

*Cordyceps militaris*에 함유된 혈당강하 성분이 간세포 Glucokinase 활성화에 미치는 영향

김현숙¹ · 노영주² · 최 면^{2*}

¹강원대학교 한국영양과학연구소

²강원대학교 축산식품과학과

Cordyceps militaris Increases Hepatic Glucokinase Activities

Hyun Sook Kim¹, Young Joo Roh² and Myeon Choe^{2*}

¹Korea Institute of Nutritional Science,

²Dept. of Animal Food Science, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Abstract

We have isolated fractions from *Cordyceps militaris* and *Paecilomyces japonica* and investigated their effects on the activity of rat liver cytosolic glucokinase, a key metabolic enzyme involved in carbohydrate metabolism. The dried powder of the *C. militaris* and *P. japonica* were successively extracted with ethanol and with 70% ethanol. The residue was exhaustively extracted with hot water. The extract was dialyzed against water, and to the non-dialyzable solution was added 2 volumes of ethanol. The precipitate was collected by centrifugation dispersed in water, and lyophilized to afford fraction A. The residue after hot-water extraction was suspended in 5% sodium carbonate. The final residue was suspended in 5% NaOH. The alkaline suspension was purified in a similar manner as described above to afford fraction B. Hepatic glucokinase activities of the fraction A extracted from *C. militaris* and *P. japonica* were 371.4 and 379%, respectively. The fraction B was 314.2 and 147.4%. The activity of fraction B of *C. militaris* extracts was higher than that of *P. japonica*. Liver cytosolic glucokinase activity of rats fed normal diet supplemented with 0.1% *C. militaris* was 1316%. In conclusion, the present study has demonstrated that *C. militaris* extracts were able to prevent sudden postprandial peaks in blood glucose as a result of a marked increase in the liver cytosolic glucokinase activities.

Key words: diabetes, glucokinase, glucose, *Cordyceps militaris*

서 론

당뇨병은 혈중 포도당 농도의 상승, 인슐린 부족 또는 인슐린 작용의 감소, 포도당, 지방과 단백질 대사의 이상과 이로 인한 급·만성 합병증의 발생으로 특징지어지는 질환으로 아직까지 근원적으로 치료할 수 있는 약물을 개발하지 못하고 있는 실정이다(1). 이에 따라 대부분의 환자들이 쉽게 접근할 수 있는 여러 종류의 민간요법을 시도하고 있다. 그러나 상당수는 과학적 근거가 희박하고 치료효과나 부작용에 대한 이론이 아직 정립되지 않아 심각한 문제를 유발할 수 있다. 그러므로 항당뇨 관련 기전상의 과학적 근거를 가지고 부작용 없이 당뇨병을 개선하거나 치유할 수 있는 물질을 발굴, 검증하고 건강 기능성 소재로 활용할 수 있다면 매우 중요한 일이라 하겠다.

동충하초는 항암, 항산화, 면역증강, 혈당강하 등 다양한 생리활성을 지닌 기능성 소재로서 *Cordyceps*(이하 *C.*)를 중

심으로 많은 연구가 진행되어 왔다. 최근 연구에 의하면 *C. sinensis* 다당체 부분의 항암효과, 면역기능 강화효과, 항피로 효과 등이 보고되고 있으며(2-4), *C. sinensis* 및 *C. militaris*에서 분리된 β -D-glucan polysaccharide, cordycepin, ergosterol peroxide에 의한 항암효과 등이 보고되고 있다(5-7). 그리고 *C. cicadae*와 *C. ophioglossoides*로부터 추출한 다당류에서 항암 활성과 *C. militaris* 에탄올 추출물의 세포독성, 항산화성 및 항돌연변이원성 효과 등이 알려졌다(8-10). 항당뇨 효능 관련 연구에서 *C. militaris* 추출물의 혈당강하 효능이 입증되었고(11), *C. sinensis* 자실체에서 다당류를 분리하여 혈당강하 작용이 있음을 보고하였는데 이는 galactomannan과 같은 가지구조를 하고 있음을 밝혔다(12). Kiho 등(12,13)은 *C. sinensis* 열수 추출물에서 분리된 다당류가 galactose, glucose, mannose로 구성되어 있고, 이 물질이 간의 glucokinase의 활성을 증가시켜 혈당강하에 효과가 있음을 보고한 바 있다. 한편 *Paecilomyces*속(이하 *P.*)

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

과 관련된 연구에서 Kwon 등(14)은 *P. tenuipes*을 첨가한 식이를 섭취한 동물에서 면역증강 효과가 있었으며 아울러 면역 modulator로서의 작용을 기대할 수 있다고 하였다. Shim 등(15)은 *P. japonica* 300 mg/kg을 STZ로 유발시킨 고혈당 쥐에게 투여했을 때 3시간 만에 유의성있는 혈당 강하효과가 있었다고 보고하였다. 이와 같이 *Cordyceps*와 *Paecilomyces*속의 혈당강하 효능에 대한 연구는 보고되었지만 작용기전에 대한 연구는 부족한 실정이다.

당뇨병의 원인은 다양하지만 치료의 기본원칙은 체내로 흡수된 당을 각 조직의 세포가 이용하는 속도를 증가시켜 혈중에 당에 과도하게 머무는 시간을 감소시키는 것이다. 그러므로 천연소재에서 탐색한 기능성 물질은 세포내로 흡수된 당의 이용 속도를 증가시키기 위하여 간에서 포도당대사에 관여하는 glucokinase 활성을 증가시키는 능력을 가져야 한다. 본 연구에서는 *P. japonica*와 *C. militaris*에서 혈당강하 기능성분을 분리하고 이의 효능을 간세포내 glucokinase 활성을 측정하여 항당뇨 작용 기전을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

동충하초는 강원생물영농조합법인으로부터 제공받았으며 건조 분말화한 후 -20°C 냉동실에 보관하면서 사용하였다. 시약으로서 glucose, Gly-Gly, MgCl₂, ATP, NADP⁺, HEPES, KCl, Na₂CO₃, NaOH, glucose-6-phosphate dehydrogenase 등은 SIGMA 제품을 구입하여 사용하였다.

유효성분 추출 및 분획

동충하초에서 각각의 유효성분은 Kiho 등(16)의 방법을 변형하여 분리하였다. 건조분말에 에탄올을 첨가하여 72시간 동안 추출하였고 다시 70% 에탄올로 10시간씩 두 번 추출한 후 다시 열수 추출하였다. 추출물은 증류수로 투석하여 탈염하였고 non-dialyzable solution에 2배의 에탄올을 첨가한 후 원심분리하여 얻은 침전물은 감압농축 후 동결건조하였고 이를 fraction A라 하였다. 열수 추출후 남은 residue에 5% Na₂CO₃로 상온에서 24시간 동안 추출하였고, 다시 그 residue에 NaBH₄를 포함한 5% NaOH로 상온에서 24시간 동안 추출하였다. 추출물은 2 mol HCl로 중화시킨 후 투석하여 탈염하였고 non-dialyzable solution에 2배의 에탄올을 첨가한 후 원심분리하여 얻은 분획물은 감압농축 후 동결건조하였고 이를 fraction B라 하였다.

Cytosol 분리

백서로부터 간조직을 적출하여 차가운 생리식염수로 세척하고 완충액(140 mM KCl, 20 mM HEPES, pH 7.4)을 넣고 균질화한 후 4°C, 105,000×g에서 1시간 동안 초원심분리(Beckman, USA)하여 cytosol을 분리하였다.

Hepatic glucokinase activity

Glucokinase 활성은 Bontemps 등(17)의 방법을 수정하여

측정하였다. Reaction buffer(GlyGly 44 mM, MgCl₂ 7.5 mM, ATP 3 mM, glucose-6-phosphate dehydrogenase 0.4 U, NADP⁺ 0.75 mM)와 100 mM glucose를 넣어 실온에서 반응시킨 후 동충하초 추출물 200 μL과 cytosol을 첨가하였다. Spectrophotometer 340 nm에서 초기 흡광도를 측정하였고 생성된 NADPH의 양을 1분 간격으로 3분 동안 측정하였다. 또한 0.5 mM glucose로 hexokinase에 의한 NADPH 생성량에 대한 보정을 하였고, 분당 NADPH의 생성량을 대조군에 대한 백분율로서 표시하였다.

In vivo에서의 glucokinase activity

*C. militaris*와 *P. japonica*의 혈당강하 작용 기작을 in vivo에서 검증하기 위하여 시도되었다. Sprague-Dawley종 수컷 흰쥐를 구입하여 적응시킨 후 난괴법에 의해 대조군, *C. militaris*군 및 *P. japonica*군의 3군으로 분류하여 1군당 7마리를 사용하였다. 모든 군은 일주간 적응 후 6주간 금여하였다. 실험식은 AIN-76에 근거하여 동충하초 건조분말을 식이 무게의 0.1%로 섞어 공급하였고, 사육 종료 후 간을 적출하여 cytosol을 분리한 후 glucokinase 활성을 측정하였다.

통계처리

실험결과는 평균±표준오차의 형태로 표시하였으며, 통계적 유의성 검증은 SAS를 이용하여 ANOVA로 수행하였다.

결 과

Hepatic glucokinase에 대한 fraction A의 활성

동충하초에서 분리된 fraction A의 간세포내 glucokinase 활성에 미치는 영향은 대조군과 비교하여 나타냈다(Fig. 1).

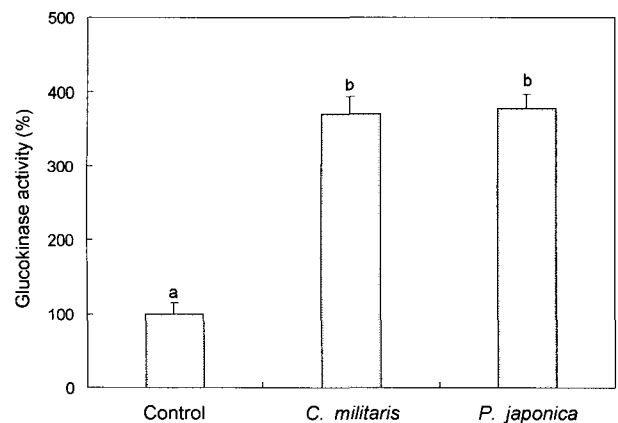


Fig. 1. Hepatic glucokinase activity of fraction A extracted from *Cordyceps militaris* and *Paecilomyces japonica*.

Fraction A prepared with EtOH and then with 70% EtOH of *C. militaris* and *P. japonica*. The residue was exhaustively extracted with hot water. The extract was dialyzed against water, and to the non-dialyzable solution was added 2 vol. of EtOH. The precipitate was collected by centrifugation dispersed in water, and lyophilized. Each bar represents the mean of three independent experiments. Different letters above the bars are significantly different at $p < 0.05$.

대조군을 100% 기준으로 하였을 때 *C. militaris*는 371.4%, *P. japonica*는 379%로 나타나 *P. japonica*가 약간 높았지만 모두 대조군에 비해 높은 glucokinase의 활성 증가를 나타냈다.

Hepatic glucokinase에 대한 fraction B의 활성

동충하초류의 fraction B의 glucokinase 활성에 미치는 영향은 Fig. 2와 같이 백분율로서 비교하였다. *C. militaris*는 대조군을 기준으로 하였을 때 314.2%의 활성증가를 보였고, *P. japonica*는 147.4%의 활성 증가를 나타냈다. 결과적으로 *C. militaris*에서 추출된 fraction B는 *P. japonica*와 비교했을 때 2배 이상의 glucokinase의 활성 증가를 나타냈다.

Fraction A와 B의 활성 비교

동충하초에서 분리된 fraction A와 B의 glucokinase에 대한 활성을 비교하면 *C. militaris*와 *P. japonica* 모두 fraction B보다는 fraction A의 활성이 훨씬 높다는 것을 알 수 있었다. *P. japonica*의 fraction A는 379%로서 가장 높은 활성 증가를 나타내었지만 fraction B는 147.4%로 낮은 감소된 활성을 나타내었고, *C. militaris*의 fraction B의 314.2%에 비해 371.4%로 fraction A가 약 18.2%의 활성 증가를 나타내었다.

In vivo에서 활성 검증

앞선 결과를 근거로 혈당강화 작용의 기작을 *in vivo*에서 검증하기 위하여 식이에 0.1% 첨가시켜 사육한 백서의 간세포내 glucokinase 활성을 측정하였다. 그 결과 *C. militaris* 첨가군의 glucokinase 활성은 대조군에 비해 1316% 이상의 활성 증가를 나타냈지만 *P. japonica* 첨가군의 활성은 315% 정도 증가하는데 그쳤다(Fig. 3). 또한 *C. militaris* 첨가군과 *P. japonica* 첨가군을 비교했을 때 *C. militaris* 섭취시 간조직내 glucokinase 활성이 현저히 증가됨을 알 수 있었다.

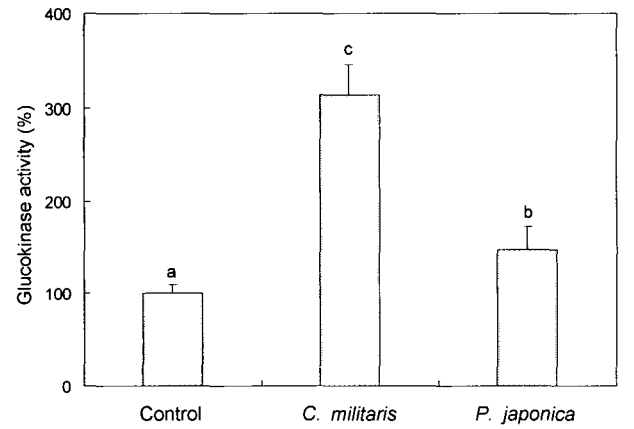


Fig. 2. Hepatic glucokinase activity of fraction B extracted from *Cordyceps militaris* and *Paecilomyces japonica*. Fraction B prepared with the residue after hot-water extraction. The residue was suspended in 5% Na₂CO₃. The final residue was extracted with 5% NaOH, and neutralized and dialyzed. Each bar represents the mean of three independent experiments. Different letters above the bars are significantly different at p<0.05.

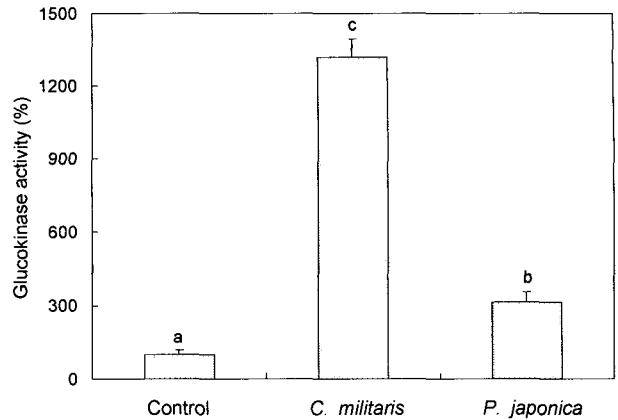


Fig. 3. Hepatic glucokinase activity of rats fed normal diet supplemented with 0.1% *Cordyceps militaris* and *Paecilomyces japonica*. After the rats were provided basal diet supplemented with 0.1% *C. militaris* and *P. japonica* for 6 weeks, the rats were fasted for 12 h, and then liver samples were obtained. Each data point in the figure represents the mean±SE of 7 rats. Different letters above the bars are significantly different at p<0.05.

고 찰

Glucokinase는 간세포와 췌장의 β-세포에만 존재하며 간의 당대사를 조절하고, 췌장에서 인슐린 분비를 조절하는 기능을 한다. 간세포와 췌장 β-세포의 glucokinase 활성도 감소는 고혈당의 요인이 되며, 인슐린 저항성에 관련이 있음이 보고되고 있다(18-21). 본 연구에서는 동충하초에서 혈당강화 성분을 분리한 후 간세포내 glucokinase 활성을 측정하여 항당뇨 기전을 규명하였다. 그 결과 *C. militaris*와 *P. japonica*의 fraction A는 B에 비해 glucokinase 활성을 더 증가시켰으며, 특히 *C. militaris*의 분획물은 대조군에 비해 3배 이상의 혈당강화 작용이 있었고, *in vivo*에서는 1300% 이상의 활성 증가를 확인할 수 있었다.

항당뇨 효능 관련 연구에서 Lee와 Chung 등(22,23)은 누에관련 물질에서 혈당강화 효과를 관찰한 바 있는데 이는 장내 탄수화물을 분해하는 효소인 α-glucosidase를 경쟁적으로 억제하여 식후 급격히 상승하는 혈당을 조절하는 것으로 보고하였다. Chung 등(24)과 Greene 등(25)은 상엽에 신경전달속도를 정상화시킴으로서 당뇨병성 합병증에 치료효과가 있는 것으로 알려져 있는 myoinositol이 다량 함유되어 있음을 확인하였다. 상백피와 누에분말에서 활성 물질을 추출물을 대상으로 한 연구들(22,23,26)에서 이들 활성물질이 장내 α-glucosidase의 작용을 억제하여 당의 소화·흡수를 지연시키며 그 결과 혈당 상승이 억제되고, 이 과정은 농도의존적으로 작용함을 밝혔다(24,27).

이러한 결과를 바탕으로 향후 동충하초의 생리활성에 대한 유효성분만을 순수 분리·정제하여 구조를 규명하고 항당뇨제와 같은 의약품으로의 이용가치를 높일 수 있는 연구가 이루어져야 할 필요가 있다.

요약

본 연구에서는 *P. japonica*와 *C. militaris*에서 혈당강화 기능성 성분을 분리하고 간세포내 glucokinase 활성을 측정하여 항당뇨 작용 기전을 규명하고자 하였다. 동충하초에서 분리된 fraction A의 간세포내 glucokinase 활성은 대조군과 비교하여 *C. militaris*는 371.4%, *P. japonica*는 379%로 증가하였다. Fraction B의 활성은 *C. militaris* 314.2%, *P. japonica*는 147.4% 증가하여 *C. militaris*에서 추출된 fraction B는 *P. japonica*와 비교했을 때 2배 이상의 glucokinase의 활성 증가를 나타냈다. 이상의 결과를 근거로 *C. militaris*의 혈당강화 작용을 *in vivo*에서 검증한 결과 *C. militaris* 첨가군의 glucokinase 활성은 대조군에 비해 1300% 이상의 활성 증가를 나타냈다. 결론적으로 *C. militaris* 추출물은 간세포 내 glucokinase 활성을 현저히 증가시킴으로써 혈중 포도당의 급격한 상승을 억제할 수 있을 것으로 판단된다.

문헌

- Edward SH, Raffaele N. 1998. *Present knowledge in nutrition*. 7th ed. ILSI Press, Washington DC. p 452-462.
- Tang SY, Chen A, Kuo YC, Lin CY. 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.
- Tamaguchi N, Yoshida J, Ren LJ, Chen H, Miyazawa Y, Fujii Y, Huang YX, Takamura S, Suzuki S, Koshimura S. 1990. Augmentation of various immune reactivities of tumor-bearing hosts with an extract of *Cordyceps sinensis*. *Biotherapy* 2: 199-205.
- Dai G, Bao T, Xu C, Cooper R, Zhu JS. 2001. CordyMax Cs-4 improves steady-state bioenergy status in mouse liver. *J Altern Complement Med* 7: 231-240.
- Bok JW, Lemer L, Chilton J, Klingeman HC, Towers GH. 1999. Antitumor sterols from the mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Phytochemistry* 51: 891-898.
- 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: 611-615.
- Kim HW, Kim YH, Cai XF, Nam KS, Lee SJ, An HS, Jeong EH, Yun SH, Sung SK, Lee SJ, Hyun JW. 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.
- Liang YL, Liu Y, Yang JW, Liu CX. 1977. Studies on pharmacological activities of cultivated *Cordyceps sinensis*. *Phytotherapy Res* 11: 237-239.
- Kim MN, Oh SW, Lee DS, Ham SS. 2001. Antioxidative and antimutagenic effects of the ethanol extract from *Cordyceps militaris*. *Korean J Phostharvest Sci Technol* 8: 109-117.
- Kim MN, Chu CB, Lee DS, Ham SS. 2001. Cytotoxicity and antigenotoxic effects of *Cordyceps militaris* extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 921-927.
- Kwon YM, Cho SM, Kim JH, Lee JH. 2001. Hypoglycemic effect of *Cordyceps militaris*. *Kor J Pharmacogn* 32: 327-329.
- 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.
- 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.
- Kwon SH, Woo HJ, Han DS, Kim MK. 2001. Effect of dried powders and water extracts of *Paecilomyces tenuipes* and *Cordyceps militaris* on lipid metabolism, antioxidative capacity and immune status in rats. *Kor J Nutr* 34: 271-284.
- Shim JY, Lee YS, Lim SS, Shin KH, Hyun JE, Kim SY, Lee EB. 2000. Pharmacological activities of *Paecilomyces japonica*, a new type *Cordyceps* sp. *Kor J Pharmacogn* 31: 163-167.
- Kiho T, Hui J, Yamane A, Ukai S. 1993. Hypoglycemic activity and chemical properties of a polysaccharide from the cultural mycelium of *Cordyceps sinensis*. *Biol Pharm Bull* 16: 1291-1293.
- Bontemps F, Hue L, Hers HG. 1978. Phosphorylation of glucose in isolated rat hepatocytes. Sigmoidal kinetics explained by the activity of glucokinase alone. *Biochem J* 174: 603-611.
- Matschinsky FM. 1990. Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic β -cells and hepatocytes. *Diabetes* 39: 647-652.
- Bedoya FJ, Wilson JM, Ghosh AK, Finegold D, Matschinsky FM. 1986. The glucokinase glucose sensor in human pancreatic islet tissue. *Diabetes* 35: 61-67.
- Meglasson MD, Matschinsky FM. 1984. New perspectives on pancreatic islet glucokinase. *Am J Physiol* 246: E1-13.
- Shimizu T, Parker JC, Najafi H, Matschinsky FM. 1988. Control of glucose metabolism in pancreatic β -cells by glucokinase, hexokinase and phosphofructo-kinase; model study with cell lines derived from β -cell. *Diabetes* 37: 1524-1530.
- Lee JS, Choi MH, Chung SH. 1995. Blood lowering effects of Murry berry leaves. *Yakhak Hoegi* 39: 367-372.
- Chung SH, Kim MS, Choue RW. 1997. Effect of mori folium column fraction on intestinal α -glucosidase activity in mice administered with a high carbohydrate-containing diet. *Yakhak Hoegi* 41: 484-491.
- Chung SH, Choi MH, Rhee CH. 1996. Effects of water extracts of murry berry leaves activity of intestinal α -glucosidase inhibitor in mice. *Genetics Molecular Biology* 8: 38-44.
- Greene DA, Sima AAF, Stevenes MJ, Feldman EL, Lattimer SA. 1992. Complication: neuropathy, pathogenetic considerations. *Diabetes Care* 15: 1902-1905.
- Hikino H, Mizuno T, Oshima Y, Konno C. 1995. Isolation and hypoglycemic activity of Moran A, a glycoprotein of *Morus alba* root barks. *Planta Medicae* 4: 159-162.
- Ryu KS, Lee HS, Choue RW, Chung SH. 1997. Utilization and isolation of new active substances from sericulture related materials. 40th Anniversary Commemoration Symposium, Progress and Future Development of Sericultural Science & Technology. p 133-158.