

## *Cordyceps militaris*로부터 분리한 Ergosterol Peroxide의 한국인 암세포주에 대한 항암작용

김하원<sup>1\*</sup> · 김영호<sup>2</sup> · 채홍복<sup>2</sup> · 남경숙<sup>1</sup> · 이승정<sup>1</sup> · 안혜숙<sup>1</sup> · 정은호<sup>1</sup>  
윤승현<sup>1</sup> · 성수경<sup>1</sup> · 이성진<sup>1</sup> · 현진원<sup>3</sup>

<sup>1</sup>서울시립대학교 생명과학과, <sup>2</sup>충남대학교 약학대학, <sup>3</sup>서울대학교 의과대학 약리학교실

### *In vitro* Antitumor Activity of Ergosterol Peroxide Isolated from *Cordyceps militaris* on Cancer Cell Lines from Korean Patients

Ha Won Kim<sup>1\*</sup>, Young Ho Kim<sup>2</sup>, Cai Xing Fu<sup>2</sup>, Kyong Suk Nam<sup>1</sup>, Seung Jung Lee<sup>1</sup>,  
Hye Suk An<sup>1</sup>, Eun Ho Jeong<sup>1</sup>, Seung Hyun Yun<sup>1</sup>, Su Kyong Sung<sup>1</sup>,  
Sung Jin Lee<sup>1</sup> and Jin Won Hyun<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Life Science, University of Seoul, Seoul 130-743, Korea

<sup>2</sup>College of Pharmacy, Chung Nam National University, Daejeon 305-764, Korea

<sup>3</sup>Department of Pharmacology, College of Medicine, Seoul National University, Seoul 110-799, Korea

**ABSTRACT:** Entomopathogenic fungus of *Cordyceps militaris* is famous of its medicinal efficacies. An antitumor compound was purified from the n-hexane extract of artificially cultivated fruiting bodies of *C. militaris* and identified as ergosterol peroxide (5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epidioxy-24(R)-methylcholesta-6,22-dien-3 $\beta$ -ol, C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>O<sub>3</sub>) mainly by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C-NMR spectroscopic techniques. When the antitumor activity of ergosterol peroxide was measured against 3 tumor cell lines from Korean cancer patients, it showed the most strong activity against gastric cancer SNU-1 cell line 3 days after treatment. The 50% inhibitory concentrations (IC<sub>50</sub>) of ergosterol peroxide 6 days after treatment were 75.8  $\mu$ g/ml for human gastric SNU-1 tumor cell line, 39.7  $\mu$ g/ml for human colorectal SNU-C4 tumor cell line and 32.7  $\mu$ g/ml for human hepatoma SNU-354 cell line.

**KEYWORDS:** Antitumor Activity, *Cordyceps militaris*, Ergosterol Peroxide, MTT Assay

동충하초는 분류학상으로 자낭균문의 핵균강의 맥각균목의 동충하초과에 속하는 버섯이며 겨울에는 곤충의 몸에 기생하고 있다가 여름에는 발아하여 자실체를 형성하는 버섯이다. 주로 곤충의 애벌레 또는 충체의 장 또는 마디에 기생하다가 온도와 습도가 높은 여름철에 증식하여 발아하며 한국을 비롯하여 중국, 일본 등 세계적으로 널리 분포하고 있다. 동충하초는 옛부터 약용으로 많이 사용되었으며, 그 용도에 대하여는 1757년의 청나라시대에 쓰여진 본초종신(本草從新) 권 1에 '동충하초는 맛이 달고 폐를 보하고 신장을 이롭게 하며 지혈시키고 가래를 삭이거나 결핵성 기침을 치료한다(冬蟲夏草 甘平保肺益腎止血化痰已勞咳)'고 기록하고 있다. 그러나 실체는 그보다 훨씬 이전인 진시황 때부터 지양강장과 불로장수약으로 알려졌다(溝口勝, 1999). 중국에서 약용으로 사용되고 있는 동충하초는 *Cordyceps sinensis*(락취나방동충하초), *C. militaris*(번데기동충하초), *C. ophiogloides*(군핵동충하초), *C. soborifera*(매미다발동충하초), *C. martialis*(유충흡색다발동충하초) 등이다. 우리 나라에는 지금까지 70여종의 동충하초가 보

고되어 있으며, 그 중에서 *C. militaris*의 인공재배가 활발히 이루어지고 있다(성, 1996). 동충하초의 화학적 성분은 수분, 지방, 조단백, 조섬유질, 탄수화물, 회분 등이 알려져 있으며 생리활성을 나타내는 2차대사산물에 대해서는 번데기동충하초의 cordycepin을 제외하고는 잘 연구되어 있지 않다.

눈꽃동충하초(*Paecilomyces tenuipes*)의 약물활성에 대하여는 쥐에서 혈당 강하작용, 면역기능 증진효과, 항피로효과 등이 보고된 바가 있다(심 등, 2000). 번데기동충하초의 인공재배법에 관한 연구도 진척되어 인공 자실체 생산법(성 등, 1999; 최 등, 1999)이 보고된 바가 있으며, 수용성 단백질의 전기영동법에 의한 근연관계 규명(성 등, 1998) 등이 확립되어있다. *C. militaris*에서 1951년에 Cunningham 등에 의해 최초로 약효물질인 cordycepin이 분리되어 3'-deoxyadenosine의 구조임이 밝혀졌으며(Cunningham 등, 1951; Kaczka 등, 1964; 自然藥食微生物研究所, 1998), *C. sinensis*에도 cordycepin이 존재함은 1996년에 와서야 밝혀지게 되었다(Chen and Chu, 1996).

이 물질은 *Bacillus subtilis*를 비롯하여 다양한 세균에 항균작용을 나타냄과 동시에 항암작용이 있음이 보고되었

\*Corresponding author <E-mail: hwkim@uoscc.uos.ac.kr>

으며, 약리작용에 관하여는 전 세계적으로 매우 상세히 연구되었다. 즉, cordycepin은 3'-deoxyadenosine으로써 adenine의 유도체이므로 cordycepin이 암세포의 DNA와 RNA의 adenine 대신에 삽입되어 항암작용을 발휘함이 보고되었으며(Cory 등, 1965), 그 후 사람의 HeLa 세포에서도 cordycepin이 핵의 RNA 합성을 억제시킨다는 것이 밝혀졌다(Siev 등, 1969). Cordycepin은 바이러스의 증식을 억제시킴도 밝혀졌는데 RNA형의 발암바이러스의 증식을 억제시킴이 보고되었다(Richardson 등, 1975). 마우스의 태아 간 세포에서 cordycepin은 globin의 mRNA 합성을 억제시켰다. 이것은 리보솜 RNA 합성을 억제시킴과 동시에 tRNA의 합성을 억제시킨 것에 기인한 것이었다(Beach and Ross, 1978). 또한 쥐의 뇌세포에 소량의 cordycepin을 가하였을 때, 짧은 poly(A)를 가진 hnRNA의 합성에는 영향을 미치지 못하였지만 긴 poly(A)를 가진 hnRNA의 합성은 억제시켰다(Kuznetsov 등, 1983).

Ergosterol peroxide는 식물을 비롯하여 각종 진균류에서 분리하여 보고된 바가 있으며, 그 생리활성은 사람의 알러지질환을 억제하여 면역효과를 나타낸다는 보고(Kreisel 등, 1990), 인플루엔자 바이러스의 증식억제작용(Lindequist 등, 1989b), 클로렐라에서 분리한 ergosterol peroxide가 TPA에 의한 발암작용을 강력히 억제시킨다는 보고(Yasukawa 등, 1996) 등이 있다.

본 연구에서는 번데기동충하초의 자실체로부터 항암성분으로써 ergosterol peroxide를 순수분리하여 그 화학구조를 밝혔으며, *in vitro*에서 한국인의 암환자로부터 유래한 각종 암세포에서 우수한 항암작용을 나타내었기에 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

본 연구에 사용된 시료는 강원대학교 동충하초은행의 균주로 인공재배된 번데기동충하초(*C. militaris*)를 제공받아 사용하였다. 항암성분을 추출하기 전에 현미를 제거하고 번데기동충하초의 자실체만 사용하였다. 인체유래의 암세포를 배양하는데 필요한 배지의 성분인 RPMI-1640, fetal bovine serum(FBS), penicillin, streptomycin은 GIBCO BRL(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. MTT, trypsin-EDTA, dimethylsulfoxide(DMSO)은 Sigma 회사(Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 성분 분리시 사용된 n-hexane, methanol, acetone, dichloromethane 등은 Tedia Co.(Fairfield, OH, USA)의 특급 시약을 사용하였다.

### 분석 기기

용점은 Electrothermal IA9100 용점측정기(England)를 사용하였으며 보정하지 않았고, 선광도는 JASCO DIP-370 digital polarimeter(Tokyo, Japan)를 사용하였다. Infrared(IR) spectrum은 JASCO IR Report-100 spectrophotometer

(Tokyo, Japan)를 사용하였다.  $^1\text{H}$ - 및  $^{13}\text{C}$ -NMR 스펙트럼은 CDCl<sub>3</sub>를 용매로 하여 Bruker DRX 300 spectrometer(Bruker Co., Germany)를 사용하여 측정하였다. Electrospray ionization(ESI) 및 fast atom bombardment(FAB) mass spectrum은 각각 ESI-MS spectrometry(VG flatform, UK)과 FAB-MS spectrometry(JEOL JMS-HX 110, Japan)를 사용하여 측정하였다. Column chromatography 용 silica gel은 Kieselgel 60(230-400 mesh, Merck, Darmstadt, Germany)을 사용하였으며, TLC는 pre-coated 60 F254 plates(E. Merck)를 사용하였으며, 10% aqueous H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>으로 발색하여 반점을 확인하였다.

### 항암성분의 순수분리 및 구조분석

번데기함유배지에서 인공 재배된 번데기동충하초 *C. militaris*를 현미로부터 분리한 뒤 완전히 건조하여 2kg의 시료를 준비하였다. 추출효율을 높이기 위하여 60°C에서 6시간 동안 n-hexane으로 3번에 걸쳐 추출하였다. 추출한 n-hexane용액을 40°C에서 감압하여 농축시킨 후 230~400 mesh의 silica gel(290 g)로 만든 직경 4 cm, 높이 55 cm의 컬럼에 가하였다. 먼저 dichloromethane(2 l)을 컬럼에 통과시켜 안정화시켰다. 그 다음으로 1%의 MeOH이 섞인 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeOH = 99 : 1)로 용출시켜 각각의 분획들을 분리하였다. 용출은 1 ml/min의 속도로 실시하였다. 2% MeOH를 이용한 용출에서 분획 I과 분획 II를 분리하였고, 3% MeOH 용액에서 분획 III을 분리하였다. 마지막으로 4% MeOH 용액을 이용하여 분획 IV를 분리하였다. 한편 분획 III은 다시 silica gel 컬럼을 이용하여 더욱 정제하였다.

분획 III은 230~400 mesh의 silica gel(200 g)로 직경 3 cm, 높이 64 cm 길이의 컬럼에서 정제하였다. 즉 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(2 l)으로 컬럼을 용출시키면서 안정화시킨 후, 1%의 acetone이 섞인 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: acetone = 99 : 1)을 통과시켰다. 분리시 acetone은 1%에서 시작하여 5%까지 농도를 높였다. 분리한 분획을 40°C에서 감압하에서 농축시킨 후 2 ml의 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>를 넣어 재결정하여 무색의 육각 기둥 모양의 결정을 얻었다. 얻어진 화합물의 구조분석을 위해서 용점, 선광도 등의 물리화학적 성질을 조사하였고, IR, NMR, MS 등의 spectral data를 측정하여 화합물의 구조를 동정하였다.

### 암세포의 배양

한국인의 암세포로부터 분리한 위암세포주(SNU-1), 간암세포주(SNU-354), 직장암세포주(SNU-C4)는 한국세포주은행에서 구입하였다. SNU-1은 비부착 세포인 반면에 SNU-C4와 SNU-354의 경우는 플라스크 바닥에 단층으로 부착하여 자라는 세포주이다. 부착하여 자라는 세포는 trypsin-EDTA 처리 후 계대배양하였다. 모든 세포주는 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin이 포함된 RPMI-1640 배지를 이용하여 배양하였다. 세포의 건강 상태와 생사 여부는 위상차 현미경으로 먼저 관찰한 후 trypan blue dye exclusion 법을 이용하여 항상 95%가 넘는 상태를 유지하면서 계대

배양하였다. 세포는 5% CO<sub>2</sub>가 주입되는 37°C 배양기에서 배양시켰다.

#### 암세포 증식도 측정

항암실험에 사용할 시료는 DMSO에 녹였으며, RPMI-1640 배지로 희석하여 0, 10, 50, 100, 150 µg/ml의 농도로 배양 중인 암세포에 가하여 세포의 사멸 정도를 modified tetrazolium salt 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT) assay를 이용하여 측정하였다. 즉, 96 well plate에 비부착상태로 자라는 세포(SNU-1)의 경우 0.5×10<sup>5</sup>개, 부착하여 자라는 세포(SNU-C4, SNU-354)의 경우 0.3×10<sup>5</sup>개의 세포를 10% FBS가 포함된 RPMI-1640 배지 200 µl에 들어가도록 한 후 시료를 0, 10, 50, 100, 150 µg/ml의 농도로 처리하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 6일 동안 배양하였다. 1일, 4일, 6일 뒤에 사용시 조제하여 여과한 MTT용액 10 µl를 넣고 4시간 더 배양하여 보라색의 결정체가 형성되었으면 결정체가 빨려나오지 않도록 주의하면서 150 µl의 배지를 제거하였다. 그 후 0.04 N c-HCl-isopropanol의 추출용매 100 µl를 넣고 보라색 결정체가 완전히 녹을 때까지 파이프팅하였다. 30분이 지나기 전에 Benchmark Microplate Spectrophotometer(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 이용하여 추출용매를 blank로 하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 암세포의 증식도를 측정하였다.

## 결 과

#### 항암성분의 정제

건조시킨 *C. militaris* 자실체(2 kg)를 n-hexane으로 3회 추출한 후 감압농축시켜 시료 57.35 g을 얻었다. 헥산 추출물 9.75 g을 silica gel 컬럼으로 분획한 결과 분획 I(1.45 g), 분획 II(2.44 g), 분획 III(2.81 g), 분획 IV(0.27 g)을 얻었다. 여기서 분획 III(2.81 g)은 다시 silica gel 컬럼을 이용하여 단일 결정성분을 분리하였다. 여기서 얻은 시료를 이용하여 SNU-1, SNU-C4, SNU-354 암세포주에 대하여 세포 사멸 정도를 측정하였다.

#### 항암성분의 구조분석

*C. militaris*에서 분리한 항암성분은 백색 육각기둥모양의 결정이었으며, 융점은 176~179°C이었으며, 선광도는  $[\alpha]_D^{25}$  26.0°(CHCl<sub>3</sub>, c = 1)를 나타내었다. IR spectrum에서는 3400 cm<sup>-1</sup>과 1459 cm<sup>-1</sup>에서 적외선 흡수를 나타내었다. FAB-MS spectrum에서 m/z 429 [M+H]<sup>+</sup>에서 quasi molecular ion 흡수를 나타내었으며, m/z 396 [M-O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>에서 ergosterol의 peroxide에 기인하는 fragment ion을 관찰할 수 있었다. <sup>1</sup>H-NMR 상에서 δ 6.50 (1H, d, J = 8.49 Hz, 7-H)과 δ 6.24 (1H, d, J = 8.49 Hz, 6-H)에서 서로 cis coupling 하는 2개의 olefinic proton과, δ 5.23 (1H, dd, J = 7.05, 15.23 Hz, 22-H)과, δ 5.14 (1H, dd, J = 7.77, 15.23 Hz, 23-H)에서 trans

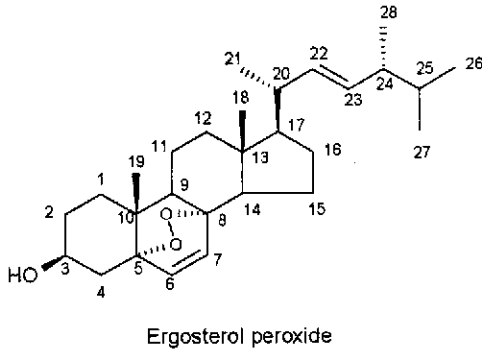
**Table 1.** <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C-NMR spectral data for ergosterol peroxide isolated from fruit bodies of *C. militaris*

Carbon	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	
1		34.6	CH <sub>3</sub>
2		30.0	CH <sub>2</sub>
3	3.96 (m)	66.4	CH
4		36.9	CH <sub>3</sub>
5		79.4	C
6	6.24 (d, J = 8.49 Hz)	135.4	CH
7	6.50 (d, J = 8.49 Hz)	130.7	CH
8		82.1	C
9		51.0	CH
10		36.9	C
11		20.6	CH <sub>2</sub>
12		39.3	CH <sub>1</sub>
13		44.5	C
14		51.6	CH
15		23.3	CH <sub>2</sub>
16		28.6	CH <sub>2</sub>
17		56.1	CH
18	0.82 (s)	12.8	CH <sub>3</sub>
19	0.88 (s)	18.1	CH <sub>3</sub>
20		39.7	CH
21	1.00 (d, J = 6.60 Hz)	20.8	CH <sub>3</sub>
22	5.23 (dd, J = 7.05, 15.23 Hz)	135.2	CH
23	5.14 (dd, J = 7.77, 15.23 Hz)	132.2	CH
24		42.7	CH
25		33.0	CH
26	0.83 (d, J = 6.80 Hz)	19.9	CH <sub>3</sub>
27	0.81 (d, J = 6.71 Hz)	19.6	CH <sub>3</sub>
28	0.91 (d, J = 6.84 Hz)	17.5	CH <sub>3</sub>

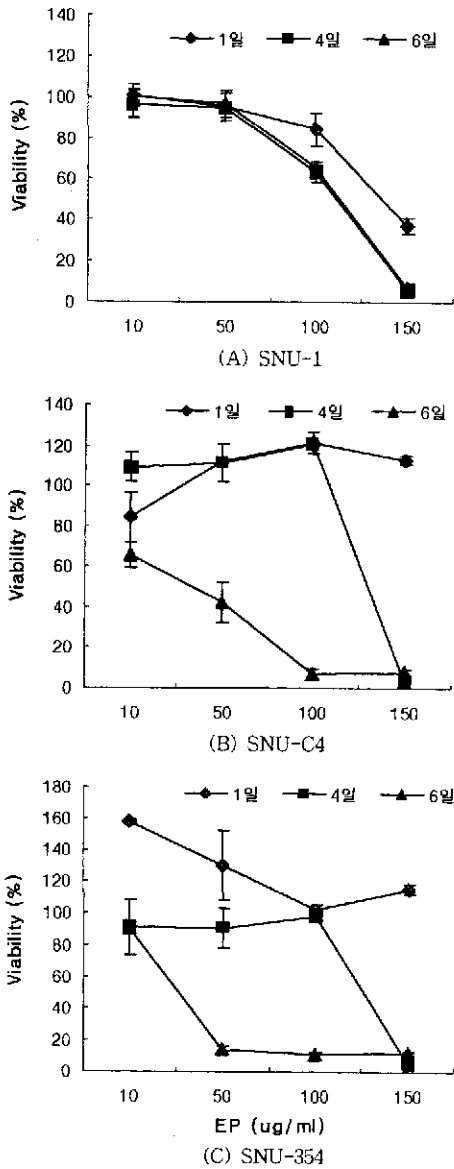
coupling 하는 2개의 olefinic proton을 관찰할 수 있었다. δ 3.96 (1H, m, 3-H)의 peak는 carbinol peak로 동정하였으며, δ 0.81과 δ 1.00 사이에서 6개의 methyl signal을 확인할 수 있었다. <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서는 총 28개의 carbon peak가 관찰되었으며 δ 135.4, δ 135.2, δ 132.3, δ 130.7에서 네 개의 olefinic carbon signal이 관찰되었고, δ 82.1과 δ 79.4에서 peroxide가 결합한 C-5와 C-6 peak를 관찰할 수 있었으며, δ 66.4에서 OH가 β 위치로 결합한 C-3의 peak를 확인할 수 있었다(Table 1). 이상의 물리화학적 성질과 spectral data를 기존에 보고된 문헌(Bok 등, 1999; 권 등, 1999)과 비교하여 항암활성물질의 구조는 ergosterol peroxide(C<sub>28</sub>H<sub>46</sub>O<sub>3</sub>, MW = 428)로 동정하였다(Fig. 1).

#### Ergosterol peroxide의 암세포 사멸효과

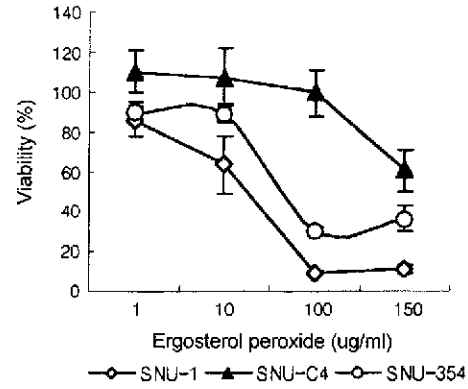
사람의 위암 세포 SNU-1, 직장암 세포 SNU-C4, 간암 세포 SNU-354 등의 암세포 성장에 대하여 *C. militaris*에서 분리한 ergosterol peroxide의 효과를 시간 경과 별로 조사하였다(Fig. 2). 세포성장 정도는 1일, 4일, 6일째에 MTT법을 이용하여 측정하였다. SNU-1의 경우에 있어서는, 시간 경과에 따라 그 정도가 미약하기는 하지만, 세포 사멸에 영향을 받고 있음을 알 수 있었다. SNU-C4의 경우는, 1일째는 시료의 영향을 전혀 받지 않고 오히려 점점



**Fig. 1.** Chemical structure of ergosterol peroxide isolated from fruit bodies of *C. militaris*.



**Fig. 2.** Effect of ergosterol peroxide (EP) from *C. militaris* on the growth of tumor cell lines of SNU-1 (panel A, human gastric tumor), SNU-C4 (panel B, human colorectal tumor) and SNU-354 (panel C, human hepatoma).



**Fig. 3.** Effect of ergosterol peroxide on the antitumor activity on day 3.

증가하다가, 4일 이후에는 100 µg/ml 이상의 농도에서 급격히 사멸하는 것을 볼 수 있었다. 또한 6일 경과 후에는 50 µg/ml 이하의 농도에서 50% 사멸되는 것을 볼 수 있었다. SNU-354의 경우도 역시 시간 의존적으로 세포 사멸이 영향을 받고 있었으며, SNU-C4와 동일한 경향을 보였다. 4일째는 100 µg/ml, 6일째는 50 µg/ml 이하의 농도에서 세포 사멸에 영향을 나타내었다. 그러므로 ergosterol peroxide는 위암세포인 SNU-1, 장암 세포인 SNU-C4, 간암 세포인 SNU-354에 대하여 시간 의존적으로 세포 사멸에 영향을 끼침을 알 수 있었다.

한편 이들 3가지 암세포주에 대하여 ergosterol peroxide가 세포 사멸 정도에 어떠한 영향을 끼치는지 알아보려고 하였다. 세포 사멸 정도는 시료를 각 농도별로(0, 1, 10, 100, 150 µg/ml) 처리하여 3일 동안 배양한 후 MTT법을 실시하여 측정하였다(Fig. 3). 위암 세포주인 SNU-1의 경우, ergosterol peroxide에 대해 다른 세포주에 비교해서 매우 민감한 것으로 나타났다. 10 µg/ml의 농도에서 대조군의 63%로 생존율이 저하되었으며, 그 이상의 농도에서도 급격히 세포가 사멸하고 있는 것을 볼 수 있었다. 반면에 SNU-C4 경우는, 150 µg/ml의 농도에서 대조군의 60%의 생존율을 나타내는 것으로 보아 ergosterol peroxide에 대해 매우 저항성이 큰 것으로 보였다. 또한 SNU-354의 경우는 10 µg/ml의 낮은 농도에서는 아무 영향이 없었지만, 100 µg/ml 이상의 높은 농도에서는 세포의 사멸에 영향이 있는 것으로 보인다. 이 모든 경우를 보아, 위암 세포주인 SNU-1, 간암 세포주 SNU-354, 장암 세포주 SNU-C4의 순으로

**Table 2.** The 50% inhibitory concentrations of ergosterol peroxide of *C. militaris* on 3 tumor cell lines originated from Korean cancer patients

Cell line	Tumor type	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup>
SNU-1	Gastric carcinoma	75.8 µg/ml (175 µM)
SNU-C4	Colorectal carcinoma	39.7 µg/ml (92.7 µM)
SNU-354	Hepatoma	32.7 µg/ml (76.4 µM)

<sup>a</sup>IC<sub>50</sub> (50% inhibitory concentration) was determined 6 days after treatment.

ergosterol peroxide에 대해 민감한 것으로 나타났다.

한편 6일 후에는 모든 세포주에서 ergosterol peroxide에 의하여 강한 항암작용을 나타내었으며, 이 때 50% 저지농도를 측정된 결과 사람의 위암세포(SNU-1), 직장암세포(SNU-C4), 간암세포(SNU-354)에 대하여 각각 75.8, 39.7, 32.7  $\mu\text{g/ml}$ 이었다(Table 2).

## 고 찰

*Cordyceps* 속의 동충하초 효능에 대해서는 고대로부터 널리 알려져 왔으며, 항암작용이 있다는 보고도 지속적으로 보고되었다. 그러나 그 항암성분에 대해서는 cordycepin이 외에는 알려진 성분이 없다. 본 연구에서는 국내에서 인공 재배되고 있으며, 소비량이 급증하고 있는 번데기동충하초(*C. militaris*)로부터 항암작용이 우수한 성분으로 ergosterol peroxide를 분리하여 그 구조를 해명하였다. Ergosterol peroxide가 번데기동충하초에도 존재하며, 그 성분을 순수 분리하여 번데기동충하초의 항암작용기전을 보다 명확하게 규명하였다.

Ergosterol은 생체의 기본 구성성분이므로 항암작용을 전혀 나타내지 않았지만(자료제시 생략), ergosterol peroxide는 한국인에서 유래한 각종 암세포주에 대하여 우수한 항암작용을 나타내었다. Ergosterol peroxide는 식물(Kim 등, 1997), 지의류(Piovano 등, 1999) 뿐만 아니라 *C. sinensis* (Bok 등, 1999)와 영지(Arisawa 등, 1986) 등의 균류에서도 보고된 바가 있다. Ergosterol peroxide의 생리활성은 면역 조절작용(Lindequist 등, 1989a; Kreisel 등, 1990; Fujimoto 등, 1994), 항바이러스작용(Lindequist 등, 1989b; Nakanishi 등, 1998), 항염증작용(Yasukawa 등, 1996), 항암작용(Bok 등, 1999) 등이 보고되어 있으므로 번데기동충하초의 ergosterol peroxide도 이와 동일한 작용을 나타낼 수 있을 것으로 사료된다.

번데기동충하초에서 분리한 ergosterol peroxide를 한국인의 암환자로부터 유래한 각종 암세포의 생존에 미치는 영향을 *in vitro*로 실험하였을 때 사람의 위암세포인 SNU-1세포주에서는 ergosterol peroxide에 의하여 1일 후에는 항암작용이 미약하였지만, 4일 또는 6일 후에는 비슷한 양상으로 농도의존적으로 항암작용이 증가하였다. 직장암세포인 SNU-C4에 대해서는 1일과 4일 후에는 ergosterol peroxide의 항암작용이 거의 나타나지 않았지만 6일 후에는 매우 강한 항암작용을 나타내었다. Ergosterol peroxide는 용해도가 매우 낮기 때문에 DMSO에 용해하여 실험을 수행하였다. 따라서 고농도에서는 세포배양액에서 침전을 형성하는 경우도 있었으므로 실험시마다 세포성장 억제정도는 약간씩 차이는 나타났지만 대표적인 결과를 본 논문에서 제시하였다. 간암세포인 SNU-354 세포주에 대해서도 4일 후까지는 ergosterol peroxide의 항암작용이 거의 나타나지 않았지만 6일 후에는 강한 항암작용을 나타내었다. 따라서 *in vitro*에서 ergosterol peroxide의 항암작용은 매우

서서히 발현하며 4일 후보다는 6일 후부터 강한 항암작용을 나타낼 수 있었다. 이러한 것은 ergosterol peroxide가 세포에 직접 독성작용을 나타내기 보다는 간접적으로 대사 등을 차단하여 항암작용을 나타낼 것으로 사료된다.

간암세포주인 SNU-354에는 다제내성 유전자인 MDR1 유전자(PGY1 유전자로도 알려져있음)가 발현되어있음이 보고된 바가 있다(Park 등, 1994, 1995). 따라서 본 연구에서도 ergosterol peroxide에 의한 각종 세포의 생존율을 비교한 결과 치료 처리 후 3일째에는 직장암세포주인 SNU-C4가 가장 저항성이 높았으며 그 다음으로는 간암세포주인 SNU-354가 저항성이 높았다(Fig. 3).

본 연구에서는 번데기동충하초로부터 분리한 항암성분인 ergosterol peroxide가 암환자로부터 분리한 암세포주에서 항암작용을 나타냄을 *in vitro*에서 실시하여 항암작용이 있음을 입증한 것으로서 매우 의의가 큰 것으로 사료된다. 더욱이 번데기동충하초가 국내에서 다량 소비되고 있다는 것을 고려할 때 한국인에게서 분리한 각종 암세포의 증식을 억제시켰다는 것도 의의가 크다고 생각된다. Ergosterol peroxide의 다양한 약리활성에 관하여는 앞으로 더욱 연구가 진행될 필요성이 대두되었으며, 항암제로 개발할 필요성도 커지게 되었다.

## 적 요

곤충기생성 균류인 번데기동충하초는 각종 약리활성을 나타내는 것으로 유명하다. 국내에서 인공재배한 번데기동충하초 자실체를 n-hexane으로 추출하여 항암성분을 실리카젤 칼럼크로마토그래피로 순수하게 분리하여 <sup>1</sup>H-NMR과 <sup>13</sup>C-NMR로 그 구조를 밝혀본 결과 ergosterol peroxide (5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epidioxy-24(R)-methylcholesta-6,22-dien-3 $\beta$ -ol)로 밝혀졌다. 분리한 ergosterol peroxide를 한국인의 암환자에서 분리한 각종 암세포에 대하여 항암작용을 측정된 결과, 3일 후에 위암세포주인 SNU-1 암세포에 대하여 가장 강한 항암작용을 나타내었다. 한국인의 암환자에서 유래한 위암세포인 SNU-1, 간암세포인 SNU-354 및 직장암세포인 SNU-C4 암세포 등에 대한 6일 후에 ergosterol peroxide의 50% 성장억제농도는 각각 75.8, 39.7, 32.7  $\mu\text{g/ml}$ 이었다. 따라서 ergosterol peroxide 성분은 번데기동충하초의 항암 성분중의 하나로 밝혀졌다.

## 감사의 말씀

이 논문은 2000년 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었으며(KRF-2000-015-DP0414), 이에 감사드립니다. 본 연구에 사용된 번데기동충하초는 (주)머쉬텍에서 제공하여 주셨으며, 이에 감사드립니다. 또한 항암성분의 구조 해명을 위한 NMR 및 MS 측정은 기초과학연구소의 기기를 이용하여 분석하였으므로 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- 권학철, 문형인, 최상훈, 이정옥, 조세연, 정이연, 김신여, 이강노. 1999. 백강잠의 세포독성 성분. 약학회지 **43**: 169-172.
- 溝口勝. 1999. 健康を蘇らせる奇蹟の菌食神秘の冬蟲夏草, 八重岳書房, 東京.
- 성재모. 1996. 한국의 동충하초, Pp. 272-274, 교학사, 서울.
- 성재모, 이현경, 유영진, 최영상, 김상희, 김용옥, 성기호. 1998. 단백질 분석을 기초로한 *Cordyceps* 속 동충하초의 분류. 한국균학회지 **26**: 1-7.
- 성재모, 최영상, 이현경, 김상희, 김용옥, 성기호. 1999. 분리된 동충하초 균주를 이용한 자실체 생산. 한국균학회지 **27**: 15-19.
- 심진영, 이연실, 임순성, 신국현, 현진이, 김성연, 이은방. 2000. 눈꽃동충하초의 약물활성. 생약학회지 **31**: 163-167.
- 自然薬食微生物研究所. 1998. (株)メタモル出版, 日本冬蟲夏草があなたのガンを消すかもしれない.
- 최인영, 최정식, 이왕휴, 유영진, 정기태, 주인옥, 최영근. 1999. *Cordyceps militaris* 인공자실체 형성조건. 한국균학회지 **27**: 243-248.
- Arisawa, M., Fujita, A., Saga, M., Fukumura, H., Hayashi, T., Shimizu, M. and Morita, N. 1986. Three new lanostanoids from *Ganoderma lucidum*. *J. Nat. Prod.* **49**: 621-625.
- Beach, L. R. and Ross, J. 1978. Cordycepin: an inhibitor of newly synthesized globin messenger RNA. *J. Biol. Chem.* **253**: 2628-2632.
- Bok, J. W., Lermer, L., Chilton, J., Klingeman, H. G., and Towers, G. H. 1999. Antitumor sterols from the mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Phytochem.* **51**: 891-898.
- Chen, S. Z. and Chu, J. Z. 1996. NMR and IR studies on the characterization of cordycepin and 2'-deoxyadenosine. *Zhongguo Kangshensu Zazhi* **21**: 9-12.
- Cory, J. G., Suhadolnik, R. J., Resnick, B. and Rich, M. A. 1965. Incorporation of cordycepin (3'-deoxyadenosine) into ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid of human tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **103**: 646-653.
- Cunningham, B. K. G., Hutchinson, S. A., Manson, W. and Spring, F. S. 1951. Cordycepin, a metabolic product from cultures of *Cordycepin militaris* (Linn.) Link. Part I. isolation and characterisation. *J. Chem. Soc.* 2290-2300.
- Fujimoto, H., Nakayama, M., Nakayama, Y. and Yamazaki, M. 1994. Isolation and characterization of immunosuppressive components of three mushrooms, *Pisolithus tinctorius*, *Microporus flabelliformis* and *Lenzites betulina*. *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo) **42**: 694-697.
- Kaczka, E. A., Trenner, N. R., Arison, B., Walker, R. W. and Folkers, K. 1964. Identification of cordycepin, a metabolite of *Cordyceps militaris*, as 3'-deoxyadenosine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **14**: 456-457.
- Kim, D. S., Baek, N. I., Oh, S. R., Jung, K. Y., Lee, I. S., Kim, J. H. and Lee, H. K. 1997. Anticomplementary activity of ergosterol peroxide from *Naematoloma fasciculare* and reassignment of NMR data. *Arch. Pharm. Res.* **20**: 201-205.
- Kreisel, H., Lindequist, U. and Horak, M. 1990. Distribution, ecology, and immunosuppressive properties of *Tricholoma populinum* (Basidiomycetes). *Zentralbl. Mikrobiol.* **145**: 393-396.
- Kuznetsov, D. A., Musaev, N. I., Khasigov, P. Z. and Nikolaev, A. Y. 1983. The effect of poly(A) segment size on the inhibition of hnRNA biosynthesis by cordycepin in rat brain cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **740**: 220-222.
- Lindequist, U., Teuscher, E., Wolf, B., Volgen, A., Hoffmann, S., Kutschabsky, L., Franke, P. and Seefeldt, R. 1989a. Isolation, characterization and structure elucidation of a substance with immunosuppressive action from *Tricholoma populinum* Lange. *Pharmazie* **44**: 165.
- Lindequist, U., Lesnau, A., Teuscher, E. and Pilgrim, H. 1989b. The antiviral action of ergosterol peroxide. *Pharmazie* **44**: 579-580.
- Nakanishi, T., Murata, H., Inatomi, Y., Inada, A., Murata, J., Lang, F. A., Yamasaki, K., Nakano, M., Kawahata, T., Mori, H. and Otake, T. 1998. Screening of anti-HIV-1 activity of north american plants. Anti-HIV-1 activities of plant extracts, and active components of *Lethalia vulpina* (L.) Hue. *Nature Medicine* (Tokyo) **52**: 521-526.
- Park, J. G., Lee, J. H., Kang, M. S., Park, K. J., Jeon, Y. M., Lee, H. J., Kwon, H. S., Park, H. S., Yeo, K. S., Lee, K. U., Kim, S. T., Chung, J. K., Hwang, Y. J., Lee, H. S., Kim, C. Y., Lee, Y. I., Chen, T. R., Hay, R. J., Song, S. Y., Kim, W. H., Kim, C. W. and Kim, Y. I. 1995. Characterization of cell lines established from human hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer* **62**: 276-282.
- Park, J. G., Lee, S. K., Hong, I. G., Kim, H. S., Lim, K. H., Choe, K. J., Kim, W. H., Kim, Y. I., Tsuruo, T. and Gottesman, M. M. 1994. MDR1 gene expression: its effect on drug resistance to doxorubicin in human hepatocellular carcinoma cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* **86**: 700-705.
- Piovano, M., Guzman, G., Garbarino, J. A. and Chamy, M. C. 1999. The chemistry of *Bacidia stipata* (Lichens, Ascomycotina). *Biochem. Syst. Ecol.* **27**: 663-664.
- Richardson, L. S., Ting, R. C., Gallo, R. C. and Wu, A. M. 1975. Effect of cordycepin on the replication of type-c RNA tumor viruses. *Int. J. Cancer* **15**: 451-456.
- Siev, M., Weinberg, R. and Penman, S. 1969. The selective interruption of nucleolar RNA synthesis in HeLa cells by cordycepin. *J. Cell. Biol.* **41**: 510-520.
- Yasukawa, K., Akihisa, T., Kanno, H., Kaminaga, T., Izumida, M., Sakoh, T., Tamura, T. and Takido, M. 1996. Inhibitory effects of sterols isolated from *Chlorella vulgaris* on 12-Q-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation and tumor promotion in mouse skin. *Biol. Pharm. Bull.* **19**: 573-576.