

동충하초의 균사 및 배양액의 항산화, 항암, 면역활성의 비교

허진철 · 남성희¹ · 강석우¹ · 홍인표¹ · 이광길¹ · 박자영² · 김경해 · 한송이 · 이상한[†]
경북대학교 식품공학과, ¹농업과학기술원 농업생물부, ²대구보건환경연구원

Comparison of Antioxidant, Anticancer and Immunomodulating Activities of Extracts from *DongChongXiaCao*

Jin-Chul Heo, Sung-Hee Nam¹, Seok-Woo Kang¹, In-Pyo Hong¹, Kwang-Kil Lee¹,
Ja-Young Park², Kyung-Hae Kim, Song-Yi Han, and Sang-Han Lee^{1†}

Department of Food Science & Technology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

¹Department of Agricultural Biology, National Advanced Institute of Science & Technology, RDA, Suwon 441-707, Korea

²Daegu Research Institute of Public Health & Environment, Daegu 706-732, Korea

Abstract

Biological properties of *DongChongXiaCao* extracts and culture supernatants were evaluated using DPPH and FRAP (antioxidants), Raw 264.7 (NO production), B16-F1 cells (cell migration activity) and HUVECs (angiogenesis activity). We found that antioxidant activity was higher in mycelium culture supernatants than in mycelial extracts. Mycelial extracts and culture supernatants inhibited or increased cyclooxygenase-2 transcription activity and NO production. Various extracts and culture supernatants inhibited B16 cell migration and motility, and inhibited HUVEC tube formation. These findings indicate that *DongChongXiaCao* extracts and products of mycelium could be a useful biological resource for anti-oxidant and anti-cancer purposes.

Key words : *DongChongXiaCao*, anti-oxidant, anti-tumor, Cox-2, nitric oxide, angiogenesis, DPPH, FRAP

서 론

Reactive oxygen species (ROS)는 세포내 대사에 잠재적으로 세포의 분화, 성장, 생존, 노화 및 암에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(1). ROS는 free radical group으로 하나 혹은 그 이상의 전자가 짝을 이루지 못한 상태를 가지는 세포내 신호전달 과정에 많은 부분이 관여하고 있다. 특히 미토콘드리아에 의한 전자전달계는 ATP의 형성에 있어 많은 부분을 O₂를 이용하는 데 이 과정에서 다량의 ROS를 만들게 된다. 전자전달계의 과정 중 만들어지는 ROS인 O₂⁻ 등은 superoxide dismutases (SODs)에 의해 H₂O₂로 바뀌게 되고 이후 catalase와 glutathione peroxidase 등에 의해 산소(O₂)와 물(H₂O)로 바뀌어 무독성 상태를 유지하게 된다. 반면 hydroxyl radical(OH)에 영향을 받게 되면 직접적으로

혹은 Fe⁺⁺, Cu⁺⁺ 등에 의해 세포를 손상시키는 신호전달 과정을 야기하여 최종적으로 세포사멸을 유도하게 된다. 세포내에서는 SOD, catalase, glutathione peroxidase, HO-1 (heme oxygenase) 등은 산화스트레스에 대한 방어기작으로 알려져 있는데 이 기작에 이상이 생기면 여러 질병을 유발하게 된다(2,3).

ROS에 의한 세포손상은 기본적으로 DNA와 protein의 손상에서 기인하는데 많은 연구 보고서에서 이를 지적하고 있다. 이외에도 산화물은 인체에서 각종 질병의 원인이 되는데 자가 면역반응(autoimmune disease)의 일종인 아토피(atopy), 천식(asthma), 비염(rhinitis) 등이 대표적인 예이다. 이는 산화물이 생물의 체내에서 산화스트레스로 작용을 하며 각종 호르몬, 사이토카인 등의 활성을 변화시켜 질병을 유발하는 것으로 알려져 있다(4-8).

항암제 중 여러 종류들이 항산화를 타겟으로 하고 있는데 vinblastine, cisplatin, mitomycin C, doxorubicin, camptothecin, inostamycin, neocarzinostatin 등이 알려져 있다. 이는 ROS

[†]Corresponding author. E-mail : sang@knu.ac.kr,
Phone : 82-53-950-7754, Fax : 82-53-950-6772

에 대한 방어 시스템이 항암효과를 가지는 데 기인한 것으로 판단된다. 많은 경우 세포의 생존과 사멸에 ROS가 관여하고 있으며, 암세포와도 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 항산화제에 의한 항암치료 (anti-oxidation therapy)는 상당히 유효한 치료법으로 알려져 있다(9,10).

동충하초는 곤충을 숙주로 하여 기생하는 균의 일종으로 중국에서는 황달, 아편중독, 결핵, 암 및 천식 등 질병의 치료에 이용하였으며, 면역기능 증강, 항암 효과가 있는 생리활성물질 등도 보고되었으며, 국내에서도 동충하초를 이용한 항암, 면역증강, 항피로 등의 효과가 보고되었다(11-13).

최근에는 사회적으로 천연물에 대한 관심이 고조되고 있으며, 동충하초를 이용한 신물질 개발에 관한 기대가 매우 높다. 또한 이를 이용한 건강식품 등이 개발되고 있다. 본 연구는 동충하초의 활용성에 있어 제약으로서의 일부를 담당하고 있는바, 이에 대한 과학적이고 체계적인 연구가 필요하다고 판단된다. 산화스트레스와 암세포의 관련성이 있어 동충하초 추출물과 배양액을 이용하여 항산화 및 항암 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

동충하초의 균분리

본 시험에 사용된 균주는 농촌진흥청 농업생물부 보존주이며, 대부분 야생에서 수집되었거나 혹은 분양받은 균이다. 야생수집균은 2~3% sodium hypochloride로 소독한 자실체를 petri dish 뚜껑에 멸균 테이프로 고정 후 water agar 상에 떨어진 포자를 이용하여 PDA (potato dextrose 24 g, 한천 15 g, 증류수 1 L)배지에서 25°C 14일간 정지 배양하여 분리하였다.

Table 1. List of DongChongXiaCao extracts used

No	Class	Mark	No	Class	Mark
1	<i>Cordyceps sinensis</i>	J21	14	<i>C. ochraceostromat</i>	J116
2	<i>C. sinensis</i>	J82	15	<i>C. youngmunensis</i>	J124
3	<i>C. sinensis</i>	J83	16	<i>C. variabilis</i>	J117
4	<i>C. sinensis</i>	J96	17	<i>Paecilomyces cicadae</i>	J16
5	<i>C. militaris</i>	J1	18	<i>P. farinosus</i>	J3
6	<i>C. militaris</i>	J98	19	<i>P. farinosus</i>	J301
7	<i>C. militaris</i>	J99	20	<i>P. tenuipes</i>	J2
8	<i>C. militaris</i>	J114	21	<i>P. tenuipes</i> (fruiting body)	J007
9	<i>C. graciloides</i>	J105	22	<i>P. cardianlis</i>	J008
10	<i>C. nutans</i>	J68	23	<i>P. cardianlis</i>	J009
11	<i>C. scara</i>	J94	24	<i>P. sphingum</i>	J41763
12	<i>C. scara</i>	J123	25	<i>C. amenosoroseus</i>	J67
13	<i>C. sphecocephala</i>	J201	26	<i>C. amenosoroseus</i>	J41779

Cordyceps*: C.; *Paecilomyces*: P.

동충하초 균사체 배양 및 추출

PD 배지(potato dextrose 24 g, 증류수 1 L)를 멸균된 100 mL의 삼각플라스크에 50 mL씩 분주한 다음 PDA 배지 상에 배양된 균종을 떼어 넣어 밀봉 후 진탕배양기(25°C, 150 rpm)에서 7일간 배양하였다. 배양 완료된 균사는 여과(Whatman No. 1)하여 증류수로 2회 세척하고 동결건조하였다. 배양액은 실험 전까지 -20°C에서 냉동 보관하였으며, 균사 추출물은 DW를 1 g/10 mL의 비율로 넣은 다음 sonicator를 이용하여 파쇄 후 원심분리기를 이용하여 상층액을 취해 -20°C에서 냉동 보관하였다 (Table 1).

DPPH assay

DPPH(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) assay는 radical 소거활성능 측정방법으로 매우 간단하면서도 강력한 측정방법으로 많이 이용되어 진다. 각 추출물의 시료에 0.2 mM DPPH를 동충하초 추출물과 DPPH solution을 1/20의 비율로 해서 실온서 10분간 incubation한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거활성 비율(% inhibition)은 아래와 같이 계산하였다(14).

$$Inhibition(\%) = \left[\frac{A_{control} - A_{sample}}{A_{control}} \right] \times 100$$

(A : Absorbance O.D. 517 nm)

FRAP assay

Ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay를 이용하여 radical을 어느 정도 환원시킬 수 있는지의 능력을 알아보았다. 실험을 위한 반응액으로는 acetate buffer (pH 3.6, 300 mM) : 10 mM의 TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) : 20 mM의 FeCl₃·6H₂O를 10:1:1의 비율로 섞어 실험직전에 만들어 사용을 하였다. 반응액과 추출물을 각각의 비율로 혼합한 후 10분간 상온에서 보관 후 590 nm에서 흡광도를 측정하였다(15).

Nitric oxide 활성 측정

Raw 264.7 세포주(mouse macrophage cell line)를 이용하여 동충하초 추출물/배양액에 대한 NO (nitric oxide) 활성, 또는 억제능을 알아보았다. Raw 264.7 세포를 2×10⁴/well (96 wells)에 배양을 한 다음, lipopolysaccharide (LPS)를 200 ng/well의 농도로 처리한 군과 처리하지 않은 군에 동충하초 추출물/배양액을 50 µL/mL 농도로 처리하여 24시간 배양 후 NO 생성량을 알아보았다. NO의 정량은 Greiss reagent (0.1% naphthylenediamine- dihydrochloride in water, 1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid, w/v)와 NaNO₂를 이용하였으며, 실험은 동량의 culture media와 혼합 후, 약 10분간 상온에서 반응을 시킨 후 560 nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였다(16).

Wound healing assay

B16F1 cell을 plate에 spreading한 다음 CO₂ incubator에서 세포가 plate에 80% 정도 confluent 상태로 될 때까지 배양한다. 배양은 RPMI 1640 배지에 10% FBS, 5% CO₂, 37°C의 incubator에서 배양하였다. Wound healing을 이용한 세포의 운동성을 확인을 위하여 배양 중인 B16 cell의 표면에 yellow tip을 이용하여 약 1 mm의 wound를 만든 다음, 배양액을 교체한 후 시료를 농도별로 처리하였다. 37°C의 5% CO₂ incubator에서 24 hr 배양 후, healing 정도를 현미경을 통하여 관찰하였으며, wound healing 비율은 현미경을 통하여 남아있는 wound의 width를 측정하여 다음 무처리군과 비교를 통하여 억제활성 정도를 비교하였다(18).

In vitro tube formation assay

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)을 이용하여 angiogenesis 실험을 실시하였다. HUVECs 세포는 ATCC (passage 2-10)에서 구입을 하였으며, EGM-2 (Cambrex, #CC-4176, Walkersville, MD, USA) media를 배양배지로 사용하였다. 배지 조성은 2.5% fetal bovine serum (FBS, Cambrex, Walkersville, MD, USA), hEGF, hydrocortisone, GA-100 (gentamicin, amphotericin-B), VEGF, hFGF-B (w/heparin), R3-IGF-1, ascorbic acid, heparin 등이 사용되었다. In vitro tube formation assay는 24-well plates에 Matrigel (BD Bioscience, #354234, Franklin Lakes, NJ, USA)을 100 µL/well로 코팅한 후 2~3 시간 동안 굳힌 다음 HUVECs을 2×10⁴ cells/well로 배양을 하였다. 동충하초 추출물 10 µL/mL의 농도로 처리한 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양을 하였다. Tube formation은 inverted microscope (Model No.TS-100, Nikon, Tokyo, Japan)을 이용하여 촬영을 하였다(19).

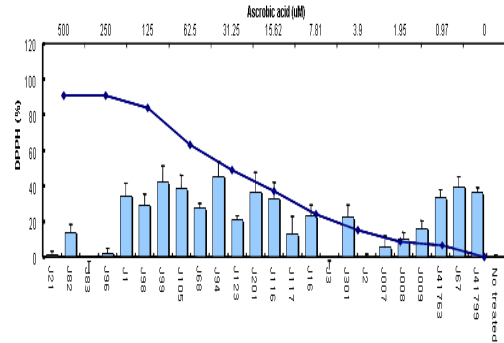
결과 및 고찰

동충하초의 약리 효능은 매우 다양한 것으로 알려져 있는데, 중국에서는 *C. sinensis*에 감염된 유충을 황달, 아편중독, 결핵, 암 등 질병의 치료에 이용하였으며, *B. bassiana*를 천식의 치료에 사용하였다. 일본에서는 *C. militaris*와 *C. ophioglossoides*에서 면역기능 증강, 항암 효과가 있는 생리활성물질을 확인하였으며, *Paecilomyces tenuipes*로부터 항암, 면역증강, 항피로 등의 효과를 규명하였다(20,21).

최근에는 사회적으로 천연물에 대한 관심이 고조되고 있으며, 동충하초를 이용한 신물질 개발에 관한 기대가 매우 높다. 때문에 동충하초의 자생종에 대한 자원으로서의 활용에 대하여 많은 수집과 분류학적 연구가 진행되고 있다. 본 연구는 최근 동충하초에 대한 관심의 증가와 함께 이에 대한 과학적인 효능이 검증되고 있어, 항산화효과와

항암활성을 동충하초 추출물과 이들의 배양배지를 이용하여 효능을 알아보려고 하였다.

A



B

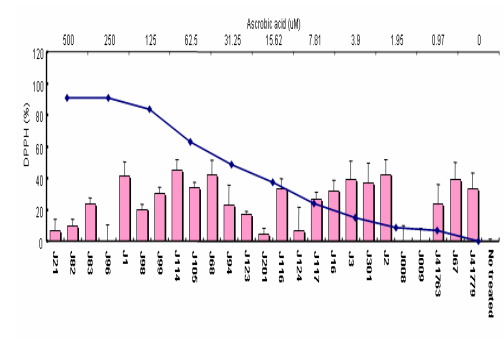


Fig. 1. Radical scavenging activity of mycelium extract (A) and mycelium culture supernatants (B) by comparing to a concentration of ascorbic acid. Data represent the mean±SD of triplicate determinations.

항산화 활성

세포 내에서 산화스트레스에 대한 방어 시스템은 superoxide dismutase (SODs), catalase, glutathione 등에 의해 H₂O₂의 억제작용을 한다. 이러한 ROS라고 불리는 산화스트레스의 유발은 단백질과 DNA에 손상을 일으키며, 염증반응 (inflammation)을 유도하는 것으로 알려져 있다. ROS는 발암현상(carcinogenesis)을 유도하는 것으로 알려져 있는데, 암의 유발 (initiation), 발전(development), 촉진(promotion), 진행(progression) 등에 관련이 있는 것으로 알려져 있다. ROS의 증가는 DNA의 sequence 및 구조에 영향을 주어 변이 (mutation)를 일으키게 된다. 산화스트레스는 각종 신호전달 관련 분자인 epidermal growth factor (EGF), tyrosine phosphorylation, protein kinase C (PKC) 등에 이상을 일으켜 세포에 변이를 일으키는 것으로 알려져 있다(22,23). 세포의 생존과 밀접한 관계를 가지며 세포의 기능적 측면에 많은 영향을 미치는 산화스트레스에 대한 활성을 항산화 실험을 통하여 알아보았다. DPPH(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)는 매우 안정한 free radical로서 517 nm에서 특징적인 광흡수를 나타내는 보라색 화합물이다. DPPH가 가진 radical은

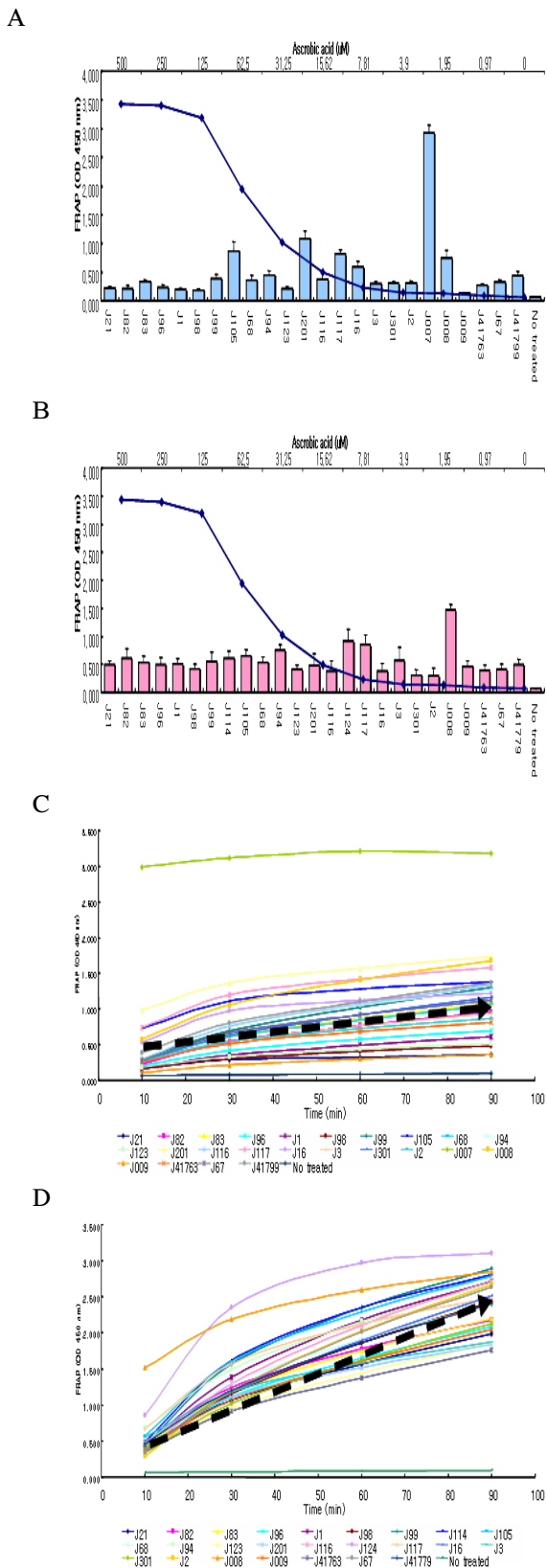


Fig. 2. Radical scavenging activity of mycelium extract (A, C) and mycelium culture sup (B, D).

FRAP activity was compared with a concentration of ascorbic acid. Data represent the mean±SD of triplicate determinations.

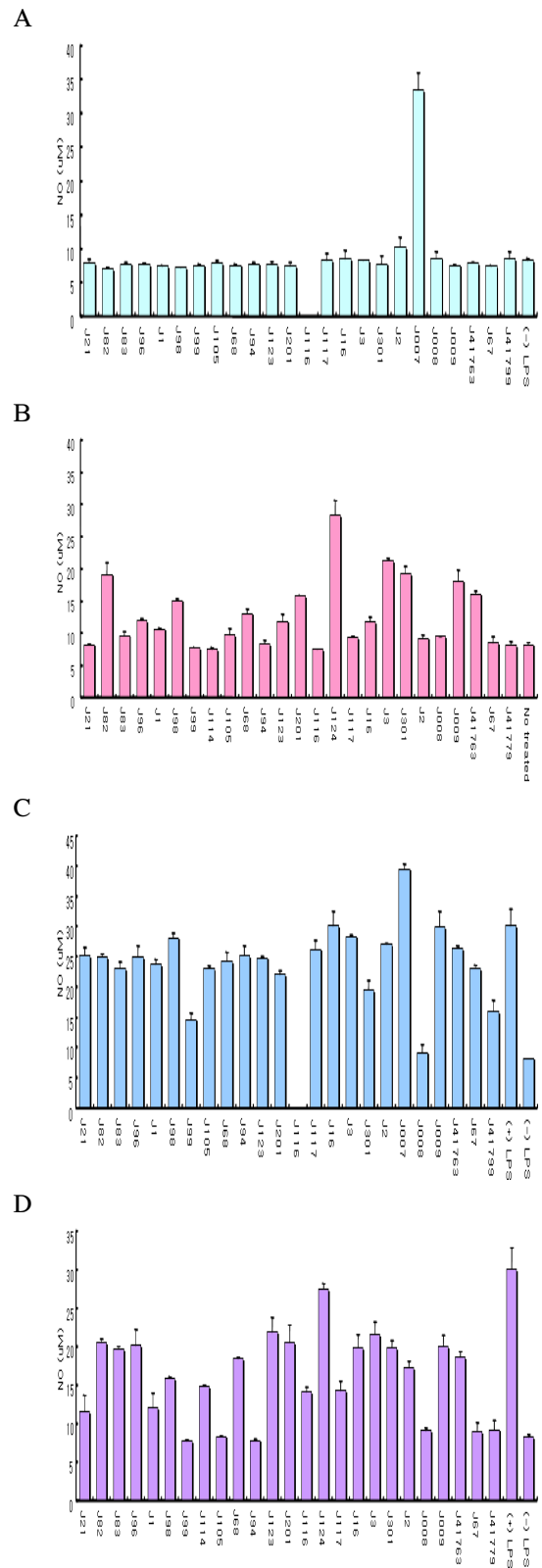


Fig. 3. Inhibitory effects of NO production by mycelium extracts (A, C) and culture supernatants (B, D) with or without LPS. Raw 264.7 cells were cultured with (C, D) or without LPS. (A, B).

After 24 hr-incubation, the supernatants were tested with Griess assay and the increasing (A, B) and inhibitory (C, D) rate were calculated. Data represent the mean±SD of triplicate determinations.

알코올 등의 유기용매에서 매우 안정하며 항산화 기작 중 proton-radical scavenger에 의하여 탈색되기 때문에 항산화 활성을 육안으로 쉽게 관찰할 수 있을 뿐 아니라 광흡수가 되는 비율을 이용하여 antioxidant의 정도를 나타낼 수 있다. DPPH 활성 실험 결과, 상대적으로 다른 종에 비해 활성이 높게 나오는 균사체는 J99, J105, J94, J201, J41763, J67, J41799 등이었으며, 배지에서는 J1, J144, J68, J3, J301, J2, J67 등 이었다 (Figure 2). FRAP 활성은 화합물의 환원력 (ferric reducing ability)을 측정하는 것으로 ferric tripyridyltriazine (Fe^{III}-TPTZ)가 환원제(antioxidant)에 의해서 파란색의 ferroustripyridyltriazine (Fe^{II}-TPTZ)로 될 때 흡광도를 측정하여 환원력을 알아보는 방법이다. FRAP 활성은 10분 경과 후 OD값에 따른 활성과 100분간 OD 변화량을 측정하여 시간에 따른 활성을 측정하였다. 10분 후 FRAP 활성의 변화는 균사체에서는 J007이, 배지에서는 J008이 활성이 가장 높게 나타났다. 시간에 따른 활성의 증가를 알아본 결과 균사체 및 배지에서 시간이 지남에 따라 활성이 증가하는 것을 나타내었으며, 특히 배지에서 균사체에 비해 활성의 증가가 두드러지는 것을 알 수 있었다. 배지 중에 J124가 시간에 따른 활성의 증가가 가장 높은 것으로 나타났다 (Figure 3).

Raw 264.7 세포주를 이용한 NO 활성 측정

동충하초 균사체 추출물과 이들의 배지를 이용하여 NO (nitric oxide) 활성을 알아보았다. NO의 생성은 면역 및 염증반응과 관련이 있으며, NOS (NO synthases)에 의해 만들어 진다. 조직의 손상이 일어났을 때 NO는 cytoprotective 및 cytotoxic 활성을 가지며, 이는 세포내 미세환경 (microenvironment)과 세포의 종류(cell type)에 의해 다양하게 발현한다. 또한 nitric oxide synthase (NOS)는 세포내에서 O₂ ·⁻ 관련 신호전달 과정인 XO activation, NADPH oxidation 등에 관여하여 infection과 inflammation을 일으키는 것으로 알려져 있는데, 암세포에서 병리학적으로 중요한 표적이 되고 있다(24,25). 본 실험에서는 Raw 264.7 세포주를 활성화시킨 다음, 동충하초 추출물과 배지가 NO의 억제여부를 알아보았다. Lipopolysaccharide (LPS)로 NO를 유도한 cell과 그렇지 않은 cell의 NO 활성을 측정해 본 결과 LPS에 의해 NO를 유도한 세포에서 균사체 추출물인 J007에서 NO의 활성을 높여 주는 것으로 나타났으며, 배지에서는 J82, J124, J3, J301, J009, J41763 등의 처리군에서 NO의 활성이 증가하는 것을 알 수 있었다. LPS로 NO를 유도하여 NO의 감소 물질을 검색한 결과 균사에서는 J41799, 배지에서는 J21에서 활성을 감소시키는 것으로 나타났다.

항암 활성

동충하초 추출물과 배지에서 항암활성을 알아보기 위하

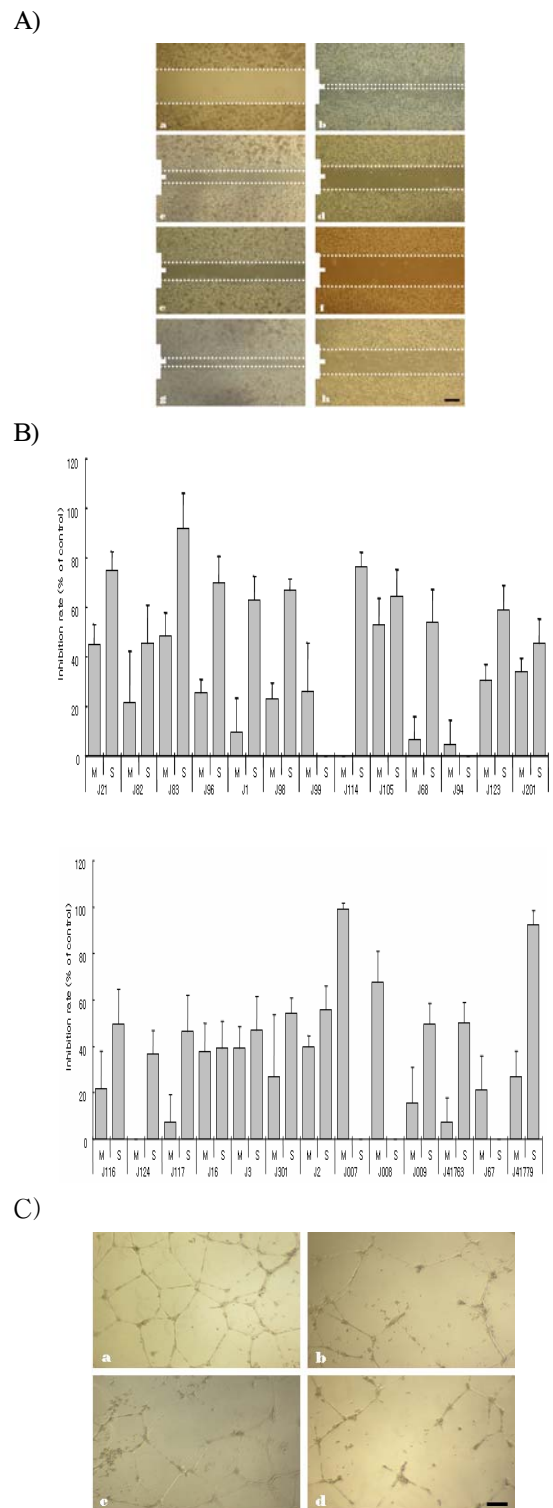


Fig. 4. Anti-tumor activity of mycelium extracts (M) and mycelium culture supernatants (S) by wound healing assay and tube formation assay.

A. Analysis of B16-F1 migration by J21 (M (c), C (d)), J83 (M (e), C (f)), J41799(M (g), C (h)) and no treatment (b) by *in vitro* scratch (a) assay. Scale bar, 100 μm; M, mycelium; C, culture supernatants.
 B. Quantification of the wound healing. Cell migration was quantified by measuring the wound width after 20 hr-incubation. Data represent the mean±SD of five determinations.
 C. HUVECs were plated at 2 × 10⁴ cells/well in matrigel-coated 24-well plates, and exposed with J68(M (b), S (c)), J3(M (d)) and no treatment (a). Scale bar, 200 μm.

여 wound healing 활성 실험을 실시하였다. B16 (mouse melanoma cell line) 세포주를 이용하여 wound를 형성한 다음 동충하초에 의한 metastasis 정도를 알아보았다. 실험 결과 여러 종류의 균사 및 배지에서 항암 활성이 있는 것을 확인하였으며, 특히 균사체에서는 J007, 배지에서는 J83, J114, J41799 등이 활성이 높게 나타났다. 혈관신생의 형성은 암세포의 성장에 직접적으로 영향을 미치는 것으로 이와 관련된 단백질들은 항암제의 개발에 대표적인 표적이 되는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 HUVEC cell (Human Umbilical Vein Endothelial Cell)을 이용하여 혈관신생 실험을 하였다. 실험 결과 균사체 J83, J1, J10, J123, J117, J3, J009 등에서, 배지에서는 J83, J68, J116, J41763 등에서 혈관생성을 억제하는 것으로 나타났다 (Figure 4). 항암과 관련하여 wound healing과 angiogenesis를 이용하여 실험한 결과, 여러 종류의 균사체 추출물 및 배지에서 항암 활성이 있는 것을 확인하였다. 이는 동충하초에 의한 세포의 운동성을 저하시켜 암세포의 전이를 억제하는 것으로 판단된다. 세포의 운동성을 결정하는 요인은 많은 경우 membrane에 위치한 단백질의 발현과 관계가 있으며, 특히 CD44, uPA, ICAM, VCAM 등의 단백질이 관여하는 것으로 알려져 있다(26). 본 실험에서 여러 종류의 동충하초 추출물 및 배양배지에서 세포의 운동성 감소를 확인할 수 있었다. 산화스트레스 유발 물질의 하나인 peroxynitrite ONOO)는 matrix metalloproteinase (MMPs)에 의한 암세포의 angiogenesis와 metastasis에 관련이 있는 것으로 알려져 있는데, 항산화제에 의한 peroxynitrite의 감소가 암세포의 angiogenesis와 metastasis를 효과적으로 억제하는 것으로 보고되어 있다(27,28). 이는 항산화제의 효과로서 항암활성을 가질 수 있다는 것을 나타내는데 이에 대한 연구 또한 많은 부분 이루어지고 있다. 세포내에서 낮은 농도의 산화스트레스는 세포의 성장과 생존에 관여하는 정도의 역할을 하지만 높은 농도는 세포의 성장을 억제할 뿐 아니라 독성으로 작용하여 세포의 생존에 큰 영향을 준다. 이는 암세포에서의 항산화 효소(antioxidative enzyme)의 level이 정상세포의 그것에 비해 현저히 낮게 나타나는 것으로 알 수 있는데, 이는 항산화 효소가 암세포를 치료하는데 중요한 요소라는 것을 알 수 있다(29-31). 본 연구에서는 항산화 활성을 가지며 항암활성을 가지는 물질을 동충하초 추출물과 이들의 배양배지를 이용하여 측정해 본 결과 균주 J68(*Cordyceps nutans*)의 배양배지에서 항산화 활성 및 항암활성이 높게 나타나는 것을 알 수 있었다.

요 약

동충하초 20여종의 균사와 배양 배지를 이용하여 생물학적 활성 효과를 항산화와 항암 실험을 통하여 알아보았다.

항산화 활성 실험 DPPH와 FRAP실험을 실시하였는데 다수의 동충하초 추출물에서 항산화 활성을 확인할 수 있었으며, 시간에 따른 FRAP활성에서는 배양배지에서 균사체 추출물보다 높은 활성을 나타내었다. NOS와 관련성을 확인하기 위하여 NO활성 실험을 한 결과 NO활성은 추출물의 종류에 따라 증가 또는 감소시키는 것을 알 수 있었다. 염증과의 관련성을 확인하기 위하여 Cox-2 promoter활성실험을 한 결과, 종에 따라 활성의 증가 또는 감소는 다양하게 나타났다. Wound healing assay를 이용하여 항암효과를 알아본 결과 많은 종에서 세포의 운동성을 억제하는 효과를 가지는 것으로 나타났다. 또한 혈관생성 억제효과를 알아보기 위하여 HUVECs를 이용하여 tube formation을 확인해 본 결과 다수의 추출물에서 혈관생성을 억제하는 것으로 나타났다.

참고문헌

1. Sundaresan, M., Yu, Z.X., Ferrans, V.J., Irani, K. and Finkel, T. (1995) Requirement for generation of H_2O_2 for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science*, 270, 296-299
2. Del Rio, L.A., Corpas, F.J., Sandalio, L.M., Palma, J.M., Gomez, M. and Barroso, J.B. (2002) Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *J. Exp. Bot.*, 53, 1255-1272
3. Chung-man Ho, J., Zheng, S., Comhair, S.A.A., Farver, C. and Erzurum, S.C. (2001) Differential expression of manganese superoxide dismutase and catalase in lung cancer. *Cancer Res.*, 61, 8578-8585
4. MacNee, W. (2001) Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *Eur. J. Pharmacol.*, 429, 195-207
5. Matsuyama, T., Ihaku, D., Tanimukai, T., Uyama, O. and Kitada, O. (1993) Superoxide dismutase suppressed asthmatic response with inhibition of manganese superoxide induction in rat lung. *Nippon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi.*, 31, 139-145
6. Nadeem, A., Chhabra, S.K., Masood, A., and Raj, H.G. (2003) Increased oxidative stress and altered levels of antioxidants in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 111, 72-78
7. Varshavskii, B., Trubnikov, G.V., Galaktimpva, L.P., Koreniak, N.A., Koledeznaia, I. L. and Oberemok, A.N. (2003) Oxidant-antioxidant status of patients with bronchial asthma during inhalation and systemic glucocorticoid therapy. *Ter. Arkh.*, 75, 21-24
8. Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P. and Lomri, A. (2007) Reactive oxygen species and superoxide

- dismutases: role in joint diseases. *Joint Bone Spine*, 74, 324-329
9. Fang, J., Nakamura, H. and Iyer, A.K. (2007) Tumor-targeted induction of oxystress for cancer therapy. *J. Drug Target*, 15, 475-486
 10. Al-Gayyar, M.M., Eissa, L.A., Rabie, A.M. and El-Gayar, A.M. (2007) Measurements of oxidative stress status and antioxidant activity in chronic leukaemia patients. *J. Pharm. Pharmacol.*, 59, 409-417
 11. Rao, Y.K., Fang, S.H. and Tzeng, Y.M. (2007) Evaluation of the anti-inflammatory and anti-proliferation tumoral cells activities of *Antrodia camphorata*, *Cordyceps sinensis*, and *Cinnamomum osmophloeum* bark extracts. *J. Ethnopharmacol.*, 114, 78-85
 12. Huang, H., Wang, H. and Luo, R.C. (2007) Inhibitory effects of cordyceps extract on growth of colon cancer cells. *Zhong Yao Cai.*, 30, 310-313
 13. Lee, H.M., Kim, Y.J., Kim, H.W., Lee, D.H., Sung, M.K. and Park, T.S. (2006) Induction of apoptosis by *Cordyceps militaris* through activation of caspase-3 in leukemia HL-60 cells. *Biol. Pharm. Bull.*, 29, 670-674
 14. Nomura, T., Kikuchi, M., Kubodera, A. and Kawakami, Y. (1997) Proton-donative antioxidant activity of fucoxanthin with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH). *Biochem Mol. Biol. Int.*, 42, 361-370
 15. Benzie, I.F. and Strain, J.J. (1996) The ferric reducing ability of plasma(FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal. Biochem.*, 239, 70-76
 16. Du, C., Guan, Q., Diao, H., Yin, Z. and Jevnikar, A.M. (2006) Nitric oxide induces apoptosis in renal tubular epithelial cells through activation of caspase-8. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 290, 1044-1054
 17. Kaltschmidt, B., Linker, R.A., Deng, J. and Kaltschmidt, C. (2002) Cyclooxygenase-2 is a neuronal target gene of NF-kappaB. *BMC Mol. Biol.*, 4, 3-16
 18. Heo, J.C., Park, J.Y., Lee, J.M., Kwon, T.K., Kim, S.U., Chung, S.K. and Lee, S.H. (2005) *Wisteria floribunda* gall extract inhibits cell migration in mouse B16F1 melanoma cells by regulating CD44 expression and GTP-RhoA activity. *J. Ethnopharmacol.*, 102, 10-14
 19. Bussolati, B., Dunk, C., Grohman M., Kontos, C.D., Mason, J. and Ahmed, A. (2001) Vascular endothelial growth factor receptor-1 modulates vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis via nitric oxide. *Am. J. Pathol.*, 159, 993-1008
 20. Lin, X.X., Xie, Q.M., Shen, W.H. and Chen, Y. (2001) Effects of fermented *Cordyceps* powder on pulmonary function in sensitized guinea pigs and airway inflammation in sensitized rats. *Zhongguo Zhong Yao Zhi.*, 26, 622-625
 21. Kuo, Y.C., Tsai, W.J., Wang, J.Y., Chang, S.C., Lin, C.Y. and Shiao, M.S. (2001) Regulation of bronchoalveolar lavage fluids cell function by the immunomodulatory agents from *Cordyceps sinensis*. *Life Sci.*, 68, 1067-1082
 22. Dreher, D. and Junod, A.F. (1996) Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur. J. Cancer*, 32A, 30-38
 23. Droge, W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.*, 82, 47-95
 24. Akaike, T., Okamoto, S., Sawa, T., Yoshitake, J., Tamura, F., Ichimori, K., Miyazaki, K., Sasamoto, K. and Maeda, H. (2003) 8-nitroguanosine formation in viral pneumonia and its implication for pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100, 685-690
 25. Fujii, S., Akaike, T. and Maeda, H. (1999) Role of nitric oxide in pathogenesis of herpes simplex virus encephalitis in rats. *Virology*, 256, 203-212
 26. van Wetering, S., van den Berk, N., van Buul, J.D., Mul, F.P., Lommerse, I., Mous, R., ten Klooster, J.P., Zwaginga, J.J. and Hordijk, P.L. (2003) VCAM-1-mediated Rac signaling controls endothelial cell-cell contacts and leukocyte transmigration. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 285, 343-352
 27. Kuwahara, H., Kanazawa, A., Wakamatu, D., Morimura, S., Kida, K., Akaike, T. and Maeda, H. (2004) Antioxidative and antimutagenic activities of 4-vinyl-2,6-dimethoxyphenol(canolol) isolated from canola oil. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 4380-4387
 28. Yoshitake, J., Akaike, T., Akuta, T., Tamura, F., Ogura, T., Esumi, H. and Maeda, H. (2004) Nitric oxide as an endogenous mutagen for Sendai virus without antiviral activity. *J. Virol.*, 78, 8709-8719
 29. Huang, P., Feng, L., Oldham, E.A., Keating, M.J. and Plunkett, W. (2000) Superoxide dismutase as a target for the selective killing of cancer cells. *Nature*, 407, 390-395
 30. Fang, J., Sawa, T. and Maeda, H. (2003a) Factors and mechanism of "EPR" effect and the enhanced antitumor effects of macromolecular drugs including SMANCS. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 519, 29-49
 31. Fang, J., Sawa, T., Akaike, T., Akuta, T., Sahoo, S.K., Greish, K., Hamada, A. and Maeda, H. (2003b) In vivo antitumor activity of pegylated zinc protoporphyrin: Targeted inhibition of heme oxygenase in solid tumor. *Cancer Res.*, 63, 3567-3574