

밀리타리스 동충하초 추출물의 항염활성 효과

최재훈, 김금숙, 이승은, 조재한, 성기호, 이대영, 김승유, 이태호¹, 노형준*
농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부, ¹동아제약 중앙연구소

Anti-inflammatory effects of *Cordyceps militaris* extracts

Je-hun Choi, Geum-Soog Kim, Seung-Eun Lee, Jae-Han Cho, Gi-Ho Sung,
Dae-Young Lee, Seung-Yu Kim, Tae-Ho Lee¹ and Hyung-Jun Noh*

Department of Medicinal Crop Research National Institute of Horticultural & Herbal Science, Rural Development Administration, Eumseoung, 369-873, Korea

¹Dong-A Pharm. Co., LTD. Sanggal-dong, Kiheung-gu, Youngin, Kyunggi-do, 446-905, Korea

(Received November 7, 2012, Revised November 15, 2012, Accepted November 20, 2012)

ABSTRACTS: This study was carried out to investigate anti-inflammatory effects of mushroom, *Cordyceps militaris*. Anti-inflammatory effects analysis was followed by peroxynitrite inhibition activity. *Cordyceps militaris* mushrooms extracts were screened about inhibition effects of nitric oxide for Raw 264.7 cell treated by lipopolisaccharide(LPS) and inhibition of cyclooxygenase-2(COX-2) for inflammatory effects. In our result, *Cordyceps militaris* mushrooms were good resource for anti-inflammatory effects and to be followed more research about related anti-inflammatory effects.

KEYWORDS: Anti-inflammatory, *Cordyceps militaris*, Mushroom,

서론

동충하초는 한국 및 일본, 중국 등 전 세계에 분포하며 여름부터 곤충의 유충을 기주로 증식하며 유색의 자낭좌자를 형성한다(Lee, 1998). 밀리타리스 동충하초에서 분리된 Cordycepin은 항산화 및 항암, 면역증강, 항균효과 등이 보고되어 있고(Kim 등; 2001, Ying 등, 1987; Lee 등, 2004; Park 등, 2002), 동맥경화 억제 및 콜레스테롤 저하, 혈당강하 작용등(Koh 등; 2001, 2002) 다양한 기능성을 보유하고 있어 최근에는 기능성식품의 소재로 주목받고 있다.

염증은 생체 혹은 조직에 물리적 자극이나 화학물질 접촉, 세균감염 등 기질적 변화를 가져오는 침습이 가해질 때 그 손상부위를 수복, 재생하려는 복구기전으로 국소적 염증성 성분이 증가되면서 염증이 유발된다(McCord, 1974; Petrone 등., 1980). 또한, 염증 반응이 만성화되면 동맥경화나 관절염 등의 염증성 질환을 일으키게 된다. 이러한 염증 반응에는 cytokine과 free radical 등이 관여 하는데 특히, tumor necrosis factor- α (TNF- α)나 lipopolysaccharide(LPS)와 같은 자극에 의해 염증 반응의 전사인자인 nuclear factor- κ B (NF- κ B)가 활성화되고 그로 인해 inducible nitric oxide synthase(iNOS)와 cyclooxygenase -2(COX-2)가 발현되어 염증작용이 나타난다 또한, 염증반응에 의해 과량의

nitric oxide (NO)가 생성된다(Lavrovsky 등, 2000;Schreck 등., 1992; Winrow 등, 1993).

따라서, 밀리타리스 동충하초의 항염증 활성을 확인하고자 동충하초 추출물의 free radical 저해능과 마우스 대식세포인 Raw 264.7 cell에 LPS를 처리하여 동충하초 추출물의 염증반응을 저해활성을 살펴보았다.

재료 및 방법

실험재료 및 추출물 조제

건조된 밀리타리스 동충하초 4mg을 1ml(추출 시료량을 늘려야 실험에 사용한 추출물 량을 맞출 수 있음)의 70% 에탄올로 상온 24시간 추출 후 상등액을 사용하였다.

실험물질의 제조

항염증 활성을 평가하기 위해 동충하초 추출물을 dim-ethylsulfoxide (DMSO)에 용해시켜 최종농도가 5 mg/ml 이 되도록 제조하여 사용하였다.

동충하초 추출물에 의한 3-Morpholinonydnimine hydrochloride (SIN-1)에 의해 발생한 peroxynitrite의 저해

검은색 96-well microplate에 농도별로 조절된 동충하초

*Corresponding author <jumpspace@korea.kr>

추출물을 10ul 취하고, 90mM NaCl 및 5mM KCl, 100 mM diethylenetriaminepenta acetic acid, 10 mM DHR 123 을 함유하는 sodium phosphate 완충액(pH 7.4)를 가한 후, peroxy-nitrite를 발생시키는 SIN-1을 50 μ M 농도로 처리하여 동충하초 추출물이 최종농도 16, 32, 64, 128 μ g/ml이 되게 하였다. 그리고, Peroxynitrite의 분당 변화량은 fluorescence microplate reader(Synergy HT, BIO-TEK, VT, USA)를 사용하여 excitation 500nm 및 emission 536nm 에서 측정하였다(Kooy 등, 1994).

마우스 대식 세포(Raw 264.7)

Raw 264.7(mouse monocyte cell line)은 American Type Culture Collection로부터 분양 받은 세포를 사용하였으며, 2mM L-glutamine 및 100mg/ml streptomycin, 2.5mg/l amphotericin B, 그리고 10% 불활성화된 fetal bovine serum(FBS)이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)을 이용하여 37°C에서 5% CO₂와 95% air 가 함유된 습한 대기 조건에서 배양하였다. 그리고 10% FBS 를 첨가하지 않은 것을 serum-free medium (SFM)으로 하였으며 100mm plastic flasks에 2일에 한번씩 subculture 하여 세포주를 유지하였다.

동충하초 추출물의 마우스 대식 세포증식에의 영향

동충하초 추출물의 세포 독성여부를 확인하기 위해, Raw 264.7 세포 증식에 미치는 영향을 MTT assay법을 이용하여 측정하였다. 즉, Raw 264.7 세포를 24 well plate에 7 x 10⁴/well이 되도록 분주하고 16시간 배양한 후 동충하초 추출물을 최종농도 16, 32, 64, 128 μ g/ml이 되게 처리하여 6 시간 동안 배양한 다음 MTT assay를 이용하여 세포독성을 측정하였다(Reddy 등, 2003).

동충하초 추출물에 의해 Raw 264.7 cell에서 LPS로 NO의 저해

Raw 264.7 세포를 24 well plate에 well당 7 x 10⁴개가 되도록 분주하고 16시간 배양한 후 동충하초 추출물이 최종농도 16, 32, 64 μ g/ml이 되게 처리 한 다음 1시간 후 lipopolysaccharide (LPS) 1 μ g/ml로 처리하여 6시간 배양하였다. 배양 후 세포 상층액으로 분비된 NO 생성량을 Griess reagen system (Promega, Fitchburg, WI, USA)를 이용하여 측정하였다(Rao, 1997; Xie 등, 1994).

동충하초 추출물의 Cyclooxygenase-2 (COX-2) 염증 단백질 발현 저해

Raw 264.7 세포를 100mm plastic flasks에 5 x 10⁶개가 되도록 분주하고 16시간 배양한 후 세포에서 COX-2의 발현

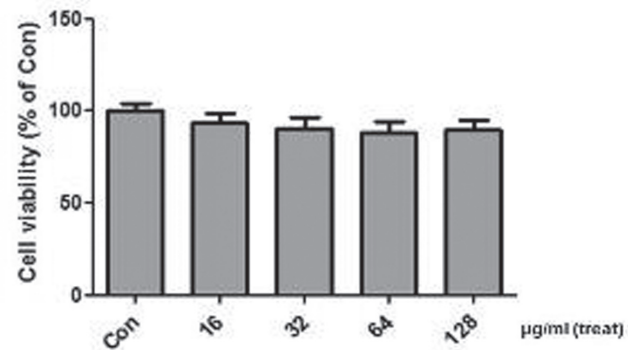


Fig. 1. Cell viability effect of *Cordyceps militaris* extracts at monocyte/macrophage cell. Cell viability was measured by MTT assay in monocyte/macrophage cell (raw 264.7). Con, Control.

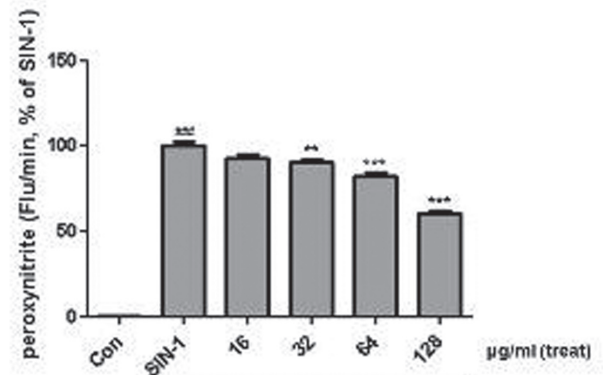


Fig. 2. Suppression of peroxynitrite level by *Cordyceps militaris* extracts. ROS was measured by fluorescence analysis using DCFDA. Con, Control. SIN-1, 50 μ M 3-Morpholiniosydnonimine hydrochloride. Statistical significance: ### p<0.001 compared to Con, ** p<0.01 compared to SIN-1, *** p<0.001 compared to SIN-1, respectively.

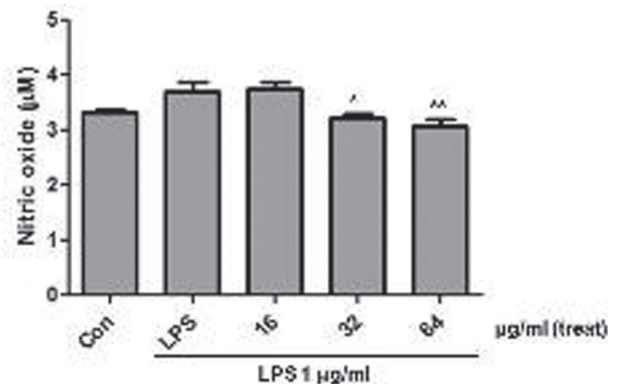


Fig. 3. Suppression of nitric oxide level by *Cordyceps militaris* extracts. Nitric oxide was measured by griess assay. Con, control. LPS, lipopolysaccharide 1 μ g/ml. Statistical significance: ** p<0.01 compared to LPS, *** p<0.001 compared to LPS, respectively. (LPS 1 μ g/ml)

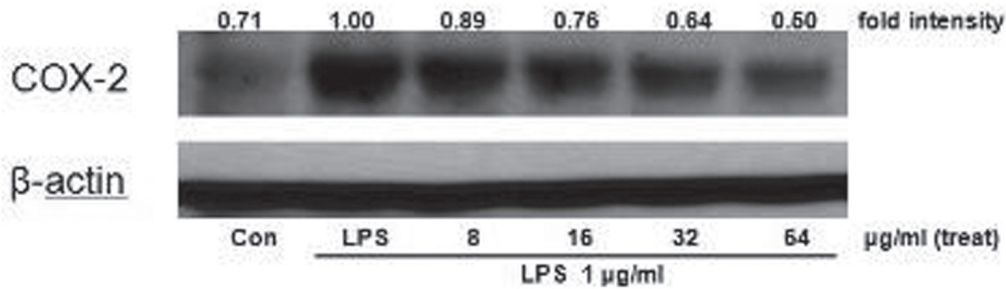


Fig. 4. Inhibition of COX-2 expression by *Cordyceps militaris* extracts. Western blot analysis was performed to detect COX-2 protein level in cytosol extracts (40 μ g protein) from each group in RAW 264.7 cell. Con, Control. LPS, lipopolysaccharide 1 μ g/ml.

을 확인하기 위해 동충하초 추출물을 8, 16, 32, 64 μ g/ml이 되도록 처리하고 1시간 후 LPS 1 μ g/ml를 처리하여 6시간 배양하였다. 배양 후 세포는 phosphate-buffered saline (PBS)로 세척하고, 세포를 세포질 용해액(10 mM Tris (pH 8.0), 1.5 mM MgCl₂, 1mM DTT, 0.1% NP-40, 20mM, 20mM β -glycerophosphate, 10mM NaF, 1mM Sodium orthovanadate) 100 μ l를 처리하여 15분간 얼음에서 방치 후 원심분리하여 상등액을 분리하였다. 이 상등액이 COX-2 발현을 확인하기 위한 세포질 단백질로 얻어진 단백질은 8% SDS-아크릴아마이드 겔 상에서 전기영동 한 후 nitrocellulose membrane으로 옮겼다. 항체의 비 특이적 결합을 억제시키기 위해 표면에 단백질이 부착되어 있는 membrane을 5% skim milk가 포함된 TBST 용액 (50 mM Tris (pH 7.5), 150mM NaCl, 0.1% Tween-20)으로 실온에서 30분간 천천히 교반 하였다. 그 후, COX-2의 specific antibodies를 이용하여 4 $^{\circ}$ C에서 over night 시켰다. COX-2 발현양은 horseradish peroxidase(HRP)가 붙어 있는 secondary antibodies로 실온에 30분 반응 후 암실에서 X-ray film에 현상하여 확인하였다(Habib 등, 1993;Reddy, 등, 2003).

통계학적 분석

통계학적 분석은 prism 5 for windows(Graphic Pad, Inc., CA, USA)의 Newman-Keuls Multiple Comparison Test에 의한 one way ANOVA를 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

밀리타리스 동충하초 추출물이 세포생존율에 미치는 영향 밀리타리스 동충하초 추출물(70% EtOH)의 마우스 대식세포 (Raw 264.7)에 대한 세포 독성을 확인한 결과, 그림 1

과 같이 모든 처리군에서 세포 생존율이 조금 하락하였다. 그림에도 불구하고, 16 μ g/ml부터 128 μ g/ml까지 모든 농도에서 밀리타리스 동충하초 추출물을 처리한 군에서 세포생존을 저해한 유의적 차이가 없는 것으로 나타나 밀리타리스 동충하초의 추출물이 마우스 대식세포 raw 264.7의 생존에 미치는 영향은 없다고 사료된다.

밀리타리스 동충하초 추출물의 peroxynitrite 저해능

Peroxynitrite는 체내에서 DNA 등을 포함한 세포 분자에 손상을 주는 자유 라디칼이며, 아질산 이온 (NO₂⁻)과 과산화수소 (H₂O₂)가 결합하여 생성되는 강력한 산화 스트레스이다. 이러한 peroxynitrite를 밀리타리스 동충하초 추출물 (70% EtOH)이 효과적으로 저해하는지 관찰한 결과는 그림 2와 같이 SIN-1 50 μ M로 유도된 peroxynitrite를 농도 의존적, 유의적으로 제거하였다. 특히, 밀리타리스 동충하초 추출물 128 μ g/ml 처리군에서 peroxynitrite를 60.77 \pm 1.67% 저해시켜 뛰어난 저해능을 가지는 것으로 확인하였다. Shin 등은 100 μ M DPPH 자유 라디칼을 밀리타리스 동충하초 Ethanol 추출물 1~30 mg/ml이 농도의존적으로 저해한다고 보고하였다. (Shin 등, 2010) 이는 밀리타리스 동충하초가 자유라디칼 저해능이 우수하다는 이번 결과와 의미가 동일하다.

밀리타리스 동충하초 추출물의 NO 저해능

체내 혹은 세포계에서 LPS와 같은 자극에 의해 염증 반응이 시작되면 염증성 유전자인 iNOS가 발현되고, iNOS가 관여하는 염증반응에 의해 과량의 NO가 생성된다. (Chen 등, 1998) 그러므로, 체내에서 NO가 감소된다는 것은 염증반응이 저해되고 있다는 것을 의미한다. 밀리타리스 동충하초 추출물(70% EtOH)의 NO 저해능을 측정된 결과 그림 3과 같이 LPS 1 μ g/ml을 처리한 군에서 NO 생성이 3.75 \pm 0.20 μ M

까지 증가하였으나 밀리타리스 동충하초 추출물 32 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서 $3.21 \pm 0.10 \mu\text{M}$, 64 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서 $3.07 \pm 0.13 \mu\text{M}$ 로 농도 의존적, 유의적으로 감소하였다. 이는 Kim 등의 raw 264.7 cell에서 LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ 에 의해 유도된 NO를 밀리타리스 동충하초의 buthanol 분획물(CMBF) 5~10 $\mu\text{g/ml}$ 에 의해 농도 의존적으로 감소 시키는 결과와 일치 하였다. (Kim 등, 2006) 또한, NO의 증가로 영향을 받아 함께 증가하는 염증성 단백질 iNOS를 밀리타리스 동충하초 Ethanol 추출물로 저해하였다는 Won 등의 결과와 의미가 연관된다. (Won 등, 2005).

밀리타리스 동충하초 추출물의 COX-2 단백질 발현 저해능

Raw 264.7 세포에 LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리하여 염증유전자 COX-2를 유도시키고 밀리타리스 동충하초 추출물의 처리가 COX-2의 발현을 저해하는지를 확인한 결과 그림 4와 같이 LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ 를 처리한 raw 264.7 세포에서 확연히 증가한 COX-2의 발현을 밀리타리스 동충하초 추출물이 처리 농도 의존적으로 저해하는 것을 확인하였다. COX-2는 평상시 일반적인 상황에서는 발현하지 않는 유전자이나, 체내에서 염증 반응이 일어나면 급격히 증가하는 염증 유전자이다. (Lin 등, 1999, Steffen 등, 1998) 그러므로, 밀리타리스 동충하초 추출물에 의한 COX-2의 저해는 염증작용이 억제되고 있음을 보여주는 결과이다. 이는 Kim 등의 raw 264.7 cell에서 LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ 에 의해 유도된 COX-2를 밀리타리스 동충하초의 buthanol 분획물 5~10 $\mu\text{g/ml}$ 에 의해 농도 의존적으로 감소 시키는 결과와 일치 하였다. (Kim 등, 2006) 하지만 Shin 등은 밀리타리스 동충하초 Ethanol 추출물 100~200 $\mu\text{g/ml}$ 에서 COX-2를 증가 더 증가시킨다고 보고하였다. (Shin 등, 2010) 밀리타리스 동충하초는 처리 농도에 따라 COX-2의 저해능과 증가능을 동시에 갖고 있는 것으로 사료된다.

적 요

밀리타리스 동충하초 추출물은 체내 염증반응을 유도하는 peroxynitrite를 밀리타리스 동충하초 추출물 128 $\mu\text{g/ml}$ 처리로 peroxynitrite를 $60.77 \pm 1.67\%$ 저해시켜 뛰어난 저해능을 가지는 것으로 free radical의 생성을 억제하며, Raw 264.7 세포에 LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리하여 NO 생성이 $3.75 \pm 0.20 \mu\text{M}$ 까지 증가하였으나 밀리타리스 동충하초 추출물 32 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서 $3.21 \pm 0.10 \mu\text{M}$, 64 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서 $3.07 \pm 0.13 \mu\text{M}$ 로 농도 의존적, 유의적으로 감소 시켰다. 또한, 이로 인해 발현되는 염증 유전자 COX-2의 발현을 유의적으로 저해 한 것을 Western blot으로 확인 하였다. 그러

므로, 밀리타리스 동충하초 추출물은 항염증소재로의 가능성이 충분하다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 시험연구사업(PJ008321022012)의 연구비로 수행된 결과이며 이에 깊은 감사를 드립니다.

참고문헌

- Chen C. C., Wang J. K., Chen W. C. and Lin S. B. 1998. Protein kinase C η mediates lipopolysaccharide-induced nitric-oxide synthase expression in primary astrocytes. *J Biol Chem*. 273: 19424-19430.
- Habib A, Creminon C, Frobert Y, Grassi J, Pradelles P and Maclouf J. 1993. Demonstration of an inducible cyclooxygenase in human endothelial cells using antibodies raised against the carboxyl-terminal region of the cyclooxygenase-2. *J Biol Chem*. 268: 23448.
- Kim H. G, Shrestha B, Lim S. Y, Yoon D. H, Chang W. C, Shin D. J, Han S. K, Park S. M, Park J. H and Park H. I. 2006. Cordycepin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation by the suppression of NF- κ B through Akt and p38 inhibition in RAW 264.7 macrophage cells. *Euro J Pharm*. 545: 192-199.
- Kim, M. N., Oh, S. W., Lee D. S. and Ham S. S. 2001. Antioxidative and antimutagenic effects of the ethanol extract from *Cordyceps militaris*. *Kor J. Postharvest Sci. Technol*. 8(1): 109-117.
- Koh, J. B. and Choi M. A., 2001, Effects of *Cordyceps militaris* on lipid metabolism in rats fed cholesterol diet. *Kor Nutri. Soc*. 34(3):265-270.
- Koh, J. B. 2002. the Effects of *Cordyceps militaris* on Liquid Metabolism, protein levels and enzyme activities in rats fed a high fat diet. *Kor. Nutri. Soc*. 35(4):414-420.
- Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H and Beckman JS. 1994. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free radical biology & medicine*. 16: 149.
- Lavrovsky Y, Chatterjee B, Clark R and Roy A. 2000. Role of redox-regulated transcription factors in in-

- flammation, aging and age-related diseases. *Experimental gerontology*. 35: 521–532.
- Lee, H. M., Lee Y. J., Park, T. S., 2004, Tumor growth inhibitory and immunomodulatory activities of *Cordyceps militaris* water extracts in ICR mice bearing sarcoma-180 solid tumor, *J Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 33, 59–65.
- Lee, J. D. 1998, Mycology 3rd edition, *Gu-duck publishing company*.
- Lin Y. I., Tsai S.H., Lin-Shiau S. Y., Ho C. T., Lin J. K. 1999. Theaflavin-3-3'-digallate from black tea blocks the nitric oxide synthase by down-regulating the activation of NF- κ B in macrophages. *Eur J Pharmacol* 367: 379–388
- McCord JM. 1974. Free radicals and inflammation: protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science* (New York, NY). 185: 529.
- Park, C. S., Kwon, C. J., Choi, M. A., Park, G. S. and Choi, K, H. 2002. Antibacterial activities of *Cordyceps* spp., Mugwort and Pine needle extracts. *Kor. J. Food Preservation* 9(1):109–113
- Petrone WF, English DK, Wong K and McCord JM. 1980. Free radicals and inflammation: superoxide-dependent activation of a neutrophil chemotactic factor in plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 77: 1159–1163.
- Rao M. 1997. Nitric oxide scavenging by curcuminoids. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 49: 105–107.
- Reddy MC, Subhashini J, Mahipal S, Bhat VB, Srinivas Reddy P, Kiranmai G, Madyastha K and Reddanna P. 2003. C-Phycocyanin, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 304: 385–392.
- Schreck R, Albermann K and Baeuerle PA. 1992. Nuclear factor κ B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radical Research*, 17: 221–237.
- Steffen P. H., Heinrich M., Bork P.M., Vogt M., Ratter F., Volker Lehmann V., Schulze-Osthoff K., Dröge W., Lienhard Schmitz M.L. 1998. Sesquiterpene Lactones Specifically Inhibit Activation of NF- κ B by Preventing the Degradation of I κ B- α and I κ B- β . *J Biol Chem*. 273: 1288–1297.
- Winrow V, Winyard P, Morris C and Blake D. 1993. Free radicals in inflammation: second messengers and mediators of tissue destruction. *British Medical Bulletin*. 49: 506–522.
- Xie Q, Kashiwabara Y and Nathan C. 1994. Role of transcription factor NF- κ B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry*. 269: 4705–4708.
- Ying, J., Mao, X., Ma, Q., Zong, Y., Wen, H., 1987, Icons of medical fungi from China, Science Press, Beijing, China, 60–85.