. In addition, CME also has free radical scavenging activity, indicating its antioxidant activity. These results indicate that *C. militaris* enhances immune activity by promoting immune cell proliferation and cytokine production.

Keywords □ *Cordyceps militaris*, immunocompromised mice, splenocyte, Th1 cytokine, inflammatory mediators, free radical, antioxidant

동충하초는 자낭균강(Ascomycetes), 맥각균목(Clavicipitales), 맥각균과(Clavicipitaceae)에 속하며 전 세계적으로 400종 이상, 국내에 80여종이 자생하는^{1,2)} 곤충의 충체내에서 자실체를 형성하여 기생하는 진균이다.³⁻⁵⁾ 자생하는 동충하초는 다량 채취가 어려워 대중적인 약재가 되지 못했으나 인공재배 기술이 개발되어 대량생산이 가능해짐에 따라 많은 연구가 시행되었고 대중화되었다.⁶⁻⁸⁾ 예로부터 동충하초는 자양강장, 신장과 간의 보호작용, 면역기능 강화, 항균작용, 항종양작용, 산화방지, 혈당강하, 콜레스테롤과 중성지질 저하 효과 등이 알려져 있다.⁹⁻¹²⁾ 시넨시스 동충하초(*Cordyceps sinensis*)와 밀리타리스 동충하초(*Cordyceps*

militaris)가 대표적인 동충하초이며 가장 많이 연구되어 있다.¹³⁾ 동충하초의 유효성분으로는 cordycepin, cordycepic acid, ophiocordin, 복합다당체, ergosterol 등이 알려져 있다.^{11,14,15)}

밀리타리스 동충하초는 폐암, 간암, 유방암, 직장암 세포의 증식을 억제한다.¹⁶⁻¹⁸⁾ 밀리타리스 동충하초의 항암효과는 세포사멸을 유도하는 caspase-3 활성 촉진과 세포의 생존을 조절하고 종양 형성에 기여하는 Akt의 비활성을 통해 암세포의 세포사멸을 유도하거나,¹⁶⁾ telomerase 역전사효소의 전사기능을 억제시켜 암세포의 성장을 억제함으로써 나타난다.¹⁷⁾ 항암 효과는 항암성분에 의한 직접적인 작용일 수도 있으나 면역기능을 강화시켜 나타내는 간접적인 작용일 수도 있다. 밀리타리스 동충하초는 자연살해세포(natural killer cell)의 작용을 강화시키고 항바이러스 사이토카인(cytokine)의 분비를 증가시켜 독감(influenza virus), 헤르페스 바이러스(herpes virus) 같은 바이러스 복제를 억제한다.¹⁹⁾ 이러한 항종양, 항바이러스 작용은 면역증강 작용과 밀접한 연관을 가지므로 우리는 밀리타리스 동충하초의 면역증

#Corresponding Author

Chaekyun Kim

Laboratory for Leukocyte Signaling Research, Department of Pharmacology & Toxicology, Inha University School of Medicine, 366, Seohaedaero, Jung-gu, Incheon 400-712, Korea

Tel.: 032-890-0976 Fax.: 032-887-7488

E-mail: chaekyun@inha.ac.kr

강 작용을 연구하였다.

밀리타리스 동충하초는 수지상세포(dendritic cell)의 major histocompatibility complex(MHC)의 발현과 MHC-restricted antigen presentation을 증가시켰으며, T cell 반응의 주요 사이토카인인 interleukin(IL)-2의 생성을 증가시켰다.²⁰⁾ 또한 수지상세포와 대식세포에서 interferon(IFN)- γ 및 IL-1 β , IL-6, tumor necrosis factor-alpha(TNF- α)를 증가시켰다.^{20,21)} 반면 lipopolysaccharide(LPS) 등에 의해 증가된 nitric oxide(NO)의 생성과 inducible nitric oxide synthase(iNOS) 발현 및 염증 매개 물질의 과도한 발현과 생성을 억제하고 유리기(free radical)를 제거함으로써 항산화 작용 및 과도한 염증반응을 억제하는 효과를 나타내었다.²²⁻²⁶⁾

본 연구는 밀리타리스 동충하초의 면역력 증강 기전을 밝히는 연구로 면역 억제된 마우스에 밀리타리스 동충하초 에탄올 추출물을 투여하거나 또는 정상마우스에서 분리한 비장세포, 대식세포인 RAW 264.7 cell과 폐암세포인 A549 cell에 밀리타리스 동충하초 에탄올 추출물을 처리하여 면역증강 작용 및 면역조절 인자의 발현과 생성에 미치는 영향을 평가하였다. 그 결과 밀리타리스 동충하초 에탄올 추출물은 면역 억제된 마우스의 비장 무게와 비장세포의 증식을 증가시켰다. IL-2와 TNF- α 의 생성을 증가시켰고, cyclophosphamide에 의해 저하된 자연살해세포 활성을 증가시켰다. 또한 일정 농도에서 methotrexate에 의해 감소된 정상 마우스 비장세포의 증식과 IL-2와 TNF- α 의 생성을 증가시켰다. 대식세포인 RAW 264.7 cell에서 LPS에 의해 유도된 iNOS의 발현과 NO 생성을 억제하였다.

실험방법

밀리타리스 동충하초 에탄올 추출물

본 연구에 사용된 밀리타리스 동충하초는 (주)머쉬텍(횡성, 한국)으로부터 제공받았다. 건조된 밀리타리스 동충하초를 파쇄한 후 50% 에탄올에서 3일간 상온, 상압에서 추출하여 여과, 농축, 살균을 거친 후 분무 건조하였다.

실험동물

본 연구에 사용된 마우스는 수컷 C57BL/6(6~7주령, 체중 18~23 g)로 오리엔트 바이오(성남, 한국)로부터 구입하였다. 동물실험은 동아ST(주) 연구본부 동물실험윤리위원회(IACUC)의 승인(승인번호 I-1111006)과 인하대학교 의과대학 동물실험윤리위원회의 승인(INHA 130605-206)을 받았으며 그 규정을 준수하여 실시하였다. 마우스는 5군(n=8)으로 분류하여 처치하였다. 정상군(normal group)은 생리식염수를 실험 시작일(day 0)과 day 3에 복강투여하고, 밀리타리스 동충하초 추출물 현탁액인 3% hydroxypropyl methylcellulose(HPMC)를 day 1부터 매일 1회

경구투여하였다. 대조군(control group)은 면역억제제인 cyclophosphamide를 실험 시작일(day 0)에 150 mg/kg, day 3에 100 mg/kg 복강투여하고 3% HPMC를 day 1부터 매일 1회 경구투여하였다. 밀리타리스 동충하초 추출물 투여군(CME)은 cyclophosphamide를 day 0과 3에 복강투여하고, 3% HPMC에 현탁한 CME를 day 1부터 30 mg/kg(CME 30), 100 mg/kg(CME 100) 그리고 300 mg/kg(CME 300) 용량으로 14일 동안 매일 1회 경구투여하였다. 각 군의 마우스는 day 14에 희생하여, 체중 및 면역 장기의 무게를 측정하였고, 비장을 적출하여 면역학적 분석에 사용하였다.

마우스 비장세포의 분리

마우스에서 비장을 적출하여 α -minimum essential medium (α -MEM)에 넣고 slide glass의 forested end를 이용하여 파쇄한 후, 40 μ m nylon cell strainer(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 통과시켜 세포를 분리하였다. 세포를 300 \times g에서 5분간 원심분리한 후 적혈구 용혈액을 가하여 적혈구를 제거하였다. 비장세포를 배양액(RPMI 1640 containing 10% fetal bovine serum(FBS), 100 U/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin)에 현탁 후 실험에 사용하였다.

대식세포주와 폐 상피세포주의 배양

마우스 대식세포주 RAW 264.7 cell(ATCC, Manassas, VA, USA)은 Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM)에 사람의 폐 상피세포주 A549 cell(ATCC)은 Ham's F-12 medium에 10% FBS, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

비장세포 및 세포주의 증식 측정

마우스 비장세포, RAW 264.7 cell과 A549 cell의 증식은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 방법으로 측정하였다.²⁷⁾ 비장세포를 96-well plate에 5 \times 10⁵ cells/well이 되도록 분주하였다. 면역억제 실험에 사용한 마우스(정상군, 대조군, CME)의 비장세포에 1 μ g/ml concanavalin A(ConA)를 넣고 48시간 배양하였다. 또한 *in vitro*에서 밀리타리스 동충하초 추출물의 비장세포 증식에 미치는 영향을 측정하기 위하여 cyclophosphamide로 면역 억제된 마우스의 비장세포와는 별도로 정상 마우스에서 비장세포를 분리한 후 면역억제 작용이 있는 1 μ M methotrexate(MTX) 처리하여 24시간 동안 배양한 후 1 μ g/ml ConA와 0~100 μ g/ml의 CME를 처리하였다. 48시간 배양 후 250 μ g/ml MTT 용액을 첨가하여 2시간 동안 배양 후 배양액을 제거하고 200 μ l의 dimethyl sulfoxide를 가하여 10분간 실온에서 반응한 후 microplate reader(Molecular Devices, VERSAmax, Menlo Park, CA, USA)를 이용하여 570 nm에서

흡광도를 측정하였다. 대식세포인 RAW 264.7 cell과 대표적인 폐암(lung adenocarcinoma) 세포인 A549 cell의 증식은 1 µg/ml LPS와 CME를 처리하여 배양한 후 MTT법으로 측정하였다.

사이토카인(IL-2과 TNF-α) 측정

밀리타리스 동충하초 추출물의 사이토카인 생성에 미치는 영향을 cyclophosphamide 투여한 면역억제 마우스 비장세포와 정상 마우스에서 추출한 비장세포에 MTX를 처리한 세포로 나누어 측정하였다. 면역억제 마우스에서 분리한 비장세포를 24-well plate에 5×10⁶ cells/well이 되도록 분주한 후, 5 µg/ml의 ConA를 첨가하여 48시간 동안 배양한 후 배양액에 유리된 IL-2와 TNF-α를 ELISA kit(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 측정하였다. 또한 정상 마우스의 비장에서 분리한 비장세포를 96-well plate에 5×10⁵ cells/well이 되도록 분주하고 MTX 처리하여 24시간 배양한 후 1 µg/ml ConA와 CME를 농도 별로 첨가한 후 48시간 배양하여 유리된 IL-2와 TNF-α를 측정하였다.

사이토카인의 측정은 제조회사의 실험방법에 따라 실험하였다. 96-well plate에 각각 IL-2와 TNF-α의 capture antibody를 18시간 동안 부착시킨다. Capture antibody가 부착된 well을 washing buffer(0.05% Tween 20 in phosphate buffered saline(PBS), pH 7.2~7.4)로 3회 세척한 후 reagent diluent(0.1% bovine serum albumin, 0.05% Tween 20 in Tris-buffered saline) 200 µl를 분주하여 실온에서 1시간 30분 반응시킨다. 다시 washing buffer로 세척한 후 IL-2와 TNF-α의 표준액 및 세포배양액을 100 µl 분주하여 실온에서 2시간 동안 반응시킨다. Washing buffer로 세척한 후, detection antibody를 100 µl 첨가하여 실온에서 2시간 동안 반응시킨 다음 세척한 후 horseradish peroxidase (HRP)가 결합된 streptavidin을 100 µl 분주하여 20분간 암소에서 반응시킨다. 반응한 plate를 세척 후 tetramethylbenzidine 용액을 넣고 다시 20분간 암소에서 반응시킨다. 반응정지액인 2N H₂SO₄를 50 µl 넣어 반응을 정지시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. IL-2와 TNF-α의 농도는 표준액을 사용하여 얻은 표준곡선에 따라 계산하였다.

자연살해세포 활성 측정

자연살해(NK)세포의 세포 독성은 NK세포가 NK-sensitive한 YAC-1 세포(한국세포주은행)를 공격하여 파괴된 YAC-1 세포로부터 유리된 lactate dehydrogenase를 측정하는 방법(LDH cytotoxic assay)을 이용하였다. 96-well U-bottom culture plate에 1×10⁴ cells/100 µl의 YAC-1 세포를 넣고 비장세포 : YAC-1 세포(effector-to-target) 비가 200 : 1, 100 : 1, 50 : 1이 되도록 비장세포를 넣은 후 37°C, 5% CO₂에서 4시간 동안 배양하였다. 원심분리 후 LDH가 유리된 상층액 100 µl을 채취하여 flat-

bottom microplate(Nunc, Roskilde, Denmark)에 옮겼다.

LDH cytotoxic assay는 LDH assay kit(Abcam, Cambridge, England)를 이용하여 실행하였다. 세포배양액에 LDH working mixture를 100 µl 첨가하고 실온(15~25°C)의 암소에서 30분간 반응 후, 반응정지 용액인 1N HCl 50 µl를 첨가한 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. NK 세포 활성도(%)는 {test sample-low control/high control-low control}×100으로 계산하였다.²⁸⁾

Nitric Oxide 생성 측정

RAW 264.7 cell을 96-well plate에 1×10⁵ cells/well로 분주하고, 24시간 부착한 후 1 µg/ml lipopolysaccharide(LPS)와 0, 10, 20, 50, 100 µg/ml 농도의 CME를 처리하였다. 24시간 배양 후 세포배양액 100 µl에 동량의 Griess reagent(0.1% N-(1-naphtyl) ethylene-diamine, 1% sulfanilamide, and 5% phosphoric acid)를 혼합하여 실온에서 10분간 반응시킨 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준액은 0~100 µM의 sodium nitrate를 사용하였다.²⁷⁾

유리기 소거 활성 측정

Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)는 매우 안정한 free radical로서 490 nm에서 특징적인 광흡수를 나타내는 보라색 화합물이다. DPPH가 가진 radical은 알코올 등의 유기용매에서 안정하며 proton-radical scavenger에 의해 탈색되므로 광흡수가 되는 비율을 이용하여 항산화 정도를 측정한다. 밀리타리스 동충하초의 유리기 소거 활성을 DPPH assay로 측정하였다. 96-well plate에 각 농도(0, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 5 mg/ml)의 CME 또는 cordycepin(0, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1 mg/ml)과 양성 대조물 질인 비타민 C와 동량의 300 µM DPPH를 혼합하여 37°C에서 30분간 배양한 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Western Blotting

RAW 264.7 cell에 1 µg/ml LPS와 0, 10, 20, 50, 100 µg/ml CME를 첨가하여 24시간 배양한 후 PBS로 세척하였다. 세포에 단백질 분해효소 억제제(10 µM leupeptin, 20 µg/ml chymostain, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride)를 함유한 radioimmuno-precipitation assay(RIPA) buffer를 넣고 30분간 얼음에서 lysis 시킨 후 원심분리하여 단백질을 시료를 얻었다. 시료를 전기영동한 후 nitrocellulose membrane으로 옮겼다. 항체의 비특이적 결합을 억제시키기 위해 blot을 TBST buffer(10 mM Tris-HCl, pH 6.8, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20)에 녹인 6% skim milk 용액에 넣고 실온에서 2시간 교반하였다. 비특이적 결합을 차단한 blot을 iNOS(BD Pharmingen, San Diego, CA, USA)와 COX-2 (Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA)에 특이적으로 결합하는 항체와 실온에서 1시간 결합시켰다. TBST buffer로 세척한 후 HRP가

결합된 2차 항체와 실온에서 30분간 반응시켰다. TBST buffer로 세척하고 enhanced chemiluminescence kit(Thermo Scientific, IL, USA)로 blot을 반응시킨 후 X-ray film에 현상하여 확인하였다.

통계처리

본 실험 자료의 통계처리는 Student's t-test를 실시하여 평균치(mean)와 표준편차(SD) 또는 표준오차(SEM)로 나타내었고, p 값이 0.05 미만일 때 유의성이 있다고 판정하였다.

실험결과 및 고찰

면역억제 마우스에 미치는 영향

밀리타리스 동충하초 추출물(CME)이 마우스의 체중 및 면역장기의 무게에 미치는 영향을 알아보기 위하여 마우스의 체중 및 비장의 무게를 측정하였다(Table I). 모든 실험군에서 실험이 진행된 14일간 약 5% 정도의 체중이 증가되어 면역억제제인 cyclophosphamide 및 CME 투여가 실험동물의 체중에는 영향을 주지 않음을 알 수 있었다(Table I). 비장의 무게는 모든 CME

Table I – Effect of *Cordyceps militaris* on the body and spleen weight of C57BL/6 mice

Group	Body weight (g)		Spleen (mg)
	day 0	day 14	
Normal	22.61±0.16 ¹⁾	23.73±0.17	70.7±4.1
Control	22.44±0.26	23.55±0.23	156.1±8.1
CME 30 ²⁾	22.63±0.26	23.59±0.24	162.8±12.7
CME 100	22.53±0.31	23.43±0.35	208.5±13.0*
CME 300	22.39±0.75	23.66±0.28	178.5±17.2

¹⁾The results are expressed as mean±SEM of 8 mice per group.

²⁾CME 30 represents administration of 30 mg/kg of 50% ethanol extract of *C. militaris*.

* Represents significant difference at $p < 0.05$ by Student's t-test.

투여군에서 대조군에 비해 증가하였으며, CME 100은 33.5%, CME 300은 14.4% 증가하여 CME 100이 가장 효과가 좋았다. 따라서 밀리타리스 동충하초 추출물은 비장세포의 증식을 촉진하는 것으로 생각된다.

동충하초가 비장세포의 DNA 합성을 촉진시켜 비장의 무게를 증가시킨다는 보고²⁹⁾가 있으므로 면역억제 마우스 비장세포 증식에 미치는 CME의 영향을 측정하였다. 마우스에 cyclophosphamide

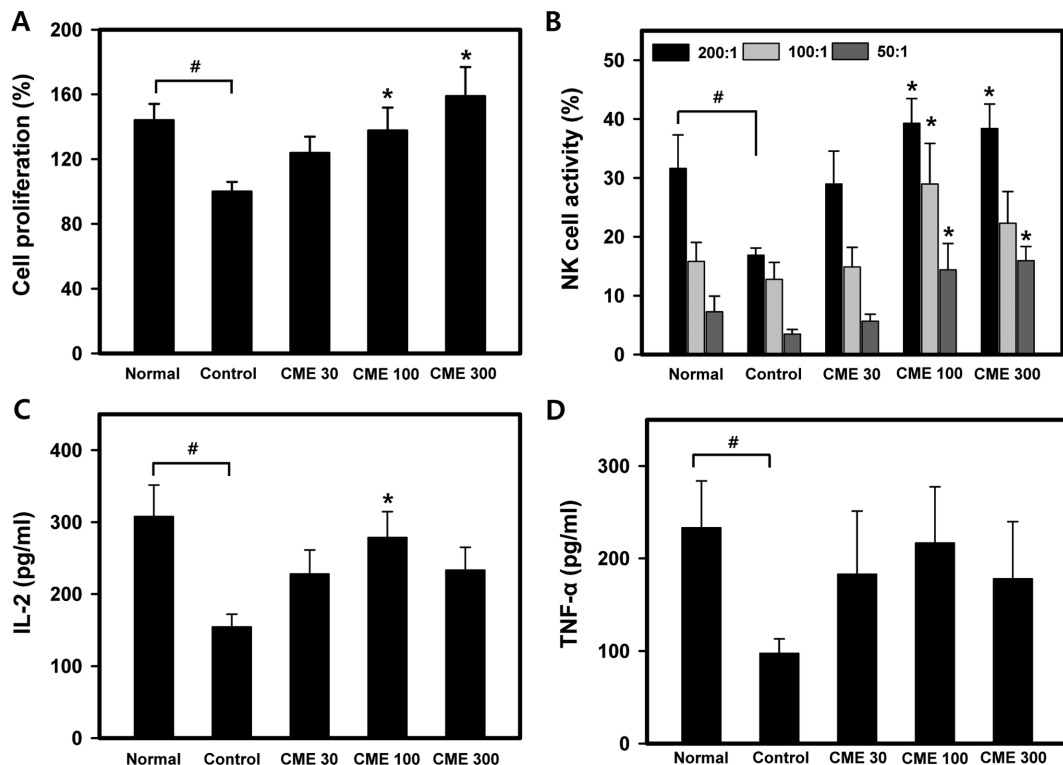


Fig. 1 – Effects of *C. militaris* on immunocompromised mouse. A. Administration of *C. militaris* stimulates proliferation of immune-suppressed mouse splenocytes. Mice were administrated with CME after immunosuppression with cyclophosphamide. The splenocytes were activated with ConA and the cell proliferation was measured by MTT assay. B. Administration of *C. militaris* enhances NK cell activity. The splenocytes were incubated with YAC-1 cell and the released LDH was determined by LDH cytotoxicity assay. C & D. Effect of *C. militaris* on cytokine production of cyclophosphamide-treated mouse splenocytes. The splenocytes were activated with ConA and the production of IL-2 (C) and TNF- α (D) was measured by ELISA. Data were mean±SD of eight mice, and # $p < 0.05$ compared to normal and * $p < 0.05$ compared to control.

를 주사하여 면역력을 억제시킨 후 3% HPMC를 투여한 대조군의 비장세포 증식을 100%로 하였을 경우, 면역력을 억제시키지 않은 정상군의 비장세포는 144.1±10.0%로 cyclophosphamide는 31% 억제하였다(Fig. 1A). CME 30, 100, 300의 증식률은 123.9±10.0%, 137.8±14.0%, 158.9±18.0%로 용량 의존적으로 증가하였다(Fig. 1A). 이 결과는 동일한 밀리타리스 동충하초 추출물을 사용하여 Kim 등³⁰⁾이 보고한 결과와 일치하였다.

면역억제 마우스의 자연살해세포 활성화에 미치는 영향

밀리타리스 동충하초 추출물이 NK 세포 활성화에 미치는 영향을 측정하였다. 대조군 마우스의 NK 세포 활성화(% cytotoxicity)는 비장세포 : YAC-1 비율이 200 : 1, 100 : 1, 50 : 1인 경우 16.9±1.2%, 12.8±2.8%, 3.4±0.8%로 정상군의 31.6±5.7%, 15.8±3.2%, 7.2±2.7%에 비하여 현저하게 감소하였다(Fig. 1B). CME 30에서 분리한 NK 세포 활성화는 비장세포 : YAC-1 비율이 200 : 1, 100 : 1, 50 : 1인 경우 28.9±5.6%, 14.9±3.3%, 5.7±1.2%로 대조군에 비해 증가했으나 통계적으로 유의하지 않았다. CME 100은 비장세포 : YAC-1 비율이 200 : 1, 100 : 1, 50 : 1에

서 각각 39.3±4.2%, 28.9±6.9%, 14.4±4.5%로 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 증가하였다. CME 300은 비장세포 : YAC-1 비율이 200 : 1, 100 : 1, 50 : 1에서 각각 38.4±4.1%, 22.3±5.4%, 15.9±2.4%로 대조군에 비해 증가되었다(200 : 1과 50 : 1 통계적으로 유의). 본 실험에서 CME 100의 NK 세포 활성이 가장 높아 Kim 등이 보고³⁰⁾한 CME 300에서 NK 세포 활성이 가장 높았던 결과와는 용량 차이가 있지만 밀리타리스 동충하초 추출물이 NK 세포의 활성을 증가시킴을 확인하였다.

면역억제 마우스의 사이토카인 분비에 미치는 영향

밀리타리스 동충하초 추출물이 사이토카인 분비에 미치는 영향을 알아보기 위해 주로 세포성 면역을 조절하는 Th1 사이토카인 중에서 IL-2와 TNF-α를 측정하였다. IL-2와 TNF-α는 주로 T-림프구의 성장인자로 작용하며, TNF-α는 대식세포와 같은 백혈구를 유도하여 자연면역과 적응면역에 관여한다.^{27,31-33)} 정상군 비장세포의 IL-2와 TNF-α의 분비량은 각각 308.1±43.6 pg/ml와 233.3±50.5 pg/ml이고 대조군은 각각 154.6±17.6 pg/ml와 97.4±15.8 pg/ml로 정상군에 비하여 감소되어 cyclophosphamide가

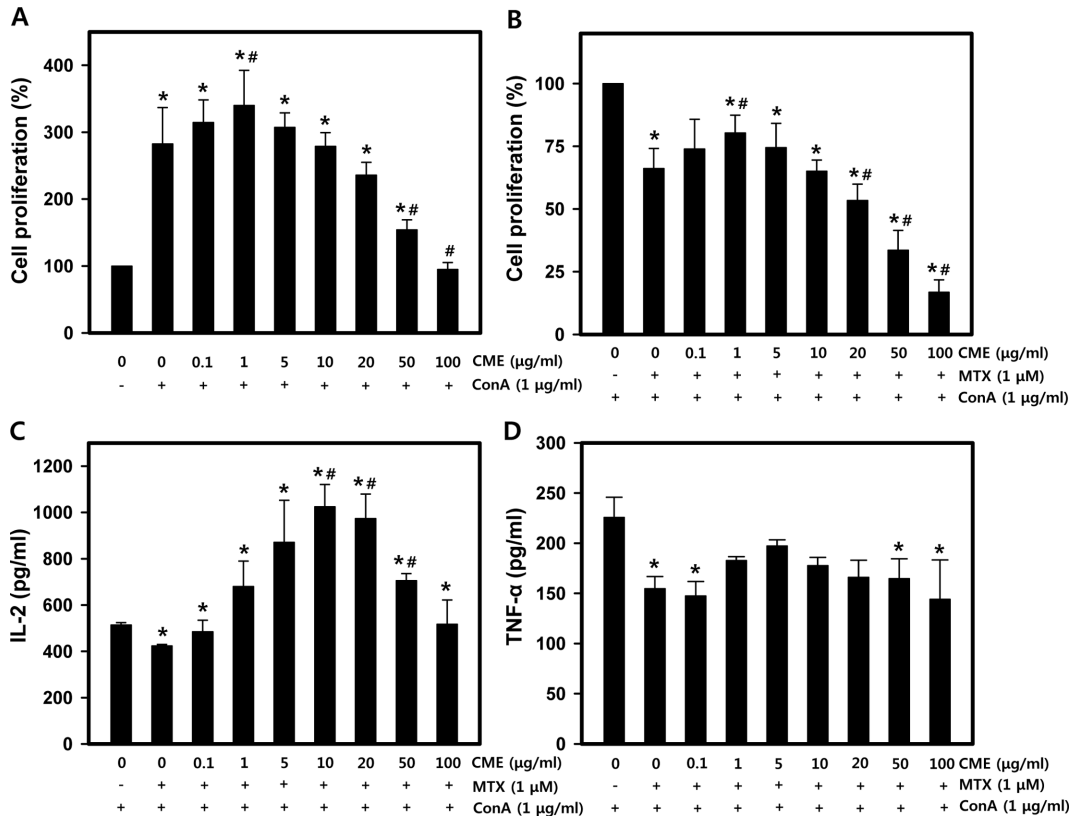


Fig. 2 – Effects of *C. militaris* on mouse splenocytes. A & B. Treatment of *C. militaris* stimulates splenocyte proliferation. The normal splenocytes (A) and methotrexate-treated splenocytes (B) were activated with ConA and the cell proliferation was measured by MTT assay. C & D. Effect of *C. militaris* on cytokine production of mouse splenocytes. The splenocytes were activated ConA and the production IL-2 (C) and TNF-α (D) was measured by ELISA. Data were mean±SD of three independent experiments. *p<0.05 compared to control (A) and ConA plus MTX (B~D), and #p<0.05 compared to ConA (A) and ConA plus MTX (B~D).

IL-2와 TNF- α 의 분비를 억제함을 보여준다. CME 100의 IL-2와 TNF- α 분비량은 278.7 ± 35.8 pg/ml와 216.7 ± 60.7 pg/ml로 대조군에 비해 유의적으로 증가하였다(Fig. 1C, D). 이 결과는 IL-2의 생성이 CME 100에서 대조군에 비해 유의적인 증가를 보인 Kim 등³⁰⁾의 결과와 일치하며, TNF- α 는 CME 투여군이 대조군에 비해 증가하였으나 통계적으로 유의하지 않았다.

정상 마우스 비장세포에 미치는 영향

면역력을 억제시킨 마우스에서 관찰한 결과가 *in vitro*에서도 유사하게 나타내는지 알아보기 위하여 정상 마우스에서 분리한 비장세포에 $1 \mu\text{g/ml}$ ConA와 CME를 처리하였다. 저농도($0.1 \sim 5 \mu\text{g/ml}$)의 CME는 ConA를 처리한 세포보다 높은 증식을 보였으나 $50 \mu\text{g/ml}$ 이상의 CME는 세포 증식을 억제하였다(Fig. 2A). 면역억제제인 MTX를 처리한 후 ConA와 CME를 넣고 비장세포의 증식을 측정한 결과, MTX 처리는 비장세포의 증식을 억제하였으며 CME는 저농도($0.1 \sim 5 \mu\text{g/ml}$)에서는 MTX에 의한 증식억제를 일부 회복시켰으나 $20 \mu\text{g/ml}$ 이상의 고농도에서는 세포증식을 억제하였다(Fig. 2B). 마우스에 경구로 투여한 CME의 생체 농도와 *in vitro*에서 처리한 농도사이의 절대적인 비교 실험은 현실적으로 어렵고 보고된 선행연구가 없으므로 우리는 본

실험을 통하여 마우스 비장세포의 *in vitro* 실험에서의 CME의 적정 농도를 알 수 있었다.

정상 마우스 비장세포의 사이토카인 분비에 미치는 영향

정상 마우스 비장세포에 ConA를 처리하면 514.9 ± 9.8 pg/ml의 IL-2와 225.7 ± 20.1 pg/ml의 TNF- α 가 분비되었고 MTX를 처리하면 423.7 ± 5.7 pg/ml의 IL-2과 154.7 ± 12.1 pg/ml의 TNF- α 가 분비되어, MTX가 IL-2(18%)와 TNF- α (31%) 분비를 억제함을 확인하였다(Fig. 2C, D). CME는 MTX에 의해 억제된 정상 마우스 비장세포의 IL-2의 분비를 증가시켰고 $10 \mu\text{g/ml}$ 에서 가장 효과가 가장 좋았으며, TNF- α 의 분비는 $1 \sim 50 \mu\text{g/ml}$ 에서 일부 회복시켰다. 이상의 결과는 밀리타리스 동충하초 추출물이 IL-2와 TNF- α 의 분비를 조절함을 나타내며, 앞서 보인 면역억제 마우스의 결과와 일치한다. 또한 밀리타리스 동충하초 수(water) 추출물을 투여한 실험에서 고용량의 수추출물이 마우스의 비장세포의 IL-2와 TNF- α 의 분비를 증가시킨 결과와도 유사하다.²⁸⁾

대식세포 및 폐암 세포의 증식과 TNF- α 생성에 미치는 영향

밀리타리스 동충하초가 면역과 염증반응에서 중요한 역할을 담당하는 대식세포에 미치는 영향을 측정하였다. CME는 $50 \mu\text{g/ml}$

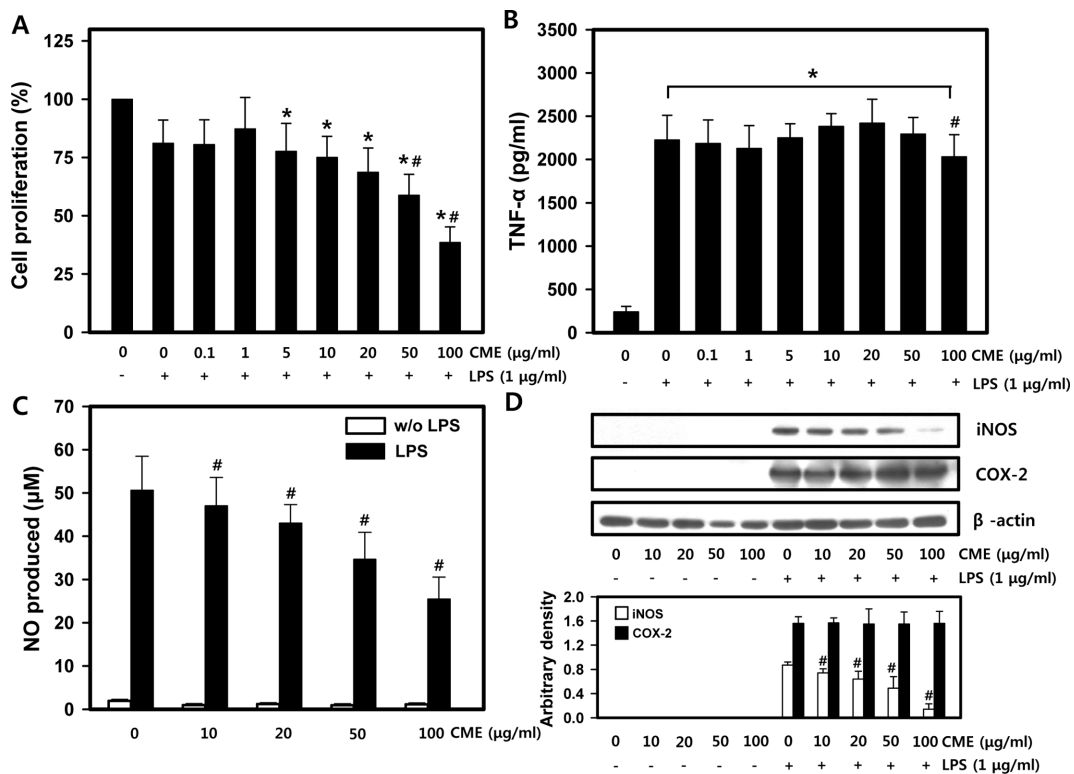


Fig. 3 – Effect of *C. militaris* on RAW 264.7 cell functions. A. RAW 264.7 cells were treated with various concentrations of CME and the proliferation was measured by MTT assay (n=4). B. TNF- α production in RAW 264.7 cells was determined (n=3). C. NO generation in RAW 264.7 cells was determined by Griess reaction (n=4). D. Protein expressions of iNOS and COX-2 were measured (n=3). Data were mean \pm SD, *p<0.05 compared to control and #p<0.05 compared to LPS.

ml 이상의 농도에서 RAW 264.7 cell의 증식을 억제하였다(Fig. 3A). 이는 밀리타리스 동충하초 온수 추출물²⁰⁾은 200 µg/ml, 열수 추출물³⁴⁾은 625 µg/ml, 70% 에탄올 추출물²³⁾은 5 mg/ml 농도까지 생존에 영향을 미치지 않는다는 RAW 264.7 cell을 사용한 다른 보고에 비하여 수십~수백 배 낮은 농도이다. 이 결과들은 밀리타리스 동충하초의 세포 증식에 영향을 미치는 농도가 세포의 종류에 따라 차이가 있을 것을 암시한다. 밀리타리스 동충하초가 다양한 종류의 암세포 증식을 억제함이 보고되었다.¹⁶⁻¹⁸⁾ 우리는 CME가 세포증식에 영향을 미치는 농도가 세포에 따라 차이가 있는지와 CME의 폐암세포 억제작용을 검증하기 위하여 사람의 폐암 상피세포인 A549 cell에 CME를 처리하였다. 10 µg/ml CME는 A549 cell의 증식을 14.7%, 100 µg/ml CME는 23.6% 억제하였다(Fig. 4). 이 결과로 100 µg/ml CME가 RAW 264.7 cell 증식을 62.5% 억제한 것에 비하여 A549 cell의 억제

율은 현저히 낮아 밀리타리스 동충하초에 대한 세포의 감수성이 서로 다를 수 있다.

밀리타리스 동충하초 추출물이 RAW 264.7 cell의 사이토카인 분비에 미치는 영향을 알아보기 위해 IL-2와 TNF-α를 측정하였다. LPS 처리군에서 TNF-α는 2226.5±274.7 pg/ml로 LPS를 처리하지 않은 대조군의 241.2±62.1 pg/ml에 비해 9배 이상 증가하였고, 20 µg/ml CME는 2420.4±274.4 pg/ml로 LPS 처리군에 비해 약간 증가하였다(Fig. 3B). 이 결과는 CME 단독 처리군의 경우 TNF-α의 분비는 증가하지만,^{20,35)} LPS와 병용처리 하였을 경우 LPS에 의해 증가된 TNF-α의 분비를 억제하는 연구 결과^{26,34)}와는 상이하였다. IL-2는 주로 활성화된 T 세포에 의해 생성되어 T cell을 활성화시키는 cytokine으로서 B cell과 T cell을 포함하는 마우스 비장세포에서는 측정이 가능하였으나, 대식세포인 RAW 264.7 cell에서는 ELISA로 측정할 만큼의 IL-2가 생성되지 않았다(data not shown).

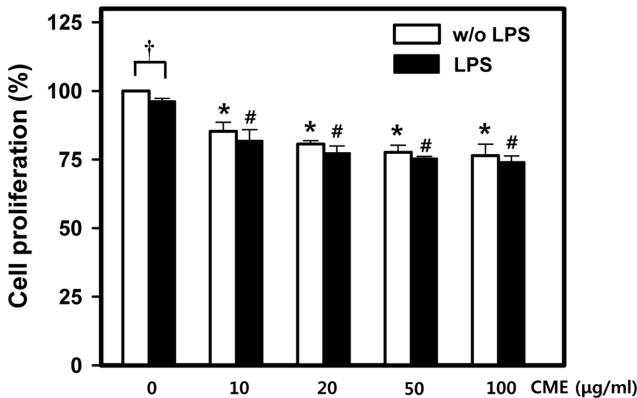


Fig. 4 – Effect of *C. militaris* on A549 cell proliferation. A549 cells were treated with various concentrations of CME and the proliferation was measured by MTT assay (n=3). Data were mean±SD, *p<0.05 compared to control, #p<0.05 compared to LPS, and †p<0.05.

Nitric oxide 생성 및 iNOS와 COX-2 발현에 미치는 영향

대식세포는 숙주의 방어와 항상성 유지에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 사이토카인 뿐 아니라 nitric oxide(NO)와 prostaglandin을 생성하여 생체방어에 중요한 역할을 한다.^{36,37)} LPS 자극에 의해 염증반응이 시작되면 iNOS가 발현되고, 과량의 NO가 생성된다.³⁸⁾ CME는 LPS에 의해 증가된 NO 생성을 농도 의존적으로 억제하였다(Fig. 3C). NO를 생성하는 iNOS와 prostaglandin을 생성하는 COX-2 발현을 측정한 결과, LPS는 iNOS 및 COX-2의 발현을 증가시켰으며, CME는 LPS에 의해 유도된 iNOS의 발현을 농도 의존적으로 억제하였으나 COX-2의 발현에는 영향을 미치지 않았다(Fig. 3D). 밀리타리스 동충하초 부탄올(butanol) 추출물³⁹⁾과 70% 에탄올 추출물⁴⁰⁾이 COX-2의 발현을 농도 의존적으로 감소시킨다는 보고와 에탄올 추출물이

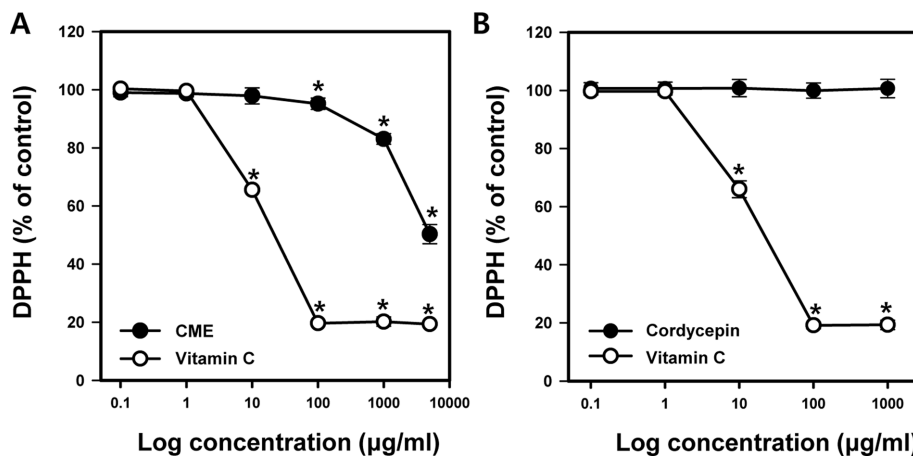


Fig. 5 – The free radical scavenging activity of *C. militaris*. DPPH radical scavenging activity by CME (A) and cordycepin (B) was determined. Vitamin C was used as a positive control. Reaction mixtures were incubated at 37°C for 30 min and the absorbance was measured at 490 nm. Data were mean±SD of three independent experiments and *p<0.05.

COX-2의 발현을 증가시킨다는 상반된 보고⁴⁾가 있다. 이들 상반된 결과는 밀리타리스 동충하초 농도에 따라 COX-2 발현을 저해하거나 증가시킴을 암시한다.

항산화 활성에 미치는 영향

밀리타리스 동충하초 추출물의 항산화 활성을 동충하초의 주요 성분인 cordycepin과 대표적 항산화 물질인 비타민 C와 비교하여 DPPH radical 소거 능력으로 측정하였다. CME 농도가 0.1에서 5000 µg/ml로 증가할수록 DPPH radical 활성은 99.0±1.4%에서 50.3±3.3%로 농도 의존적으로 감소시켰다(Fig. 5). 동충하초의 IC₅₀ 값은 5.3 mg/ml이고 비타민 C의 IC₅₀ 값은 10.5 mg/ml이었다. Cordycepin은 농도 증가에 따른 DPPH radical 활성에 영향을 미치지 않아 밀리타리스 동충하초의 DPPH radical 소거 능력은 cordycepin이 아닌 다른 성분에서 유래됨을 추측할 수 있다.

결 론

본 연구에서는 밀리타리스 동충하초의 면역력 증강작용을 *in vivo*와 *in vitro*에서 비교, 평가하였다. 마우스에 cyclophosphamide를 투여하여 면역억제한 후 밀리타리스 동충하초 50% 에탄올 추출물을 14일간 경구투여하였다. 마우스를 희생하여 체중 및 비장의 무게, 비장세포의 증식과 IL-2와 TNF-α의 생성, 자연살해세포 활성을 측정하였다. 그 결과 Kim 등³⁰⁾의 보고와 같이 동충하초 추출물은 면역억제 마우스의 체중에는 영향을 주지 않았으나 비장의 무게는 증가시켰다. Cyclophosphamide는 비장세포의 증식을 억제하였고, 동충하초 추출물은 용량 의존적으로 비장세포 증식을 증가시켰다. 동충하초 추출물은 IL-2와 TNF-α의 분비를 증가시켰으며 자연살해세포의 활성을 현저하게 증가시켰다.

밀리타리스 동충하초 추출물을 투여한 마우스에서 관찰한 결과를 *in vitro*에서 증명하기 위하여 정상 마우스의 비장세포를 분리하여 증식 및 IL-2와 TNF-α의 분비를 측정하였다. 동충하초 추출물은 methotrexate에 의해 감소된 비장세포의 증식을 저농도(0.1~5 µg/ml)에서는 증가시켰으나 20 µg/ml 이상의 고농도에서는 억제하였다. 또한 동충하초 추출물은 methotrexate에 의해 감소된 IL-2와 TNF-α의 생성을 증가시켰다.

밀리타리스 동충하초 추출물은 대식세포 RAW 264.7 cell의 증식을 1 µg/ml 농도에서 증가시켰고 20 µg/ml 이상의 농도에서는 억제하였다. TNF-α의 분비는 유의하게 변화시키지 않았으며, NO 분비는 농도 의존적으로 억제하였다. 동충하초 추출물은 iNOS 발현을 NO 분비와 유사하게 감소시켰으나, COX-2 발현에는 효과가 없었다.

이상의 결과를 종합해 보면 밀리타리스 동충하초는 억제된 면역력을 회복, 증강시키며, 이러한 면역 증강작용은 일정한 농도

범위에서 일어나므로 밀리타리스 동충하초를 복용하는 경우 일정한 약리학적 농도를 유지하는 것이 중요할 것으로 생각된다.

감사의 말씀

이 연구는 일부 동아제약에서 후원하는 한국타우린연구회 연구비의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사를 드립니다.

References

- 1) Sung, G. H., Hywel-Jones, N. L., Sung, J. M., Luangsa-Ard, J. J., Shrestha, B. and Spatafora, J. W. : Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Stud. Mycol.* **57**, 5 (2007).
- 2) 성한수 : 한국의 동충하초, 교학사, 서울 p. 13 (1996).
- 3) Jang, Y. S. and Hong, S. W. : Notes on unrecorded fresh fungi of *Cordyceps* in Korea. *Kor. J. Mycol.* **14**, 85 (1986).
- 4) Sung, J. M., Kim, C. H., Yang, K. J., Lee, H. K. and Kim, Y. S. : Studies on distribution and utilization of *Cordyceps militaris* and *C. nutans*. *Kor. J. Mycol.* **21**, 94 (1993).
- 5) Sung, J. M., Lee, H. K., Yoo, Y. J., Choi, Y. S., Kim, S. H., Kim, Y. U. and Sung, K. H. : Classification of *Cordyceps* species based on protein banding pattern. *Kor. J. Mycol.* **26**, 1 (1998).
- 6) Kobayasi, Y. : The genus *cordyceps* and its allies. *Sci. Ret. Tokyo Bunrika Daigaku Sect.* **B5**, 53 (1941).
- 7) Basith, M. and Madelin, M. F. : Studies on the production of perithecial stromata by *Cordyceps militaris* in artificial culture. *Can. J. Bot.* **46**, 473 (1968).
- 8) Sung, H. M., Choi, Y. S., Lee, H. K., Kim, S. H., Kim, Y. O. and Sung, G. H. : Production of fruiting body using cultures of entomopathogenic fungal species. *Kor. J. Mycol.* **27**, 15 (1999).
- 9) Kim, H. W., Kim, Y. H., Fu, C. X., Nam, K. S., Lee, S. J., An, H. S., Jeong, E. H., Yun, S. H., Sung, S. K., Lee, S., J. and Hyun, J. W. : In vitro antitumor activity of ergosterol peroxide isolate from *Cordyceps militaris* on cancer cell lines from Korean patients. *Kor. J. Mycol.* **29**, 61 (2001).
- 10) Cory, J. G., Suhadolnik, R. J., Resnick, B. and Rich, M. A. : Incorporation of cordycepin(3'-deoxyadenosine) into ribonucleic acid of human tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta* **103**, 646 (1965).
- 11) Song, C. H., Jeon, Y. J., Yang, B. K., Ra, K. S. and Sung, J. M. : Anticomplementary activity of exo-polymers produced from submerged mycelial cultures of higher fungi with particular reference to *Cordyceps militaris*. *J. Microb. Biotechnol.* **8**, 536 (1998).
- 12) Shim, J. Y., Lee, Y. S., Lim, S. S., Shin, K. H., Hyun, J. E., Kim, S. Y. and Lee, E. B. : Pharmacological activities of *Paecilomyces japonica* a new type cordyceps sp. *Kor. J. Pharmacogn.* **31**, 163

- (2000).
- 13) Buenz, E. J., Bauer, B. A., Osmundson, T. W. and Motley, T. J. : The traditional Chinese medicine *Cordyceps sinensis* and its effects on apoptotic homeostasis. *J. Ethnopharmacol.* **96**, 19 (2005).
 - 14) Mizuno, T. : Medicinal effects and utilization of *Cordyceps* (Fr.) link (ascomycetes) and *Isaria* Fr. (mitosporic fungi) Chinese caterpillar fungi, "Tochukaso". *Intl. J. Med. Mushroom* **1**, 251 (1999).
 - 15) Ng, T. B. and Wang, H. X. : Pharmacological actions of *Cordyceps*, a prized folk medicine. *J. Pharm. Pharmacol.* **57**, 1509 (2005).
 - 16) Jin, C. Y., Kim, G. Y. and Choi, Y. H. : Induction of apoptosis by aqueous extract of cordyceps *militaris* through activation of caspases and inactivation of Akt in human breast cancer MDA-MB-231 cells. *J. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 1997 (2008).
 - 17) Jeong, J. W., Jin, C. Y., Park, C., Han, M. H., Kim, K. Y., Moon, S. K., Kim, C. G., Jeong, Y. K., Kim, W. J., Lee, J. D. and Choi, Y. H. : Inhibition of migration and invasion of LNCaP human prostate carcinoma cells by cordycepin through inactivation of Akt. *Int. J. Oncol.* **40**, 1697 (2012).
 - 18) Lee, H. M., Lee, Y. J. and Park, T. S. : Tumor growth inhibitory and immunomodulatory activity of *Cordyceps militaris* water extracts in ICR mice bearing sarcoma-180 solid tumor. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **33**, 59 (2004).
 - 19) Ohata, Y., Lee, J. B., Hayashi, K., Fujita, A., Park, D. K. and Hayashi, Y. : In vivo anti-influenza virus activity of an immunomodulatory acidic polysaccharide isolated from *Cordyceps militaris* grown on germinated soybeans. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 10194 (2007).
 - 20) Shin, S., Kwon, J., Lee, S., Kong, H., Lee, S., Lee, C. K., Cho, K., Ha, N. J. and Kim, K. : Immunostimulatory effects of *Cordyceps militaris* on macrophages through the enhanced production of cytokines via the activation of NF- κ B. *Immune Netw.* **10**, 55 (2010).
 - 21) Kim, C. S., Lee, S. Y., Cho, S. H., Ko, Y. M., Kim, B. H., Kim, H. J., Park, J. C., Kim, D. K., Ahn, H., Kim, B. O., Lim, S. H., Chun, H. S. and Kim, D. K. : *Cordyceps militaris* induces the IL-18 expression via its promoter activation for IFN- γ production. *J. Ethnopharmacol.* **120**, 366 (2008).
 - 22) Yu, R., Song, L., Zhao, Y., Bin, W., Wang, L., Zhang, H., Wu, Y., Ye, W. and Yao, X. : Isolation and biological properties of polysaccharide CPS-1 from cultured *Cordyceps militaris*. *Fitoterapia* **75**, 465 (2004).
 - 23) Won, S. Y. and Park, E. H. : Anti-inflammatory and related pharmacological activities of cultured mycelia and fruiting bodies of *Cordyceps militaris*. *J. Ethnopharm.* **96**, 555 (2005).
 - 24) Yu, R. M., Yang, W., Song, L. Y., Yan, C. Y., Zhang, Z. and Zhao, Y. : Structural characterization and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of cultured *Cordyceps militaris*. *Carbohydrate Polym.* **70**, 430 (2007).
 - 25) Chen, C., Luo, S. S., Li, Y., Sun, Y. J. and Zhang, C. K. : Study on antioxidant activity of three *Cordyceps* sp. by chemiluminescence. *Shanghai J. Trad. Chinese Med.* **38**, 53 (2004).
 - 26) Han, E. S., Oh, J. Y. and Park, H. J. : *Cordyceps militaris* extract suppresses dextran sodium sulfate-induced acute colitis in mice and production of inflammatory mediators from macrophages and mast cells. *J. Ethnopharmacol.* **134**, 703 (2011).
 - 27) Kim, J. W. and Kim, C. : Inhibition of LPS-induced NO production by taurine chloramine in macrophages is mediated through Ras-ERK-NF κ B. *Biochem. Pharmacol.* **70**, 1352 (2005).
 - 28) Ha, J. W., Yoo, H. S., Shin, J. W., Cho, J. H., Lee, N. H., Yoon, D. H., Lee, Y. W., Son, C. G. and Cho, C. K. : Effects of *Cordyceps militaris* extract on tumor immunity. *Kor. J. Ori. Med.* **27**, 12 (2006).
 - 29) Liu, J., Yang, S., Yang, X., Chen, Z. and Li, J. : Anticarcinogenic effect and hormonal effect of *Cordyceps militaris*. *Zhongguo Yao Za Zhi* **22**, 111 (1997).
 - 30) Kim, H. J., Lee, T. H., Kwon, Y. S., Son, M. W. and Kim, C. : Immunomodulatory activities of ethanol extract of *Cordyceps militaris* in immunocompromised mice. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **41**, 494 (2013).
 - 31) Abbas, A. K., Lichtman, A. H. and Pober, J. S. : Cellular and molecular immunology. 3rd eds., W. B. Saunders Company. Philadelphia, PA. p. 229 (1998).
 - 32) Abbas, A. K., Murphy, K. and Sher, A. : Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* **383**, 787 (1996).
 - 33) Asadullah, K., Sterry, W. and Volk, H. D. : Interleukin-10 therapy - review of a new approach. *Pharmacol. Rev.* **55**, 241 (2003).
 - 34) Jo, W. S., Choi, Y. J., Kim, H. J., Lee, J. Y., Nam, B. H., Lee, J. D., Lee, S. W., Seo, S. Y. and Jeong, M. H. : The anti-inflammatory effects of water extract from *Cordyceps militaris* in murine macrophage. *Kor. J. Mycol.* **38**, 46 (2010).
 - 35) Kim, H. Y., Kim, K. H., Han, S. H., Lee, S. J., Kwon, J. H., Lee, S. W. and Kim, K. J. : Activation of macrophages by the components produced from *Cordyceps militaris*. *Immune Netw.* **7**, 57 (2007).
 - 36) Lee, Y. S., Kim, H. S., Kim, S. K. and Kim, S. D. : IL-6 mRNA expression in mouse peritoneal macrophages and NIH3T3 fibroblasts in response to *Candida albicans*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **10**, 8 (2000).
 - 37) Higuchi, M., Higashi, N., Taki, H. and Osawa, T. : Cytolytic mechanism of activated macrophages. tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act synergistically as

- the major cytolytic mechanism of activated macrophages. *J. Immunol.* **144**, 1425 (1990).
- 38) Chen, C. C., Wang, J. K., Chen, W. C. and Lin, S. B. : Protein kinase C η mediates lipopolysaccharide-induced nitric-oxide synthase expression in primary astrocytes. *J. Biol. Chem.* **273**, 19424 (1998).
- 39) Kim, H. G., Shrestha, B., Lim, S. Y., Yoon, D. H., Chang, W. C., Shin, D. J., Han, S. K., Park, S. M., Park, J. H. and Park, H. I. : Cordycepin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation by the suppression of NF- κ B through Akt and p38 inhibition in RAW 264.7 macrophage cells. *Eur. J. Pharm.* **545**, 192 (2006).
- 40) Choi, J. H., Kim, G. S., Lee, S. E., Cho, J. H., Sung, G. H., Lee, D. Y., Kim, S. Y., Lee, T. H. and Noh, H. J. : Anti-inflammatory effects of *Cordyceps militaris* extracts. *J. Mushroom Sci. Prod.* **10**, 249 (2012).
- 41) Shin, S. M., Park, Y. H., Kim, S. A., Oh, H. E., Ko, Y. W. Han, S. H., Lee, S. J., Lee, C. K., Cho, K., H. and Kim, K. J. : *Cordyceps militaris* enhances MHC-restricted antigen presentation via the induced expression of MHC molecules and production of cytokines. *Immune Netw.* **10**, 135 (2010).