

## *Cordyceps militaris* 성분이 당대사 관련 효소 활성화에 미치는 영향

김현숙<sup>1</sup> · 노영주<sup>2</sup> · 최 면<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>강원대학교 한국영양과학연구소

<sup>2</sup>강원대학교 축산식품과학과

### Effects of *Cordyceps militaris* on Key Enzymes of Carbohydrate Metabolism

Hyun Sook Kim<sup>1</sup>, Young Joo Ro<sup>2</sup> and Myeon Choe<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Korea Institute of Nutritional Science, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

<sup>2</sup>Dept. of Food Science and Technology in Animal Resources,  
Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

#### Abstract

The present study was designed to investigate the antidiabetic effect of *Cordyceps militaris* on activities of hepatic glucose-regulating enzymes, such as glucokinase (GK), pyruvate dehydrogenase (PDH) and acetyl-CoA carboxylase (ACC). We have isolated the active compounds, CM-A and CM-B from *C. militaris* and the extracts are under investigation to determine their mechanism of action. Hepatic GK, PDH and ACC activities were significantly ( $p < 0.05$ ) increased compared with the control. Treatment with CM-A led to a rise in percentage of enzymes by 380%, 396% and 286%, respectively, relative to control levels. CM-B were 329%, 312% and 239%, respectively. The increase in GK and ACC activities was linearly proportional with increased ratio of CM-A. Our findings suggest that *C. militaris* exerted antihyperglycemic potency, which is thought to be mediated through activation of GK, PDH and ACC enzymes related to glucose metabolism directly or indirectly and therefore *C. militaris* is promising as antidiabetic functional foods.

**Key words:** *Cordyceps militaris*, antihyperglycemic, glucokinase, pyruvate dehydrogenase, acetyl-CoA carboxylase

#### 서 론

당뇨병의 원인은 다양하지만 당뇨 증상의 개선이나 치유의 기본 원리는 식사 후 체내로 흡수된 당의 이용 속도를 증가시켜 혈중에 당이 과도하게 머무는 시간을 감소시키는 것이다. 최근 천연소재들을 대상으로 고혈당을 억제하는 항당뇨 효능을 검색하여 질병예방, 회복, 생체조절기능 등을 갖는 기능성 식품 개발이 활발히 진행되고 있다. 항당뇨 효능 검증을 위해 사용된 방법은 현상적 혈당 강하작용(당의 소화 흡수조절 관련) 또는 부분적으로 기작 규명이 수반된 혈당 강하작용(insulin 분비 및  $\beta$ -cell의 기능 회복 관련)을 규명하고자 하는 것이 대부분이다.

세포내로 흡수된 당의 이용 속도를 증가시키려면 1차적으로 해당작용의 첫 단계 주요 조절 효소인 glucokinase(GK) 활성을 증가시키는 능력을 가져야 하고, 2차적으로는 NADP<sup>+</sup> 존재하에 glucose-6-phosphate를 6-phosphogluconate로 산화시키는 pentose phosphate pathway의 초기 단계에 작용하는 glucose-6-phosphate dehydrogenase(G6PDH)나 생성된 pyruvate를 acetyl-CoA로 탈탄산화시키는 pyru-

vate dehydrogenase(PDH) 또는 비활성형에서 활성형의 PDH로의 전환에 관여하는 PDH phosphatase 등을 활성화시켜 흡수된 당의 이용을 촉진시키는 기능을 가지고 있어야 한다(Fig. 1). 그리고 식후 미토콘드리아내로 지방산을 이동시켜 지방산 산화 및 에너지 공급을 돕는 carnitine palmitoyl transferase를 저하시키거나 생성된 acetyl-CoA를 지방산 생합성의 첫 번째 산물인 malonyl-CoA로 전이하는 과정을 촉매하는 acetyl-CoA carboxylase(ACC) 및 fatty acid synthase를 활성화시킬 수 있는 기능이 있다면 더욱 완벽하게 혈당을 감소시키는 효능이 있다고 할 수 있다.

항암, 항산화, 면역증강, 혈당강하 등 다양한 생리활성을 지닌 동충하초는 *Cordyceps* 속을 중심으로 많은 연구가 진행되어 왔다. 항당뇨 효능 관련 연구에서 *C. militaris*의 혈당 강하 효능이 입증되었고(1), Kiho 등(2,3)은 *C. sinensis*에서 분리된 다당류가 간의 GK 활성을 증가시켜 혈당 강하에 효과가 있음을 보고하였다. 우리 연구진은 *P. japonica*와 *C. militaris*에서 혈당강하 기능성 성분을 분리한 후 간의 GK 활성을 측정하여 항당뇨 효능을 검증한 바 있다(4). 그러나 GK 이외의 당대사 관련 효소들의 활성 조절과 관련된 항당

\*Corresponding author. E-mail: mchoe@kangwon.ac.kr  
Phone: 82-33-250-8645. Fax: 82-33-244-2198

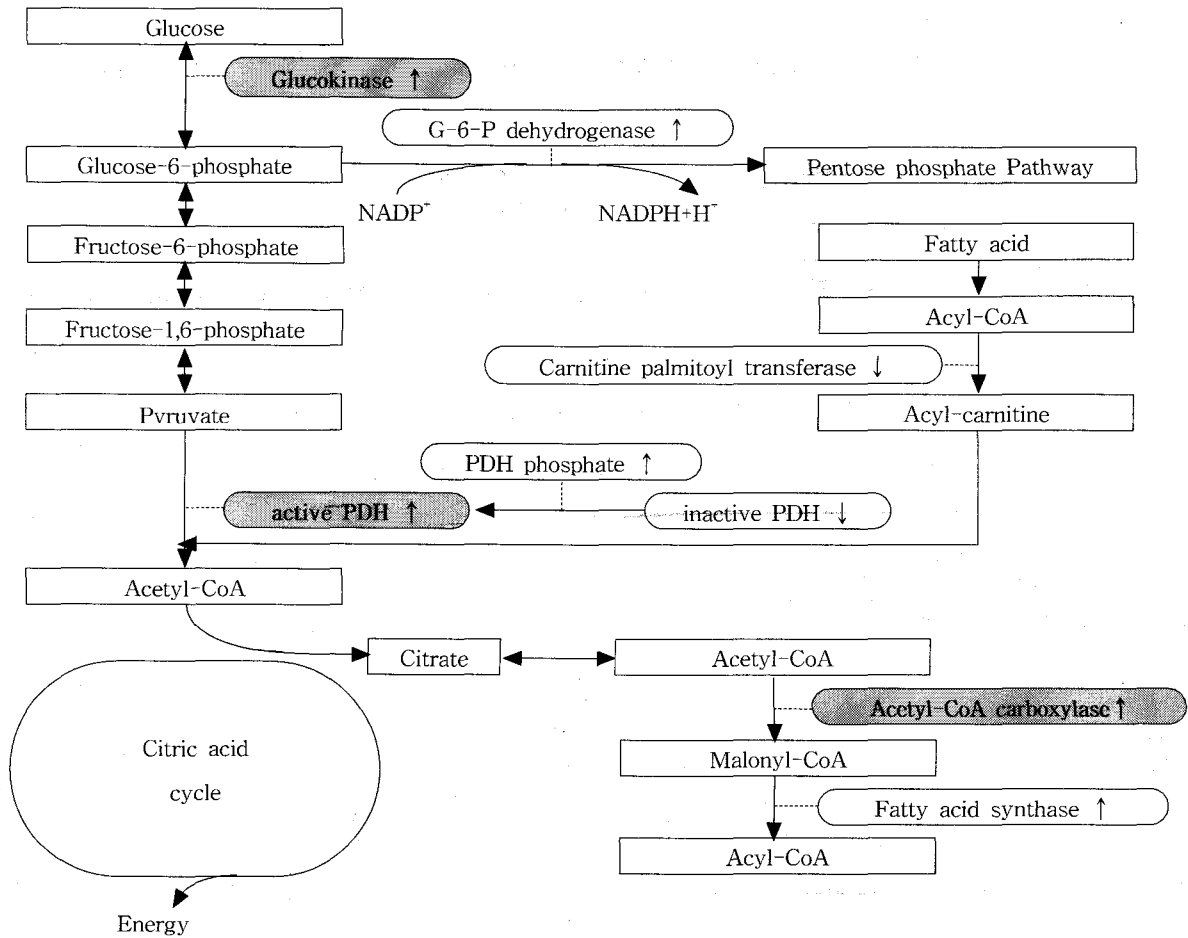


Fig. 1. Mechanism of carbohydrate metabolism in cells.

노 대사 기전을 중심으로 한 연구는 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 *C. militaris*의 기능성 성분이 당대사 관련 효소인 GK, PDH 및 ACC 활성에 미치는 영향을 측정하여 항당뇨 작용 기전을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

유효성분 추출

*C. militaris*에서 기능성 성분은 Kiho 등(2,3)의 방법을 수정하여 추출하였다. 건조 분말에 에탄올을 첨가하여 72시간 동안 추출하였고 다시 70% 에탄올로 10시간씩 두 번 추출하여 다시 열수 추출하였다. 추출물은 증류수로 투석하여 탈염하였고 non-dialyzable solution에 2배의 에탄올을 첨가한 후 원심분리하여 얻은 침전물은 감압농축 후 동결건조하여 CM-A라 하였다. 열수 추출후 남은 residue에 5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>로 24시간 동안 추출하였고, 다시 NaBH<sub>4</sub>를 포함한 5% NaOH로 추출하였다. 추출물은 2 mol HCl로 중화시킨 후 투석하여 탈염하였고, non-dialyzable solution에 에탄올을 가한 후 원심분리하여 얻은 침전물은 감압농축 후 동결건조하여 CM-B라 하였다.

Tissue fraction 분리

유효성분의 혈당강하 효능을 *in vitro*에서 검증하기 위하여 백서로부터 간을 적출한 후 조직액을 분리하여 추출물을 처리하였다. 간은 차가운 생리식염수로 세척하였고 완충액(150 mM KCl, 5 mM EDTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM 2-mercaptoethanol, pH 7.4)를 넣고 균질화한 후 4°C, 1,500×g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액을 다시 4°C, 105,000×g에서 1시간 동안 초원심분리(Beckman, USA)하여 cytosol을 분리하였다. 침전물은 완충액(250 mM sucrose, 10 mM Tris·HCl, 0.5 mM EDTA)으로 부유시켜 4°C, 10,000×g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 4°C, 105,000×g에서 1시간 동안 초원심분리하여 mitochondria를 분리하였다(5).

Glucokinase activity

Glucokinase 활성은 Sharma 등(6) 및 Ahn과 Kim(7)의 방법으로 측정하였다. Reaction buffer(44 mM GlyGly, 7.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 mM ATP, 0.4 U G-6-PDH, 0.75 mM NADP<sup>+</sup>)와 100 mM glucose를 넣고 실온에서 5분간 반응시킨 후 분획물 200 μL과 cytosol을 첨가하였다. 흡광광도계로 340 nm에서 초기 흡광도를 측정하였고 생성된 NADPH 양을 1분 간격으로 3분 동안 측정하였다. 또한 0.5 mM glucose로

hexokinase에 의한 NADPH 생성량에 대한 보정을 하였고, 분당 NADPH 생성량을 대조군에 대한 백분율로서 표시하였다.

**Pyruvate dehydrogenase activity**

PDH 활성은 Shuichi와 Takashi(8)의 방법으로 측정하였다. Reaction buffer(25 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM  $\rho$ -nitroaniline, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM 2-mercaptoethanol, 10 mU arylamine acetyltransferase, 1 mM TPP, 0.5 mM  $\text{NAD}^+$ , 0.1 mM CoA, 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  lactate dehydrogenase)와 20 mM pyruvate를 넣고 25°C에서 5분간 반응시킨 후 각 분획물 200  $\mu\text{L}$ 과 mitochondria 조직액을 넣고 410 nm에서 초기 흡광도를 측정하였고 반응한  $\rho$ -nitroaniline 양을 1분 간격으로 3분 동안 측정하였다.

**Acetyl-CoA carboxylase activity**

ACC 활성은 Tadashi 등(9)의 방법으로 측정하였다. Reaction buffer(50 mM Tris · HCl, 10 mM potassium citrate, 3.75 mM glutathion, 0.125 mM NADH, 0.2 mg BSA, 0.125 mM acetyl CoA, 0.5 mM potassium phosphoenolpyruvate, 0.009 mg pyruvate kinase, 0.002 mg LDH, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ )와 cytosol를 넣고 37°C에서 12분간 반응시킨 후 3.75 mM ATP 첨가하였고, 다시 37°C에서 1분간 반응시킨 후 25 mM  $\text{KHCO}_3$  가한 후 340 nm에서 초기 흡광도를 측정하였고 반응한 NADH 양을 1분 간격으로 3분 동안 측정하였다.

**통계 처리**

실험결과는 평균±표준편차로 나타내었고 각 처리군의 평균간의 유의성은 ANOVA를 이용하여  $\alpha=0.05$  수준에서 Duncan's multiple range test로 검정하였다.

**결 과**

**Glucokinase activity**

*C. militaris*에서 추출된 CM-A와 CM-B 분획물의 간세포내 GK 활성화에 미치는 영향은 Fig. 2와 같다. 대조군을 100% 기준으로 하였을 때 CM-A 380%, CM-B 329%로 나타나 모두 대조군에 비해 유의적으로 활성이 증가되었다 ( $p<0.05$ ).

**Pyruvate dehydrogenase activity**

*C. militaris*에서 추출된 CM-A와 CM-B의 PDH 활성화에 미치는 영향을 대조군과 비교하여 나타내었다(Fig. 3). 대조군을 100% 기준으로 하였을 때 CM-A 396%, CM-B 312%로 나타나 모두 대조군에 비해 유의적으로 활성이 증가되었다 ( $p<0.05$ ).

**Acetyl CoA carboxylase activity**

CM-A와 CM-B의 간세포내 ACC 활성화에 미치는 영향은 Fig. 4에 나타내었다. 대조군에 비해 CM-A 286%, CM-B 239%의 활성을 나타내 대조군에 비해 유의적으로 활성이

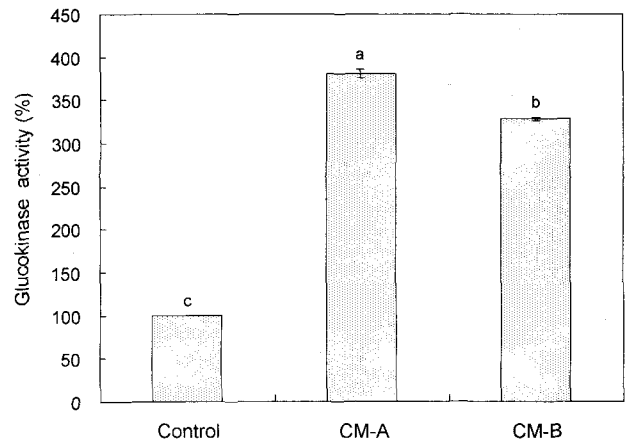


Fig. 2. Glucokinase activity of CM-A and CM-B fractions extracted from *Cordyceps militaris*. Each bar represents the mean of three independent experiments. Values with different letters are significantly different ( $p<0.05$ ).

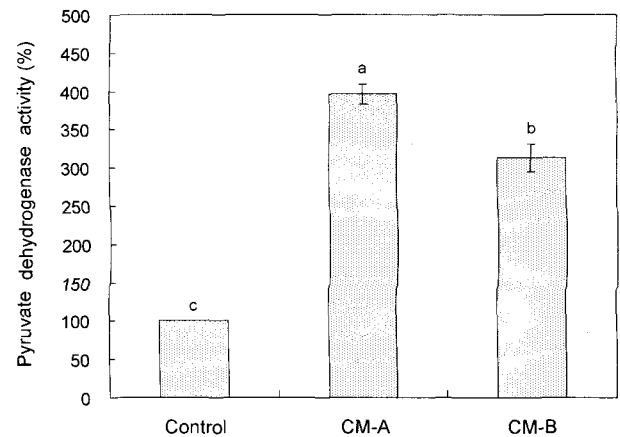


Fig. 3. Pyruvate dehydrogenase activity of CM-A and CM-B fractions extracted from *Cordyceps militaris*. Each bar represents the mean of three independent experiments. Values with different letters are significantly different ( $p<0.05$ ).

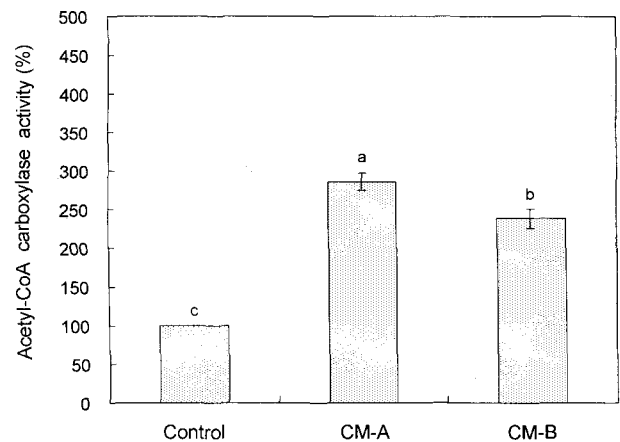


Fig. 4. Acetyl-CoA carboxylase activity of CM-A and CM-B fractions extracted from *Cordyceps militaris*. Each bar represents the mean of three independent experiments. Values with different letters are significantly different ( $p<0.05$ ).

증가되었다( $p < 0.05$ ).

#### 추출물의 혼합 비율에 따른 활성 비교

유효성분의 항당뇨 효능에 대한 상승효과를 알아보기 위하여 각각의 분획물 CM-A와 CM-B를 1:3, 2:2 및 3:1 비율로 혼합했을 때의 효소 활성을 측정하여 Fig. 5에 나타내었다. GK 활성은 CM-A와 CM-B가 3:1 비율일 때 가장 높게 나타났으며, CM-A 함량이 높아질수록 단독일 때보다는 활성이 증가하는 것으로 나타났다. PDH는 CM-A와 CM-B 비율이 2:2일 때 379%로 가장 높게 나타났으나, 이는 CM-A 단독일 때의 396%보다는 낮은 수치였다. ACC는 각각 267%, 304% 및 390%로 나타나 CM-A 함량이 많을수록 활성이 증가하는 것으로 나타났다.

## 고 찰

당뇨병은 당대사와 관련된 효소의 활성을 유도하는데 필요한 인슐린을 분비하는 췌장  $\beta$ -cell의 기능 저하로 특징지어지는 질환이다. 본 연구에서는 *C. militaris*가 당대사 관련 효소인 GK, PDH 및 ACC 효소 활성에 미치는 영향을 측정하였고, 결과적으로 *C. militaris*는 이들 효소의 활성을 유의적으로 증가시켰다.

최근 다양한 약용식물에서 간의 hexokinase(HK), GK, G6PDH, G-6-phosphatase(G6Pase), glycogen synthase, glycogen phosphorylase 및 phosphofructokinase 활성을 유의적으로 변화시킴으로써 혈당강하 작용을 한다는 많은 연구들이 보고되었다(10-14). 당대사와 관련된 연구에서 Joo 등(15-17)과 Lee 등(18)은 홍삼 사포닌 성분의 혈당 강하작용이 당뇨로 저하된 GK, ACC, G6PDH, 6-phosphogluconate

dehydrogenase 및 glycogen synthetase 활성을 유의적으로 증가시키고 상승된 G6Pase 활성을 낮추는 효과에 기인함을 관찰하였다. 닭의장풀은 혈당 감소효과가 있으며, 당뇨병자의 인슐린에 대한 내성은 당대사에 관여하는 효소인 G6PDH, ACC 및 fatty acid synthetase 등의 활성저하가 그 요인이라고 하였다(19). 함초섭취는 당뇨에 의해 증가된 G6Pase 활성을 정상 수준으로 회복시킴으로써 고혈당 발생을 억제하였고(20), 누에분말 투여에 의한 혈당강하작용의 가능한 기작은  $\alpha$ -glycosidase 활성 억제작용에 기인한다고 보고되었다(21,22). 또한 뽕잎은 당뇨쥐 소장 proximal 부분의 이당류 분해효소 활성을 억제시켜 혈당 상승을 완화시킨다고 하였다(23).

간의 GK, PDH 및 G6PDH 활성은 공복이나 당뇨시에 낮고 이들 효소의 활성도 감소는 고혈당의 요인이 되며 인슐린 저항성에 관련이 있다(24,25). Seoane 등(26)은 낮은 GK 활성은 당신생을 통해 합성된 당질의 순환을 유리시키는 방향으로 작용하며, 반면에 높은 GK 활성은 간에서 글리코겐 축적을 증가시킨다고 하였다. Vats 등(27)에 의하면 *Trigonella foenumgraecum*(FG) 섭취로 GK와 phosphofructokinase 활성이 증가된 것은 FG에 의해 당질의 세포내 이동이 촉진되었음을 의미하며 순차적으로 이들 효소의 활성이 자극되었기 때문이라고 하였다. Chithra와 Leelamma(28)는 고수(*Coriandrum sativum*)씨는 G6PDH 활성을 증가시킴으로써 혈당강하 효능을 나타내며, 이는 G6PDH 활성 증가로 인해 pentose phosphate pathway와 glycolysis에 의한 당질의 이용이 증가했기 때문이라고 하였다.

결론적으로 *C. militaris*는 당대사 관련 효소인 GK, PDH 및 ACC 활성을 유의적으로 증가시킴으로써 흡수된 당의 이용과 지방산 합성에 보다 유리하게 작용하여 혈중 포도당의 급격한 상승을 억제시킬 수 있을 것으로 판단되어지며 이로 인해 높아진 혈당을 낮출 수 있을 것으로 사료된다. 그러나 *C. militaris*의 항당뇨 성분이 직접적으로 효소 활성에 관여하는지 간접적으로 효소의 합성을 증가시키는 것인지에 대하여는 지속적으로 연구가 진행되어야 할 것이다.

## 요 약

*C. militaris* 동충하초의 기능성을 규명하기 위하여 당대사 관련 효소인 GK, PDH 및 ACC 활성을 측정하였다. *C. militaris*에서 추출된 CM-A와 CM-B는 GK와 PDH 및 ACC 효소에 대하여 대조군에 비해 높은 활성을 나타냈으며, CM-B 보다는 CM-A에서 유의적으로 높은 활성 증가를 나타냈다( $p < 0.05$ ). 간세포내 당질 관련 효소의 활성은 CM-A와 CM-B 분획물의 혼합 비율에 영향을 받는 것으로 나타났는데 활성이 높은 CM-A의 비율이 커질수록 유의적으로 높은 활성 증가를 나타냈다. GK와 ACC는 단일 상태의 CM-A 보다는 혼합된 상태일 때 활성이 증가하였지만, PDH는 혼

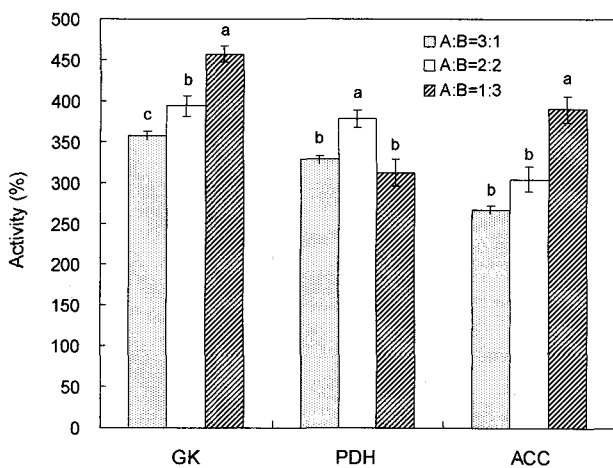


Fig. 5. Glucokinase, pyruvate dehydrogenase and acetyl-CoA carboxylase activity of the proportion of CM-A to CM-B. The ratio of A:B means the proportion of CM-A/CM-B for each extract. Each bar represents the mean of three independent experiments. Values with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

합된 상태보다는 CM-A 단독일 때 가장 높은 활성을 나타냈다. 결론적으로 *C. militaris*는 GK, PDH 및 ACC 등의 효소 활성을 증가시킴으로써 혈중 포도당의 상승을 억제하며 이로 인해 항당뇨 작용을 한다고 판단된다.

### 감사의 글

본 연구는 2004년도 중소기업청지원 중소기업기술혁신개발사업 및 한국영양과학연구소의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### 문헌

1. Kwon YM, Cho SM, Kim JH, Lee JH. 2001. Hypoglycemic effect of *Cordyceps militaris*. *Kor J Pharmacogn* 32: 327-329.
2. Kiho T, Ookubo K, Usui S, Ukai S, Hirano K. 1999. Structural features and hypoglycemic activity of a polysaccharide (CS-F10) from the cultured mycelium of *Cordyceps sinensis*. *Biol Pharm Bull* 22: 966-970.
3. Kiho T, Yamane A, Hui J, Usui S, Ukai S. 1996. Hypoglycemic activity of polysaccharide (CS-F30) from the cultured mycelium of *Cordyceps sinensis* and its effect on glucose metabolism in mouse liver. *Biol Pharm Bull* 19: 294-296.
4. Kim HS, Roh YJ, Choe M. 2005. *Cordyceps militaris* increases hepatic glucokinase activities. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 158-161.
5. Hans UB. 1983. Cell and tissue fractionation. *Method of Enzymatic Analysis* 2: 38-45.
6. Sharma C, Manjehwar R, Weinhouse S. 1963. Effects of diet and insulin on glucose-adenosine triphosphate phosphotransferases of rat liver. *J Biol Chem* 238: 3840-3845.
7. Ahn HS, Kim HR. 1992. Effects of dietary fat to carbohydrate ration on hepatic glucokinase activity in rats. *Kor J Nutr* 25: 109-115.
8. Shuichi F, Takashi H. 1982. Pyruvate dehydrogenase complex from pigeon breast muscle. *Methods in Enzymology* 89: 414-420.
9. Tadashi T, Shigetada N, Takashi H, Hideo O, Junichi N, Shosaki N. 1981. Acetyl-CoA carboxylase from rat liver. *Methods in Enzymology* 71: 5-15.
10. Lee HA, Kwon SO, Lee HB. 1997. Hypoglycemic action of components from red ginseng: (I) investigation of the effect of ginsenosides from red ginseng on enzymes related to glucose metabolism in cultured rat hepatocytes. *Korean J Ginseng Sci* 21: 174-186.
11. Kumari K, Mathew BC, Augusti KT. 1995. Antidiabetic and hypolipidemic effects of S-methyl cysteine sulfoxide isolated from *Allium cepa* linn. *Indian J Biochem Biophys* 32: 49-54.
12. Bopanna KN, Kannan J, Gadgil S, Balaraman R, Rathod SP. 1997. Antidiabetic and antihyperlipidemic effects of neem seed kernel powder on alloxan-diabetic rabbits. *Indian J Pharmacol* 29: 162-167.
13. Khan BA, Abraham A, Leelamma S. 1995. Hypoglycemic action of *Murraya Koenigii* (curry leaf) and *Brassica juncea* (mustard): mechanism of action. *Indian J Biochem Biophys* 32: 106-108.
14. Glombitz KW, Mahran GH, Mirhom YM, Michel KG, Motawi TK. 1994. Hypoglycemic and antihyperglycemic effect of *Ziphus spinachristi* in rats. *Planta Med* 60: 244-247.
15. Joo CN, Yoon SH, Lee HS, Kim YK, Koo JH, Lee HB. 1992. Study on the hypoglycemic action of ginseng saponin on streptozotocin induced diabetic rats (II). *Korean J Ginseng Sci* 16: 198-209.
16. Joo CN, Koo JH, Lee HB. 1993. Study on the hypoglycemic action of fat soluble fraction of *Panax ginseng* C.A. meyer in streptozotocin induced diabetic rats. *Korean J Ginseng Sci* 17: 13-21.
17. Joo CN, Kim SJ. 1993. Hypoglycemic action of fat soluble fraction of *Panax ginseng* C.A. meyer in streptozotocin induced diabetic rats. *Korean J Ginseng Sci* 17: 101-108.
18. Lee HA, Sim HS, Choi KJ, Lee HB. 1998. Hypoglycemic action of red ginseng components (II): investigation of the effect of fat soluble fraction from red ginseng on enzymes related to glucose metabolism in cultured rat hepatocytes. *Korean J Ginseng Sci* 22: 51-59.
19. Roman-Ropez CR, Allred JB. 1987. Acute alloxan diabetes alters the activity but not the total quantity of acetyl CoA carboxylase in rat liver. *J Nutr* 117: 1976-1981.
20. Bang MA, Kim HA, Cho YJ. 2002. Hypoglycemic and antioxidant effect of dietary Hamcho powder in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 315: 840-846.
21. Cho MR, Choue RW, Chung SH, Ryu JW. 1998. Effects of silkworm powder on blood glucose and lipid levels in NIDDM (Type II) patients. *Korean J Nutr* 31: 1139-1150.
22. Chung SH, Kim MS, Choue RW. 1997. Effect of *Mori folium* column fraction on intestinal  $\alpha$ -glycosidase activity in mice administered with a high carbohydrate-containing diet. *Yakhak Hoeji* 41: 484-491.
23. Yoo SK, Kim JW, Rhee SJ. 2002. Effects of YK-209 mulberry leaves on disaccharidase activities of small intestine and blood glucose-lowering in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 1071-1077.
24. Shimizu T, Parker JC, Najafi H, Matschinsky FM. 1988. Control of glucose metabolism in pancreatic  $\beta$ -cells by glucokinase, hexokinase and phosphofructokinase: model study with cell lines derived from  $\beta$ -cells. *Diabetes* 37: 1524-1530.
25. Matschinsky FM. 1990. Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic  $\beta$ -cells and hepatocytes. *Diabetes* 39: 647-652.
26. Seoane J, Gomez-Foix AM, O'Doherty RM, Gomez-Ara C, Newgard CB, Guinovart JJ. 1966. Glucose 6-phosphate produced by glucokinase, but not hexokinase I, promotes the activation of hepatic glycogen synthase. *J Biol Chem* 271: 23756-23760.
27. Vats V, Yadav SP, Grover JK. 2003. Effect of *T. foenum-graecum* on glycogen content of tissues and the key enzymes of carbohydrate metabolism. *J Ethnopharmacology* 85: 237-242.
28. Chithra V, Leelamma S. 1999. *Coriandrum sativum*-mechanism of hypoglycemic action. *Food Chemistry* 67: 229-231.

(2005년 9월 29일 접수; 2005년 12월 2일 채택)