

## 제주긴뿌리동충하초와 풍뎅이동충하초 배양액의 Nitric Oxide 생성 저해

이기만 · 이금선 · 심홍 · 남성희<sup>1</sup> · 강태진\*

삼육대학교 약학대학 및 만성병연구소, <sup>1</sup>농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부

### Inhibitory Effect of the Culture Broth of *Cordyceps longissima* and *C. scarabaeicola* on Nitric Oxide Production

Ki Man Lee, Geum Seon Lee, Hong Shim, Sung Hee Nam<sup>1</sup> and Tae Jin Kang\*

College of Pharmacy and Institute of Chronic Disease, Sahmyook University, Seoul 139-742, Korea

<sup>1</sup>Department of Agricultural Biology, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea

(Received February 7, 2012. 1st Revised March 13, 2012. 2nd Revised March 19, 2012. Accepted March 22, 2012)

**ABSTRACT:** During search for novel bioactive materials from natural resources with the potential as health food and alternative medicine, the culture broth of *Cordyceps longissima* (CL) J106, J144 and *C. scarabaeicola* (CS) J94, J123 were prepared, and their effect on cytotoxicity and nitric oxide (NO) production in RAW 264.7 cells were investigated. Whereas the culture broth of CL J144 and CS J123 had cytotoxicity in RAW 264.7 cells, that of CL J106 and CS J94 did not. The culture broth of CL J106 and CS J94 suppressed NO production in RAW 264.7 cells activated with lipopolysaccharide (LPS) at a dose-dependent manner. These results suggest that culture broth, a by-product of *Cordyceps*, may have active compounds with anti-inflammatory effect. In addition, it appears that their biological activity is dependent on the strains in spite of the same species.

**KEYWORDS :** *Cordyceps longissima*, *Cordyceps scarabaeicola*, Cytotoxicity, Nitric oxide

염증(inflammation)은 대표적인 면역반응으로 생체 내로 침입한 병원체(pathogen)에 대한 방어 기전으로 나타나는 국소적인 손상에 대한 혈관의 살아있는 조직반응이다(Kumar *et al.*, 2007). 염증은 발적(redness), 종창(swelling), 발열(heat), 통증(pain) 및 기능의 상실(loss of function) 등 5가지 징후를 동반하는데 이러한 초기 급성염증에 관여하는 세포 중 가장 대표적인 것이 대식세포(macrophage)이다. 항원을 제시하는 대식세포는 병원체를 직접 제거하기도 하지만 cytokine을 분비하여 각종 신호전달에 관여하기도 한다. 대표적인 cytokine에는 IL-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ ), TNF- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ )가 있으며, 또한 NO(nitric oxide) 등이 있어서 이들을 매개로 하여 염증이 발생한다(Kumar *et al.*, 2007; Abbas *et al.*, 2011).

동충하초는 포자가 기주인 곤충에 부착 후 내부에서 증식하여 자실체를 생성하는 곤충병원성진균(entomopathogenic fungi)으로 약 800여 종이 알려져 있다(Samson *et al.*, 1988; Sung *et al.*, 1997). 예로부터 중국을 포함한 아시아에서 한약재로 사용하였는데 면역 증강 효과, 항암 효과, 혈당 강하 효과, 항산화 효과 등이 보고되고 있다(Kuo *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2009). 본 연구에서는

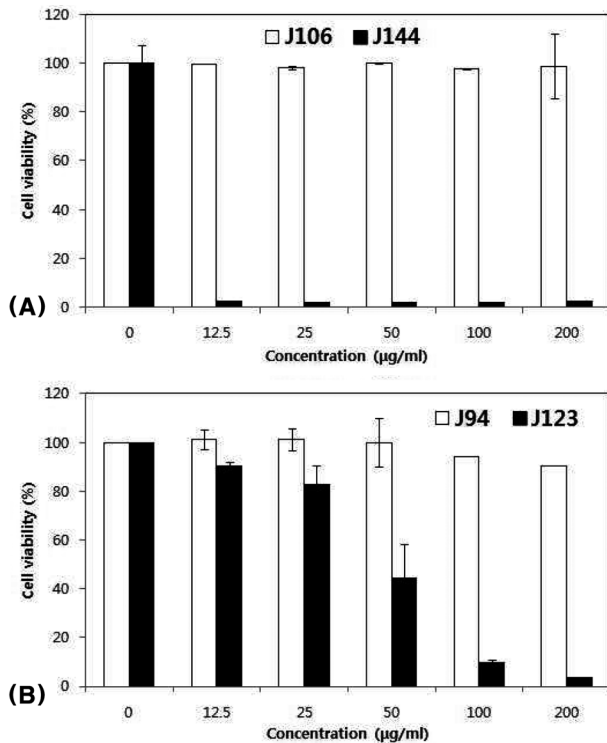
다양한 동충하초 중 제주긴뿌리동충하초(*Cordyceps longissima*, CL)와 풍뎅이동충하초(*C. scarabaeicola*, CS)의 부산물인 배양액을 이용하여 염증 반응에 관여하는 대식세포의 Nitric Oxide (NO) 생성량을 조사하여 동충하초 배양액의 염증 억제 가능성을 알아보았다.

CL과 CS는 농촌진흥청 잠사양봉소재와 보존주로 각각 제주도 한라산 일대와 충청북도 속리산 일대에서 채집 후 균 분리하고 PDA(potato dextrose agar, Difco) 배지에 계대하여 4°C 항온기에 보관하였다(Table 1). 각각의 종은 2균주씩 사용하였으며 PDB(potato dextrose broth, Difco) 배지 상에 접종하여 14일간 진탕배양(25°C, 150 rpm)하고 동결건조 후 증류수에 현탁하여 실험에 사용하였다. 본 연구에서는 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포를 사용하였으며, 10% FBS (fetal bovine serum, Hyclone)와 1% P/S(penicillin-streptomycin, Sigma)가 들어있는 DMEM (dulbecco's modified eagle's medium, Hyclone) 배지를 이용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 배양기에서 배양하였다. 세포 독성은 96 well plate에 RAW 264.7 세포를 5 × 10<sup>4</sup> cells/well가 되도록 200  $\mu$ l씩 seeding하여 배양한 후 희석된 CL과 CS의 배양액이 농도별로 들어있는 새로운 배지로 교체하였다. 24시간 후 상등액을 제거한 뒤 MTT solution 100  $\mu$ l을 각각 첨가하였다. 배양기에서 4시간 반응시키고

\*Corresponding author <E-mail : kangtj@syu.ac.kr>

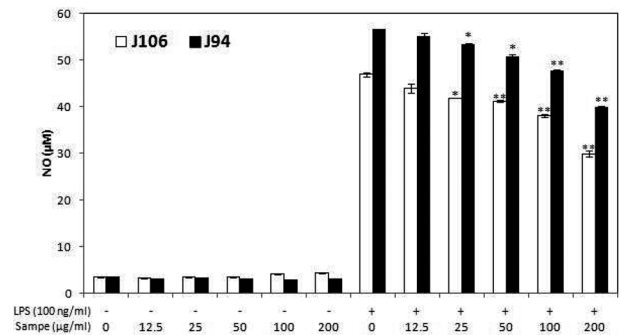
**Table 1.** List of used strains for experiment

| Scientific name                | Korean name | Strain     | Origin            |
|--------------------------------|-------------|------------|-------------------|
| <i>Cordyceps longissima</i>    | 제주긴뿌리동충하초   | J106, J144 | Jeju-do           |
| <i>Cordyceps scarabaeicola</i> | 풍뎅이동충하초     | J94, J123  | Chungcheongbuk-do |

**Fig. 1.** Cytotoxic effect of the culture broth of *Cordyceps longissima* and *C. scarabaeicola* on RAW 264.7 cells. The cells were treated with culture broth of (A) *C. longissima* and (B) *C. scarabaeicola* for 24 h at a dose dependent manner and cell viability was measured by MTT assay.

다시 상등액을 제거한 후 DMSO 100 µl를 넣어 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO 생성량 측정을 위하여 24 well plate에  $5 \times 10^5$  cells/well이 되도록 세포를 넣고 부착시킨 후 lipopolysaccharide(LPS)를 1시간 동안 전처리하여 세포를 활성화시켰다. 동결 건조된 CL과 CS의 배양액을 농도별로 처리한 후 24시간 배양하였다. 배양된 배지 상등액 50 µl에 Griess reagent (1% sulfanilamide 50 µl + 0.1% N-(1-naphtyl) ethylenediamine dihydrochloride 50 µl)를 첨가 후 5분간 반응시켜 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO 생성량은  $\text{NaNO}_2$ 를 사용한 표준곡선으로 나타내었다.

4균주의 CL과 CS 배양액의 세포독성을 측정한 결과 CL J106과 CS J94는 사용된 모든 농도에서 RAW 264.7 세포가 control 대비 90% 이상 생존하였다. 하지만 CL J144와 CS J123은 사용된 동충하초 배양액이 세포 독성을 일으켜 200 µg/ml에서는 4% 이하의 세포 생존율을 나타냈다(Fig. 1). LPS로 활성화된 RAW 264.7 세포의 NO

**Fig. 2.** The effect of the culture broth of *Cordyceps longissima* and *C. scarabaeicola* on NO production in RAW 264.7 cells. The cells were treated with culture broth for 24 h at a dose dependent manner in the absence (-) or presence (+) of LPS pre-treatment for 1 h. \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  versus LPS alone based on Student's t-test.

생성에 대한 CL J106과 CS J94의 효과를 측정한 결과, 두 균주의 동결 건조된 배양액 모두 농도 의존적으로 NO 생성을 억제하였다(Fig. 2). RAW 264.7 세포에 LPS를 처리하지 않고 동결 건조된 두 종 CL과 CS의 배양액을 첨가한 경우에는 NO 생성에는 변화가 없어 동충하초 배양액 자체가 NO 생성에는 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다. 세포독성을 보인 CL J144와 CS J123 역시 NO 생성을 억제하였는데 이는 세포독성에 기인한 것으로 판단된다(data not shown).

동충하초의 자실체를 이용한 면역반응관련 연구는 보고되고 있으나(Zhu *et al.*, 1998) 동충하초 부산물인 배양액을 이용한 연구보고는 미비하며 본 실험결과를 통해 자실체뿐만 아니라 배양액에도 항염증과 관련된 동충하초의 우수한 성분이 들어 있음을 확인하였다. 하지만 같은 종이라 할지라도 균주에 따라 세포독성이 다르게 나타난 것으로 보아 독성을 나타내게 한 물질의 성분 분석 등 이에 대한 구체적인 연구가 추후 필요할 것으로 판단된다.

## 적 요

제주긴뿌리동충하초(*Cordyceps longissima*, CL)와 풍뎅이동충하초(*C. scarabaeicola*, CS)의 배양액을 이용하여 RAW 264.7 세포 내 세포 독성 및 NO 생성량을 확인하였다. 세포에 CL J106과 CS J94 배양액을 처리한 경우 세포 독성이 나타나지 않았으나 CL J144와 CS J123 배양액은 세포생존율을 4% 이하로 감소시켜 같은 종일지라

도 군주에 따라 세포 독성이 있음을 확인하였다. 따라서 NO 생성 억제 실험에는 CL J106과 CS J94를 이용하였으며 두 종 모두 LPS(lipopolysaccharide)가 처리된 RAW 264.7 세포의 NO 생성을 농도 의존적으로 억제하였다. 본 실험결과 동충하초 부산물인 배양액에도 항염증효과에 관여하는 성분이 존재할 것으로 판단되었고 동일한 종일 지라도 생리활성측면에서 매우 다른 특성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

## 감사의 글

이 논문은 서울장학재단 하이서울장학금 지원을 받아 연구되었음.

## 참고문헌

Abbas, A., Lichtman, A. H. and Pillai, S. 2011. Cellular and molecular immunology. 7th ed. Elsevier Inc. Philadelphia. USA.

- Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N. and Michell, R. N. 2007. Robbins basic pathology. 8th ed. Elsevier Inc. England.
- Kuo, Y. C., Lin, C. Y., Tsai, W. J., Wu, C. L., Chen, C. F. and Shiao, M. S. 1994. Growth inhibitors against tumor cells in *Cordyceps sinensis* other than codycepin and polysacgharides. *Cancer Invest.* 12:611-615.
- Lee, K. M., Nam, S. H., Song, H. S., Yeo, J. H., Lee, K. G. and Bae, Y. H. 2009. Total phenol contents and DPPH radical scavenging activity of entomopathogenic fungi. *Kor. J. Appl. Entomol.* 48:377-383.
- Samson, R. A., Evans, H.C. and Latge, J. P. 1988. Atlas of entomopathogenic fungi. Springer. Heidelberg.
- Sung, J. M., Lee, H. K., Choi, Y. S., Kim, Y. O., Kim, S. H. and Sung, G. H. 1997. Distribution and taxonomy of entomopathogenic fungi species from Korea. *Kor. J. Mycol.* 25:231-252.
- Zhu, J. S., Halpern, G. M. and Jones, K. 1998. The scientific rediscovery of an ancient Chinese herbal medicine : *Cordyceps sinensis*. Part I. *J. Altern. Complement. Med.* 4:289-303.