

## Inhibitory Effect of *Clavicipitaceae* on Serotonin Release out of Human Platelets and Human Platelet Aggregation

Hyun-Jeong Cho<sup>1</sup>, Hye-Seon Ham<sup>2</sup>, Chang-Ryul Lim<sup>1</sup>, Sun-A Choi<sup>1</sup>, Hyo-Chan Kang<sup>1</sup>, Young-Cheol Ju<sup>1</sup> and Hwa-Jin Park<sup>1†</sup>

<sup>1</sup>Department of Biomedical Laboratory Science, College of Biomedical Science and Engineering, Inje University, 607, Obangdong, Gimhae, Gyungnam 621-749, Korea, <sup>2</sup>Cancer Research Institute, Seoul National University, College of Medicine Yeongeon-dong, Jongno-gu, Seoul, Korea

We have investigated the effects of hypha-water extracts (HWE), fruit body-water extracts (FWE) and cordycepin from *Cordyceps militaris* on serotonin release out of human platelets and human platelet aggregation. HWE and FWE inhibited the release of [<sup>3</sup>H]-serotonin from human platelet stimulated by thrombin (2 U/ml) or collagen (20 µg/ml) in a dose-dependent manner. Furthermore, cordycepin, a major component of *Cordyceps militaris*, inhibited the human platelet aggregation induced by collagen (10 µg/ml) in a dose-dependent manner. These results suggest that cordycepin containing in HWE and FWE may inhibit the serotonin release by suppressing the collagen-induced human platelet aggregation. Accordingly, our data demonstrate that HWE and FWE containing much cordycepin might have antithrombotic and antimigrainous functions.

**Key Words:** *Clavicipitaceae*, Serotonin release, Cordycepin, Platelet aggregation

### 서 론

동충하초 (冬蟲夏草)는 분류학적으로 자낭균의 맥각균목, 동충하초과에 속하는 버섯으로, 겨울에는 곤충의 몸 속에 있다가 여름에는 풀처럼 나타난다. 이것은 한국을 비롯하여 일본, 중국 등에 널리 분포하고 있고, 중국에서는 성인병 치료제, 정력강장제 등 한방약재로 널리 이용되고 있다<sup>1,2</sup>. 이외에 항균작용, 혈압강화작용, 항암작용, 혈당저하작용<sup>1,4</sup> 등 다양한 약효가 알려지고부터 세인 (世人)의 흥미를 불러일으키고 있다. 그러나, 동충하초 그 자체 또는 그 성분이 혈전에 미치는 영향을 검토한 결과는 거의 없다. 본 연구는 혈소판 응집 반응과 편두통의 원인 인자로 알려져 있는 serotonin 방출 반응에 미치는 영향을 검토하는 것이 목적이다. Serotonin은 일반적으로 소화기관, 혈소판 및 중추신경계에서 발견되지만, 혈소판의 dense body에 가장 많이 농축되어 있고<sup>5</sup>, platelet activating factor (PAF), collagen, ADP, thrombin 등에 의해 자극을 받았을 때 혈소판으로부터 방출된다<sup>3,5,6,10</sup>. Thrombosis

는 serotonin의 방출 반응과 밀접하게 관련 있는 혈소판의 비가역적 응집에 기인하고<sup>3,5,6,10</sup>, 편두통의 주요 원인 물질은 혈소판으로부터 방출되는 serotonin이다<sup>4,11</sup>. 본 연구에서 동충하초의 자실체와 균사체 물추출물이 collagen 및 thrombin이 유인하는 serotonin 방출 반응을 억제했을 뿐만 아니라 동충하초의 자실체와 균사체의 주요 성분인 cordycepin은 농도에 의존하여 collagen (10 µg/ml)이 유인하는 혈소판 응집 반응을 억제시켰다. 이에 본 연구에서는 동충하초의 자실체 및 균사체 물추출물이 편두통 및 혈소판 응집 촉진 인자인 serotonin의 방출 반응을 억제시킴을 확인하였다.

### 재료 및 방법

#### 1. 재 료

본 연구에 사용한 동충하초 (*Cordyceps militaris*)의 자실체 및 균사체는 (주)고려식료 (경남 김해시 주촌면 원지리 1066번지)에서 인공적으로 배양하여 개발한 것을 사용하였으며, 추출물 제조 및 성분분석에 이용된 모든 시약은 Sigma Co. Ltd.에서 구입하였다.

#### 2. 자실체 및 균사체의 물추출물의 제조

Mixer (4-8-5241, 한일전기)로 분쇄한 자실체 100 g, 균사체 100 g 에 증류수 1 ℓ를 첨가하여 70~80°C에서 2시간씩 3번

\*는 문 접 수: 2004년 1월 6일

수정재접수: 2004년 1월 31일

†별책 요청 저자: 박화진, (우) 621-749 경남 김해시 어방동 607, 인제대학교 임상병리학과

Tel: 055-320-3538, Fax: 055-334-3426

e-mail: mlsjpark@inje.ac.kr

반복 중탕·교반한 후 원심 ( $4,000 \times g$ , 20 min,  $20^\circ C$ )하여 얻은 상층액을 filter paper (Advantec No. 2)로 filtration하였다. 이 여과액을  $40^\circ C$ 에서 농축하여 동결건조 시켜 시료로 사용하였다.

### 3. Concentrated human platelet-rich plasma (PRP) 제조

사람 혈소판 풍부 혈장 (platelet-rich plasma)을  $180 \times g$ ,  $25^\circ C$ 에서 15분 동안 원심 분리하여 여분의 다른 세포 즉 백혈구, 적혈구를 침전시킨 후 순수한 PRP만을 얻었다. 이것을 다시  $1,100 \times g$ ,  $25^\circ C$ 에서 10분 동안 원심하여 PPP (platelet-poor plasma)와 혈소판 pellets (PLTs)으로 분리하였다. 상층의 PPP 적당량을 PLTs에 조심스럽게 첨가하여 cell suspension ( $5 \times 10^8$  platelets/ml)을 제조하였다.

### 4. Serotonin loading

건강한 사람의 PRP를  $125 \times g$ 에서 10분 동안  $25^\circ C$ 에서 원심한 후 적혈구를 제거시키고, PRP 40 ml에 5-hydroxy-[ $G-^3H$ ]-tryptamine (serotonin,  $1 \mu M$ )을 첨가하여  $37^\circ C$ 에서 60분간 incubation 한 후  $1,100 \times g$ , 10분 동안 원심 분리하고, 침전물인 platelets를 Tris-citrate-bicarbonate buffer (129 mM NaCl, 10.9 mM Na Citrate, 8.9 mM  $NaHCO_3$ , 1 mg/ml Glucose, 10 mM Tris-hydroxymethylamino methane, 2.8 mM KCl, 0.8 mM  $KH_2PO_4$ , 2 mM EDTA, pH 6.5)<sup>8)</sup>에서 2회 세척 후, EDTA가 함유되어 있지 않은 Tris-citrate-bicarbonate buffer (pH 6.9)<sup>8)</sup>에서  $5 \times 10^8$  cells/ml로 조정하였다.

### 5. Serotonin의 방출 반응 측정

$CaCl_2$  2 mM을 함유하는 platelets ( $10^8$ /ml)에서 동충하초 (*Cordyceps militaris*) 물추출물을 첨가 또는 첨가하지 않은 상태에서 반응 tube (반응계 0.5 ml)를  $37^\circ C$ 에서 stirring하면서 2분 동안 preincubation 시킨 다음 thrombin (2 U/ml) 또는 collagen ( $20 \mu g/ml$ )을 첨가하여 5분 동안 반응시켰다. 반응은 16.5% formaldehyde로 정지시키고, 그 후 즉시  $25^\circ C$ 에서  $1,100 \times g$ 로 10분간 원심하여 생긴 상층액 300  $\mu l$ 를 Scint A-XF (Packard) 10 ml가 함유된 scintillation vial에 첨가하여 liquid scintillation counter로 cpm을 측정하였다. Serotonin의 방출은 Costa and Murphy의 방법<sup>2)</sup>에 따라 방출율 (%)을 계산하였다.

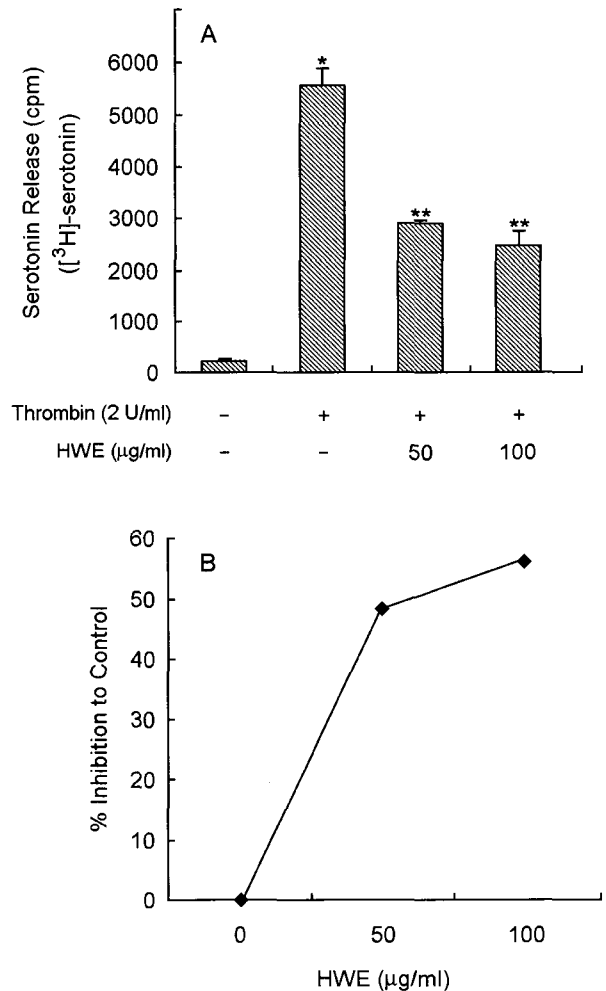
### 6. 혈소판 응집 반응

Platelet-rich plasma (PRP)를 aggregometer (Chrono Log Corp.) tube에  $10^8$  platelets/ml이 되게 넣고,  $37^\circ C$ 에서 3분간 preincubation 한 후 collagen ( $10 \mu g/ml$ )을 첨가하여 5분 동안 incubation시키고, 응집에 의한 빛의 투과도 증가를 측정했다.

Cordycepin의 영향을 보기 위해서 우선 cordycepin의 최종 농도를  $50 \mu M$ ,  $100 \mu M$ ,  $500 \mu M$ 로 하여, collagen을 첨가하기 전에  $37^\circ C$ 에서 3분간 preincubation 시킨 후 collagen ( $10 \mu g/ml$ )을 첨가하여 collagen에 의한 응집 반응과 마찬가지로 aggregometer (Chrono Log Corp.)에서 응집에 의한 빛 투과도의 변화를 측정했다.

### 7. Cordycepin의 함량 측정

동충하초 (*Cordyceps militaris*) 균사체 및 자실체로부터 제조한 물추출물 및 에탄올 추출물 (40, 80  $\mu g$ )에 anthrone reagent 40  $\mu l$  및 80  $\mu l$ 를 첨가하여 boiling water ( $100^\circ C$ )에서 10분간 반응시키고, cooling한 다음 260 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준용액으로 cordycepin (Sigma. Co. Ltd.) 1



**Fig. 1.** Effects of HWE from *Cordyceps militaris* on thrombin-induced serotonin release out of human platelets. **A:** serotonin release (cpm) ( $[^3H]$ -serotonin), **B:** % inhibition to control. Data are given as the mean  $\pm$  S.D. (n=3). HWE, hypha-water extracts. \* $P < 0.001$  compared with that of cell only. \*\* $P < 0.05$  compared with that of thrombin-induced serotonin levels.

mg/ml을 사용하였다.

## 결 과

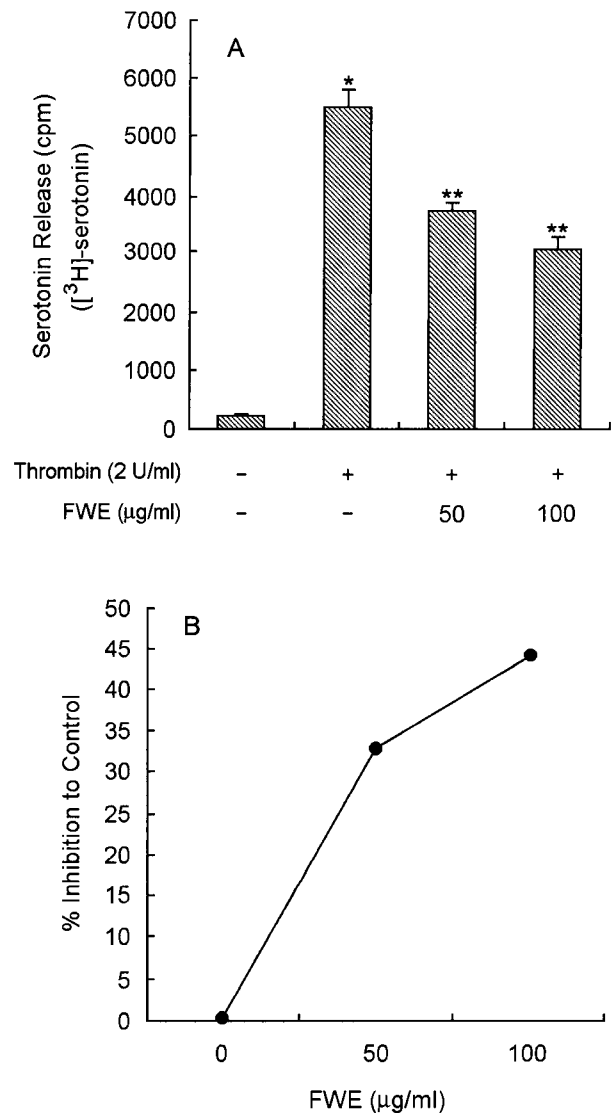
1. Thrombin에 의한 [<sup>3</sup>H]-serotonin 방출에 미치는 동충하초의 균사체 물추출물 (hypha-water extracts) 및 자실체 물추출물 (fruit body-water extracts)의 효과

Fig. 1은 thrombin (2 U/ml)에 의한 [<sup>3</sup>H]-serotonin의 방출 반응에 미치는 동충하초의 균사체 물추출물 (hypha-water extracts, HWE)의 영향을 표시한 것이다. Fig. 1-A에 표시한 바와 같이 사람 혈소판 (10<sup>8</sup>/ml)을 thrombin (2 U/ml)으로 자극하여 혈소판 응집 반응을 일으키면, control에 비해 thrombin (2 U/ml)에 의하여 현저하게 serotonin이 방출되었다 (Fig. 1-A). 그러나 HWE를 농도별로 첨가하여 3분간 37°C에서 preincubation 시킨 후, thrombin (2 U/ml)으로 5분간 반응시키면, 그 농도에 의존하여 [<sup>3</sup>H]-serotonin의 방출이 control에 비해 감소했다. 이것은 HWE가 thrombin (2 U/ml)에 의해 사람 혈소판으로부터 방출되는 [<sup>3</sup>H]-serotonin의 방출을 억제시키고 있음을 보여준다 (Fig. 1-B).

Fig. 2는 thrombin (2 U/ml)에 의한 [<sup>3</sup>H]-serotonin 방출 반응에 미치는 동충하초 자실체 물추출물 (fruit body-water extracts, FWE)의 영향을 표시한 것이다. Fig. 2-A에 표시한 바와 같이 사람 혈소판 (10<sup>8</sup>/ml)을 thrombin (2 U/ml)으로 자극하여 혈소판 응집 반응을 일으키면, control에 비해 thrombin (2 U/ml)에 의하여 현저하게 [<sup>3</sup>H]-serotonin이 방출되었다 (Fig. 2-A). 그러나 FWE를 농도별로 첨가하여 3분간 37°C에서 preincubation 시킨 후, thrombin (2 U/ml)으로 5분간 반응시키면, 그 농도에 의존하여 [<sup>3</sup>H]-serotonin의 방출이 감소하는 것을 볼 수 있다. 이것은 FWE가 thrombin (2 U/ml)에 의해 사람 혈소판으로부터 방출되는 [<sup>3</sup>H]-serotonin의 방출을 억제시키고 있음을 보여준다 (Fig. 2-B).

2. Collagen에 의한 [<sup>3</sup>H]-serotonin 방출 반응에 미치는 동충하초의 자실체 물추출물 (fruit body-water extracts)의 영향

Fig. 3은 collagen (20 µg/ml)에 의한 [<sup>3</sup>H]-serotonin의 방출 반응에 미치는 동충하초의 FWE의 영향을 표시한 것이다. Fig. 3에 표시한 바와 같이 사람 혈소판 (10<sup>8</sup>/ml)을 collagen (20 µg/ml)으로 자극하여 혈소판 응집 반응을 일으키면, collagen (20 µg/ml) 단독에 의한 serotonin 방출 반응에 비해 FWE를 농도별로 첨가하여 3분간 37°C에서 preincubation 시킨 후, collagen (20 µg/ml)으로 5분간 반응시키면, 그 농도에 의존하여 [<sup>3</sup>H]-serotonin의 방출이 collagen (20 µg/ml) 단독에 비해 감소하는 것을 볼 수 있다. 이것은 FWE가 collagen (20 µg/ml)에 의해 사람 혈소판으로 방출되는 [<sup>3</sup>H]-serotonin의 방



**Fig. 2.** Effects of FWE from *Cordyceps militaris* on thrombin-induced serotonin release out of human platelets. **A:** serotonin release (cpm) (<sup>3</sup>H-serotonin), **B:** % inhibition to control. Data are given as the mean ± S.D. (n=3). FWE, fruit body-water extracts. \*P<0.001 compared with that of cell only. \*\*P<0.05 compared with that of thrombin-induced serotonin levels.

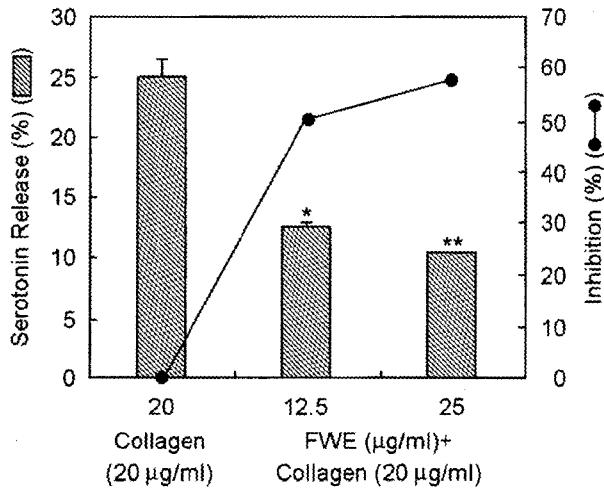
출을 억제시키고 있음을 보여준다.

3. Collagen에 의한 사람 혈소판 응집 반응에 미치는 cordycepin의 영향

Table 1에서 볼 수 있듯이 동충하초의 자실체와 균사체 물추출물에는 cordycepin이 다량 함유되어 있고, 또한 전술한 바와 같이 cordycepin은 다양한 기능을 가지고 있는 것으로 알려져 있지만, 혈소판 응집 반응에 대해 연구한 것은 없다. 또한 collagen, thrombin 등에 의한 혈소판 응집 반응시에 혈소판의 dense body에서 분비되는 serotonin은 autacoid로서 혈

**Table 1.** Contents of cordycepin in hypha and fruit body

	Hypha	Fruit body
Cordycepin ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ -powder)	166.4 $\pm$ 12.1	78.7 $\pm$ 9.1

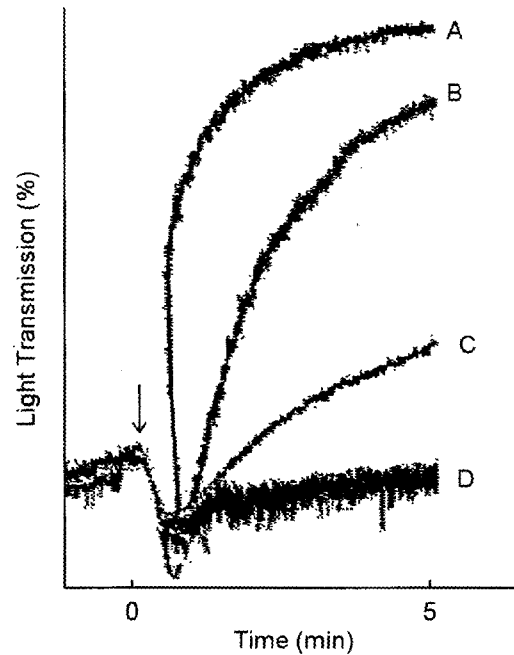


**Fig. 3.** Effects of FWE from *Cordyceps militaris* on collagen-induced serotonin release out of human platelets. Data are given as the mean  $\pm$  S.D. (n=3). FWE, fruit body-water extracts. \* $P$ <0.001 compared with that of collagen-induced serotonin levels. \*\* $P$ <0.05 compared with that of collagen-induced serotonin levels.

소판 응집 반응을 강력하게 촉진시키는 물질이므로 collagen에 의한 혈소판 응집 반응에 대해 cordycepin이 미치는 영향을 함께 검토했다.

Fig. 4는 사람 혈소판 ( $10^8/\text{ml}$ )의 응집 반응에 미치는 cordycepin의 영향을 표시한 것이다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 혈소판 응집은 collagen ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ )으로 유도하였으며, cordycepin  $50 \mu\text{M}$ 에서부터 약간의 혈소판 응집 억제 반응을 보이기 시작하였고,  $100 \mu\text{M}$ ,  $500 \mu\text{M}$ 로 농도를 높여 진행할수록 혈소판 응집 억제 효과는 더욱 커졌다. 즉 cordycepin은 collagen ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ )에 의한 사람 혈소판 응집 반응을 농도 의존적으로 강하게 억제시키고 있음을 제시하고 있다 (Fig. 4). 한편, cordycepin은 ethanol에 의해서 재구성 되었기 때문에, 용매에 의한 혈소판 응집 반응을 감안하여 혈소판 응집 억제율을 계산하였다. 즉 cordycepin은 collagen에 의한 사람 혈소판 응집 반응을 농도 의존적으로 강력하게 저해시키는 항혈소판제로서의 의미를 가진다고 할 수 있다 (Fig. 4).

따라서 collagen에 의한 혈소판 응집 반응을 강력하게 억제시키는 cordycepin은 serotonin의 방출을 억제시키는 HWE 및 FWE에 함유되어 있으므로, cordycepin이 serotonin의 방출을 억제할 가능성이 있지만 이것에 대한 것은 금후 검토해 볼 필요가 있다. 또한 혈소판 응집 억제 반응은 serotonin



**Fig. 4.** Effect of cordycepin on collagen-induced human platelet aggregation. Arrow is indicated as a collagen-addition point. A: collagen  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ , B: cordycepin  $50 \mu\text{M}$  + collagen, C: cordycepin  $100 \mu\text{M}$  + collagen, D: cordycepin  $500 \mu\text{M}$  + collagen.

의 방출 억제 반응과 관계가 있으므로 혈소판 응집 반응을 억제하면서 cordycepin을 함유하는 동충하초의 HWE 및 FWE는 항혈소판 작용 및 항편두통 작용을 가지고 있을 것으로 사료된다.

## 고 찰

혈소판은 collagen 및 thrombin에 의해 자극을 받으면 혈소판의 응집 반응을 촉진하는 thromboxane  $A_2$  ( $\text{TXA}_2$ )가 막인 지질로부터 분해되어 나오는 arachidonic acid로부터 생성된다<sup>7)</sup>. 특히 높은 농도의 collagen ( $5\sim 20 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) 및 thrombin ( $1\sim 5 \text{U}/\text{ml}$ )으로 혈소판이 자극받았을 때 분비되어 나오는 serotonin은 혈소판의 비가역적인 응집 반응을 촉진한다<sup>7)</sup>. 이와 같은 사실을 통해 collagen 및 thrombin에 의한 serotonin의 방출 반응을 억제하면, 혈소판의 응집 반응을 촉진하는  $\text{TXA}_2$ 의 생성을 저해시킬 수 있음을 알 수 있다.

Fig. 1과 Fig. 2에서 보면 HWE와 FWE는 thrombin ( $2 \text{U}/\text{ml}$ ) 및 collagen ( $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ )에 의해 증가된 serotonin의 방출 반응을 농도 의존적으로 억제하고 있다. 이러한 사실은 HWE와 FWE가 thrombin 또는 collagen에 의한 혈소판 응집 반응에서  $\text{TXA}_2$ 의 생성을 억제시킬 수 있음을 의미한다. 또한 이것을 반영해 주는 것은 HWE 및 FWE에 다량 함유되어 있는 cordycepin (Table 1)이 collagen에 의해 일어나는 혈소판

응집 반응을 농도 의존적으로 강력하게 억제하고 있다는 사실이다 (Fig. 4). 다시 말해서 cordycepin은 collagen이나 thrombin 자극에 의한 혈소판 응집 반응에서 TXA<sub>2</sub>의 생성을 억제시킬 가능성을 제시하고 있다. 실제로 다른 실험에서 cordycepin은 TXA<sub>2</sub>의 전구물질인 arachidonic acid를 결합하고 있는 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate의 분해를 강력히 저해했다 (data not shown). 그러나 HWE 및 FWE에 함유되어 있는 어떤 성분이 collagen 또는 thrombin에 의한 serotonin의 방출 억제 및 혈소판 응집 억제에 관여하는지는 현재 알려져 있지 않지만, 강력한 후보 물질로서 cordycepin을 들 수 있다.

또한 동충하초의 HWE 및 FWE에는 oleic acid (18:1)가 각각 30.6%, 11.1% 함유되어 있다<sup>13)</sup>. 그리고 oleic acid는 linoleic acid, eicosapentaenoic acid, docosahexaenoic acid와 더불어 동맥경화의 위험 인자인 혈소판의 응집 반응을 억제시키는 것으로 알려져 있다<sup>13)</sup>. 따라서 HWE 및 FWE에 의한 사람 혈소판 응집 반응의 억제는 각각 30.6%, 11.1% 함유되어 있는 oleic acid에서 기인될 수도 있다. 한편, HWE 및 FWE의 아미노산 조성을 살펴보면, HWE 및 FWE에는 lysine이 각각 28.6%, 14.4%, arginine이 31.7%, 7.2% 함유되어 있다<sup>13)</sup>. Lysine은 polyamine으로서 혈소판을 강력하게 억제시키는 것으로 알려져 있다<sup>1)</sup>. 그리고 arginine은 혈소판 내부에서 혈소판 응집의 주요 인자인 Ca<sup>2+</sup>의 동원을 억제하는 작용을 가진 cGMP의 생성을 촉진시킴으로서 혈소판 응집을 억제시키는 작용을 가진다<sup>12)</sup>.

이상과 같이 동충하초의 HWE, FWE는 혈소판 응집을 강력하게 억제하는 cordycepin (Table 1), oleic acid, lysine 및 arginine 등을 함유하고 있기 때문에 동맥경화의 병리현상인 혈소판의 응집 반응 억제와 serotonin의 방출 반응을 억제시키는 후보 물질이 될 수 있음을 시사한다.

#### 감사의 말씀

본 연구는 인제대학교 학술 연구 조성비 지원 (연구과제 번호: 00011999239)에 의해 수행된 연구 결과이며, 깊이 감사드립니다.

#### 참고 문헌

- 1) Cho HJ, Ham HS, Lee DS and Park HJ (2003): Effects of proteins from hen egg yolk on human platelet aggregation and blood coagulation. *Biol Pharm Bull*, **26**: 1388-1392.
- 2) Costa JL and Murphy DL (1975): Platelet 5-HT uptake and release stopped rapidly by formaldehyde. *Nature*, **255**: 407-408.
- 3) Dale GL, Friese P, Batar P, Hamilton SF, Reed GL, Jackson KW, Clemetson KJ and Alberio L (2002): Stimulated platelets use serotonin to enhance their retention of procoagulant proteins on the cell surface. *Nature*, **415**: 175-179.
- 4) Durham P and Russo A (2002): New insights into the molecular actions of serotonergic antimigraine drugs. *Pharmacol Ther*, **94**: 77-92.
- 5) Maurer-Spurej E, Pittendreigh C and Solomons K (2004): The influence of selective serotonin reuptake inhibitors on human platelet serotonin. *Thromb Haemost*, **91**: 119-128.
- 6) Mustard JF and Packham MA (1970): Factors influencing platelet function: adhesion, release, and aggregation. *Pharmacol Rev*, **22**: 97-187.
- 7) Narita H, Park HJ, Tanaka K, Matsuura T and Kito M (1985): Insufficient mobilization of calcium by early breakdown of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate for aggregation of human platelets by collagen. *J Biochem (Tokyo)*, **98**: 1063-1068.
- 8) Rittenhouse-Simmons S and Deykin D (1976): Isolation of membranes from normal and thrombin-treated gel-filtered platelets using a lectin marker. *Biochim Biophys Acta*, **426**: 688-696.
- 9) Segawa T (1981): Storage and release of serotonin (author's transl). *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, **26**: 1662-1666.
- 10) Tollefsen DM, Feagler JR and Majerus PW (1974): The binding of thrombin to the surface of human platelets. *J Biol Chem*, **249**: 2646-2651.
- 11) Villalon CM, Centurion D, Valdivia LF, De Vries P and Saxena PR (2002): An introduction to migraine: from ancient treatment to functional pharmacology and antimigraine therapy. *Proc West Pharmacol Soc*, **45**: 199-210.
- 12) Walter U (1989): Physiological role of cGMP and cGMP-dependent protein kinase in the cardiovascular system. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, **113**: 41-88.
- 13) 박화진, 최미애 (1998): 동충하초 (冬蟲夏草) 함유성분의 약리학적 기능 고찰. 인제대학교, 인제논총, **14**: 1145-1153.
- 14) 이지열 (1996): 버섯이야기 ② 동충하초. 임산버섯. **11**: 46-48.