

## 누에번데기 및 누에애벌레 밀리타리스동충하초(*Cordyceps militaris*) 열수추출물의 투여가 고형암이 유발된 마우스의 종양성장 억제 및 면역기능에 미치는 영향

이해미 · 이어진 · 박태선<sup>†</sup>

연세대학교 식품영양학과

### Tumor Growth Inhibitory and Immunomodulatory Activities of *Cordyceps Militaris* Water Extracts in ICR Mice Bearing Sarcoma-180 Solid Tumor

Haemi Lee, Yeajin Lee and Taesun Park<sup>†</sup>

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

#### Abstract

Hot water-extracts prepared from *Cordyceps militaris* of silkworm pupa (CMP) or *Cordyceps militaris* of silkworm larva (CML) were tested for tumor growth inhibitory and immunomodulatory activities in ICR mice bearing sarcoma-180 cells solid tumor, and compared with those of the known compound, cordycepin, found in *Cordyceps militaris*. Mice were subcutaneously injected with sarcoma-180 cells, and *i.p.* injected with either saline (Control), 50 mg/kg or 100 mg/kg of CMP (CMP50 or CMP100, respectively), or CML (CML50 or CML100, respectively), or 1 or 2 mg/kg of cordycepin (C1 or C2, respectively) for 10 days. Mice injected with CMP50 or CMP100 showed a 47.3% or 57.6% inhibition in the solid tumor growth ( $p < 0.05$ ), while those injected with CML50 or CML100 exhibited a 35.5% or 37.1% reduction ( $p < 0.05$ ) in solid tumor size compared to the value for control mice treated with saline. Animals injected with cordycepin showed a 26~30% inhibition in the solid tumor growth ( $p < 0.05$ ). Mice bearing solid tumor and injected with CMP or CML showed a significantly increased thymus weight (38~44% increase), lymphocyte percentages of CD4<sup>+</sup> T-cell, CD8<sup>+</sup> T-cell, and NK-cell (63~110% increase) in the spleen, and interleukin-2 excretion (33~51% increase) by the isolated splenocytes compared to those in control mice ( $p < 0.05$ ). These results indicate that the anti-tumor activity of hot water extracts of *Cordyceps militaris*, raised on both silkworm pupa and silkworm larva, appears to be associated with their immunomodulatory activity, and these activities found in *Cordyceps militaris* are superior to those for the single compound, cordycepin.

**Key words:** *Cordyceps militaris*, cordycepin, ICR mice, growth inhibition of solid tumor, immunomodulatory activity

#### 서 론

동충하초(冬蟲夏草)는 포자가 곤충의 유충, 번데기 또는 성충내로 침입하여 기주 안에서 내생균핵을 만든 후 밖으로 자실체를 형성하고, 성숙된 자실체는 다시 포자를 형성하므로써 다른 곤충에 기생하게 되는 생활주기를 지닌다(1). 동충하초는 자낭균강(Ascomycetes), 맥각균목(Clavicipitales), 맥각균과(Clavicipitaceae)에 속하며, 전 세계적으로 현재까지 약 800여종의 동충하초균이 알려져 있고 이 중 국내에서 채집 및 분류된 것은 78종이다(2). 식품공전 상 "식품원재료 분류표"에 제시되어 있는 동충하초의 종류로는 눈꽃동충하초(*Paecilomyces japonica*/*Paecilomyces tenuipes*)와 밀리타리스동충하초(*Cordyceps militaris*)가 있다. 현재 국내 동

충하초 시장은 연간 1천 2백만 톤 정도이며, 이중 밀리타리스 동충하초가 약 15% 정도를 차지하고 있다. 자연계에서 밀리타리스동충하초는 주로 나비목(Lepidoptera)의 유충 또는 번데기를 기주로 하여 주황색의 곤봉형 가좌를 형성하며, 원통형의 자낭 안에 실모양의 자낭포자들을 함유하고 있다(3). 또한 밀리타리스동충하초는 cordycepin을 다량 함유하고 있는 동충하초의 대표 종으로서 항균, 항암, 면역기능 증강 및 마약에 대한 해독기능 등을 지니는 것으로 알려져 있다(4).

최근 악성종양의 치료를 위한 접근방법으로 면역요법(immunotherapy)에 관한 관심이 증대되고 있다. 즉, 면역학적 의미에서 종양을 하나의 이식된 항원으로 본다면 암의 치료는 숙주의 일반적 면역반응을 회복 또는 증강시키거나, 종양 항체의 발현을 증폭시키므로써 가능하며, 이 때 세포성 및

<sup>†</sup>Corresponding author. E-mail: tspark@yonsei.ac.kr  
Phone: 82-2-2123-3123, Fax: 82-2-312-5229

체액성 면역반응이 함께 작용해야 할 것이다(5-7). 암세포에 대한 숙주의 면역기능 활성을 평가하기 위해서는 주로 macrophage 활성화, T 세포 및 NK 세포수, 그리고 기타 면역 관련 분비물질 등이 지표로 이용되고 있다(8). 이와 연관 지어 건강기능식품 후보소재로 주목받는 다양한 종류의 버섯류들이 면역기능 증진을 통해 항암효과를 나타내고 있음이 제시된 바 있다(9-12). 즉, 구름버섯, 표고버섯, 느타리버섯 등의 자실체 열수추출물은 sarcoma-180 종양세포에 대한 항암효과를 나타냄이 발표된 바 있고(13), 상황버섯 자실체에 함유된 다당류의 항암활성, 면역조절기능 및 지질과산화 억제효과 등이 확인되었다(14). 담자균류에서 항암활성을 나타내는 주요 유효성분으로 다당류인  $\beta$ -글루칸이 알려져 있으며, 균주에 따라 *Lentinus edodes*로부터 분리된 lentinan, *Trametes versicolor*로 분리된 krestin, 그리고 *Schizophyllum commune*로부터 분리된 schizophyllan 등의  $\beta$ -글루칸이 알려져 있다(15-18).

자연 상태에서 동충하초는 극히 소량 생산되어 채집이 어려운 실정이나, 최근에는 인공으로 자실체를 형성하므로써 동충하초의 대량생산이 가능하여졌다. Oh 등(19)은 기주로 누에 애벌레 또는 누에번데기를 사용하여 인공 재배된 *Paezilomyces tenuipes*의 영양성분과 cordycepin 함량을 측정 한 결과, 같은 종류의 동충하초라 할지라도 재배된 기주에 따라 영양성분 및 효능이 달라질 수 있음을 제시하였다. 따라서 본 연구는 누에번데기 또는 누에애벌레를 기주로 인공 재배된 밀리타리스동충하초를 대상으로 고행암 성장 억제 효과 및 면역조절 활성을 평가하고, 동충하초의 주요 유효성분으로 알려진 cordycepin의 효능과 비교하므로써 건강기능식품 소재로서의 가능성을 타진하고자 시도되었다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 실험에 이용된 밀리타리스동충하초 시료는 (주)머슈빌(성남시, 한국)로부터 제공받아 사용하였다. 누에번데기 밀리타리스동충하초는 냉동상태의 누에번데기를 원형의 플라 스틱 용기에 분주한 후 액체종균을 접종하여 재배하였고, 누에애벌레 밀리타리스동충하초는 누에애벌레에 액체종균을 접종하여 배양·재배하였다. 재배된 동충하초를 95°C에서 6시간 동안 추출하여 여과하는 과정을 2차례 반복한 후 동결 건조하였다. 파우더상태의 동충하초시료를 일정 농도의 멸균된 증류수에 용해시키고, 0.4  $\mu$ m filter를 통해 여과시킨 후 사용하였다. 비교표준품으로 이용된 cordycepin(3'-deoxyadenosine)은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

### Cordycepin 농도 분석

동충하초시료의 cordycepin 농도 분석은 Cunningham 등(20)의 방법을 이용하여 실시하였다. 동충하초시료를 90°C에

서 6시간 동안 끓인 후 여과하고, 2배 부피의 아세톤을 가한 후 4°C에서 24시간 동안 방치하였다. 5,000 $\times$ g에서 10분간 원심 분리한 후 상층액을 수거하여 용매를 완전히 증발시키고, 증류수를 가하여 용해시킨 후 0.45  $\mu$ m filter를 사용하여 여과하였다. 시료의 cordycepin 함량은 Altima C18(Shimadzu, Japan) column이 장착된 HPLC를 이용하여 260 nm에서 측정하였으며, 누에번데기 동충하초시료의 경우 0.2%, 그리고 누에애벌레 동충하초시료의 경우 0.4%의 cordycepin이 검출되었다.

### 실험동물 및 암 유발

총 64마리의 수컷 ICR계 마우스(18~22 g body wt)를 대 한실험동물센터로부터 구입하여 일반 고행사료(삼양유지 사료사)로 사육하면서 1주일간 실험실 환경에 적응시켰다. 사육실의 온도는 22 $\pm$ 2.0°C, 그리고 습도는 55 $\pm$ 5.0%를 유지하였으며, 명암주기는 12시간으로 조절하였다. 실험실 환경에 적응된 실험동물을 다음과 같이 8군(n=8)으로 분류하여 28일간 사육하였다. 정상군(normal group, N)의 경우 암세포를 이식하지 않은 채 생리식염수만을 복강 투여하였고, 대조군(control group, C)의 경우에는 암세포를 이식한 후 생리식염수를 투여하였다. 누에번데기 밀리타리스동충하초 50군(CMP50) 및 누에번데기 밀리타리스동충하초 100군(CMP100)의 경우 암세포를 이식한 후 각각 50 mg/kg 및 100 mg/kg의 누에번데기 밀리타리스동충하초(*Cordyceps militaris* of silkworm pupa) 추출물을 복강 투여하였다. 누에애벌레 밀리타리스동충하초 50군(CML50) 및 누에애벌레 밀리타리스동충하초 100군(CML100)의 경우 암세포를 이식한 후 각각 50 mg/kg 및 100 mg/kg의 누에애벌레 밀리타리스동충하초 추출물(*Cordyceps militaris* of silkworm larva)을 복강 투여하였다. 또한 cordycepin 1군(C1) 및 cordycepin 2군(C2)의 경우 암세포를 이식한 후 각각 1 mg/kg 및 2 mg/kg의 cordycepin을 복강 투여하였다.

마우스의 겨드랑이에 고행암을 유발하기 위하여 주사기를 이용하여 0.2 mL(1.0 $\times$ 10<sup>6</sup> cells/mouse)의 sarcoma-180 세포부유액을 실험동물의 왼쪽 겨드랑이에 피하이식하고, 24시간이 경과한 후부터 10일간 연속적으로 일일 일회 0.2 mL의 생리식염수, 밀리타리스동충하초 추출물 또는 cordycepin을 복강 내에 투여하였다. 모든 실험동물을 대상으로 실험 시작일과 종료일(암세포 이식 3주 후), 두 차례에 걸쳐 체중을 측정하였다.

### 고형암 성장 저지 실험 및 면역장기의 무게 측정

겨드랑이에 종양세포를 이식한 후 21일째 되는 날 경추탈 골법에 의하여 실험동물을 치사시키고, 생성된 고행암을 적출하여 무게를 측정한 후 다음 공식에 준해 종양 성장저지 백분율(tumor growth inhibition rate, %)을 계산하였다(21).

종양 성장저지능(%) =

$$\frac{\text{대조군의 고행암 무게(g)} - \text{실험군의 고행암 무게(g)}}{\text{대조군의 고행암 무게(g)}} \times 100$$

아울러 흉선, 비장 및 간을 적출하고, 그 무게를 측정하였다.

**면역기능 측정**

**비장세포의 준비** : 왼쪽 겨드랑이에 종양세포를 투여한 후 21일 간 사육한 마우스의 비장을 적출하여 4°C의 HBSS (Hank's Balance Salt Solution, GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA)로 2회 세척하였다. 이를 다시 30 mm 세포배양용 접시에 옮기고 HBSS를 가한 후, 40 µm nylon cell strainer (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA)를 이용하여 비장세포를 유리시키고 반복 여과하여 작은 조직편들을 제거하였다. 유리된 비장세포에 lysis 용액(50% diethylene glycol과 15% formaldehyde가 혼합된 용액을 증류수와 1 : 10 v/v의 비율로 혼합한 용액)을 가하고 실온에서 10분 동안 방치하여 남아 있는 적혈구를 용혈시켰다. 원심분리 후 얻어진 침전물을 HBSS로 세척한 후 10% FBS가 함유된 RPMI 1640 배양액에 현탁시켰다.

**면역세포수의 측정** : 마우스의 비장에 존재하는 T-세포, B-세포 및 NK-세포수의 백분율을 간접면역형광법을 이용하여 측정하였다(22). 약  $6 \times 10^6$  cells/mL의 수가 되도록 준비된 마우스 비장세포를 두개의 튜브에 각각 300 µL씩 첨가하고, 1,000×g에서 5분간 원심분리하였다. 0.1% sodium azide가 함유된 phosphate buffered saline(PBS) (pH 7.2) 500 µL를 가하여 현탁시킨 다음, 1,000×g에서 5분간 원심분리하여 세포침전물을 얻었다. 0.1% sodium azide와 2% FBS가 함유된 PBS 용액에 단일항체(PE-labeled antimouse CD8 + FITC-labeled antimouse CD4, 그리고 PE-labeled anti-mouse CD19 + FITC-labeled antimouse NK1.1) (Becton Dickinson, Mountain View, USA)를 각 10 µg/mL 농도가 되도록 혼합한 후 세포침전물에 50 µL씩 첨가하고, 얼음 위에서 30분 동안 배양하였다. 0.1% sodium azide가 함유된 빙냉 상태의 PBS 용액 500 µL를 가하여 세척한 후 원심분리하였다. 상등액을 제거하고 얻은 세포침전물에 fixing buffer(0.1% sodium azide + 1% paraformaldehyde가 함유된 PBS 용액) 300 µL를 넣어 잘 섞은 후, flow cytometry(FACScan, Becton Dickinson, Mountain View, USA)를 이용하여 면역세포의 수를 분석하였다.

**Interleukin-2 농도 측정** :  $5 \times 10^6$  cells/mL의 농도로 준비된 마우스 비장세포에 concanavalin-A(Sigma, USA)를 100 µg/mL의 농도가 되도록 가한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 48시간동안 배양하였다. 배양액을 수거한 후 interleukin-2 (IL-2) kit (BD Bioscience, USA)를 이용하여 IL-2의 농도를 측정하였다. Kit에서 제공된 ELISA 희석용액 50 µL를 96-well plate에 분주한 후, 배양액 시료 또는 kit에서 제공된 IL-2 표준액을 각각 50 µL씩 첨가하고 실온에서 2시간동안 방치하였다. 96-well plate에 있는 반응액을 aspirator를 이용하여 제거하고 PBS로 5회 세척한 후, 미리 혼합된 반응용액(anti-mouse IL-2 monoclonal antibody + avidin-horse radish peroxidase conjugated enzyme) 100 µL을 첨가하여

실온에 1시간동안 방치하였다. Aspirator를 이용하여 well 내의 반응액을 제거하고 5회 세척하였다. 기질로 사용된 3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) 100 µL를 96-well plate에 가한 후 상온에서 30분간 배양하였다. 각 well에 반응정지 용액 50 µL씩을 가하고, ELISA reader(Perkin Elmer사, Wallac 1420, Turkin, Finland)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**통계처리**

모든 자료의 통계분석은 SAS(Statistical Analysis system) PC package를 사용하여 실시하였고, 분석 수치는 mean ± SE로 제시하였다. 동충하초 열수추출물 또는 cordycepin의 효과는 one way ANOVA(analysis of variance)에 의해 p<0.05 수준에서 유의성을 평가하였으며, 통계적 유의성이 관찰된 경우 각 실험군 간의 평균값의 차이는 Duncan's multiple range test에 의해 검증하였다.

**결과 및 고찰**

**고형암 성장 억제효과**

밀리타리스동충하초의 투여가 암세포를 이식받은 마우스의 고형암 성장에 미치는 효과는 Table 1에 제시된 바와 같다. Sarcoma-180 세포를 ICR 마우스의 겨드랑이에 이식한 후 10일동안 식염수를 복강투여하고 21일째에 처사시켜 종양무게를 측정한 결과,  $2.45 \pm 0.30$  g으로 나타났다. 한편, 50 mg/kg(CMP50) 및 100 mg/kg(CMP100)의 누에번데기 밀리타리스동충하초를 복강투여한 군의 경우, 실험 21일째의 종

**Table 1. Effect of *Cordyceps militaris* or cordycepin administration on the growth of sarcoma-180 solid tumor in ICR mice<sup>1)</sup>**

Group	Dose (mg/kg/d)	Tumor weight (g)	Inhibition rate <sup>2)</sup> (%)
Control	Saline	$2.45 \pm 0.30^{5)ab}$	-
CMP <sup>3)</sup>	50	$1.29 \pm 0.17^{bc}$	47.3
	100	$1.04 \pm 0.04^c$	57.6
CML <sup>4)</sup>	50	$1.58 \pm 0.02^{bc}$	35.5
	100	$1.54 \pm 0.04^{bc}$	37.1
Cordycepin	1	$1.81 \pm 0.22^b$	26.1
	2	$1.72 \pm 0.09^b$	29.8

<sup>1)</sup>The treatment continued for 10 days following the subcutaneous injection of  $1 \times 10^6$  sarcoma-180 cells.

<sup>2)</sup>Inhibition rate (%):  $\frac{\text{Tumor weight of control mice} - \text{Tumor weight of treated mice}}{\text{Tumor weight of control mice}} \times 100$

<sup>3)</sup>CMP: *Cordyceps militaris* of silkworm pupa.

<sup>4)</sup>CML: *Cordyceps militaris* of silkworm larva.

<sup>5)</sup>Values are mean ± SE of 8 rats.

<sup>6)</sup>Different alphabets in the same column indicate significant difference among experimental groups by one way ANOVA at p<0.05.

양무게가 각기  $1.29 \pm 0.17$  g 및  $1.04 \pm 0.04$  g으로 나타나 대조군에 비해 고형암 성장이 47.3% 및 57.6% 유의하게 억제되었다( $p < 0.05$ ). 아울러 50 mg/kg(CML50) 및 100 mg/kg(CML100)의 누에번데기 밀리타리스동충하초를 투여한 군의 고형암 무게는 동일량의 누에애벌레 밀리타리스동충하초를 투여받은 군에 비해 감소하는 경향을 나타냈고, 대조군에 비하여는 고형암의 성장이 35.5% 및 37.1% 유의하게 억제되었다( $p < 0.05$ ). 한편, cordycepin 투여군의 경우 21일째 종양무게가 1 mg/kg(C1) 및 2 mg/kg(C2)농도에서 대조군에 비해 26.1% 및 29.8% 유의하게 더 적었다( $p < 0.05$ ). 본 연구에서 이용된 동충하초시료의 cordycepin 함유량은 누에번데기 동충하초의 경우 0.2%, 그리고 누에애벌레 동충하초의 경우 0.4%이며, 따라서 본 실험에 사용된 cordycepin 농도는 동충하초시료에 함유된 cordycepin 농도보다 누에번데기 동충하초의 경우 10배, 그리고 누에애벌레 동충하초의 경우 5배 정도 더 높은 농도이다. 결과적으로 동충하초 열수추출물은 cordycepin 단일성분에 비해 고형암성장 저지효과가 더 우수한 것으로 생각된다.

Kneifel 등(23)은 마우스를 대상으로 sarcoma-180 세포주를 이식한 후 *Cordyceps ophioglossoides*에서 분리한 글루칸 다당류를 10일동안 투여한 결과, 30일 후 종양무게가 대조군에 비해 87~100% 억제되었음을 관찰하였고, Miyazaki 등(24)도 *Cordyceps sinensis*로부터 분리된 다당류 중 galactomannan기를 함유한 물질이 항종양 효과가 있음을 보고하였다.

#### 면역장기의 무게

밀리타리스동충하초 열수추출물 또는 cordycepin의 복강투여가 고형암을 이식받은 마우스의 면역 관련 장기의 무게에 미치는 영향이 Table 2에 나타나 있다. 체중증가량, 간 및 비장무게는 암세포를 이식받지 않은 정상군과 암세포를

이식받은 후 생리식염수를 투여받은 대조군 간에 유의적인 차이가 관찰되지 않았다. 밀리타리스동충하초 열수추출물 또는 cordycepin 투여군의 간 및 비장무게는 대조군에 비해 통계적 유의성은 없었지만, 증가하는 경향을 보였다. 겨드랑이 피하조직에 암세포를 이식받고 3주가 경과한 시점에서 측정된 대조군의 흉선 무게는  $63.4 \pm 6.2$  mg으로 나타나 암세포를 이식받지 않은 정상군( $77.6 \pm 4.1$  mg)에 비해 더 적은 경향을 보였으며, CMP50군 및 CM100군의 흉선무게는 각기  $87.6 \pm 12.5$  mg과  $90.8 \pm 6.2$  mg으로 나타나 대조군에 비해 38~43% 유의적으로 증가하였다( $p < 0.05$ ). CML50 및 CML100군의 흉선무게 역시 생리식염수를 투여받은 대조군에 비해 40~44% 유의하게 증가하였으며( $p < 0.05$ ), cordycepin 투여군의 흉선무게(78~83 mg)는 대조군에 비해 15~30% 더 높은 경향을 보였으나 통계적 유의성은 관찰되지 않았다( $p > 0.05$ ). 간조직의 경우 주로 Kuffer 세포가, 그리고 비장에는 splenic macrophage 및 다양한 면역 관련 세포가 존재하여 이물질 및 암세포에 대한 방어능을 담당하는 것으로 알려져 있다. 동충하초의 면역활성에 관한 선행 연구결과들(25,26)에 의하면 *Cordyceps sinensis*는 비장세포의 DNA 합성을 촉진함으로써 비장무게의 증가를 초래하고, macrophage에 의한 식균작용을 증가시키는 효과가 있음이 보고된 바 있다.

#### 면역세포수 및 IL-2 농도의 변화

밀리타리스동충하초 열수추출물 및 cordycepin의 투여가 고형암이 유발된 마우스의 비장내 임파구 비율에 미치는 영향을 평가한 결과가 Table 3에 나타나 있다. 정상군의 비장내 임파구 비율을 살펴보면, CD4+ 및 CD8+ T-세포가 각기  $35.6 \pm 1.0\%$  및  $17.7 \pm 0.9\%$ 로 존재하여 약 2.0의 CD4+/CD8+ T-세포수의 비를 나타냈다. 한편, 고형암 세포를 이식받은 대조군의 CD4+ 및 CD8+ T-세포비율은 각기  $20.2 \pm 2.2\%$  및  $11.2 \pm 0.8\%$ 로 나타나 정상군에 비해 유의하게 낮았고( $p <$

Table 2. Effect of *Cordyceps militaris* or cordycepin administration on immuno-organ weights of ICR mice bearing sarcoma-180 solid tumor<sup>1)</sup>

Group	Dose (mg/kg/d)	Weight gain (g/3 wks)	Liver weight (g)	Spleen weight (g)	Thymus weight (mg)
Normal	Saline	$10.7 \pm 0.5^{4)}$	$1.65 \pm 0.04$	$0.21 \pm 0.02$	$77.6 \pm 4.1^{ab5)}$
Control	Saline	$12.1 \pm 0.3$	$1.63 \pm 0.06$	$0.24 \pm 0.01$	$63.4 \pm 6.2^b$
CMP <sup>2)</sup>	50	$7.9 \pm 0.3$	$1.67 \pm 0.06$	$0.26 \pm 0.01$	$87.6 \pm 12.5^a$
	100	$8.8 \pm 0.5$	$1.77 \pm 0.12$	$0.28 \pm 0.02$	$90.8 \pm 6.2^a$
CML <sup>3)</sup>	50	$9.2 \pm 0.5$	$1.56 \pm 0.08$	$0.29 \pm 0.04$	$89.0 \pm 6.4^a$
	100	$8.5 \pm 0.2$	$1.57 \pm 0.06$	$0.29 \pm 0.01$	$91.2 \pm 5.4^a$
Cordycepin	1	$8.9 \pm 0.2$	$1.76 \pm 0.12$	$0.26 \pm 0.01$	$82.6 \pm 3.0^{ab}$
	2	$9.4 \pm 1.2$	$1.79 \pm 0.17$	$0.24 \pm 0.02$	$73.2 \pm 4.6^{ab}$

<sup>1)</sup>The treatment continued for 10 days following the subcutaneous injection of  $1 \times 10^6$  sarcoma-180 cells.

<sup>2)</sup>CMP: *Cordyceps militaris* of silkworm pupa.

<sup>3)</sup>CML: *Cordyceps militaris* of silkworm larva.

<sup>4)</sup>Values are mean  $\pm$  SE of 8 rats.

<sup>5)</sup>Different alphabets in the same column indicate significant difference among experimental groups by one way ANOVA at  $p < 0.05$ .

**Table 3. Effect of *Cordyceps militaris* or cordycepin administration on the lymphocyte composition in the spleen of ICR mice bearing sarcoma-180 solid tumor<sup>1)</sup>** (%)

Sample	Dose (mg/kg/d)	CD4+ T-cell	CD8+ T-cell	CD4+/CD8+ T-cell ratio	CD19 B-cell	NK-cell
Normal	Saline	35.6±1.0 <sup>1)a5)</sup>	17.7±0.9 <sup>a</sup>	2.0±0.1	40.8±1.3 <sup>ab</sup>	2.9±0.2 <sup>bc</sup>
Control	Saline	20.2±2.2 <sup>c</sup>	11.2±0.8 <sup>d</sup>	1.8±0.2	34.6±2.1 <sup>bc</sup>	1.9±0.2 <sup>e</sup>
CMP <sup>2)</sup>	50	29.7±2.2 <sup>ab</sup>	15.6±0.6 <sup>ab</sup>	1.9±0.2	39.3±3.2 <sup>ab</sup>	4.0±0.6 <sup>a</sup>
	100	31.5±1.3 <sup>ab</sup>	15.7±1.6 <sup>ab</sup>	2.0±0.1	44.0±3.0 <sup>a</sup>	3.7±0.5 <sup>a</sup>
CML <sup>3)</sup>	50	26.5±0.6 <sup>ab</sup>	14.3±0.8 <sup>c</sup>	1.9±0.1	35.4±0.9 <sup>bc</sup>	3.1±0.3 <sup>bc</sup>
	100	27.5±0.7 <sup>ab</sup>	15.9±1.3 <sup>ab</sup>	1.9±0.1	40.8±1.3 <sup>ab</sup>	3.6±0.2 <sup>ab</sup>
Cordycepin	1	24.5±0.7 <sup>bc</sup>	12.3±0.4 <sup>cd</sup>	2.0±0.1	32.4±2.5 <sup>c</sup>	2.5±0.1 <sup>bc</sup>
	2	23.9±0.9 <sup>bc</sup>	12.4±1.3 <sup>cd</sup>	1.9±0.2	36.8±2.4 <sup>bc</sup>	2.6±0.9 <sup>bc</sup>

<sup>1)</sup>The treatment continued for 10 days following the subcutaneous injection of  $1 \times 10^6$  sarcoma-180 cells.

<sup>2)</sup>CMP: *Cordyceps militaris* of silkworm pupa.

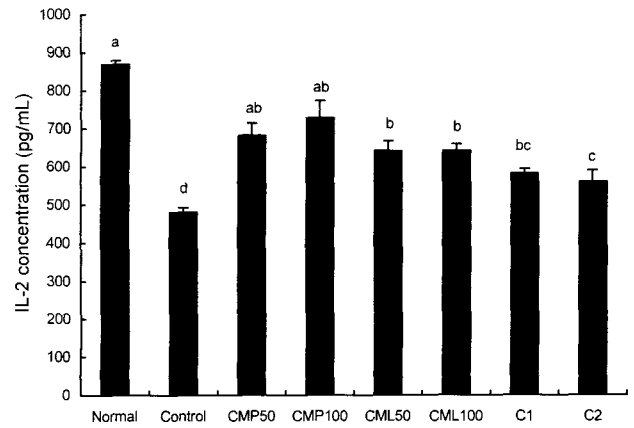
<sup>3)</sup>CML: *Cordyceps militaris* of silkworm larva.

<sup>4)</sup>Values are mean±SE of 8 rats.

<sup>5)</sup>Different alphabets in the same column indicate significant difference among experimental groups by one way ANOVA at  $p < 0.05$ .

0.05), CD4+/CD8+ 비율 역시 정상군에 비해 낮았으나, 통계적 유의성은 관찰되지 않았다( $p > 0.05$ ). 한편, CMP50 및 CMP100군의 경우 CD4+ T-세포 비율이 각기  $29.7 \pm 2.2\%$  및  $31.5 \pm 1.3\%$ 로 나타나 대조군에 비해 유의하게 더 높았고, 마찬가지로 CD8+ T-세포 비율 역시  $15.6 \pm 0.6\%$  및  $15.7 \pm 1.6\%$ 로 대조군에 비해 유의하게 더 높았다( $p < 0.05$ ). 아울러 CML50 및 CML100군의 CD4+ T-세포수( $26.5 \pm 0.6\%$  및  $27.5 \pm 0.7\%$ ) 및 CD8+ T-세포수( $14.3 \pm 0.8\%$  및  $15.9 \pm 1.3\%$ ) 역시 대조군에 비해 유의적으로 더 높았다( $p < 0.05$ ). 한편, cordycepin 투여군의 경우에는 비장내 CD4+ 및 CD8+ T-세포수가 대조군과 유의적인 차이를 나타내지 않았다. CD4+/CD8+ T-세포수의 비는 모든 실험군과 대조군 간에 유의적인 차이가 없었는데, 이는 실험군의 CD4+ 및 CD8+ T-세포 비율이 대조군에 비해 모두 유의하게 더 높았기 때문이다. B-세포에 해당되는 CD19 세포의 비율은 정상군( $40.8 \pm 1.3\%$ )에 비해 암세포를 이식받은 대조군( $34.6 \pm 2.1\%$ )에서 감소하는 경향을 보였으며, CMP50군, CMP100군 및 CML100군의 경우 대조군에 비해 증가하는 경향을 보였다( $p < 0.05$ ). 비장내 NK-세포 비율은 CMP50군 및 CMP100군에서 각기  $4.0 \pm 0.6\%$ 와  $3.7 \pm 0.5\%$ 로 나타나, 대조군( $1.9 \pm 0.2\%$ )보다 96~110% 증가하였다( $p < 0.05$ ). CML50군( $3.1 \pm 0.3\%$ ) 및 CML100군( $3.6 \pm 0.2\%$ )의 비장내 NK-세포 비율은 대조군에 비해 63~89% 유의하게 증가하였고( $p < 0.05$ ), C1 및 C2군의 경우에는 대조군보다 31~36% 유의하게 증가하였다( $p < 0.05$ ). 이상의 면역세포수 결과로 미루어 볼 때, 누에번데기 또는 누에애벌레 밀리타리스동충하초 열수추출물은 cordycepin 단일물질에 비해 비장의 면역세포수를 증가시키는 효과가 더 탁월함을 알 수 있다.

밀리타리스동충하초 추출물의 투여가 고형암을 이식받은 마우스의 비장세포에 의한 IL-2 생성능에 미치는 영향을 측정 한 결과 (Fig. 1), 고형암을 이식받은 대조군의 경우  $481 \pm 10.9$  pg/mL로 나타나 정상군( $869 \pm 11.8$  pg/mL)에 비해 유



**Fig. 1. Effect of *Cordyceps militaris* or cordycepin administration on interleukin-2 production by the spleen of ICR mice bearing sarcoma-180 solid tumor.**

Values are mean±SE of 8 rats.

CMP50: *Cordyceps militaris* of silkworm pupa (50 mg/kg body wt).

CMP100: *Cordyceps militaris* of silkworm pupa (100 mg/kg body wt).

CML50: *Cordyceps militaris* of silkworm larva (50 mg/kg body wt).

CML100: *Cordyceps militaris* of silkworm larva (100 mg/kg body wt).

C1: Cordycepin (1 mg/kg body wt).

C2: Cordycepin (2 mg/kg body wt).

The treatment continued for 10 days following the subcutaneous injection of  $1 \times 10^6$  sarcoma-180 cells.

Different alphabets above the bar indicate significant difference among experimental groups by one way ANOVA at  $p < 0.05$ .

의하게 감소되었다. 한편, CMP50 및 CMP100군의 경우 비장세포에 의한 IL-2 분비능이 생리식염수를 투여받은 대조군보다 41.8% 및 51.4% 유의적으로 증가되었고( $p < 0.05$ ), CML50군 및 CML100군의 비장세포에 의한 IL-2 분비능 역시 대조군에 비해 33.3%와 33.4% 유의하게 증가하였다( $p < 0.05$ ). Cordycepin을 투여받은 C1군 및 C2군의 경우 대조군에 비해 IL-2 분비능이 모두 유의하게 증가되었으나( $p < 0.05$ ), 그 증가폭이 누에번데기 또는 누에애벌레 밀리타리스동충하초를 투여받은 군에 비해 더 적었다.

세포독성을 나타내는 기존의 항암제와는 달리 담자균류

에서 분리된 다양한 다당류들은 숙주의 저하된 면역기능을 증강시키므로써 암예방 및 치료에 긍정적인 효과를 나타냄이 제기되고 있는데(27,28), 특히 최근 구조가 규명된 일부 다당류들은 항종양활성 뿐 아니라 감염방어효과, 항보체활성, 식세포 활성화 등의 면역조절 기능을 나타내는 것으로 보고되었다(29). 면역시스템의 조절을 이용한 항암활성은 다음과 같은 두가지 단계로 나타날 수 있다. 첫째는 인체 면역시스템의 특징인 메모리 기능을 이용하여 T-세포(세포성 면역) 또는 항체(체액성 면역)를 종양 항원에 의해 활성화시키는 것이고(30), 둘째는 interferon류, T-세포의 성장인자로 알려진 IL-2, 암세포를 괴사시키는 TNF- $\alpha$  등의 cytokine 분비를 증가시키는 기전을 들 수 있다(31,32).

동충하초가 면역기능에 미치는 영향에 대한 선행연구로는 마우스의 폐에 B<sub>16</sub> mouse melanoma 세포를 투여한 후 동충하초 에탄올 추출물을 투여한 결과, NK-세포의 활성이 촉진되고 암세포의 성장이 억제되었음이 보고되었다(33). 또한 Chen 등(34)은 마우스에 동충하초추출물을 투여한 결과 T<sub>H</sub> 세포수, CD4+/CD8+ T-세포수의 비, 그리고 식균활성이 증가되었음을 관찰하였다. 본 실험에서도 밀리타리스동충하초 열수추출물이 고형암을 이식받은 마우스 비장내의 T-세포, B-세포 및 NK-세포수를 유의적으로 증가시킨 것으로 나타났고, 따라서 밀리타리스동충하초는 주로 세포 및 체액 매개성 면역반응의 증진을 통해 수명연장효과 및 항종양 효과를 나타내는 것으로 추측된다. IL-2는 임파구를 활성화시키고 분화를 촉진하므로써 숙주의 면역능을 증강시키는 작용을 한다. 본 연구에서 sarcoma-180 세포를 이식한 ICR 마우스를 대상으로 밀리타리스동충하초 추출물을 투여한 결과 대조군에 비하여 IL-2 생성능이 유의하게 증가한 결과로 미루어 볼 때, 밀리타리스동충하초는 비장에 의한 IL-2 분비능 증가를 통해 숙주의 면역기능을 활성화시키고 T-세포의 증식을 유도하였던 것으로 생각된다.

동충하초 내에 존재하는 cordycepin은 암세포의 DNA, RNA 및 단백질 합성을 저해하므로써 세포분열을 억제하는 것으로 보고된 바 있다(35,36). 한편, 이와는 대조적으로 Kuo 등(37)은 분획별로 *Cordyceps sinensis*의 항종양 활성을 평가한 결과, 우수한 항종양 활성을 나타낸 분획에 cordycepin이 함유되어 있지 않음을 관찰하였고, 따라서 동충하초의 항종양 효과는 cordycepin 이외의 다른 성분에 의해 나타날 수 있음을 제시한 바 있다. 즉, 동충하초의 항종양 효과는 유효성분이 종양세포에 직접적으로 작용하거나, 또는 다당류 및 기타 성분들이 마우스의 면역기능을 증가시켜 나타난 결과일 수도 있다. 본 연구에서 기주를 달리하여 재배된 두가지의 밀리타리스동충하초의 효능을 비교 평가한 결과, 통계적 유의성은 나타나지 않았으나 누에번데기동충하초가 누에애벌레동충하초에 비해 종양성장 억제 및 면역 효과에서 더 우수한 경향을 나타냈고, cordycepin 단일 물질보다는 밀리타리스동충하초 추출물에서 그 효과가 더욱 증대되었음이

관찰되었다. 앞으로 밀리타리스동충하초에 함유된 유효성분들에 대한 동정, 생리활성 평가 및 작용기전 규명 등이 계속 연구되어야 할 것으로 생각된다.

## 요 약

본 연구에서는 누에번데기 또는 누에애벌레를 기주로 하여 인공 재배된 밀리타리스동충하초의 고형암 성장억제 및 면역조절 기능을 평가하였다. 이를 위해 sarcoma-180 세포주를 겨드랑이에 피하 이식받은 ICR 마우스를 대상으로 밀리타리스동충하초 또는 유효성분으로 알려진 cordycepin을 10일간 복강투여한 후 고형암 성장저지능, 면역관련 장기의 무게변화, 비장 내 면역세포수의 변화, 그리고 비장세포에 의한 interleukin-2(IL-2) 생성능을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다. 겨드랑이에 고형암을 이식받은 마우스에게 50 mg/kg(CMP50) 또는 100 mg/kg(CMP100)의 누에번데기 밀리타리스동충하초 추출물을 10일간 투여한 결과 생리식염수를 투여한 대조군에 비해 3주 후 고형암 성장이 47.3% 및 57.6% 유의하게 억제되었다( $p < 0.05$ ). 50 mg/kg(CML50) 및 100 mg/kg(CML100)의 누에애벌레 밀리타리스동충하초를 투여받은 경우 35.5% 및 37.1%, 그리고 1 mg/kg 및 2 mg/kg의 cordycepin을 투여받은 군의 경우 26.1%와 29.8%의 고형암 성장 억제효과가 관찰되었다( $p < 0.05$ ). 고형암을 이식받은 후 누에번데기 또는 누에애벌레 밀리타리스동충하초를 투여받은 마우스는 대조군에 비해 흉선무게가 38~44% 유의하게 증가하였고( $p < 0.05$ ), 비장내 CD4+ 및 CD8+ T-세포수, NK-세포수(63~110% 증가), 그리고 비장세포에 의한 IL-2 생성능(33~51% 증가)이 모두 유의하게 증가하였다( $p < 0.05$ ). 이상의 결과를 종합해 볼 때, 밀리타리스동충하초 열수추출물은 고형암의 성장을 억제하는 효과가 있으며, 이와 같은 밀리타리스동충하초 추출물의 항암활성은 면역기능 증강효과와 연관이 있을 것으로 생각된다. 아울러 밀리타리스동충하초의 고형암 성장억제 및 면역조절 기능은 cordycepin 단일물질에 비해 더 우수하였다.

## 감사의 글

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

## 문 헌

1. Sung JM, Lee HK, Choi YS, Kim YO, Kim SH, Sung GH. 1997. Distribution and taxonomy of entomopathogenic fungal species from Korea. *Kor J Mycol* 25: 231-252.
2. Cory JG, Suhadolnik RJ, Resnick B, Rich MA. 1965. Incorporation of cordycepin (3'-deoxyadenosine) into ribonucleic acid of human tumor cells. *Biochem Biophys Acta* 103: 646-653.

3. Sung JM, Yu YB, Cha DY. 1998. *Mushroom science*. Kyohaksa, Seoul. p 569-570.
4. Ying J, Mao X, Ma Q, Zong Y, Wen H. 1987. *Icons of medical fungi from China*. Science press, Beijing, China. p 60-85.
5. Herlyn M, Menrad A, Koprowski H. 1990. Structure, function and clinical significance of human tumor antigens. *J Natl Cancer Inst* 82: 1883-1889.
6. Kath R, Herlyn M. 1989. Molecular biology of tumor antigens. *Curr Opin Immunol* 1: 863-866.
7. Davis ID. 2000. An overview of cancer immunotherapy. *Immunol Cell Biol* 78: 179-195.
8. Reilly RT, Emens LA, Jaffee EM. 2001. Humoral and cellular immune responses: independent forces or collaborators in the fight against cancer? *Curr Opin Investig Drugs* 2: 133-135.
9. Youlchi M, Osamu Y. 1991. Activation by protein bound polysaccharide PSK (Krestin) of cytotoxic lymphocytes that act on fresh autologous tumor cells and T24 human urinary bladder transitional carcinoma cell line in patients with urinary bladder cancer. *J Urology* 145: 1082-1088.
10. Han SG, Lee CW, Jeon YJ, Hong ND, Yoo ID, Yang KH, Kim HM. 1999. The inhibitory effect of polysaccharides isolated from *Phellinus linteus* on tumor growth and metastasis. *Immunopharmacology* 41: 157-164.
11. Wang HX, Liu WK, Ng TB, Ooi VE, Chang ST. 1995. Immunomodulatory and antitumor activities of a polysaccharide-peptide complex from a mycelial culture of *Tricholoma sp.*, a local edible mushroom. *Life Sci* 57: 269-281.
12. Oh-hashii F, Kataoka T, Tsugagoshi S. 1978. Effect of combined use of anticancer drugs with a polysaccharides preparation, Krestin, on mouse leukemia P388. *Gann* 69: 255-257.
13. Park MH, Oh KY, Lee BW. 1998. Anticancer activity of *Lentinus edodes* and *Pleurotus ostreatus*. *Korean J Food Sci Technol* 30: 702-708.
14. Lee JW, Baek SJ, Bang KW, Kang SW, Kang SM, Kim BY, Ha IS. 2000. Biological activities of polysaccharide extracted from the fruit body and cultured mycelia of *Phellinus linteus* IY001. *Kor J Food Sci Technol* 32: 726-735.
15. Maeda YY, Chihara G. 1971. Lentinan, a new immunoad accelerator of cell-mediated responses. *Nature* 229: 634-636.
16. Wasser SP, Weis AL. 1999. Medicinal properties of substances occurring in higher *Basidiomycetes* mushrooms: current perspectives. *Int J Med Mushrooms* 1: 31-62.
17. Ooi VE, Liu F. 2000. Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. *Curr Med Chem* 7: 715-729.
18. Suzuki F, Suzuki C, Shimomura E, Maeda H, Fujii T, Ishida N. 1979. Antiviral and interferon-inducing activities of a new peptidomannan, KS-2, extracted from culture mycelia of *Lentinus edodes*. *J Antibiot (Tokyo)* 32: 1336-1345.
19. Oh SW, Kim SH, Song HN, Han D. 2003. Comparative chemical compositions of four kinds of *Tochukaso*. *Korean J Food Sci Technol* 35: 15-22.
20. Cunningham KG, Hutchison SA, Manson W, Spring FS. 1951. Cordycepin, a metabolic product from cultures of *Cordyceps militaris*. Part I. Isolation and characterization. *J Chem Soc* 51: 2299-2300.
21. Goldin R, Pet R. 1981. The causes of cancer, quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst* 66: 1192-1308.
22. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monk A, McMahon JD, Vista J, Warren T, Kenney S, Boyd MR. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 82: 1107-1112.
23. Kneifel H, Konig WA, Loeffler W, Muller R. 1997. *Ophiocordin*, an antifungal antibiotic of *Cordyceps ophioglossoides*. *Arch Microbiol* 113: 121-130.
24. Miyazaki J, Oikawa N, Yamada H. 1977. Studies on fungal (*Penicillium chrysogenum*) polysaccharides. XX. Galactomannan of *Cordyceps sinensis* (*Lepi doptera*). *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 25: 3324-3330.
25. Jia TY, Lau BHS. 1997. The immuno-enhancing effect of Chinese herbal medicine *Cordyceps sinensis* on macrophage. *Chinese Pharmacol J* 32: 142-144.
26. Kuo YC, Tsai WJ, Shiao MS, Chen CF, Lin CY. 1996. *Cordyceps sinensis* as an immunomodulatory agent. *Am J Chin Med* 24: 111-125.
27. Hartwell J, Nakamishi M, Uehara N, Chihara G, Fukuoka F. 1971. Antitumor action of some basidiomycetes especially *Phellinus linteus*. *Gann* 59: 155-157.
28. Kim HM, Han SB, Oh GT, Kim YH, Hong DH, Yoo LD. 1996. Stimulation of humoral and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. *Int J Immunopharmacol* 18: 295-303.
29. Ebihara K, Minamishima Y. 1984. Protective effect of biological response modifiers on murine cytomegalovirus infection. *J Virology* 51: 117-121.
30. Hans W. 1986. The immune system as a therapeutic agent. *Scientific American* 272: 455-515.
31. Rosenberg SA, Lotze MT, Mule JJ. 1988. New approaches to the immunotherapy of cancer using interleukin 2. *Ann Intern Med* 108: 853-864.
32. Sukurai T, Suzu S, Yamada M, Yanai N, Kawashima T, Hataka K, Takaku T, Motovoshi K. 1994. Induction of tumor necrosis factor in mice by recombinant human macrophage colony-stimulating factor. *Jpn J Cancer Res* 85: 80-85.
33. Xu RH, Peng XE, Chen GZ, Chen GL. 1992. Effectors of *Cordyceps sinensis* on natural killer activity and colony formation of B16 melanoma. *Chin Med J* 105: 971-980.
34. Chen GZ, Chen GL. 1991. Effects of *Cordyceps sinensis* on murine T lymphocyte subsets. *Chin Med J* 104: 4-11.
35. Glazer RI, Lott TJ, Peale AL. 1978. Potentiation by 2'-deoxycoformycin of the inhibitory effect by 3'-deoxyadenosine (cordycepin) on nuclear RNA synthesis in L1210 cells in vitro. *Cancer Res* 38: 2233-2238.
36. Piga A, Ganeshaguru K, Green ES, Sheridan B, Hoffbrand AV. 1989. Selective toxicity of purine nucleosides to human leukemic cells. *Adv Exp Med Biol* 253B: 291-298.
37. Kuo YC, Lin CY, Tsai WJ, Wu CL, Chen CF, Shiao MS. 1994. Growth inhibitors against tumor cells in *Cordyceps sinensis* other than cordycepin and polysaccharides. *Cancer Invest* 12: 611-618.

(2003년 8월 5일 접수; 2003년 11월 21일 채택)