

밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*)의 인플루엔자백신 적응면역에 미치는 영향

이환희 · 조효선[#]

덕성여자대학교 약학대학 약학과

(Received December 9, 2014; Revised February 12, 2015; Accepted February 12, 2015)

The Effect of *Cordyceps militaris* on Adaptive Immune Responses in DBA2 Mice Immunized with Influenza Vaccine

Hwan Hee Lee and Hyosun Cho[#]

Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

Abstract — *Cordyceps militaris* has shown to have various pharmacological activities including an immune-modulatory effect. Previously, we reported that anti-influenza effect of *C. militaris* in DBA/2 mice was mediated by increased IL-12 and the activation of NK cells. In this study, we investigated the effect of *C. militaris* on adaptive immune responses using DBA2 mice immunized with influenza vaccine. To determine the effect of *C. militaris* on antigen presentation capability, we treated RAW 264.7 cells with various concentrations of ethanol extract of *C. militaris*, which showed a significant upregulation of CD86 (B7.2), CD284 (TLR4), CD40, H-2k (MHC I) and I-Ad (MHC II). To examine the direct effect of *C. militaris* on adaptive immune responses, we immunized DBA2 mice with influenza vaccine in presence or absence of *C. militaris*. After 2 or 4 weeks, influenza-specific T cell proliferation, HAI titers and IFN- γ production were measured in plasma or PBMCs isolated from animals. Influenza-specific T cell proliferation and HAI titers were not considerably increased in immunized mice in presence of *C. militaris*. However, the production of IFN- γ was much greater in immunized mice with *C. militaris* as adjuvant than only immunized mice.

Keywords □ *Cordyceps militaris*, adaptive immunity, influenza virus, IFN- γ

동충하초는 동아시아 지역을 중심으로 다양한 생리활성이 보고되어 왔으며, 대표적으로 면역증강, 항염, 항암, 항노화, 간기능 개선 및 피로회복 등의 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 따라서 동충하초 유래물질의 질병예방 효능에 대한 연구는 지난 수 십 년 간 활발히 진행되어 왔다. 현재, 국내외 연구진에 의해 동충하초 유래 생리활성물질 중 그 구조와 작용기전이 밝혀진 단일물질은 코디세핀(cordycepin), 사이클로스포린(cyclosporin), 아세톡시스시르펜올(acetoxyscirpenol), 에르고스테롤 퍼옥사이드(ergosterol peroxide) 등이 있다.^{1,2)}

동충하초는 진균이 자실체를 형성하는 대상에 따라 다양한 종류로 나뉘어지며, 시넨시스 동충하초(*Cordyceps sinensis*)와 밀리타리스 동충하초(*Cordyceps militaris*)가 대표적이다. 시넨시스 동충하초는 전통적으로 귀한 약재로 알려져 왔으나 야생에서 구하기가 힘들며 대량생산이 불가능하다. 하지만 밀리타리스 동충하초의 경우, 주요 유효성분인 cordycepin과 cordycepic acid의 함량이 시넨시스 동충하초에 비해 높으며 대량생산이 가능하여 최근 건강기능식품으로 각광받고 있다.³⁾

동충하초는 인체 면역체계에 선천면역(innate immunity)뿐 아니라 적응면역(adaptive immunity)에도 증강효능이 있는 것으로 알려져 있다. 동충하초 추출물은 선천면역세포인 대식세포의 탐식세포능(phagocytosis)을 활성화시키고, 염증반응 매개 사이토카인인 IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 생성을 증가시킨다.⁴⁾ 동충하초의 적응면역에 대한 효능은 Th1와 Th2 세포의 활성을 조절하며, 대표적인 자가면역질환인 전신성 홍반성낭창에서 anti-dsDNA 항

[#]Corresponding Author

Hyosun Cho

Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Duksung Women's University, 144-33, Samyang-ro, Dobong-gu, Seoul 132-714, Korea
Tel.: 02-901-8678 Fax.: 02-901-8386

E-mail: hyosun1102@duksung.ac.kr

체의 생산억제와 관련이 있는 것으로 보고되었다.⁵⁾ 최근, 면역억제가 유도된 마우스에서 12일간 동충하초 추출물을 경구투여하여 비장세포의 증식, cytokine 분비능 증가, 자연살해세포(NK cells)의 활성촉진에 효능이 있음을 확인하였다.⁶⁾ 이러한 결과는 장기적인 항암치료에 의해 면역력이 억제된 상황에서 동충하초 추출물이 면역력을 정상으로 회복시키는 요인이 될 수 있음을 보여준다.

본 연구팀은 이전의 연구에서 밀리타리스 동충하초의 지속적인 경구투여로 인플루엔자 바이러스에 감염된 마우스 모델에서 뚜렷한 생존률 증가와 질병회복률을 관찰하였고, 이러한 항바이러스 효능은 IL-12분비 및 NK 세포 활성 등의 선천면역증강과

밀접한 관계가 있음을 확인하였다.⁷⁾ 따라서 본 연구에서는 밀리타리스 동충하초의 인플루엔자 백신에 대한 적응면역 효능을 면역억조제의 형태로 백신과 함께 투여하여 인플루엔자 특이 T림프구 증식, 인플루엔자 특이 항체가, 인플루엔자 특이 IFN- γ 등의 변화를 살펴보고자 하였다.

실험에 사용된 동충하초 추출물은 밀리타리스 동충하초의 에탄올 추출물로 동아ST(주)에서 제공받았다.⁷⁾ 먼저 동충하초 추출물의 항원제시능 유도여부를 살펴보기 위해 항원제시세포인 RAW264.7을 이용하여 추출물 처리 후 CD86, CD284, CD40, H-2k(MHC I) 그리고 I-Ad(MHC II)의 표면항원의 발현변화를 측정하였다. RAW264.7에 동충하초를 농도 별로(0, 100, 300 μ g/

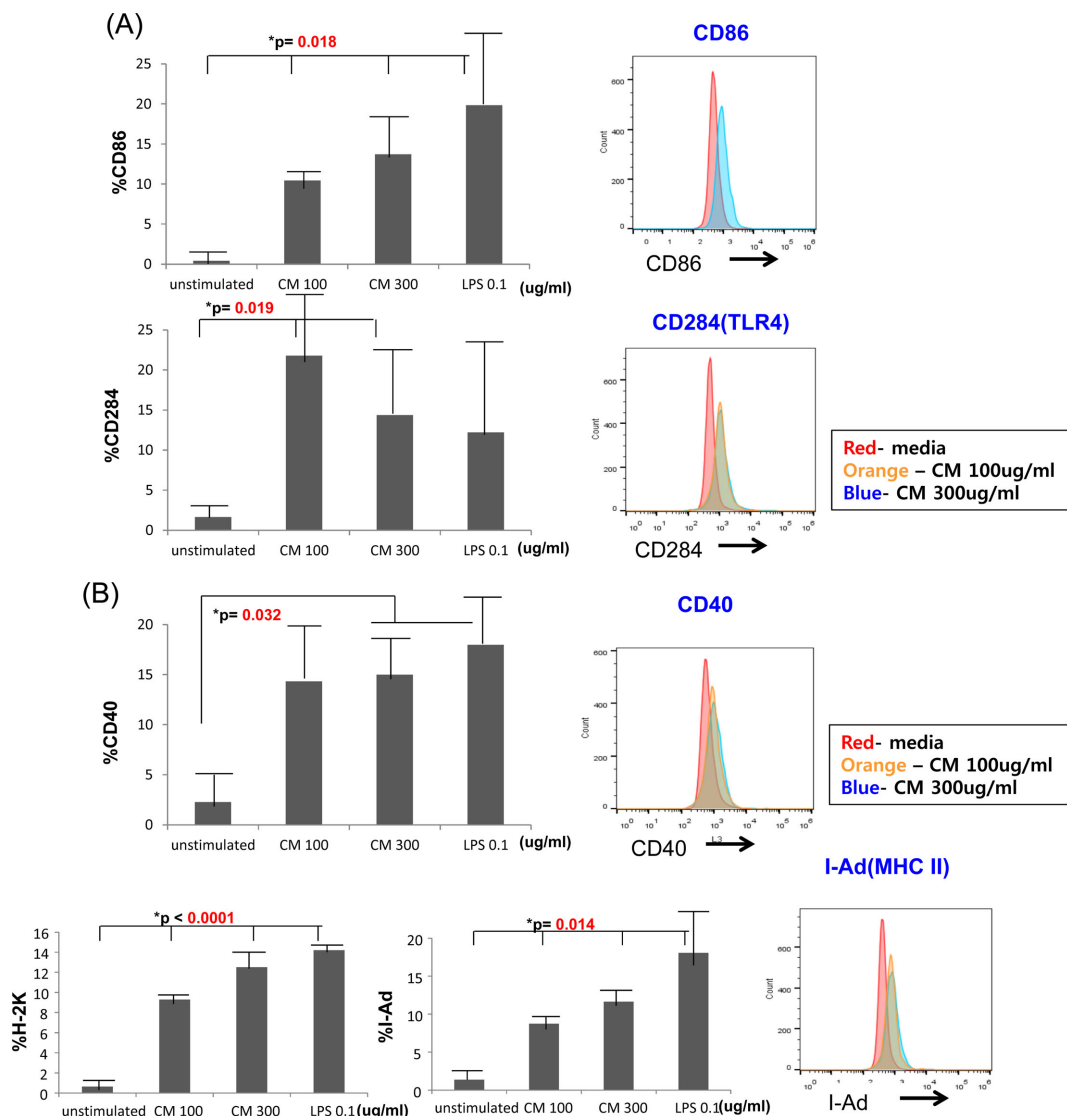


Fig. 1 – Effect of *Cordyceps militaris* on expression of CD86, CD284, CD40, H-2k and I-Ad in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were plated and treated with *Cordyceps militaris* (100 μ g, 300 μ g/ml) or LPS (0.1 μ g/ml) for 24 h. Then, cells were stained with anti-mouse CD86, CD284, CD40, H-2k and I-Ad and analyzed by flow cytometry. The results were presented as mean \pm standard deviation (SD) values for three independent experiments. (A) The percentage of CD86 and CD284 expression (B) The percentage of CD40, H-2k (MHC I) and I-Ad (MHC II) expression.

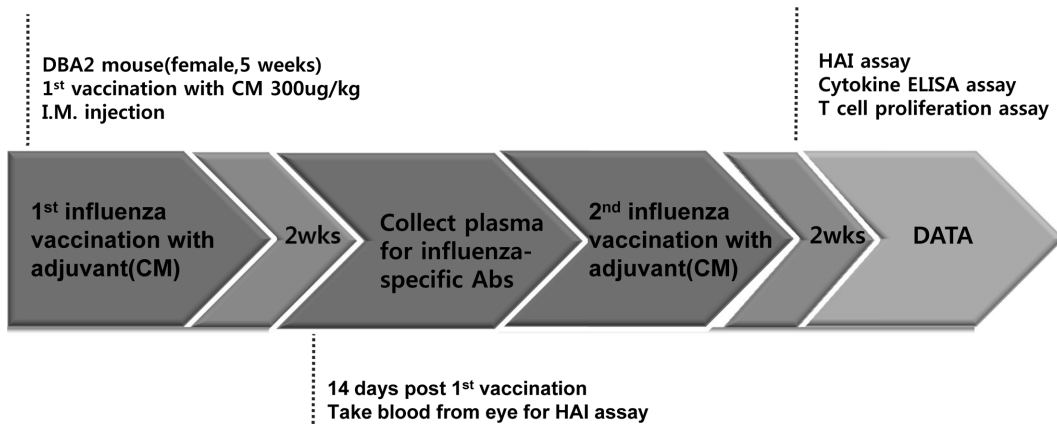


Fig. 2 – *In vivo* experimental design for influenza-specific immune responses of *Cordyceps militaris* (CM). Mice were intramuscularly injected with influenza vaccine in presence or absence of CM (300 µg/kg) as adjuvant. After 14 days, blood was taken from eye for HAI assay. Subsequently, boost vaccination with or without CM were injected. After another 14 days, blood was taken from eye as well as heart. PBMCs were isolated for influenza-specific T cell proliferation assay. Plasma was assessed for HAI assay and IFN-γ ELISA assay.

mL) 가하여 24시간 또는 48시간 동안 배양시킨 후, 0.25% trypsin-EDTA를 이용하여 세포를 얻었다. 항원제시능을 나타내는 CD86, CD284, CD40, H-2k 그리고 I-Ad에 대한 각 형광항체를 이용하여 30분간 염색 후, 유세포 분석기를 통하여 분석하였다.⁷⁾ Fig. 1에서 제시된 바와 같이 동충하초 추출물의 농도 100 그리고 300 µg/mL에서 유의적으로 증가된 CD86, CD284, CD40, H-2k(MHC I) 그리고 I-Ad(MHC II)의 발현율을 보였다. 최근, Shin *et al.* 그룹은 동충하초 물추출물이 수지상세포에서 MHC I 또는 II 경로에 의한 ovalbumin항원 제시의 증가효과가 있음을 보고하였다.⁸⁾ 즉, 밀리타리스 동충하초 추출물이 항원제시세포의 항원제시능을 향상시켜 적응면역에 기여할 수 있는 가능성을 제시한다.

다음으로 동충하초 추출물의 인플루엔자 백신에 대한 면역증강 효능을 살펴보기 위해 DBA/2 마우스 종을 이용한 *in vivo* 백신접종 모델을 설계하였다(Fig. 2). 병원성 인플루엔자 바이러스(2009 pandemic influenza A virus H1N1)에 대한 백신으로 H1N1 Alcaifornia 17109를 고려대학교 의과대학 미생물학 교실에서 확보하였다. 주요항원인 헤마글루티닌(HA; hemagglutinin)의 함량이 246.3 µg/mL이며, 마우스 한 마리당 백신용량은 15 µg으로 결정하였다.⁹⁾ 본 연구팀의 이전 연구에서 선천면역증강을 통한 항인플루엔자 효능을 보인 동충하초 추출물의 투여용량을 고려하여 본 연구에서는 마우스 한 마리당 동충하초 추출물 30 µg을 면역보조제 용량으로 사용하였다.⁸⁾ Fig. 2에서 제시된 백신접종 스케줄에 따라 단회 백신(1차), 단회 백신(1차)+동충하초 추출물, 부스터 백신(1, 2차), 부스터 백신(1, 2차)+동충하초 추출물 그리고 Mock 투여군, 총 5그룹으로 분류하여 백신과 동충하초 추출물을 함께 근육주사하였다. 1차백신 접종 2주후, 각 군의 동물 안와에서 혈액을 추출하여 인플루엔자 항체가 측정을 위해 혈청을 보관하였다. 2차 백신 접종 12일째에 반복하여 안와

혈액을 추출하였고, 15일째 심장혈액을 추출하여 말초 T림프구를 분리하였다. 각군에서 분리된 T림프구는 CCK-8 assay (Dojindo, Japan)를 이용하여 증식 정도를 측정하였다. 비특이적 항원으로 PHA(phytohemagglutinin) 1 µg, 인플루엔자 특이 항원으로 HA 200 µg을 가하여 72시간 동안 배양시킨 다음, 450 nm의 흡광도에서 T림프구의 증식 변화를 측정하였다. 동충하초 추출물의 단회 백신(1차)에 대한 T림프구 증식 효과는 PHA에 대한 반응으로 비특이적인 증식이 관찰되었으며, HA항원에 대한 인플루엔자 특이 T림프구 증식 효과는 단회 백신에 의한 효과가 부스터 백신(2차) 보다 높았으나 통계적으로 유의하지 않았다(Fig 3). 이러한 결과는 동충하초 추출물이 면역이 억제된 마우스의 T세포 증식에 효과를 보인 Kang *et al.* 그룹의 보고와 상반되나 본 연구의 경우, 인플루엔자 백신에 의해 이미 활성화된 T세포

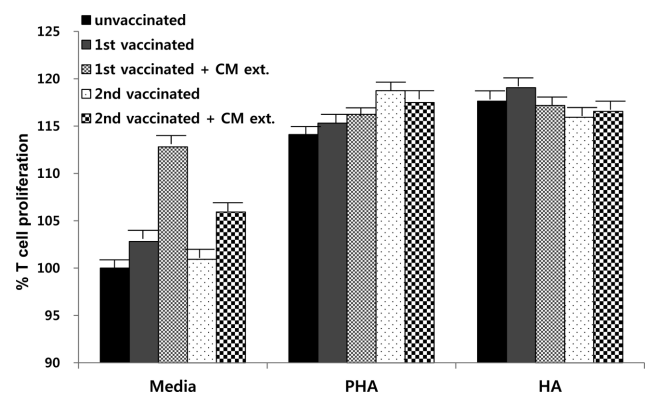


Fig. 3 – Effect of *Cordyceps militaris* on T cell proliferation from vaccinated mice injected with or without CM as adjuvant. PBMCs were isolated from blood taken 2 or 4 weeks after vaccination with or without CM. PBMCs (3×10^5 /well) were plated and treated with phytohemagglutinin (PHA) or hemagglutination (HA) for 72 h. T cell proliferation was measured by CCK-8 assay.

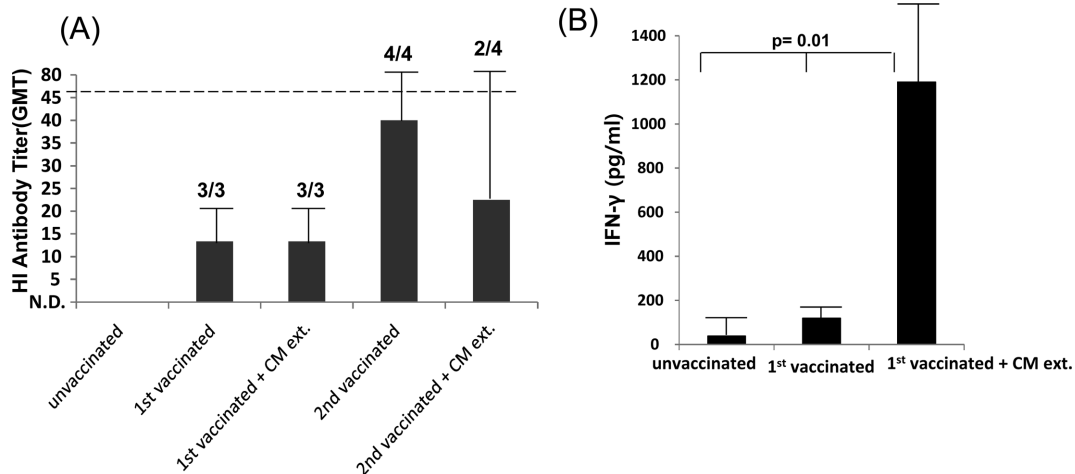


Fig. 4 – Effect of *Cordyceps militaris* on influenza-specific antibody production (A) and IFN- γ production (B) from vaccinated mice injected with or without CM as adjuvant. Plasma was isolated from blood taken 2 or 4 weeks after vaccination with or without CM. The presence of antibody against influenza A/California/7/09 (H1N1) was measured using HAI assay (A), and the production of IFN- γ (B) was measured using ELISA.

의 추가적인 증식에 대한 추출물의 효과이므로 통계적으로 유의하지 않은 것으로 추측된다.⁶⁾

다음으로 1, 2차 백신접종 후 수집된 안와 혈액을 이용하여 인플루엔자 특이 항체를 측정하였다. 인플루엔자 바이러스의 외막에 존재하는 당단백질인 헤마글루티닌(hemagglutinin, HA)은 적혈구 세포막의 시알산(sialic acid)을 포함하는 수용체(receptor)와 특이적으로 결합하는데 이를 혈구응집(hemagglutination)이라 한다. 그러나, 인플루엔자 바이러스 특이 항체가 HA 항원 부위에 결합하면 적혈구와의 반응이 억제되며 이를 혈구응집억제(hemagglutination inhibition, HAI)라 하고 인플루엔자 백신접종으로 나타나는 혈중 바이러스 항체의 존재여부 및 정량 측정에 이용한다. 본 연구에서는 혈구응집억제시험(HAI assay)을 사용하여 1, 2차 백신 및 면역보조제 투여 후 나타나는 혈중 인플루엔자 바이러스 항체가(influenza specific antibody titer)를 측정하였다.¹⁰⁾ Fig. 4A에서 제시된 바와 같이 인플루엔자 특이 항체는 단회 백신(1차)군보다 부스터 백신(1, 2차)군에서 높게 측정되었으나, 동충하초 추출물의 인플루엔자 특이 항체에 대한 영향은 없는 것으로 보였다. 또한 혈청 내 바이러스 특이 T림프구의 대표적인 분비 사이토카인인 IFN- γ 를 ELISA로 측정할 결과, 동충하초 추출물을 면역보조제로 투여받은 백신접종군에서 훨씬 많은 양의 IFN- γ 를 분비함을 알 수 있었다(Fig. 4B). 이러한 결과는 동충하초 추출물의 인플루엔자 적응면역에 대한 효과가 인플루엔자 특이항체가 증가에 의한 체액성 면역증강이 아닌 T림프구의 IFN- γ 분비 증가에 따른 세포성 면역증강임을 시사하고 있다.

본 연구는 밀리타리스 동충하초의 적응면역에 대한 효과를 알아보고자 하였다. 우선 RAW264.7을 이용하여 밀리타리스 동충

하초의 항원제시능에 대한 효능을 살펴보았으며, 동충하초 추출물 100 그리고 300 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 항원제시와 관련된 CD86, CD284, CD40, H-2k 그리고 I-Ad의 발현이 증가함을 확인하였다. 또한 인플루엔자 백신을 이용하여 동충하초 추출물의 면역보조제로의 효능을 살펴보고자 DBA/2 마우스 종을 1, 2차 백신 후 인플루엔자 특이 T림프구 증식, 인플루엔자 특이 항체가, 인플루엔자 특이 IFN- γ 등을 측정하였다. 동충하초 추출물이 인플루엔자 특이 T림프구의 증식 또는 항체를 증가시키지는 않았지만, 항바이러스 싸이토카인인 IFN- γ 의 분비를 유도시킴으로써 세포성 면역증강을 통해 적응면역 활성화에 기여하고 있는 것으로 추측할 수 있다.

감사의 말씀

병원성 인플루엔자 바이러스(2009 pandemic influenza A virus H1N1)에 대한 백신인 H1N1 Alcaifornia 17109를 제공해 주신 고려대학교 의과대학 미생물학 교실 박만성 교수 연구팀께 감사의 말씀을 전한다.

본 연구는 덕성여자대학교 2014년도 교내연구비(3000002122) 지원에 의해 수행되었음.

References

- 1) Tuli, H. S., Sharma, A. K., Sandhu, S. S. and Kashyap, D. : Cordycepin: a bioactive metabolite with therapeutic potential. *Life Sci.* **93**, 863 (2013).
- 2) Yue, K., Ye, M., Zhou, Z., Sun, W. and Lin, X. : The genus *Cordyceps*: a chemical and pharmacological review. *J. Pharm.*

- Pharmacol.* **65**, 474 (2013).
- 3) Zhou, X., Gong, Z., Su, Y., Lin, J. and Tang, K. : Cordyceps fungi : natural products, pharmacological functions and developmental products. *J. Pharm. Pharmacol.* **61**, 279 (2009).
 - 4) Shin, S., Kwon, J., Lee, S., Kong, H., Lee, S., Lee, C. K., Cho, K., Ha, N. J. and Kim, K. : Immunostimulatory effects of *Cordyceps militaris* on macrophages through the enhanced production of cytokines via the activation of NF-kappa. *Immune Netw.* **10**, 55 (2010).
 - 5) Chen, J. R., Yen, J. H., Lin, C. C., Tsai, W. J., Liu, W. J., Tsai, J. J., Lin, S. F. and Liu, H. W. : The effects of Chinese herbs on improving survival and inhibiting anti-ds DNA antibody production in lupus mice. *Am. J. Chin. Med.* **21**, 257 (1993).
 - 6) Kang, I. S., Kim, H., Lee, T. H., Kwon, Y. S., Son, M. and Kim, C. : Effect of *Cordyceps militaris* on immune activity. *Yakhak Hoeji* **58**, 81 (2014).
 - 7) Lee, H. H., Park, H., Sung, G. H., Lee, K., Lee, T. and Cho, H. : Anti-influenza effect of *Cordyceps militaris* through immunomodulation in a DBA/2 mouse model. *J. Microbiol.* **52**, 696 (2014).
 - 8) Shin, S., Park, Y., Kim, S., Oh, H. E., Ko, Y. W., Han, S., Lee, S., Lee, C. K., Cho, K. and Kim, K. : *Cordyceps militaris* enhances MHC-restricted antigen presentation via the induced expression of MHC molecules and production of cytokines. *Immune Netw.* **10**, 135 (2010).
 - 9) Manicassamy, B., Medina, R. A., Hai, R., Tsibane, T., Stertz, S., Nistal-Villán, E., Palese, P., Basler, C. F. and García-Sastre, A. : Protection of mice against lethal challenge with 2009 H1N1 influenza A virus by 1918-like and classical swine H1N1 based vaccines, *PLoS Pathog.* **6**, e1000745. doi: 10.1371 (2010).
 - 10) Lee, S., Kim, J. I., Heo, J., Lee, I., Park, S., Hwang, M. W., Bae, J. Y., Park, M. S., Park, H. J. and Park, M. S. : The anti-influenza virus effect of *Phellinus igniarius* extract. *J. Microbiol.* **51**, 676 (2013).