

눈꽃 동충하초의 약물활성

심진영, 이연실, 임순성, 신국현,* 현진이, 김성연, 이은방

서울대학교 천연물과학연구소

Pharmacological Activities of *Paecilomyces japonica*, A New Type Cordyceps sp.

Jin Young Shim, Yeon Sil Lee, Soon Sung Lim, Kuk Hyun Shin,*

Jin Ee Hyun, Seung Yeun Kim and Eun Bang Lee

Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea

Abstract – Cordyceps is reputed for its broad biological activities and as a tonic for replenishing vital function in Chinese traditional medicines. As an attempt to obtain fundamental data for the development of a new type Cordyceps, the effects of the fruiting bodies of cultivated fungus of *Paecilomyces japonica* grown on silkworm larvae on hyperglycemia induced by streptozotocin(STZ) and by epinephrine in rats and in mice as well as on immunological functions in mice were investigated. The 70% methanol extract of the fungus, when administered orally at 100 and 300 mg/kg in STZ-induced hyperglycemic rats, caused a significant decrease in blood glucose level 3 hr after sample treatments. The methanol extract, when administered p.o. at the same dose levels in epinephrine-induced hyperglycemic mice, also caused a significant decrease in serum glucose levels as well as a significant reversal of the liver glycogen contents suggesting its hypoglycemic activity might be due to glycogen breakdown in the liver. Treatment of normoglycaemic mice with the methanol extract of the fungus exhibited a significant glucose tolerance up to 3 hr after oral glucose load(2.0 g/kg). The methanol extract also showed immuno-stimulating activity as measured by carbon clearance in mice and a significant antifatigue effect as measured by weight loaded forced swimming performance in mice.

Key words – *Paecilomyces japonica*; Cordyceps sp.; silkworm larvae; epinephrine; streptozotocin; hyperglycemia; carbon clearance; swimming performance

동충하초는 다양한 곤충기생성 균류가 주로 곤충에 침입하여 이를 기주로 자실체를 형성하거나 총체상에 포자과를 형성하는 버섯의 일종으로 곤충과 거미 이외에도 일부 균류에 기생하여 발생한 자실체도 포함하여 동충하초라 한다.¹⁾

전세계적으로 약 100속 750여종이 분포되어 있으며²⁾ 그 중 대표적인 동충하초속으로는 원전세대의 유성생식 기관으로 자낭균류(Ascomycetes)의 맥각균과(Clavicipitaceae)에 속하는 Cordyceps 속과 불완전균류의 Paecilomyces속, Torrubiella속 및 Podonectria 속 등이며 자실체를 형성하는 대표적인 Cordyceps속

은 전세계적으로 300여종이 분포되어 있는 것으로 알려져 있다.¹⁾

자실체를 형성하는 일부 동충하초는 고대로부터 중국에서 인체의 활력을 보하는 불로장생의 비약으로 인식되어 왔으며 특히 전통적으로 한방에서 이용되고 있는 대표적인 동충하초는 박쥐나방의 유충을 기주로 자실체를 형성하는 *Cordyceps sinensis*로서 매우 다양한 약물활성을 발현한다는 사실이 입증되고 있다.^{3,4)}

그러나 천연에서 얻어지는 진품 동충하초는 매우 희귀하여 그 원료의 확보가 어렵기 때문에 진품과 유사한 작용이 있는 새로운 형의 동충하초의 개발연구가 많은 연구자들에 의하여 추진되어 왔으며 그 결과 중국의 국립약물연구소에서(Institute of Materia Me-

*교신저자 : Fax : 02-762-8322

dica) 천연 동충하초로부터 새로운 발효산물인 Cs-4의 분리에 성공하였으며 진포과 유사한 활성과 활성성분의 구별이 이루어진 바 있다. 연구자들은 이와같은 연구사실을 바탕으로 새로운 형의 동충하초 개발의 일환으로 누에의 번데기에 불완전세대 균주의 하나인 *Paecilomyces japonica*를 접종하여 생성한 눈꽃동충하초에 대한 약물활성을 추적하여 다양한 생물활성을 나타냄을 보고한 바 있다.⁵⁾ 본 연구에서는 건조누에에 균주를 접종하여 생성한 눈꽃동충하초의 혈당강하효과를 중심으로 약물활성을 탐색한 결과를 보고한다.

재료 및 방법

실험재료 - 눈꽃동충하초는 (주)이우양행에서 4-5주령의 건조누에에 동충하초균(*Paecilomyces japonica*)을 접종하여 인공재배에 의하여 생산한 것(Patent 출원 No.99-33529)을 제공받아 70% methanol로 가온 추출한 것을 동결건조하여 실험에 사용하였으며 그 표본은 이우양행에 보관하였다.

Streptozotocin, epinephrine, glycogen, α -tocopherol, zymosan 등은 Sigma Chem. Co.에서 구입하였으며 Glucose analysis kit는 영동제약(서울)에서 구입하였으며 다른 시약과 용매는 일급시약을 구입하였다.

실험동물 - 실험동물로서 서울대학교 천연물과학연구소에서 계대 사육한 순계 ICR계 웅성마우스(20-30 g)와 Sprague-Dawley 웅성랫트(180-250 g)를 사용하였으며 12시간/day and night cycle($22 \pm 2^\circ\text{C}$)로 air-condition을 유지한 동물실험실에서 적응시켰으며 고행사료 및 식수를 공급하였다.

고혈당에 미치는 효과의 측정 - Streptozotocin (STZ)으로 유도된 고혈당은 체중 180-210 g의 웅성랫트를 사용하여 유발시켰다. 즉, ketamine 100 mg/kg을 근육내 주사하여 마취시킨 후 꼬리정맥에 pH 4.5의 citrate buffer에 용해한 STZ를 60 또는 50 mg/kg씩 투여하고 혈당치가 안정 될 때까지 1주일간 관찰한 후 혈당치가 300 mg/dl 이상이 되는 동물만을 당뇨쥐로 간주하여 실험에 사용하였다. 혈당치가 안정화된 쥐 10마리를 1군으로 하고 혈액을 채취한 후에 시료를 12시간 간격으로 4회 경구투여 하였다. 마지막 시료 투여 후 1시간 간격으로 4시간까지 각각 혈액을 채취하고 3000 g에서 30분간 원심분리하여 혈청을 분리한 후 glucose analysis kit(영동제약)를 사용하여 혈당을 측정하였다.

Epinephrine 으로 유도된 고혈당은 체중 20-30 g의 웅성마우스를 사용하여 유발시켰다. 즉, 1주야 절식시킨 마우스 8마리를 1군으로 하고 시료를 경구투여하고 4시간 후 epinephrine을 0.6 mg/kg씩 복강내 주사한 다음 1시간 후 경동맥으로부터 채혈하고 3000 g에서 20분간 원심분리하여 혈청을 분리한 후 glucose analysis kit를 사용하여 혈당을 측정하였다.

간의 glycogen 함량 측정 - Epinephrine으로 고혈당을 유발시킨 마우스의 간 glycogen 함량을 Johnson and Fusaro⁷⁾ 등의 방법에 준하여 측정하였다. 즉, epinephrine으로 고혈당을 유발시킨 마우스의 간을 제거하고 30% KOH (100 mg/2 ml)를 가하여 끓은 물로 20분간 가열 추출하였다. 반응액에 ethanol을 가하여 4°C 에서 1시간 방치 후 3000 g로 15분간 원심분리(2회)하였다. 생성된 침전을 합하여 desiccator에서 건조한 후 물에 용해시킨 것을 anthrone-sulfuric acid 법에 의해 glucose 함량을 측정하였다.

내당효과의 측정 - 마우스 10마리를 1군으로 하여 실험 하루 전날 절식시킨 후 시료를 경구투여하고 4시간 후 2 g/kg 씩 glucose를 경구투여한 후 30분, 60분 및 120분 간격으로 채혈하고 혈청을 분리한 다음 glucose 함량을 측정하였다.⁸⁾

강제수영법에 의한 항피로효과 측정 - 마우스 12~13마리를 1군으로 하여 꼬리근부로부터 2.5 cm되는 부위에 체중의 5.5%에 해당하는 무게의 분동을 부착시키고 각각의 방으로 분리된 항온조에서 $33 \pm 2^\circ\text{C}$ 를 유지하면서 강제수영을 시킨 다음 마우스가 5초간 완전히 수중에 잠수하는 시간까지를 수영시간으로 하였다.⁹⁾

Carbon 탐식능에 미치는 효과의 측정 - Carbon의 탐식능 측정은 Wagner 등의 방법¹⁰⁾에 준하여 실시하였다. 마우스에 시료를 3일간 경구투여하고 최종시료 투여 1시간 후에 colloidal carbon 용액(saline으로 8배 희석한 rotring ink, 1% glectine 함유, $40 \sim 70^\circ\text{C}$ 로 가온)을 $10 \mu\text{g/g}$ b.w 씩 꼬리정맥 주사한 다음 안와정맥으로부터 3, 6, 9, 12 및 15분 간격으로 채혈하여 0.1% Na_2CO_3 에 포집하여 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도로부터 경시적으로 carbon 농도의 변화를 plot하여 얻은 회귀직선으로부터 회귀계수의 비(시료투여군/대조군)를 구하여 carbon 탐식능을 구하였다.

통계처리 - 모든 실험의 측정치는 student-t test로 통계 처리하여 대조군과의 유의성 차를 검정하였으며 STZ 유발 당뇨쥐의 혈당치의 값은 시료 투여전의 혈

당치를 100으로 하여 그 상대적인 수치로 표시하였다.

실험결과 및 고찰

STZ로 유발한 당뇨병에 미치는 효과는 꽃 동충하초 70% methanol추출물이 STZ로 유발시킨 고혈당 쥐에 미치는 효과를 측정된 결과를 Table I 및 II에 표시하였다. Table I에서 보는바와 같이 STZ 60 mg/kg으로 고혈당을 유발시킨 흰쥐에서 10마리를 1군으로 하고 동충하초 추출물을 0.5% CMC에 현탁시켜서 100 mg/kg 및 300 mg/kg 씩 12시간 간격으로 4회 경구투여하고 마지막 시료 투여후 1시간 간격으로 채혈하여 그 혈당을 측정된 결과, 눈꽃 동충하초 100 mg/kg경구투여군의 경우 3 및 4시간 후에는 혈당의 강하경향을 보였지만 유의성 있는 차이는 아니었으나 300 mg/kg경구투여군에서는 3시간만에 통계적으로 유의성 있는 혈당강하효과가 관찰되었다. 이 효과는 대조약물인 glibenclamide 10 mg/kg투여군 보다는 약간 약하나 유사한 혈당감소 경향을 보임을 알 수 있다. STZ의 50 mg/kg투여로 고혈당을 유발시킨 동물군의 경우에도 눈꽃 동충하초 300 mg/kg을 투여한 3시간만에 유의성 있는 혈당강하효과를 나타내었다.

동충하초 추출물이 마우스에서 epinephrine 유발 고혈당에 미치는 효과를 측정된 결과를 Fig. 1에 표

시하였다. epinephrine 0.6 mg/kg 복강내 투여 후 1시간 만에 대조군의 혈당이 정상동물군에 비하여 약 152% 증가하여 매우 강한 고혈당이 유발된 것을 관찰할 수 있었으나 동충하초 추출물 100 mg/kg 및 300 mg/kg 씩 단일회 경구투여로 각각 혈당이 45.6 및 52.3%씩 현저히 감소하여 강력한 혈당강하효과가 관찰되었다. 대조약물인 tolbutamide 100 mg/kg 투여군에 비하여 우수한 혈당강하효과를 보였다.

한편 epinephrine투여 후 간을 적출하여 glycogen 함량을 측정된 결과 Fig. 2에서 보는바와 같이 대조군의 경우 정상군의 그것에 비해 간의 glycogen함량이 약 140% 감소하였으나 동충하초 300 mg/kg 경구투여로 대조군에 비해 약 65% 유의성있는 회복을 보임을 관찰하였다. 일반적으로 epinephrine유발 고혈당은 epinephrine에 의하여 간의 glycogen의 분해가 촉진되기 때문인 것으로 설명할 수 있으며¹¹⁾ 본 실험에서 동충하초 투여로 현저한 혈당강하에 따라 간의 glycogen의 회복이 일어나는 것으로 미루어 보아 epinephrine에 의한 고혈당에 대한 동충하초의 혈당강하 효과는 간의 glycogen분해 억제에 기인하는 것으로 추정되며 glyconeogenesis의 억제¹¹⁾나 말초의 당이용의 증가나 직접적으로 insulin분비를 촉진하기 때문일 가능성도 있다.

일반적으로 포도당, 아미노산, 지방산등의 energy원 들은 체장 hormone에 의해 조절되며 이 중 포도당

Table I. Effect of Dongchunghacho on diabetes rats (STZ 60 mg/kg, i.v.)

Group	Dose (mg/kg)	No. of animals	Relative serum glucose concentration(mg/100 ml)				
			Before administration	1 hr after administration	2 hr after administration	3 hr after administration	4 hr after administration
Control	-	10	100	103.2 ± 4.9	99.2 ± 6.4	97.6 ± 6.7	91 ± 5.6
Dongchunghacho	100	10	100	109 ± 6.6	101.2 ± 5.9	90.3 ± 6.1	90.1 ± 5.8
	300	10	100	89.7 ± 6.9	95.9 ± 6.5	86.7 ± 6.2*	88.4 ± 8.9
Glibenclamide	10	10	100	105 ± 6.6	103.4 ± 7.2	81 ± 3.9***	86.7 ± 3.9**

All data represent the mean ± S.E.M.

Significantly different from the control group; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

Table II. Effect of Dongchunghacho on diabetes rats (STZ 50 mg/kg, i.v.)

Group	Dose (mg/kg)	No. of animals	Relative serum glucose concentration(mg/100 ml)				
			Before administration	1 hr after administration	2 hr after administration	3 hr after administration	4 hr after administration
Control	-	10	100	104.4 ± 6.7	105.5 ± 7.2	107.6 ± 11.3	103.4 ± 9.1
Dongchunghacho	100	10	100	112.1 ± 9.3	112.5 ± 5.4	106 ± 2.9	108.4 ± 8.2
	300	10	100	108.3 ± 3.7	106.4 ± 2	93.2 ± 2.9*	99.9 ± 6.2
Glibenclamide	10	10	100	95.1 ± 2.4	96.8 ± 3.4	89.7 ± 4.2*	95.8 ± 4.6

All data represent the mean ± S.E.M.

Significantly different from the control group; *p<0.05

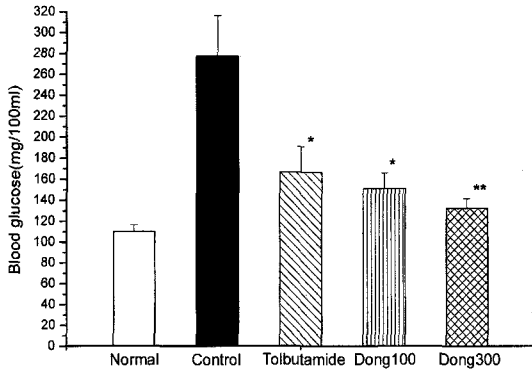


Fig. 1. Effect of “Dongchunghacho” on blood glucose levels of epinephrine-induced hyperglycemic mice. Mice were administered p.o with samples dissolved in saline. Four hours later, epinephrine (0.6 mg/kg i.p) was administered and blood glucose was collected one hour later. Each value represents the mean±S.E.M. of 8 mice. Significantly different from the control; * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$.

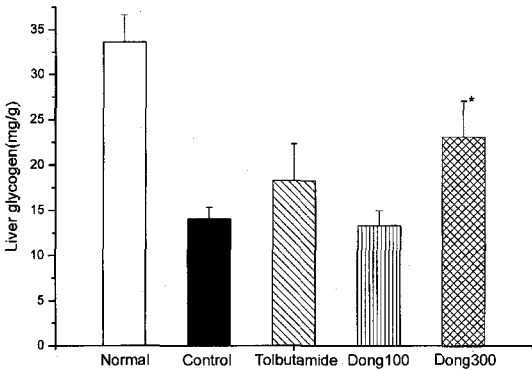


Fig. 2. Effect of “Dongchunghacho” on liver glucose levels of epinephrine-induced hyperglycemic mice. Mice were administered p.o with samples dissolved in saline. Four hours later, epinephrine (0.6 mg/kg i.p) was administered and blood glucose was collected one hour later. Each value represents the mean±S.E.M. of 8 mice. Significantly different from the control; * $p < 0.05$.

은 insulin분비의 주 signal이 됨으로¹¹⁾ 일정기간 사이에 포도당은 대량 투여시 내성 test에 의해서 insulin reserve의 유무를 검증할 수 있다. Fig. 3에서 보는바와 같이 1주야 절식시킨 정상 쥐에서 동충하초 100-300 mg/kg 경구투여로 당 투여후 2시간까지 경시적으로 현저한 내당 효과를 발현함을 알 수 있다.

이상의 실험결과들에 비추어 눈꽃동충하초는 현저한 insulin resistance를 일으키는 제 2형 당뇨

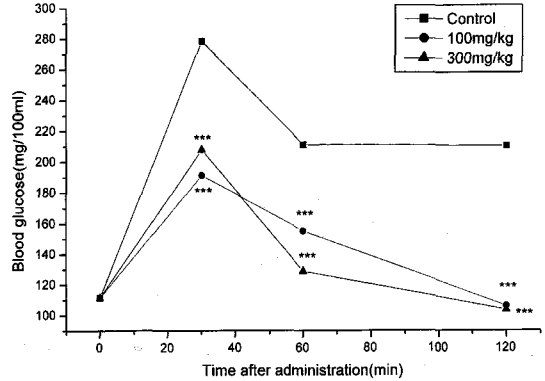


Fig. 3. Glucose tolerance test of “Dongchunghacho” Normal mice (20-31 g) were fasted overnight (18 h) and administered p.o. with samples 4 h before oral glucose administration (2.0 g/kg). Values are the mean±S.E.M. of 8 mice. Significantly different from the control; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

에 유효하며 STZ 유발 고혈당에 대한 억제효과도 나타나는 점으로 미루어 보아 insulin분비와 관계가 있는 제 1형 당뇨에도 완전한 효능이 있는 것으로 추정된다.

눈꽃동충하초가 면역세포의 탐식능에 미치는 효과 - 눈꽃동충하초의 물 또는 메탄올 추출물은 복강내 투여시 *in vivo*에서 현저한 carbon입자의 탐식능 증진효과가 있음을 보고한 바 있다.⁵⁾ 눈꽃동충하초의 알콜추출물을 경구투여시에도 면역기능증진효과가 있는가를 추적하기 위하여 마우스에 알콜추출물 50, 100 mg/kg씩 3일간 경구투여하고 carbon입자의 탐식능 측정에 의하여 면역기능에 미치는 효과를 측정한다. 결과 각각 회귀계수의 비가 1.25 및 1.41로서 대조약물인 zymosan(복강투여)에 비하여는 약하나 유의성 있는 면역기능 증진효과를 나타냄을 확인하였다 (Table III).

한편 눈꽃동충하초의 추출물의 항피로효과를 측정하기 위해서 마우스에 각각 50 mg/kg 및 100 mg/kg씩 3일간 경구투여하고 최종투여 2시간후 강제수영법에 의하여 수영시간을 측정한다. 결과 Fig. 4에서 보는바와 같이 대조군에 비하여 각각 79.4% 및 100.9% 증가함을 관찰하였으며 100 mg/kg 투여량에서 대조약물 α -tocopherol acetate 투여군 보다도 강력한 수영시간 연장효과를 발현하였다.

이와같은 결과는 눈꽃동충하초가 면역증강효과로 말미암아 항피로효과와 증진이 일어나는 것이 아닌가 추정된다.

Table III. Effects of the test samples on carbon clearance in mice

Treatment	Dose (mg/kg, p.o., i.p.)	Regression coefficient ^{a)}	R _{Ctrl} /R _{Cc}	index ^{b)}
Dongchunghacho	50	0.0257 ± 0.0015	1.25	1
	100	0.0288 ± 0.0017	1.41	1
Zymosan	50	0.04159 ± 0.0012	2.03	2
Control	-	0.0205 ± 0.0018	-	0

Mice were administered orally with test extracts for 3 consecutive days and tests were performed 1 h after the final administration of test samples.

Zymosan, positive control, was administered i.p. with concentration of 50 mg/kg b.w.

Each test samples was dissolved in saline.

^{a)}Each values are the mean ± S.E.M. of regression coefficient.

^{b)}Index indicates the immunostimulating activity, *Index* : 2 (R_{Ctrl}/R_{Cc} =>1.5: very active), 1 (R_{Ctrl}/R_{Cc} =<1.5: active), 0 (R_{Ctrl}/R_{Cc} =>1.0: not active)

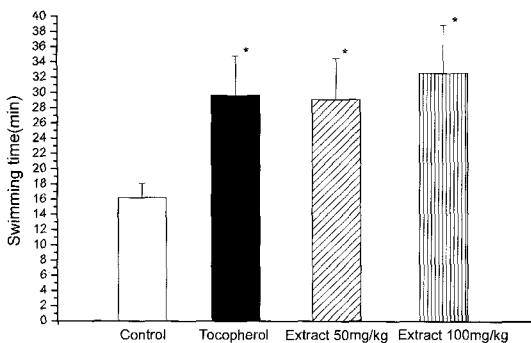


Fig. 4. Effect of “Dongchunghacho” on swimming performance mice.

Mice were administered orally with test extracts for 3 consecutive days. The test was performed 2 h after the final administration of test samples. Data represent the mean ± S.E.M. Significantly different from the control group; *p<0.05.

사 사

본 연구논문은 (주) 이우양행의 연구지원과 2000년 두뇌한국 21사업 핵심분야에 의하여 지원되었다

인용문헌

1. Kobayashi, Y and Shimizu, D.(1983). Iconography of vegetable wasps and plant worms. Hoikusha Pub. Co. Ltd., Osaka. p280.
2. Samson, R. A., Evans, H. C. and Latge, J. P.(1988). Atlas of Entomopathogenic Fungi. Springer. Heidelberg. p-189.
3. Zhu, J. S., Halpern, G. M. and Jones, K. (1998). The scientific rediscovery of an ancient Chinese herbal medicine: *Cordyceps sinensis*. Part I. *J. Altern. Complement. Med.* 4(3); 289-303.

4. Zhu, J. S., Halpern, G. M. and Jones, K. (1998). The scientific rediscovery of an ancient Chinese herbal medicine: *Cordyceps sinensis*. Part II. *Ibid.* 4(4); 429-457.
5. Shin, K. H. Screening and evaluation of pharmacologically active principles from cultivated fungus of *Cordyceps* sp. growing on the silkworm, *Bombyx mori* L. in The Final Report of the Collaborative Research of National Sericulture and Entomology Research Institute, Ruaral Development Administration(1998). P 69-171.
6. Tutuiler, G. E, Joseph, J. and Wallace, N.(1985). Effect of methyl palmoxirate, an oral hypoglycemic agent, on epinephrine-induced hyperglycemia in the rat. *Biochem. Pharmacol.* 34: 2217-2220.
7. Johnson J. A. and Fusaro R. M.(1966). The quantitative enzymic determination of animal liver glycogen. *Anal. Biochem.* 15: 140-149.
8. Mariam, A., Asmawi, M. Z. and Sadikun.(1996). Hypoglycemic activity of the aqueous extract of *Orthosiphon stamineus*. *Fitoterapia* 57(5): 465-468.
9. Busnel, R. G. and Lehmann, A. G.(1980). Antagonic effect of sodium ascorbate on ethanol-induced changes in swimming of mice. *Behavioral Brain Res.* 1: 351-356.
10. Wagner, H., Proksch, A., Riess-Maurer, I., Vollmar, A. Odenthal, S., Stuppner, H., Jurcic, K., Le Turdu, M. and Fang, J. N.(1985). Immunstimulierend. wirkende Polysaccharide(Heteroglykane) aus hoheren Pflanzen. *Arzneim-Forsch.* 35: 1069-1075.
11. Lee, S. M., Tutwiler, G., Bressler, R., and Kircher, C. H.(1982). Metabolic control of prevention of nephropathy by 2-tetradecylglycidate in the diabetic mouse (db/db). *Diabetes* 31(1): 12-18.

(2000년 5월 12일 접수)