

## 밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*) 에탄올 추출물의 면역억제 마우스 면역활성에 미치는 영향

김혜주<sup>1</sup> · 이태호<sup>1</sup> · 권용삼<sup>1</sup> · 손미원<sup>1</sup> · 김채균<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>동아제약(주) 연구본부

<sup>2</sup>인하대학교 의과대학 약리학교실

### Immunomodulatory Activities of Ethanol Extract of *Cordyceps militaris* in Immunocompromised Mice

Hyeju Kim<sup>1</sup>, Tae Ho Lee<sup>1</sup>, Yong Sam Kwon<sup>1</sup>, Miwon Son<sup>1</sup>, and Chaekyun Kim<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Research Center, Dong-A Pharm. Co., Ltd., Gyeonggi 446-905, Korea

<sup>2</sup>Dept. of Pharmacology and Toxicology, Inha University School of Medicine, Incheon 400-712, Korea

#### Abstract

In order to determine the functional benefits of *Cordyceps militaris* in the immune system, we examined the immunomodulatory activities of *Cordyceps militaris* in an immunocompromised C57BL/6 mice model. Mice were injected intraperitoneally with an immunosuppressive drug, cyclophosphamide, and then administered orally with 3% hydroxypropylmethylcellulose or 30, 100, and 300 mg/kg of 50% ethanol extract of *Cordyceps militaris* (CM 30, CM 100, and CM 300, respectively) for 12 days. Mice treated with CM displayed significantly increased splenocyte proliferation and natural killer cell activity compared to immunosuppressed control mice ( $p < 0.05$ ). The spleen cells isolated from mice treated with CM also displayed increased production of Th1 cytokines, including IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ , suggesting enhanced cellular immunity in response to CM. However, CM had no significant effect on the production of IL-4 and IL-10. These results indicate that *Cordyceps militaris* enhances immune function by promoting immune cell proliferation and Th1 cytokine production.

**Key words:** *Cordyceps militaris*, immunocompromised mice, natural killer cell activity, splenocyte, Th1 cytokine

#### 서 론

동충하초는 살아있는 곤충을 기주로 살아가는 곤충 기생균으로, 기주의 외피를 통하여 충체 내에 침입하여 내생균핵을 형성한 후, 충체 밖으로 자실체를 형성하여 포자를 분산함으로써 다른 곤충에 침입하는 생활주기를 가지고 있다(1). 동충하초는 자낭균강(*Ascomycetes*), 맥각균목(*Clavicipitales*), 맥각균과(*Clavicipitaceae*)에 속하는 균으로, 전 세계적으로 400종 이상이 분포하고 있다(2). 식품공전에 “식품에 사용할 수 있는 원료”로 분류되어 있는 동충하초는 눈꽃 동충하초(*Paecilomyces japonica*, *Paecilomyces tenuipes*)와 밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*)가 있다. 동충하초는 주로 동아시아에서 자양강장제의 원재료로 사용되어 왔으며(3), 동충하초에 함유된 다당체(polysaccharides), cordycepin(3'-deoxyadenosine, C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>), ergosterol, mannitol 등 여러 가지 유효성분의 생리활성으로 인해 현재는 다양한 의학적 용도로 사용되고 있다(4-6). 동충하초의 생리활성은 시넨시스 동충하초(*Cordyceps sinensis*)에서 가장 많이 연

구되었다. 시넨시스 동충하초는 중국 전통의약에 가장 많이 사용되는 동충하초로 중국에서는 식품으로 분류되어 있으나 인공재배가 되지 않고, 해발고도 4000 m 이상의 박쥐나방 유충에서 자연산으로만 채집이 가능하다.

밀리타리스 동충하초는 유리기(free radical)를 제거하고, nitric oxide(NO)의 생성과 inducible nitric oxide synthase(iNOS)의 발현을 저해함으로써 항산화 효과와 항염 작용을 가진다(7-10). 밀리타리스 동충하초 에탄올 추출물은 파두유로 유도된 염증을 억제하였으며 항노화 효과를 보였다(8). Lee 등(11)은 암세포를 이식한 쥐에 투여한 밀리타리스 동충하초 추출물이 고형암의 성장을 저지하는 항암효과를 입증하였으며, 이러한 항암효과는 비장 내 natural killer(NK) 세포와 T세포의 수 그리고 비장세포의 IL-2 생성 증가에 의한 것임을 보고하였다. 이 외에도 밀리타리스 동충하초의 추출물 투여에 의한 항암효과에 관한 연구가 다수 보고되었다(12-17). 특히 밀리타리스 동충하초의 지표성분인 cordycepin은 암세포 DNA와 RNA에 adenine 대신 삽입되어 항암효과를 가지며(18), 역전사효소(reverse transcriptase)의 활성

\*Corresponding author. E-mail: chaekyun@inha.ac.kr  
Phone: 82-32-890-0976, Fax: 82-32-887-7488

을 억제시켜 HIV 감염을 저해하였다(19).

본 연구에서는 면역력이 억제된 동물 모델에서 밀리타리스 동충하초의 면역력 증강 활성을 평가하고자 하였다. 특히 바이러스성 질환과 암에 대한 면역력과 관련 있는 세포성 면역력 증강효과를 평가함으로써 건강기능식품 소재로서의 가능성을 보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 밀리타리스 동충하초 에탄올 추출물

본 실험에 이용된 밀리타리스 동충하초는 ㈜머쉬텍(횡성, 한국)으로부터 제공받았다. 건조된 밀리타리스 동충하초를 파쇄한 후 50% 에탄올에서 3일간 상온, 상압에서 추출하여 여과, 농축, 살균을 거친 후 분무 건조하였다.

### 실험동물

수컷 C57BL/6 마우스(7주령, 체중 19~23 g)를 오리엔트 바이오(성남, 한국)로부터 구입하여 일반 고형사료로 1주일 간 순화, 사육하였다. 사육실의 온도는  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  습도는  $55\pm 5\%$ 로, 그리고 명암주기는 12시간으로 일정하게 유지하였다. 본 동물실험은 동아제약(주) 연구본부 동물실험윤리위원회(IACUC)의 승인을 거쳤으며, 그 규정을 준수하여 실시하였다(승인번호 I-1111006). 실험을 위하여 마우스를 다음과 같이 5군(n=12)으로 분류하여 처치하였다. 정상군(normal group)은 생리식염수를 day 0과 day 3에 2회 복강투여한 후 매일 1회 vehicle인 3% hydroxypropylmethylcellulose(HPMC)를 경구투여하였고, 대조군(control group)의 경우 면역억제제인 cyclophosphamide를 day 0에 150 mg/kg, day 3에 100 mg/kg 복강투여하고 3% HPMC를 day 1부터 매일 1회 경구투여하였다. 밀리타리스 동충하초 추출물 투여군은 cyclophosphamide를 day 0과 3에 복강투여한 후 3% HPMC에 현탁한 밀리타리스 동충하초 추출물을 day 1부터 각 30 mg/kg, 100 mg/kg 그리고 300 mg/kg 용량으로(CM 30, CM 100, CM 300) 매일 1회 12일 동안 경구투여하였다. 각 군의 마우스는 day 12에 희생하여, 체중 및 면역기관의 무게 측정 후 8마리는 비장을 적출하여 면역학적 분석에 사용하였으며, 4마리는 면역장기의 조직학적 분석에 사용하였다.

### 체중 및 면역장기 무게 측정

실험 시작일(day 0)과 종료일(day 12)에 실험동물의 체중을 측정하였다. 또한 실험 종료일에 실험동물을 희생한 후 간, 흉선, 비장을 적출하여 그 무게를 측정하였다.

### 비장세포 준비

마우스 비장세포의 분리는 Mishell과 Shiigi(20)의 방법에 의해 실행하였다. 실험동물에서 비장을 적출하여 배양액(RPMI 1640, 10% FBS, 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin)으로 2회 세척하였다. 이를 세포 배양접시로 옮겨 10 mL의 배양액을 가한 뒤, 40  $\mu\text{m}$  nylon cell strainer(BD

Biosciences, San Jose, CA, USA)를 이용하여 균질화하였다. 이렇게 얻어진 비장세포를  $300\times g$ 에서 10분간 원심분리 한 후 red blood cell lysis buffer(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 가하여 상온에서 10분간 반응시켜 적혈구를 파괴하고 원심분리를 반복하여 세포를 세척한 후 배양액에 현탁하였다.

### 비장세포의 증식능 측정

비장세포의 증식능은 MTT 방법으로 측정하였다(21). 비장세포가  $5\times 10^6$  cells/well이 되도록 배양액 500  $\mu\text{L}$ 에 희석하여 24-well plate에 분주한 후, 배양액에 희석한 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  concanavalin A(ConA) 500  $\mu\text{L}$ 를 각 well에 첨가하였다. 세포를 5%  $\text{CO}_2$ 가 포함된 습도 90%,  $37^{\circ}\text{C}$  배양기에서 48시간 동안 배양한 후, MTT 용액(1 mg/mL)을 첨가하여 4시간 동안 반응시켰다. 배양액을 제거한 후 각 well에 detergent를 첨가하여 실온의 어두운 곳에서 8시간 세포를 용해한 후 microplate reader(Molecular devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 570 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

### Cytokine 분비능 측정

비장세포가  $5\times 10^6$  cells/well이 되도록 배양액 500  $\mu\text{L}$ 에 희석하여 24-well plate에 분주한 후, 각 well에 배양액에 희석된 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 ConA를 500  $\mu\text{L}$  첨가하였다. 5%  $\text{CO}_2$ 가 포함된 습도 90%,  $37^{\circ}\text{C}$  배양기에서 48시간 동안 배양한 후 배양액을 취하여 IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ 의 유리를 ELISA kit(R&D systems, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 측정하였다. Capture antibody가 부착되어 있는 well에 희석용액을 50  $\mu\text{L}$  씩 분주한 후, 각 cytokine 표준액 및 배양액을 50  $\mu\text{L}$  분주하여 2시간 동안 실온에서 반응시켰다. 세척용액으로 4회 세척한 후, detection antibody와 peroxidase conjugated enzyme 혼합용액을 100  $\mu\text{L}$  첨가하여 실온에서 1시간 더 반응시켰다. 다시 세척용액으로 4회 세척한 후, 기질인 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine 용액을 100  $\mu\text{L}$  분주 후 상온에서 30분간 반응시켰다. 각 well에 반응정지 용액을 50  $\mu\text{L}$  씩 첨가한 후, microplate reader를 이용하여 450 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 각 cytokine의 농도는 표준액을 사용하여 얻은 표준곡선에 따라 계산하였다.

### NK 세포 활성 측정

Natural killer(NK) 세포의 세포독성은 NK세포가 YAC-1 세포(NK-sensitive cell line)를 공격하여 파괴된 YAC-1 세포로부터 유리된 lactate dehydrogenase(LDH)를 측정하는 방법(LDH cytotoxic assay)을 이용하였다. 96-well U-bottom culture plate에  $1\times 10^4$  cells/100  $\mu\text{L}$ 의 YAC-1 세포를 첨가하고 비장세포 : YAC-1세포(effector-to-target) 비가 200:1, 100:1, 50:1이 되도록 비장세포를 첨가한 plate를 5%  $\text{CO}_2$ 가 포함된 습도 90%,  $37^{\circ}\text{C}$  세포배양기에서 4시간 동안 배양한 후 원심분리 하였다. LDH가 유리된 상층액 100  $\mu\text{L}$ 을 채취하여 flat-bottom microplate(Nunc, Roskilde,

Denmark)에 옮겼다. LDH cytotoxic assay는 Abcam사 (Cambridge, England)의 LDH assay kit를 이용하여 제조회사의 실험방법에 따라 실험하였다. LDH working mixture를 100  $\mu$ L 첨가하고 암소의 실온(15~25°C)에서 30분간 반응시킨 후, 반응정지 용액인 1 N HCl 50  $\mu$ L를 첨가한 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. NK 세포 활성도는 다음과 같은 공식을 이용하여 계산하여 백분율(% of cytotoxicity)로 나타내었다.

$$\% \text{ of cytotoxicity} = \frac{\text{Test sample} - \text{Low control}}{\text{High control} - \text{Low control}} \times 100$$

#### 통계처리

본 실험의 자료의 통계처리는 SigmaStat3.5(Systat Software, San Jose, CA, USA)을 이용하여 분석하였다. 결과는 mean $\pm$ SEM으로 표시하였으며 정상군 또는 대조군과의 평균 차이에 대한 유의성은 one-way ANOVA로 분석 후 Duncan's multiple range test로 p<0.05 수준에서 검정하였다.

## 결과 및 고찰

#### 체중 및 면역장기의 무게

각 실험군 마우스의 체중 및 면역장기인 간, 흉선, 비장의 무게는 Table 1에 나타내었다. 실험 시작일(day 0)과 day 3에 면역억제제인 cyclophosphamide를 투여하고 day 1부터 day 12까지 vehicle(3% HPMC) 또는 밀리타리스 동충하초 추출물(CM)을 매일 1회 투여한 후 쥐를 희생하여 체중 및 면역장기의 무게를 측정하였다. 모든 실험군에서 실험이 진행된 12일간 약 7% 정도의 체중 증가를 보여 cyclophosphamide 및 동충하초 추출물의 투여가 실험동물의 체중에 유의적인 영향을 주지 않음을 알 수 있었다. 간의 무게는 유의적인 변화를 보이지 않았으나, 흉선의 무게는 면역억제제인 cyclophosphamide를 투여한 군에서 유의적으로 감소하였으며 비장의 무게는 cyclophosphamide 투여군에서 유의적으로 증가하였다(Table 1). Cyclophosphamide 투여에 의한 흉선 무게 감소는 cyclophosphamide 투여 후 14일 동안 흉선 무게와 흉선 세포수의 감소를 보인 Miyachi 등(22)의 결과와 유사하며, 본 연구에서도 cyclophosphamide가 T 세포의 분화를 억제한 것으로 생각된다. 비장의 무게 증가는

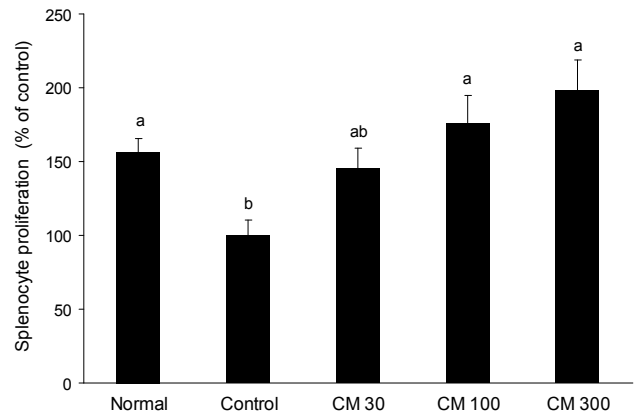


Fig. 1. Administration of *C. militaris* stimulates splenocyte proliferation. Mice were administered with HPMC and CM after immunosuppression. The splenocytes were activated with ConA and the cell proliferation was measured by MTT assay. Data were mean $\pm$ SEM of 8 mice, and bars with different alphabet letters are significantly different at p<0.05 compared to control by one-way ANOVA.

cyclophosphamide 투여 후 8~14일 사이에 비투여군에 비하여 비장 무게가 증가됨을 보고한 Joyce 등(23)의 결과와 일치하며 면역억제에 대한 방어기작으로 생각된다. 밀리타리스 동충하초 50% 에탄올 추출물을 투여한 경우 각 농도에서 비장의 무게가 대조군에 비해 5~13% 정도 증가하였다. 이는 밀리타리스 동충하초가 비장세포의 증식을 촉진시킨 것으로 생각되며, Liu 등(12)은 동충하초 투여 시 비장세포의 DNA 합성이 촉진되어 비장 무게가 증가된다고 보고하였다.

#### 밀리타리스 동충하초 추출물의 비장세포 증식 촉진 효과

밀리타리스 동충하초 추출물의 투여가 비장세포의 증식 능에 미치는 영향을 Fig. 1에 나타내었다. 24-well plate에 각 실험군의 비장세포( $5 \times 10^6$  cells/well)를 넣은 후 ConA를 넣고 48시간 후 비장세포의 증식 정도를 MTT assay로 측정하였다. 면역력을 억제시킨 대조군의 세포증식 정도를 100%로 하고 각 실험군의 비장세포 증식 정도를 백분율로 나타내었다. 면역력을 억제시키지 않은 정상군의 비장세포 증식은 156.2 $\pm$ 9.4%로 면역력을 억제시킨 후 vehicle을 투여한 대조군의 1.6배로 cyclophosphamide 투여가 비장세포의 증식을 약 35% 억제함을 확인하였다. 밀리타리스 동충하초 추출물을 투여한 경우, 용량 의존적으로 비장세포의 증식이 증가되

Table 1. Effect of *C. militaris* administration on the body weight and immune-organ of C57BL/6 mice

Group	Body weight (g)		Liver (g)	Thymus (mg)	Spleen (mg)
	(day 0)	(day 12)			
Normal	22.31 $\pm$ 0.30 <sup>1)</sup>	23.91 $\pm$ 0.40	1.51 $\pm$ 0.05	62.8 $\pm$ 2.6 <sup>a</sup>	69.5 $\pm$ 2.8 <sup>a</sup>
Control	22.33 $\pm$ 0.29	23.40 $\pm$ 0.29	1.46 $\pm$ 0.06	44.1 $\pm$ 1.8 <sup>b</sup>	137.9 $\pm$ 8.4 <sup>b</sup>
CM 30 <sup>2)</sup>	22.34 $\pm$ 0.29	23.19 $\pm$ 0.35	1.44 $\pm$ 0.05	47.5 $\pm$ 2.5 <sup>b</sup>	145.4 $\pm$ 5.6 <sup>b</sup>
CM 100	22.35 $\pm$ 0.28	23.33 $\pm$ 0.45	1.45 $\pm$ 0.03	50.5 $\pm$ 3.3 <sup>b</sup>	155.5 $\pm$ 8.4 <sup>b</sup>
CM 300	22.35 $\pm$ 0.28	23.57 $\pm$ 0.46	1.50 $\pm$ 0.03	46.2 $\pm$ 2.7 <sup>b</sup>	153.1 $\pm$ 7.0 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup>The results are expressed as mean $\pm$ SEM of 12 mice per group.

<sup>2)</sup>CM 30 represents administration of 30 mg/kg of 50% ethanol extract of *Cordyceps militaris*.

<sup>a,b</sup>Different alphabet letters represent significant difference at p<0.05 by one-way ANOVA.

었다. 밀리타리스 동충하초 추출물을 30, 100, 300 mg/kg의 용량으로 투여하였을 때, 비장세포의 증식율은 각각  $145.3 \pm 13.6\%$ ,  $175.8 \pm 18.9\%$  그리고  $197.8 \pm 20.9\%$ 로 100, 300 mg/kg의 용량 투여군의 경우 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 증가하였다. Zhang 등(24)은 방사능을 처리하여 면역 억제된 마우스에 배양한 시넨시스 동충하초로부터 얻은 다당류를 6주 동안 투여한 결과, ConA로 자극한 비장세포의 수가 2배 이상 증가됨을 보였으며, Siu 등(25)은 야생 혹은 인공배양 시넨시스 동충하초 추출물을 *in vitro*에서 ConA로 자극한 마우스 비장세포에 처리했을 때, 비장세포의 증식이 증가된다고 보고하였다.

밀리타리스 동충하초 추출물의 비장 세포에서의 Th1 cytokine 분비 촉진 효과

밀리타리스 동충하초 추출물의 투여가 비장세포의 cytokine 분비능에 미치는 영향을 Fig. 2에 나타내었다. 주로 세포성 면역을 조절하는 Th1 cytokine 중에서 IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ 와 TNF- $\alpha$ 를 체액성 면역에 관여하는 Th2 cytokine으로 IL-4와 IL-10을 선정하여 비장세포 배양액에 분비된 이들 cytokine의 농도를 ELISA법으로 정량하였다. 정상군 비장세포의 IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ 와 TNF- $\alpha$  분비량은 각각  $347.5 \pm 41.4$  pg/mL,  $24.2 \pm 3.8$  pg/mL,  $14.5 \pm 1.9$  ng/mL,  $231.2 \pm 16.5$  pg/mL이었으며, 면역력이 억제된 대조군 비장

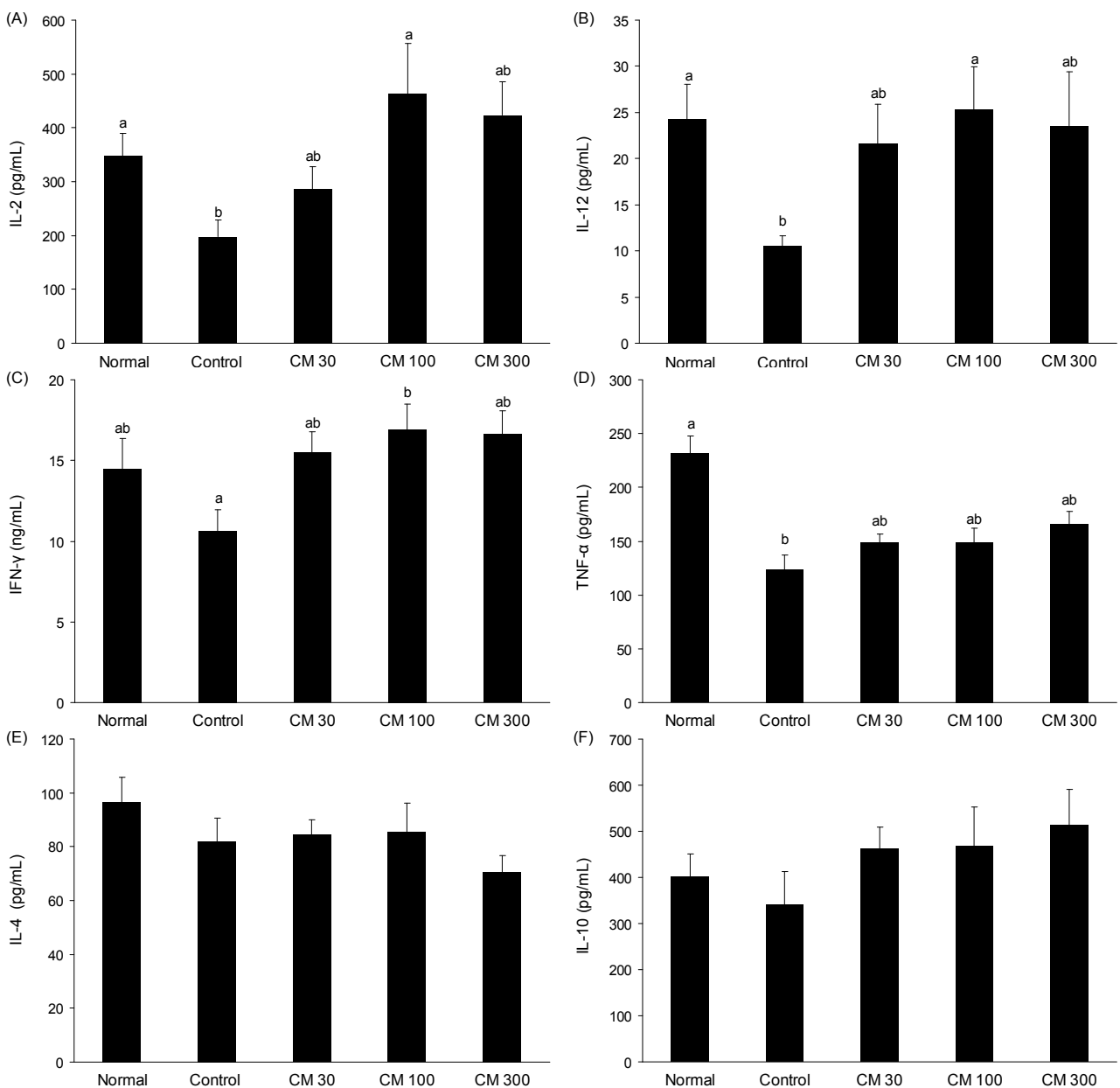


Fig. 2. Effect of *C. militaris* extract on the cytokine production of cyclophosphamide-treated murine splenocytes. The splenocytes were activated with ConA and the production of cytokines were measured by ELISA. Data were mean $\pm$ SEM of 8 mice, and bars with different alphabet letters are significantly different at  $p < 0.05$  compared to control by one-way ANOVA.

세포의 분비량은 각각  $198.5 \pm 30.0$  pg/mL,  $10.6 \pm 1.0$  pg/mL,  $10.7 \pm 1.3$  ng/mL,  $123.6 \pm 13.3$  pg/mL로 정상군에 비하여 유의적으로 감소되어 cyclophosphamide가 성공적으로 면역력을 억제함을 확인하였다.

밀리타리스 동충하초 추출물을 투여 받은 실험군에서의 Th1 cytokine 분비능은 IL-2의 경우, CM 100 투여 시 농도가  $528.9 \pm 92.6$  pg/mL로 대조군 대비 유의적인 증가를 보이며 정상군 이상의 수준으로 증가되었다. IL-12의 경우 CM 30, CM 100 그리고 CM 300 투여 시 농도가  $21.7 \pm 4.2$  pg/mL,  $25.3 \pm 4.7$  pg/mL,  $23.5 \pm 5.9$  pg/mL로 CM 100 투여군은 대조군 대비 유의적인 증가를 보이며 정상군 수준으로 분비가 회복되었다. IFN- $\gamma$ 의 경우 CM 30, CM 100 그리고 CM 300 투여 시  $15.5 \pm 1.3$  ng/mL,  $16.9 \pm 1.6$  ng/mL,  $16.6 \pm 1.4$  ng/mL로 CM 100 투여군의 경우 대조군에 비해 유의적인 증가를 보이며 정상군 이상으로 증가되었다. 이상의 결과를 보면, IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$  생성 증가는 CM 100을 투여한 경우 CM 300에 비해 더 효과적이었다. TNF- $\alpha$ 의 경우 CM 300 투여 시 농도가  $165.6 \pm 11.8$  pg/mL로 대조군 대비 증가하는 경향을 보였으나 유의하지는 않았다. Th2 cytokine인 IL-4와 IL-10의 측정 결과, 면역력을 억제시키지 않은 정상군에서  $96.6 \pm 9.3$  pg/mL과  $401.2 \pm 48.8$  pg/mL이었으며 cyclophosphamide 투여를 받아 면역력이 억제된 대조군 비장세포에서  $81.8 \pm 8.9$  pg/mL과  $340.5 \pm 71.7$  pg/mL로 IL-4와 IL-10 역시 정상군에 비하여 분비가 감소되었으나 유의하지는 않았다. 밀리타리스 동충하초 추출물을 투여 받은 실험군에서의 IL-4 분비는 증가를 보이지 않았으며, IL-10은 용량 의존적으로 증가하여 정상군 이상이었으나 통계적으로 유의하지 않았다.

이상의 결과로 밀리타리스 동충하초 추출물은 세포성 면역력을 증진시키는 Th1 cytokine의 분비를 조절하는 효과가 있으나 체액성 면역력에 영향을 미치는 Th2 cytokine의 분비에는 효과가 없음을 알 수 있다. Ha 등(26)은 BALB/c 마우스의 비장세포에 밀리타리스 동충하초 수(water) 추출물 ( $2 \sim 200$   $\mu$ g/mL)을 처리한 실험에서 고용량의 수추출물이 IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  같은 Th1 cytokine의 분비는 물론 IL-10의 분비도 증가시킴을 보고한 바 Th1 cytokine의 분비 증가는 본 결과와 유사하지만 IL-10 분비는 상이한 결과를 보고하였다. 또한 Kim 등(27)은 밀리타리스 동충하초 수추출물( $100$   $\mu$ g/mL)이 수지상(dendritic) 세포의 IL-2 분비를 증가시키는 보고를 하여 본 결과를 뒷받침한다.

#### 밀리타리스 동충하초 추출물의 NK 세포 활성 촉진 효과

밀리타리스 동충하초 추출물의 투여가 NK 세포의 활성화에 미치는 영향을 Fig. 3에 나타내었다. Cyclophosphamide 투여로 면역력이 억제된 대조군의 NK 세포 활성(% cytotoxicity)은 E:T ratio가 200:1, 100:1, 50:1인 경우  $20.1 \pm 3.8\%$ ,  $14.2 \pm 1.2\%$ ,  $8.2 \pm 0.8\%$ 로 면역력을 억제시키지 않은 정상군의  $39.1 \pm 3.8\%$ ,  $30.4 \pm 3.0\%$ ,  $16.2 \pm 3.5\%$ 에 비하여 현저하게

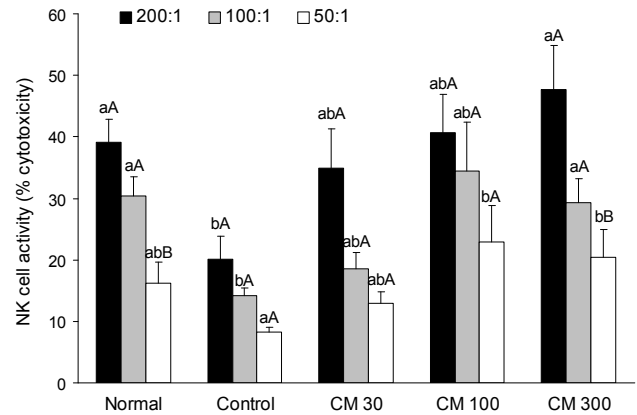


Fig. 3. Administration of *C. militaris* enhances NK cell activity. The splenocytes were incubated with different ratio of YAC-1 cells and the released LDH was determined by LDH cytotoxic assay. Data were mean  $\pm$  SEM of 8 mice, and bars with different small letters are significantly different at  $p < 0.05$  among the groups. Bars with different capital letters are significantly different at  $p < 0.05$  among the E:T ratios.

감소되었다. 한편 CM 30 투여군의 NK 세포 활성은 E:T ratio가 200:1, 100:1, 50:1에서 각각  $34.8 \pm 6.5\%$ ,  $18.5 \pm 2.7\%$ ,  $13.0 \pm 1.9\%$ 로 대조군에 비해 증가되었으나 통계적으로 유의하지 않았다. CM 100 투여군에서는 E:T ratio가 200:1, 100:1, 50:1에서 각각  $40.7 \pm 6.2\%$ ,  $34.4 \pm 7.9\%$ ,  $23.0 \pm 5.9\%$ 로 정상군 이상으로 회복되었으며, E:T ratio가 50:1의 경우 통계적으로 유의하였다. CM 300 투여군에서는 E:T ratio가 200:1, 100:1, 50:1에서 각각  $47.7 \pm 7.1\%$ ,  $29.3 \pm 4.0\%$ ,  $20.4 \pm 4.5\%$ 로 모든 E:T ratio에서 정상군 이상으로 증가되었으며 대조군에 비해 통계적으로 유의하였다. 따라서 NK 세포 활성증가 효과는 300 mg/kg 밀리타리스 동충하초 추출물 투여에서 가장 우수하였다. 본 결과와 유사하게 Ha 등(26)은 BALB/c 마우스 비장세포에 처리한 밀리타리스 동충하초 수추출물( $0.2 \sim 20$   $\mu$ g/mL)이 NK 세포의 활성을 증가시킴을 보고하였고, Kim 등(27) 역시 밀리타리스 동충하초 수추출물( $100$   $\mu$ g/mL)이 골수세포에서 분화된 수지상 세포의 NK 세포 활성을 증가시키는 결과를 보고하였다.

## 요 약

본 연구에서는 면역억제 동물모델에서 밀리타리스 동충하초 50% 에탄올 추출물의 면역력 증강 기능을 평가하였다. 이를 위하여 C57BL/6 마우스에 cyclophosphamide를 2회 복강주사 하여 면역력을 억제한 후, 밀리타리스 동충하초 추출물을 30, 100, 300 mg/kg 용량으로 12일간 경구투여 하였다. 마우스를 희생하여 몸무게 및 면역장기 무게, 비장세포의 증식, 비장세포의 cytokine 분비능, NK 세포 활성을 측정하였다. 그 결과, cyclophosphamide 투여에 의한 면역억제는 마우스의 몸무게와 간의 무게에 영향을 주지 않았으나 흉선의 무게는 감소시켰고 비장의 무게는 증가시켰다. 밀리타리스

스 동충하초 추출물 투여는 마우스의 몸무게 및 면역장기 무게에 영향을 주지 않았다. Cyclophosphamide 투여는 비장 세포의 증식능을 감소시켰으며 밀리타리스 동충하초 추출물은 용량 의존적으로 비장세포 증식을 증가시켜 실험에 사용한 전 용량에서 비장세포의 유의적인 증식효과를 보였다. 비장세포의 cytokine 분비능을 측정한 결과, 밀리타리스 동충하초 추출물 투여는 IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  같은 Th1 cytokine의 분비를 대조군에 비해 유의적으로 증가시켰으나, IL-4와 IL-10 같은 Th2 cytokine의 분비에는 영향을 미치지 않았다. 또한 cyclophosphamide는 NK 세포의 활성을 정상군에 비하여 유의적으로 감소시켰으며, 밀리타리스 동충하초 추출물 투여는 cyclophosphamide에 의해 저하된 NK 세포 활성을 현저하게 증가시켰다. 이상의 결과를 종합해 볼 때, 밀리타리스 동충하초는 면역력이 억제된 상황에서 면역력을 증강시키며, 이러한 면역력 증강 효과는 체액성 면역보다 세포성 면역력 증강에 기인하는 것으로 보인다.

### 감사의 글

본 논문은 차세대 바이오그린21 사업 (농생명바이오 식의 약소재 개발사업단, PJ008321)과 타우린연구회 연구비에 의해 수행되었다.

### 문 헌

- Sung JM, Lee HK, Choi YS, Kim YY, Kim SH, Sung GH. 1997. Distribution and taxonomy of entomopathogenic fungal species from Korea. *Kor J Mycol* 25: 239-252.
- Sung GH, Hywel-Jones NL, Sung JM, Luangsa-Ard JJ, Shrestha B, Spatafora JW. 2007. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Stud Mycol* 57: 5-59.
- Ying J. 1987. *Icons of medicinal mushroom from China*. Beijing Science Press, Beijing, China. p 151-155.
- Mizuno T. 1999. Medicinal effects and utilization of *Cordyceps* (Fr.) Link (Ascomycetes) and *Isaria* Fr. (Mitosporic fungi) Chinese caterpillar fungi, "*Tochukaso*" (review). *Intl J Med Mushroom* 1: 251-261.
- Song CH, Jeon YJ, Yang BK, Ra KS, Sung JM. 1998. Anti-complementary activity of exo-polymers produced from submerged mycelial cultures of higher fungi with particular reference to *Cordyceps militaris*. *J Microbiol Biotechnol* 8: 536 - 539.
- Ng TB, Wang HX. 2005. Pharmacological actions of *Cordyceps*, a prized folk medicine. *J Pharm Pharmacol* 57: 1509-1519.
- Yu R, Song L, Zhao Y, Bin W, Wang L, Zhang H, Wu Y, Ye W, Yao X. 2004. Isolation and biological properties of polysaccharide CPS-1 from cultured *Cordyceps militaris*. *Fitoterapia* 75: 465-472.
- Won SY, Park EH. 2005. Anti-inflammatory and related pharmacological activities of cultured mycelia and fruiting bodies of *Cordyceps militaris*. *J Ethnopharm* 96: 555-561.
- Yu RM, Yang W, Song LY, Yan CY, Zhang Z, Zhao Y. 2007. Structural characterization and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of cultured *Cordyceps militaris*. *Carbohydrate Polym* 70: 430-436.
- Chen C, Luo SS, Li Y, Sun YJ, Zhang CK. 2004. Study on antioxidant activity of three *Cordyceps* sp. by chemiluminescence. *Shanghai J Trad Chinese Med* 38: 53-55.
- Lee H, Lee Y, Park T. 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.
- Liu J, Yang S, Yang X, Chen Z, Li J. 1997. Anticarcinogenic effect and hormonal effect of *Cordyceps militaris*. *Zhong-guo Yao Za Zhi* 22: 111-113.
- Johns DG, Adamson RH. 1976. Enhancement of the biological activity of cordycepin (3'-deoxyadenosine) by the adenosine deaminase inhibitor 2'-deoxycoformycin. *Biochem Pharmacol* 25: 1441-1444.
- Muller WE, Seibert G, Breter HJ, Maidhof A, Zahn RK. 1977. Effects of cordycepin on nucleic acid metabolism in L5178Y cells and on nucleic acid-synthesizing enzymes. *Cancer Res* 37: 3824-3833.
- Kodama EN, McCaffrey RP, Yusa K, Mitsuya H. 2000. Antileukemic activity and mechanism of action of cordycepin against terminal deoxynucleotidyl transferase-positive (TdT+) leukemic cells. *Biochem Pharm* 59: 273-281.
- Lin YW, Chiang BH. 2008. Anti-tumor activity of the fermentation broth of *Cordyceps militaris* cultured in the medium of radix astragali. *Proc Biochim* 43: 244-250.
- Mao XB, Zhong JJ. 2006. Significant effect of  $\text{NH}_4^+$  on cordycepin production by submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. *Enzyme Microb Technol* 38: 343-350.
- Cunningham KG. 1951. Cordycepin, a metabolic product from cultures of *Cordyceps militaris* (Linn.) Link. Part I. Isolation and characterization. *J Chem Soc* 1: 2299-3200.
- Müller WE, Weiler BE, Charubala R, Pfeleiderer W, Leserman L, Sobol RW, Suhadolnik RJ, Schröder HC. 1991. Cordycepin analogues of 2'5'-oligoadenylate inhibit human immunodeficiency virus infection via inhibition of reverse transcriptase. *Biochemistry* 30: 2027-2033.
- Mishell BB, Shiigi SM. 1980. *Selected methods in cellular immunology*. 1st ed. WHFreeman and Co., San Francisco, CA, USA. p 4-27.
- Kim JW, Kim C. 2005. Inhibition of LPS-induced NO production by taurine chloramine in macrophages is mediated through Ras-ERK-NF $\kappa$ B. *Biochem Pharmacol* 70: 1352-1360.
- Miyauchi A, Hiramane C, Tanaka S, Hojo K. 1990. Differential effects of a single dose of cyclophosphamide on T cell subsets of the thymus and spleen in mice: flow cytometry analysis. *Tohoku J Exp Med* 162: 147-167.
- Joyce RA, Hartmann O, Chervenick PA. 1979. Splenic granulopoiesis in mice following administration of cyclophosphamide *Cancer Res* 39: 215-218.
- Zhang J, Yu Y, Zhang Z, Ding Y, Dai X, Li Y. 2011. Effect of polysaccharide from cultured *Cordyceps sinensis* on immune function and anti-oxidation activity of mice exposed to  $^{60}\text{Co}$ . *Int Immunopharmacol* 11: 2251-2257.
- Siu KM, Mak DH, Chiu PY, Poon MK, Du Y, Ko KM. 2004. Pharmacological basis of 'Yin-nourishing' and 'Yang-invigorating' actions of *Cordyceps*, a Chinese tonifying herb. *Life Sci* 76: 385-395.
- Ha JW, Yoo HS, Shin JW, Cho JH, Lee NH, Yoon DH, Lee YW, Son CG, Cho CK. 2006. Effects of *Cordyceps militaris* extract on tumor immunity. *Kor J Ori Med* 27: 12-29.
- Kim GY, Ko WS, Lee JY, Lee JO, Ryu CH, Choi BT, Park YM, Jeong YK, Lee KJ, Choi KS, Heo MS, Choi YH. 2006.

Water extract of *Cordyceps militaris* enhances maturation of murine bone marrow-derived dendritic cells in vitro. *Biol Pharm Bull* 29: 354-360.

28. Kuo YC, Tsai WJ, Shiao MS, Chen CF, Lin CY. 1996. *Cordyceps sinensis* as an immunomodulatory agent. *Am J Chin Med* 24: 111-125.

(2012년 1월 6일 접수; 2012년 2월 21일 채택)