

큰 번데기 동충하초의 사람 암세포에서의 항암효과

임현우 · 권영민 · 조수민 · 김지현 · 윤규형 · 이승정 · 김하원¹ · 이민원*

중앙대학교 약학대학, ¹서울시립대학교 생명과학과

Antitumor Activity of *Cordyceps militaris* on Human Cancer Cell Line.

Hyun Woo Lim, Young Min Kwon, Su Min Cho, Jee Hun Kim, Gyu Hyung Yoon,

Seung Jung Lee, Ha Won Kim¹, and Min Won Lee*

College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

¹Department of Life Science, University of Seoul, Seoul 130-743, Korea

Abstract – *Cordyceps militaris* (CM) has been used as antidiabetics, anticancer, endocrine and sexual functions enhancement in the traditional medicine. Water soluble fractions of CM showed cytotoxic activities on the three kinds of human cancer cell lines, stomachic adenocarcinoma(SNU-1), colorectal adenocarcinoma (SNU-C4), and hepatocellular carcinoma(SNH-354). Cytotoxic activity guided isolation and identification of active fractions afforded cordycepin as an active component.

Key words – *Cordyceps militaris*, cordycepin, cytotoxic activities, human cancer cell lines.

큰번데기동충하초(*Cordyceps militaris*)는 자낭균강(Ascomycetes) 맥각균과(Clavicipitaceae)코디셉스속(*Cordyceps* spp.)에 속하는 버섯으로 북동충하초(北冬蟲夏草), 잠용충초, 용초라고도 불린다. 겨울에는 곤충의 몸에 기생하고 있으면서 균사를 땅속에 있는 번데기의 체내에 뻗쳐 영양분을 취하면서 번데기는 균사로 가득차게 되어 죽게 한다. 여름철 상대습도가 높아지는 장마철에 접어들면서 기주인 번데기에서 발아하여 여러개의 자실체가 성장하여 땅속을 뚫고 나와 가늘고 긴 야구막대기모양의 형태로 자라게 된다.¹⁻²⁾

동충하초 *Cordyceps sinensis*는 중국에서 인체의 활력을 주는 불로장생의 묘약이라고 인식되어 왔으며,²⁻³⁾ *Cordyceps* spp.에서 분리된 cordycepin 및 ergostrol peroxide의 항암효과,⁴⁻⁶⁾ 다당체 부분의 혈당강하효과,⁷⁻⁹⁾ 성기능 강화 및 항암효과,¹⁰⁻¹¹⁾ 면역기능강화 효과,¹²⁻¹³⁾ 항피로 효과,¹⁴⁾ 항돌연변이효과¹⁵⁾ 등이 보고되었다. 본 연구자들은 국내에서 인공배양된 큰번데기동충하초(*Cordyceps militaris*)의 항암 활성물질을 밝혀내기 위해 본 연구를 진행하였다.

재료 및 방법

실험재료 – 큰번데기동충하초(*Cordyceps militaris*, 2 kg)는 초당농원에서 인공재배하는 것을 제공받아 사용하였다. 즉, 현미와 번데기를 혼합한 배지에서 재배하였고, 배지부분을 제거한 자실체를 60°C에서 3일간 건조한 것을 시료로 사용하였다.

기기 및 시약 – 기기로는 Molecular sieving apparatus (Sartocon II crossflow system), Sartorius (Germany), Column Chromatography gel : Sephadex LH 20 (75 – 230 µm mesh, Pharmacia), Solvent (v/v); H₂O → MeOH, TLC : Kieselgel 60 F254 (Merck, Germany), 10% -H₂SO₄ 및 UV- lamp (254 nm), IR spectrophotometer : Shimadzu IR-435 (Japan), KBr, ¹H-NMR spectrometer : Varian GEMINI 2000, 300 MHz (USA), Bruker AMX-500, 500 MHz (Germany), ¹³C-NMR spectrometer : Varian GEMINI 2000, 75 MHz (USA), Bruker AMX-500, 125 MHz (Germany), Mass spectrometer : API 3000 triple quadrupole mass spectrometry (Canada)를 사용하였다.

시약으로서는 인체유래 암세포를 배양하는데 필요한 배지의 성분인 RPMI-1640, fetal bovine serum(FBS), penicillin, streptomycin : Gibco BRL (Grand island, NY, U.S.A.)에서 구

*교신저자(E-mail) : mwlee@cau.ac.kr
(FAX) : 02-822-9778

입하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), Dimethyl Sulfoxide (DMSO), Trypsin-EDTA : Sigma 회사 (Sigma Chem. Co., St Louis, MO, U.S.A.)에서 구입하였다. 다른 시약과 용매는 일급 시약을 사용하였다. 흡광도는 Human TU-1800PC UV/Vis spectrophotometer (PGENERAL) 를 사용하여 측정하였다.

추출, 분획 및 항암성분의 분리, 구조결정 - 큰 번데기 동충하초 2 kg을 증류수로 6시간 동안 3회 수욕 상에서 온침한 후 여과하여 membrane filter를 이용하여 분자량 10만 이상 (CM-H1, 0.35 g), 2만~10만 (CM-H2, 1.4 g), 2만이하 (CM-H3, 300 g)로 분획하였으며 CM-H3을 BuOH로 분획하여 CM-H31 (120 g), CM-H32 (150 g)를 얻으며, 이상의

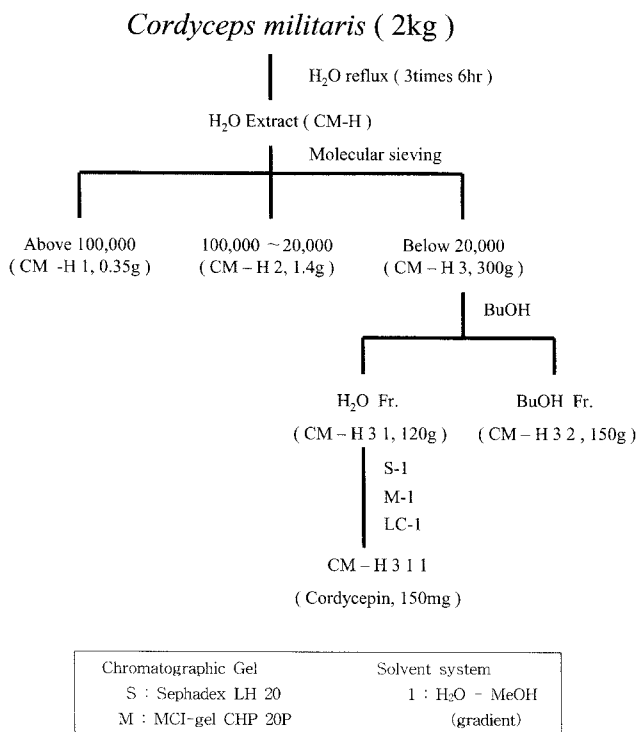
분획들에 대해 항암활성을 1차 평가하여 활성을 나타낸 CM-H31로 부터 Sephadex LH20 컬럼 크로마토그래피(H₂O→MeOH) 및 MCI-gel CHP 20P 컬럼 크로마토그래피(H₂O→MeOH)를 실시하여 CM-H311 (cordycepin, 150 mg)을 얻었다.

CM-H311 (cordycepin)

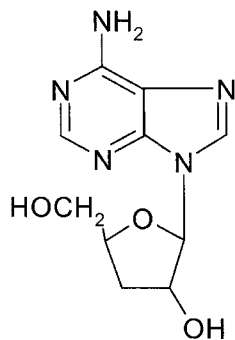
C₁₀H₁₃O₅N₅, White needles, m.p. : 187 – 192°, m/z : 251 [M+1]⁺. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) : 8.32 (1H, s, H-8), 8.13 (1H, s, H-2). 5.87 (1H, d, J=6.15 Hz, H-1'), 4.59 (1H, dd, J=5.31, J=5.81 Hz, H-2'), 4.34 (1H, dd, J=3.06, J=4.98 Hz, H-3'), 3.97 (1H, dd, J=3.39, J=6.70, H-4'), 3.76 (1H, m, H-5'), 3.63 (1H, m, H-5'), 2.26 (1H, m, H-3'), 1.93 (1H, m, H-3'), 7.29 (2H, s, NH₂). ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆) : 152.77 (C-2), 149.19 (C-4), 119.42 (C-5), 156.39 (C-6), 139.42 (C-8), 91.13 (C-1'), 34.4 (C-2'), 74.93 (C-3'), 62.96 (C-5').

암세포의 배양 - 한국인의 암세포로부터 분리한 위암세포주(SNU-1), 직장암세포주(SNU-C4), 간암세포주(SNH-354)는 한국세포주은행에서 구입하였다. 위암세포주는 비부착 세포인 반면 직장암세포주와 간암세포주의 경우는 플라스크 바닥에 단층으로 부착하여 자라는 세포주이다. 부착하여 자라는 세포주는 trypsin-EDTA처리 후 계대배양하였고, 모든 세포주는 10% FBS, 1% penicillin- streptomycin이 포함된 RPMI-1640 배지를 이용하여 배양하였다. 세포의 건강상태와 생사 여부는 위상차 현미경으로 먼저 관찰한 후 trypan blue dye exclusion법을 이용하여 항상 95%가 넘는 상태를 유지하면서 계대배양하였다. 세포는 5% CO₂가 주입되는 37°C 배양기에서 배양시켰다.

암세포 증식도 측정 - 항암실험에 사용할 시료는 물에 녹는 시료의 경우엔 DMEM 또는 RPMI-1640 배지에 녹였으며, 물에 녹지 않는 시료의 경우에는 최소량의 DMSO에 녹인 후 0, 50, 100, 150, 200 µg/ml의 농도로 배양중인 암세포에 가하여 세포의 사멸정도를 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay를 이용하여 측정하였다. 즉, 96 well plate에 비부착상태로 자라는 세포(SNU-1)의 경우 0.5×10⁵개, 부착하여 자라는 세포(SNU-C4, SNU-354)의 경우 0.3×10⁵개의 세포를 10% FBS가 포함된 RPMI-1640 배지 200 µl에 들어가도록 한 후 0, 10, 50, 100, 150 µg/ml의 농도로 처리하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 6일동안 배양하였다. 1, 4, 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 파이펫팅하였다. 30분이 지나기 전



Scheme 1. Extraction, Fractionation and isolation procedure of *Cordyceps militaris*.



Scheme 2. Structure of CM-H311 (cordycepin).

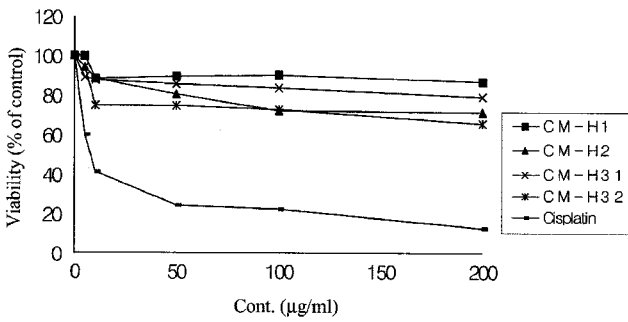


Fig. 1. Effect of CM fractions on the growth of tumor cell lines of stomachic adenocarcinoma (SNU-1).

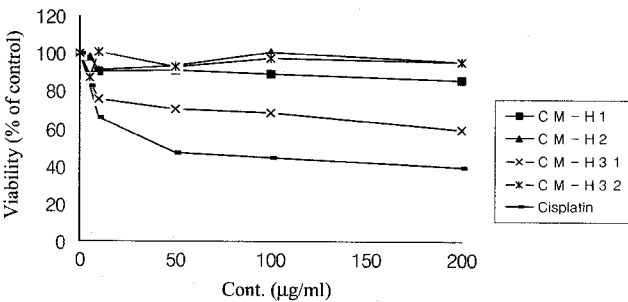


Fig. 2. Effect of CM fractions on the growth of tumor cell lines of colorectal adenocarcinoma (SNU-C4).

에 Benchma가 Microplate Spectrophotometer(Bio-Red Laboratories, Hercules, CA, USA)를 이용하여 추출용매를 blank로 하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 암세포의 증식도를 측정하였다.

결 과

큰번데기 동충하초의 H₂O extract를 분자체를 이용하여 다당체로 구성된 CM-H1과 CM-H2 및 CM-H3으로 분획하였고 CM-H3은 BuOH를 이용하여 CM-H31 및 CM-H32로 분획하였다. 이상의 분획들에 대하여 한국인 암환자로부터 얻은 3종의 암세포에 대한 암세포사멸 효과에 대해 실험한 결과 위암세포(SNU-1)에 대해서는 CM-H1, CM-H2, CM-H31, CM-H32 모두 거의 영향을 미치지 않았다(Fig. 1 참조).

한편, 직장암세포주(SNU-C4)에서는 CM-H1, CM-H2, CM-H32은 영향을 미치지 않았지만 CM-H31의 경우 200 µg/ml 이상의 농도에서 세포사멸효과를 나타내었다(Fig. 2 참조).

또한, 간 암세포주(SNH-354)에서는 CM-H, CM-H1, CM-H32 은 영향을 미치지 않았지만 CM-H31의 경우 50 µg/ml 이상의 농도에서 세포사멸효과를 나타내었다(Fig. 3 참조).

이상과 같이 간암 및 직장암세포에서 효과를 나타낸 CM-H31로부터 유효성분의 분리를 시도한 결과 CM-H311을 얻었다. CM-H311과 비교물질인 Cisplatin을 200 µg/ml씩 각각의 암세포주에 투여하여 사멸도를 측정한 결과 위암세포

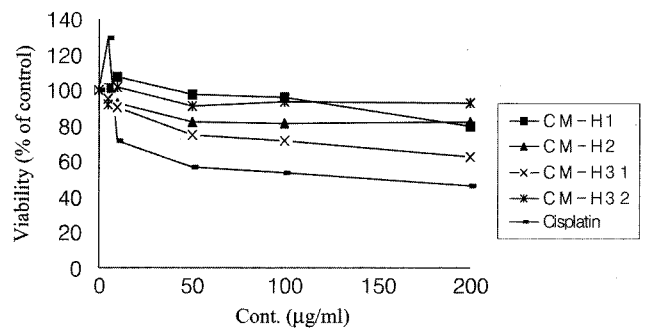


Fig. 3. Effect of CM fractions on the growth of tumor cell lines of hepatocellular carcinoma (SNH-354).

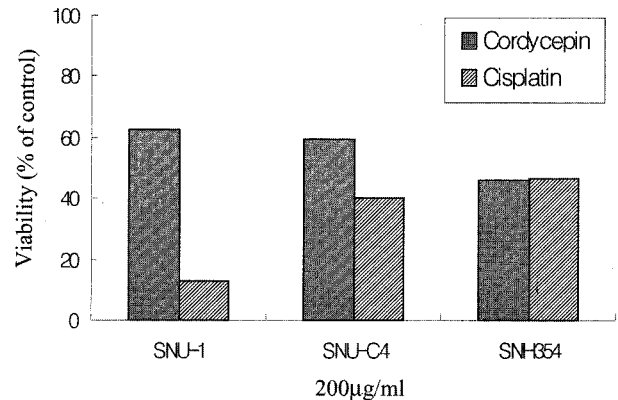


Fig. 4. The anticancer Effects of CM-311 (Cordycepin) on the growth of tumor cell lines of stomachic adenocarcinoma (SNU-1), colorectal adenocarcinoma (SNU-C4) and hepatocellular carcinoma (SNH-354).

주(SNU-1)에서는 효과를 나타내지 않았지만, 직장암세포주(SNU-C4)와 간암세포주(SNH-354)에서는 뚜렷하게 세포활성을 저해한 결과를 보였다.

또한 CM-H311은 각종 물리학적 성상과 기기분석의 해석 및 문헌과의 비교를 통해 cordycepin으로 동정하였다.¹⁵⁾

결 론

동충하초 분획으로부터 각각의 세포주에 따라 세포독성을 실험하여 간암 및 직장암세포주에 대해 활성을 나타낸 CM-H31 분획을 얻었으며(Figs. 1, 2, and 3) 이 분획으로부터 활성을 추적, 분리를 시도한 결과 CM-H311 (150 mg)을 분리하였으며 각종 물리학적 성상, 기기분석 그리고 문헌비교를 통해 이 활성성분이 cordycepin임을 밝혔다.

Cordycepin의 구조는 adenosine의 4번 탄소에 OH (hydroxy)기가 없는 형태인데 이것이 독특한 약리 작용을 하는 것으로 알려졌으며, 특히 한국인의 직장암과 간암세포의 발육억제 작용이 탁월함을 이 실험을 통하여 확인하였다(Fig. 4 참조).

사 사

이 논문은 2003년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의한 것임.

인용문헌

1. 성재모 (1966) 한국의 동충하초 272-274, 교학사, 서울.
2. 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 M.* **4**: 289-303.
3. Zhu, J. S., Halpern, G. M., and Jones, K. (1998) The Scientific Rediscovery of an Ancient Chinese Herbal Regimen: *Cordyceps sinensis*: part II. *J. Altern. Complement M.* **4**: 2429-2457.
4. Bok, J. W., Lermer, L., Chilton, J., Klingeman, H. G., and Towers, G. H. (1990) Antitumor sterols from the mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Phytochemistry* **51**: 891-898.
5. Kuo, Y. C., Lin, C. Y., Tsai, W. J., Wu, C. L., Chen, C. F., and Shiao, M. S. (1994) Growth inhibitors against tumor cells in *Cordyceps sinensis* other than cordycepin and polysaccharides. *Cancer Invest.* **12**: 611-615.
6. Kim, H. W., Kim, Y. H., Cai, X. F., Nam, K. S., Lee, S. J., An, H. S., Jeung, E. H., Yun, S. H., Sung, S. K., Lee, S. J., and Hyun, J. W. (2001) *In vitro* Antitumor Activity of Ergosterol Peroxide Isolated from *Cordyceps militaris* on Cancer Cell Lines from Korean Patients. *Kor. J. Mycol.* **29**: 61-66.
7. Kiho, T., Ookubo, K., Usui, S., Ukai, S., and Hirano, K. (1990) Structural features and hypoglycemic activity of a polysaccharide (CS-F10) from the cultured mycelium of *Cordyceps sinensis*. *Biol. Pharm. Bull.* **22**: 966-970.
8. Kino, T., Yamane, A., Hui, J., Usui, S., and Ukai (1996) S. Polysaccharides in fungi. XX. Hypoglycemic activity of a polysaccharide (CS-F30) from cultured mycelium of *Cordyceps sinensis* and its effect on glucose metabolism in mouse liver. *Biol. Pharm. Bull.* **19**: 294-296.
9. Kwon, Y. M., Cho, S. M., Kim, J. H., and Lee, M. W. (2001) Hypoglycemic Effect of *Cordyceps militaris*. *Kor. J. Pharmacogn.* **32**: 327-329.
10. Huang, B. M., Hsu, C. C., Tsai, S. J., Sheu, C. C., and Leu, S. F. (2001) Effects of *Cordyceps sinensis* on testosterone production in normal Mouse Leydig cells. *Life Sci.* **19**: 2593-2602.
11. Liu, J., Yang, X., Chen, Z., and Li, J. (1997) Anticarcinogenic effect and hormonal effect of *Cordyceps militaris* Link. *Zhongguo Zhong Ya Zhi.* **22**: 111-113.
12. Yang, L. Y., Chen, A., Kuo, Y. C., and Lin, C. Y. (1999) Efficacy of a pure compound H1-A extracted from *Cordyceps sinensis* on autoimmune disease of MRL lpr/lpr mice. *J. Lab. Clin. Med.* **134**: 492-500.
13. Yamaguchi, N., Yoshida, J., Ren, L. J., Chen, H., Miyazawa, Y., Fujii, Y., Hung, Y. X., Takamura, S., Suzuki, S., and Koshimura, S. (1990) Augmentation of various immune reactivities of tumor-bearing hosts with an extract of *Cordyceps sinensis*. *Biotherapy.* **2**: 199-205.
14. Dai, G., Bao, T., Xu, C., Dooper, R., and Zhu, J. S. (2001) CordyMax Cs-4 improves steady-state bioenergy status in mouse liver. *J. Altern. Complement Med.* **7**: 231-240.
15. Cho, M. A., Lee, D. S., Kim, M. J., Sung, J. M., and Ham, S. S. (2003) Antimutagenicity and Cytotoxicity of Cordycepin Isolated from *Cordyceps militaris*. *Food Science and Biotechnology.* **12**: 472-475.

(2004년 12월 1일 접수)