보안과제( ), 일반과제(O) 과제번호 107092-3

발아대두 동충하초의 유효성평가 및 제품개발

Efficacy evaluation of *Cordyceps militaris grown in the germinated* soybean and its application to develop novel neutraceuticals

주관연구기관
(주)세포활성연구소

농 림 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “발아대두 동충하초의 유효성평가 및 제품개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2010년 5월 29일

주관연구기관명 : (주)세포활성연구소
주관연구책임자 : 박 동 기
연 구 원 : 박 소 현, 한 지 영
협동연구기관명 : 건국대학교
협동연구책임자 : 이 충 환
협 동 연 구 원 : 윤 도 영, 김 지 영, 김 정 희
강 정 우, 최 희 숙, 조 민 철
김 기 홍
협동연구기관명 : 서울대학교
협동연구책임자 : 한 승 현
협 동 연 구 원 : 조 민 경, 임 진 택

요 약 문

Ⅰ. 제 목

발아대두 동충하초의 유효성평가 및 제품개발

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발 목적

발아대두에 동충하초 종균을 접종시켜 새로운 소재의 발아대두 동충하초를 개발하였다. 이 신소재로부터 유효성분을 탐색하고, 이 유효성분들에 대한 효능을 평가함으로써 제품화로 연계시키는 것을 그 목적으로 한다.

2. 연구의 필요성

동충하초는 중국, 일본 등지에서 일찍이 불로장생의 비약으로 알려져 있고, 이를 이용하여 아편해독제, 병후 보양 및 강장제, 폐병 치료제, 면역증가제 등으로 가치를 인정받고 있다. 국외에서는 일찍부터 미래의 식량자원으로서 균류에 대한 관심이 집중되면서 특히 동충하초균과 같은 고등균류에 대한 연구는 기초적인 연구뿐만 아니라 이를 이용하여 식품, 의약품 및 천연농약제제로서 상품화 연구가 진행 중이다. 국내에서는 번데기 동충하초(Cordyceps militaris)와 눈꽃동충하초(누에동충하초, Paecilomyces tenupis)를 번데기나 누에에서 인공배양에 성공하여 실용화되고 있으며, 최근 암, 뇌졸중, 심장병과 같은 성인병에 대한 예방 및 개선효과가 발견되어 무한한 잠재력을 가진 소재로 각광받고 있다. 동충하초에서 유래된 코디세핀(Cordycepin), 다당체 등의 각종 생리활성 성분이 B cell 활성증가, 마크로파지 탐식능 활성화 등에 관여하여 항암표화를 나타냄이 보고되고 있다.

한편, 대두는 양질의 식물성 단백질을 많이 함유하고 있으며, 필수아미노산과 비타민 등이 풍부하며, 레시틴, 이소플라본 등 각종 생리활성효능을 가진 성분들이 밝혀지면서 혈행개선, 갱년기 여성치료, 고지혈증 치료 등에 널리 사용되고 있다. 현미, 대두 등 각종 발아시킨 곡류에서 GABA, 아라비녹실란 등과 같은 각종 생리활성성분이 함유되어 있음이 밝혀지며 새로운 소재로 부각되고 있다.

본 연구자들은 이와 같은 효능을 지닌 발아대두에 동충하초균을 접종 배양시켜 새로운 소재인 발아대두 동충하초에 대한 체계적은 연구의 필요성이 요구된다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

- 균사체의 최적 배양 조건을 확립
- 발아대두 동충하초의 활성성분 분리와 구조분석 및 효능 검증
- 동충하초 추출물을 이용하여 호흡기 점막 기능 및 면역강화 평가를 위한 모델 구축
- 균사체 생산조건의 표준화
- 발아조건별 활성성분 최적 함량비 결정
- 면역활성인자 탐색 및 암세포 살해 효능 검사
- 대사성 조절인자 탐색 및 기증 분석
- 발아대두 동충하초에서 분리정제된 유용물질을 이용한 호흡기 점막 기능 및 면역강화 평가와 작용기전 연구
- 원료 생산조건 확립 및 대량 생산
- 제품화
- 동충하초 유래 생리활성물질의 대량분리 생산공정 표준화
- 면역효능 검사
- 대사성 조절인자와 탐색 및 in vitro 효능 분석
- 발아대두 동충하초의 효능 물질의 면역조절 효능 극대화 및 활용 최적화 연구

Ⅳ. 연구개발결과

1. 발아대두 동충하초 균사체 Master/Working cell bank 구축

계대수가 각각 2, 4, 6, 8, 10 generation의 균주를 PDA 배지에서 15일간 배양하며 균사체 성장 속도를 직경을 추측하여 비교한 결과 적어도 10계대까지의 cell bank의 안정성을 확인하였음.

2. 배양 공정을 표준화시켰다.

원료(발아대두), 종균(동충하초) 등을 균일하게 표준화시키고 이를 배양하여 유효성분은 HT-29 cell line에서 세포독성, 생리활성 등을 측정함과 동시에 무게, 품질지표 등을 검토하고 배양공정을 표준화시켰다.

3. 원료생산 공정을 표준화

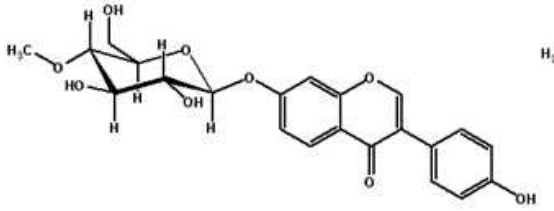
유효성분이 파괴되지 않는 온도, 시간을 확립하고 자동화 프로그램을 이용하여 원료 생산 공정을 표준화시켰다.

4. 배양 조건별 생리활성 성분 최적 함량 비율 결정

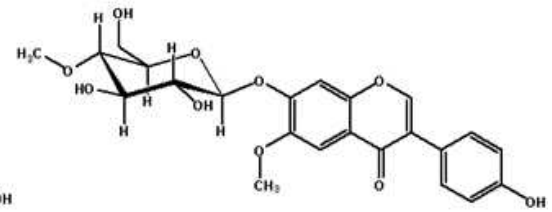
LC/MS/MS 성분 분석을 이용하여 4가지 생리활성 물질로 추정되는 화합물의 배양 시간별 함량을 측정한 경로가 발아대두 동충하초의 1~2주 배양 샘플이 가장 높은 함량을 나타냈으며 이는 배양 시간이 증가할수록 줄어드는 것을 확인하였음.

5. 발아대두 동충하초로부터 4종의 신규물질을 밝혀냈다.

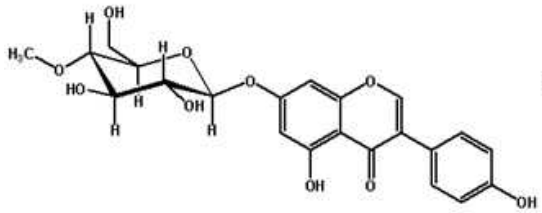
발아대두 동충하초로부터 다음과 같은 신규물질을 밝혀 CDGM, CGLM, CGNMⅠ, CGNMⅡ로 명명하였다.



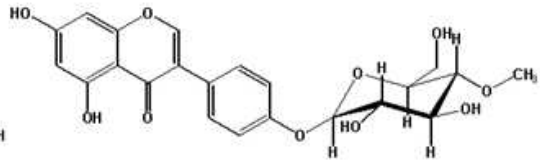
CDGM



CGLM



CGNM Ⅰ



CGNM Ⅱ

6. 발아대두 동충하초 추출물의 항염증 효과

세균성 내독소인 lipopolysaccahride(LPS)에 의해 유도된 MMP-9의 활성이 처리한 동충하초 추출물에 의해 농도 의존적으로 저해됨을 확인하였으며 세포독성 여부를 MTS assay로 확인한 결과 세포독성은 없는 것을 확인함.

7. 발아대두 동충하초로부터 분리된 신규물질 CDGM, CGLM, CGNMⅠ, CGNMⅡ의 항염증 효과

4물질에서 세포독성은 나타나지 않았다. RAW 264.7 세포에 CDGM, CGLM, CGNMⅠ, CGNMⅡ를 5~10㎍/㎖ 농도로 2시간 전 처리한 후, LPS(100ng/㎖)를 사용하여 TNF-alpha의 생성을 유도한 후 확인한 결과, TNF-alpha 생성 억제는 CGLM에서 다른 물질에 비해 높은 억제효과를 나타내었다. 이는 CGLM, CGNMⅠ, CGNMⅡ가 LPS에 의해 유도되는 염증성 싸이토카인 억제에 영향을 준다는 것을 의미하며, 다른 염증성 싸이토카인의 저해 효과도 기대됨.

8. 신규물질의 비만세포에서 항알러지 효과

RBL 2H3 세포에 PI(PMA + Ionomycin)로 유도되는 COX-2 단백질 발현저해 작용을 Western blotting 방법을 통하여 확인한 결과 COX-2의 생성 억제는 CGLM에서 다른 물질에 비해 높은 억제 효과를 나타냄을 확인하였으며 처리한 농도에서 세포 독성을 나타내지는 않음. 또한 Th2 type 싸이토카인 IL-13의 promoter가 transfection된 stable cell line(RBL-2H3)에 CDGM, CGLM, CGNMⅠ, CGNMⅡ(30uM)을 1시간 전 처리한 후 PI(PMA 50 ng/ml + Ionomycin 500 nM)를 처리하고 16시간 배양한 후, Luciferase assay를 이용하여 IL-13

promoter 활성을 확인하여 본 결과, IL-13의 promoter 활성이 CGML에 의해 다소 감소됨을 확인함.

한편, 사람의 호흡기 상피세포(NCI-H292)에 EGF로 유도되는 IL-8의 발현이 CDGM과 CGLM으로 인해 감소됨을 ELISA를 통해 확인함

9. 발아대두 동충하초의 호흡기 점막 면역 강화 기능성 평가

- 발아대두 동충하초 추출물을 이용하여 호흡기 점막 기능 및 면역강화 평가를 위한 모델을 구축.
- 케모카인과 싸이토카인 발현 평가를 이용한 호흡기 점막 면역강화 평가를 확립.

10. 발아대두 동충하초 추출물질에 특이적으로 조절되는 표적인자 발굴

발아대두 동충하초 추출물인 CGGS에 의해 활성이 조절되는 인체 호흡기 점막상피세포내 신호전달 표적인자들로서 MAP kinase들 중 ERK와 JNK, 전사인자들 중 AP-1과 NF-IL6를 발굴할 수 있었음.

11. 발아대두 동충하초에서 분리/정제된 유용물질을 이용한 호흡기 점막기능 및 면역강화 평가와 작용기전 연구

발아대두 동충하초 추출물인 CGGS의 단일물질들에 의해 여러 가지 면역조절인자들 중 항균펩타이드인 HBD-4, 계면활성단백질인 SP-A, 케모카인인 MCP-1, 점액형성물질인 Muc 5A 및 세포부착인자인 ICAM-1의 발현이 특이적으로 증가됨을 확인하였으며, 상기 면역조절인자들 중 가장 발현이 높았던 CDGM에 의한 SP-A의 발현과 관련된 세포내 신호전달기전을 규명하였음.

12. 세포활성을 유도하는 세포수용체 및 생체막 구조 연구

발아대두 동충하초 추출물인 CGGS에 의한 호흡기 점막상피세포에서의 IL-8 발현 및 관련된 세포내 신호전달기전연구의 결과들은 세계적 학술지인 Molecular immunology (2010, Vol. 127: 55-61)(12)에 게제됨으로서 그 학문적 성과를 인정받았음.

13. 발아대두 동충하초 추출물의 세포내 신호전달 체계와 전사조절인자들의 활성화 연구

발아대두 동충하초 추출물인 CGGS의 단인물질인 CDGM에 의한 SP-A의 발현을 mRNA와 단백질수준에서 관찰함과 함께 SP-A 발현에는 세포내 주요 신호전달물질로서 ERK, JNK, 및 p38 MAP kinase 및 NF-κB 전사인자가 관여함을 확인할 수 있었음.

14. 발아대두 동충하초로부터 분리된 신규물질의 면역내성(Tolerance)유발 평가와 면역학적 안정성 연구

신규물질 CDGM의 저용량-저용량, 저용량-고용량 및 고용량-저용량의 반복처리시 SP-A의 발현을 저해하지 않는 등의 면역내성을 관찰할 수 없었으나, 고용량-고용량의 반복처리시 SP-A 발현이 감소되는 면역내성을 관찰할 수 있었음

15. 작용기전을 기반으로 효능조절 작용점 예측과 효능 극대화 조건 탐색/제시

신규물질 CDGM의 효능을 극대화하기 위한 조건으로 저용량 반복처리가 가장 효과적임을 나타내고 있음.

Ⅴ. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 연구성과

1) 논문

① Metabolomics revealed novel isoflavones and optimal cultivation time of Cordyceps militaris fermentation, *J Agric Food Chem.* 2010 Apr 14;58(7):4258-67.

② Detection of Espressed IL-32 in Human Stomach Cancer Using ELISA and Immunostaining. *J. Microbiol. Biotechnol.* (2008), 18(9), 1606-1612.

③ Peptidoglycan-mediated IL-8 expression in human alveolar type II epithelial cells requires lipid raft formation and MAPK activation. *Molecular Immunology* 45(6):1665-1673.

④ Induction of IL-8 expression by bacterial flagellin is mediated through lipid raft formation and intracellular TLR5 activation in A549 cells. *Molecular Immunology* 47(2~3):614-622.

⑤ *Armillariella mellea* induces maturation of human dendritic cells without induction of cytokine expression. *Journal of Ethnopharmacology* 119(1):153-159.

⑥ Induction of ICAM-1 by *Armillariell amellea* is mediated through generation of reactive oxygen species and JNK activation. *Journal of Ethnopharmaclolgy* 128(1):198-205.

⑦ Induction of IL-8 expression by *Cordyceps militaris* grown on germinated soybeans through lipid rafts formation and signaling pathways via ERK and JNK in A549 cells. *Journal of Ethnopharmacology* 127(1): 55 - 61

2)제품개발 실적

판테민

이뮤노페린

우리정

2. 성과물 활용계획

발아대두 동충하초에 대한 항염증, 항알러지, 면역조절기능 등의 효능이 밝혀짐으로 인해 다양한 제품개발에 활용할 수 있다. 일본에서는 이미 신종바이러스에 대한 항균제품으로 개발

되어 판매되고 있으며, 조류 인플루엔자 예방 및 치료에 활용을 검토 중에 있다. 또한 항아토피 임상결과를 통해서 아토피 제품 개발에 활용할 계획이다.

SUMMARY

I. Title

Efficacy assessment and product development of *C. militaris* grown on germinated soybeans.

II. The goal and the significance of the research

1. The goal of research

We developed *C. militaris* that was cultivated on germinated soybeans (GSC). In this research, we aimed for developing the product after identifying the active components from GSC, and evaluating the biological activites of these components.

2. The significance of the research

Cordyceps militaris, a traditional medicine, has been widely used to treat inflammation, anemia, asthma, and cancer in East Asia. Recent studies have shown that the extract of *C.militaris* has strong anti-inflammatory activity on the croton-oil induced ear edema in mice and was effective in asthma patient and in asthma mice. Many nutritional compounds from soybeans were reported to be effective in preventing various inflammatory diseases, and cancers. In this regard, we cultivated *C.militaris* on the germinated soybeans that might provide plentiful novel nutraceutical compounds that derive from the biologically effective components of the two materials.

It is required to systematically study the biological activities of *C. militaris* grown on germinated soybean (GSC).

III. The contents of the study

- The establishment of the culture condition of *C. militaris* mycellia
- The identification of components from GSC and the validation of their biological activities
- Investigating the immunomodulatory activity of GSC
- The standardization of the producing condition of GSC
- The determination of the optimal yield of the active components among various culture

conditions

- Screening the immunmodulating compounds from GSC and its anti-cancer activities
- Screening the active compondents for metabolism
- The investigation of the mechanism of immunomodulatory activity of GSC
- The establishment of optimal mass raw material producing condition
- Manufacture
- The standardization of mass production of the active components from GSC
- Screening the potential compounds from GSC that regulate metabolism
- The maximization of biological efficacies of GSC

Researching its applications for food and pharmaceutical industries

IV. Results

1. The estabilshment of GSC mycellia master/ working cell bank

C. militaris mycellia was cultured on the PDA media for 15 days. We speculated the growth rates of *C. militaris* mycellia by measuring the diameters.

2. The standardization of culture condition

The stardard raw materials (soybeans) and *C. militaris* mycellia was cutured and its active components were tested on cancer cell lines for establishing the standard culture condition.

3. The standardization of manufacturing condition

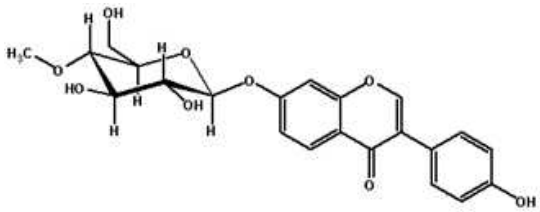
The automatic program was used for manufacturing raw materials without affecting the biological activity of the active compounds by setting constant temperature and incubation time.

4. The determination of optimal ratio of active compounds of GSC according to the cultivation periods.

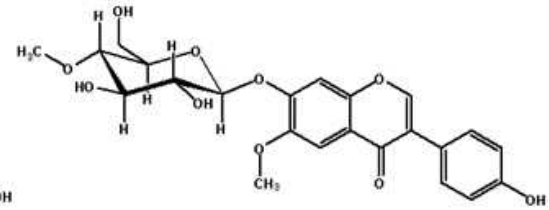
The contents of active compounds from GSC were most abundant between 1 and 2 weeks, but decreased as cultivation time becomes longer.

5. Identification of novel 4 isoflavonoids from GSC

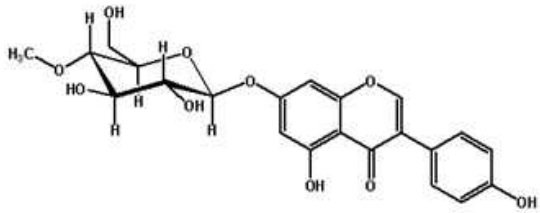
We found novel isoflavonoids from GSC.



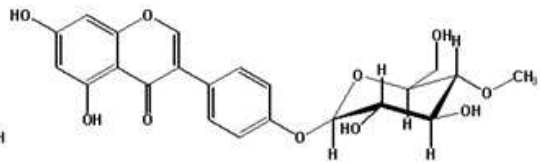
CDGM



CGLM



CGNM I



CGNM II

6. The anti-inflammatory activities of GSC

GSC inhibited LPS-induced MMP-9 activity in a dose-dependent manner without affecting cell viability.

7. The anti-inflammatory activities of novel isoflavonoids (CDGM, CGLM, CGNM I and CGNM II)

Novel isoflavonoids inhibited the release of TNF-a in LPS-stimulated RAW 264.7 cells without affecting its cell viability.

8. The anti-allergic activities of novel isoflavonoids (CDGM, CGLM, CGNM I and CGNM II)

The COX-2 protein expression level was determined using immunoblot analysis. CGLM inhibited COX-2 protein expression in PMA + ionomycin stimulated RBL 2H3 cells. Using luciferase assay, we found that the activation of IL-13 promoter was decreased by CGLM. The IL-8 expression was decreased by CDGM and CGLM in NCI-H292 cells.

9. The assessment of immunmodulatory activities of GSC on respiratory systems

The estabilshment of immunmodulatory activities of GSC through evaluating the expression of chemokines and cytokines

10. Screening target molecules of active compounds from GSC

GSC inhibited the activation of ERK, JNK, AP-1 and NF-IL6.

11. The investigation of the regulatory mechanism on immunmodulatory activities of GSC on respiratory systems.

GSC induced the expression of HBD-4, SP-A, MCP-1, Muc 5A and ICAM-1. We investigated the signalling pathway that affects the SP-A expression

12. The investigation of the receptor and lipid raft that affects the cellular activity.

We published Molecular immunology (2010, Vol. 127: 55-61)(12) that explains the effect of GSC on the expression of IL-8 through regulating cellular signalling pathways.

13. The effect of GSC on signalling pathway and the activation of transcription factors

CDGM affects SP-A expression through affecting the activation of ERK, JNK, p38 MAP kinase and NF-kB.

14. the immune tolerance of novel compounds from GSC

The repetitive administration of High-High concentration of CDGM decreased SP-A expression that may be due to immune tolerance.

15. The establishment of optimal condition for the biological activity.

The repetitive administration of los concentration of CDGM was effective.

V. Outcomes and Future plans

1. Outcomes

1) Publications

① Metabolomics revealed novel isoflavones and optimal cultivation time of Cordyceps militaris fermentation, *J Agric Food Chem.* 2010 Apr 14;58(7):4258-67.

② Detection of Espressed IL-32 in Human Stomach Cancer Using ELISA and Immunostaining. *J. Microbiol. Biotechnol.* (2008), 18(9), 1606-1612.

③ Peptidoglycan-mediated IL-8 expression in human alveolar type II epithelial cells requires lipid raft formation and MAPK activation. *Molecular Immunology* 45(6):1665-1673.

④ Induction of IL-8 expression by bacterial flagellin is mediated through lipid raft formation and intracellular TLR5 activation in A549 cells. *Molecular Immunology* 47(2~3):614-622.

⑤ *Armillariella mellea* induces maturation of human dendritic cells without induction of cytokine expression. *Journal of Ethnopharmacology* 119(1):153-159.

⑥ Induction of ICAM-1 by *Armillariell amellea* is mediated through generation of reactive oxygen species and JNK activation. *Journal of Ethnopharmacology.* 128(1):198-205.

⑦ Induction of IL-8 expression by *Cordyceps militaris* grown on germinated soybeans through lipid rafts formation and signaling pathways via ERK and JNK in A549 cells. *Journal of Ethnopharmacology* 127(1): 55 - 61

2) Developed products

Pandemine

Immunoperin

Urijung

2. future plan for the commercial application

We can utilize GSC on various products due to its anti-inflammatory, anti-allergic and immunmodulatory activites. The products containing GSC is on sale as an anti-microbial product in Japan. The anti-viral or/ and anti-allergic products are under consideration.

CONTENTS

Summary in Korean · 2

Summary in English · 8

chapter 1. The research outline · 19

1. The research goal · 19

2. The significance of the research · 19

3. The research scope · 22

Chapter 2. The current Research status · 23

Chapter 3. Contents /results · 25

I. The estabilshment of GSC mycellia master/ working cell bank · · · · · · · · 25

II. The standardization of culture condition · · · · · · · · · · · · · · · · · · · 26

III. The standardization of manufacturing condition · · · · · · · · · · · · · · · 27

1. The determination of the optimal ratio of the active compounds of GSC among the cultivation periods. · 27

2. The investigation of maximum anti-oxidant activity of GSC among the cultivation periods. · 29

IV The determination of optimal ratio of active compounds of GSC according to the cultivation periods. · 30

1. The standardization of raw materials: drying/extraction/SD and packaging 30

2. Establishing the optimal condition for producing GSC extracts · · · · · · 30

V. Quality control / safety assessment · 31

VI. The management of QC · 31

VII. The determination of the optimal yield of the active components of GSC among various culture conditions · 32

VIII. The assessment of anti-oxidant activity of GSC according to the cultivation periods. · 37

IX. The development of nutraceuticals · 38

1. The enzymatic process on GSC · 38
2. The determination of raw material stability · · · · · · · · · · · · · · 39
X. Product development · 42
1. The strategy for developing products · · · · · · · · · · · · · · · · · · 42
2. Product development · 42
XI. The identification of components from GSC and the validation of their biological activities · 43
XII. The structure determination of compounds from GSC · · · · · · · · · · 45
1. LC-MS/MS analysis · 45
2. The stucture determination · 46
3. The physicol-chemical properties · 46
XIII. The biological activities of GSC · 48
1. The anti-inflammatory activities of GSC · · · · · · · · · · · · · · · · · 48
2. The anti-cancer activities of GSC · 50
3. Screening the potential compounds from GSC that regulate metabolism that targets PPAR gamma · 51
XIV. The biological activities of novel isoflavonoids (CDGM, CGLM, CGNM I and CGNM II) · 52
1. The anti-inflammatory activities of GSC · · · · · · · · · · · · · · · · · 52
2. The anti-cancer activities of GSC · 54
3. Screening the potential compounds from GSC that regulate metabolism that targets PPAR gamma · 54
4. The anti-allergic activities of GSC in mast cells. · · · · · · · · · · · · 55
5. The anti-allergic activities of GSC in lung epithelial cells. · · · · · · · 56
XV. The assessment of immunmodulatory activities of GSC on respiratory systems · 57
1. The establishment of immune boosting activity of GSC on respiratory systems · 57
2. The mechanism of active components of GSC on immunmodulatory activity on respiratory systems · 60
3. Optimizing active components of GSC with immunodulatory activity · · 65

XVI. The clinical trial of GSC and PBR · 71
1. Purpose of the study · 71
2. Methods · 72
3. Results · 74
4. Conclusion and discussion · 79

Chapter 4. Contributions to industrial fields · · · · · · · · · · · · · · · · · 81
1. Aims · 81
2. Contributions · 84

Chapter 5. The future plan for the commercial application · · · · · · · · · · 85
1. Annual aims and outcomes · 85
2. The commercializaion and industalization · · · · · · · · · · · · · · · · 97
3. The plan for utilizing the outcomes · · · · · · · · · · · · · · · · · · · 97

Chapter 6. The obtained informations during the project progress · · · · · · 98

Chapter 7. References · 99

목 차

요약문 · · ·

제 11 절 발아대두 동충하초 유래 생리활성물질의 분리 조건 확립 · · · · · · · · · 43
제 12 절 발아대두 동충하초 유래 생리활성물질로 추정되는 화합물의 구조 결정 · · 45
1. LC/MS/MS 분석을 통해 발아대두 동충하초에서 생리활성물질로 추정되는 4개 화합물을 1D, 2D-NMR과 FAB-MS를 이용하여 구조 분석 및 결정 · · 45
2. 4가지 생리활성물질로 추정 되는 화합물의 구조 결정 완료 · · · · · · · · 46
3. 4가지 생리활성물질로 추정되는 화합물의 이화학적 특성 · · · · · · · · · 46
제 13 절 발아대두 동충하초 추출물질의 효능 · · · · · · · · · · · · · · · · · · 48
1. 대식세포에서의 항염증 효과 · 48
2. 항암효과 · 50
3. 대사성질환 표적인자인 PPAR를 타깃으로 하는 동충하초 추출물질들의 대사조절기능후보인자 탐색 · 51
제 14 절 발아대두 동충하초에서 생리활성물질로 추정되는 4개 화합물 CGNMⅠ, CGNMⅡ, CDGM, CGLM의 효능 · 52
1. 항염증효과 · 52
2. 대사성질환 표적인자인 PPAR를 타깃으로 하는 동충하초 추출물질들의 대사조절기능후보인자 탐색 · 54
3. 폐암세포에서의 항암 효과 · 54
4. 비만세포에서 항알러지 효과 · 55
5. 호흡기상피세포에서 항알러지 효과 · · · · · · · · · · · · · · · · · · · 56
제 15 절 발아대두 동충하초의 호흡기 점막면역강화 기능성 평가 · · · · · · · · 57
1. 발아대두 동충하초 추출물을 이용하여 호흡기 점막 기능 및 면역강화 평가를 위한 모델구축 · 57
2. 발아대두 동충하초에서 분리/정제된 유용물질을 이용한 호흡기 점막기능 및 면역강화평가와 작용기전 연구 · 60
3. 발아대두 동충하초 유래 효능지표물질의 면역조절효능 극대화 및 활용최적화 연구 · 65
제 16 절 아토피 피부염에 대한 발아대두 동충하초 및 발아현미 상황버섯의 치료효과 임상 시험 보고서 · 71
1. 시험배경 및 목적 · 71
2. 시험대상 및 방법 · 72
3. 결과 · 74

4. 고찰 및 결론 · 79

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 · · · · · · · · · · · · · · · · · · · 81

제 1 절 목표달성도 · 81

제 2 절 관련 분야에의 기여도 · 84

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 · 85

제 1 절 연차별 연구성과 목표 및 성과 · 85

제 2 절 실용산업화 계획 · 97

제 3 절 성과 활용 계획 · 97

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 · · · · · · · · · · · · · · 98

제 7 장 참고문헌 · 99

제 1 장 연구개발과제의 개요

1. 연구개발 목적

발아대두에 동충하초 중균을 접종시켜 새로운 소재의 발아대두 동충하초를 개발하였다. 이 신소재로부터 유효성분을 탐색하고, 이 유효성분들에 대한 효능을 평가함으로써 제품화로 연계시키는 것을 그 목적으로 한다.

2. 연구의 필요성

동충하초는 중국, 일본 등지에서 일찍이 불로장생의 비약으로 알려져 있고, 이를 이용하여 아편해독제, 병후 보양 및 강장제, 폐병 치료제, 면역증가제 등으로 가치를 인정받고 있다. 국외에서는 일찍부터 미래의 식량자원으로서 균류에 대한 관심이 집중되면서 특히 동충하초균과 같은 고등균류에 대한 연구는 기초적인 연구뿐만 아니라 이를 이용하여 식품, 의약품 및 천연농약제제로서 상품화 연구가 진행 중이다. 국내에서는 번데기 동충하초(Cordyceps militaris)와 눈꽃동충하초(누에동충하초, Paecilomyces tenupis)를 번데기나 누에에서 인공배양에 성공하여 실용화되고 있으며, 최근 암, 뇌졸중, 심장병과 같은 성인병에 대한 예방 및 개선효과가 발견되어 무한한 잠재력을 가진 소재로 각광받고 있다. 동충하초에서 유래된 코디세핀(Cordycepin), 다당체 등의 각종 생리활성 성분이 B cell 활성증가, 마크로파지 탐식능 활성화 등에 관여하여 항암표화를 나타냄이 보고되고 있다.

한편, 대두는 양질의 식물성 단백질을 많이 함유하고 있으며, 필수아미노산과 비타민 등이 풍부하며, 레시틴, 이소플라본 등 각종 생리활성효능을 가진 성분들이 밝혀지면서 혈행개선, 갱년기 여성치료, 고지혈증 치료 등에 널리 사용되고 있다. 현미, 대두 등 각종 발아시킨 곡류에서 GABA, 아라비녹실란 등과 같은 각종 생리활성성분이 함유되어 있음이 밝혀지며 새로운 소재로 부각되고 있다.

본 연구자들은 이와 같은 효능을 지닌 발아대두에 동충하초균을 접종 배양시켜 새로운 소재인 발아대두동충하초에 대한 체계적은 연구의 필요성이 요구된다. 또한, 인간이나 가축 등 모든 살아있는 포유류는 호흡을 통해 산소를 흡수하고 이산화탄소 등 각종 가스성 노폐물을 체외로 내보내며, 이 과정에서 산소 뿐 아니라 먼지, 공해물질 및 미생물 등의 다양한 유해물질이 호흡기내로 유입되며, 인체는 이들을 제거하여 호흡기의 항상성유지를 위한 다양한 단계적 시스템을 가진다.

인체 호흡기의 대부분을 구성하는 호흡기 점막상피세포는 상기 유해물질 제거시스템의 중심적 역할을 수행하여, 유해물질들의 인체침입시 우선적으로 이들에 대한 물리적장벽의 역할을 수행하는 한편 mucociliary movement를 통해 이들을 체외로 배출하는 역할을 수행한다(Fig 1)(10).

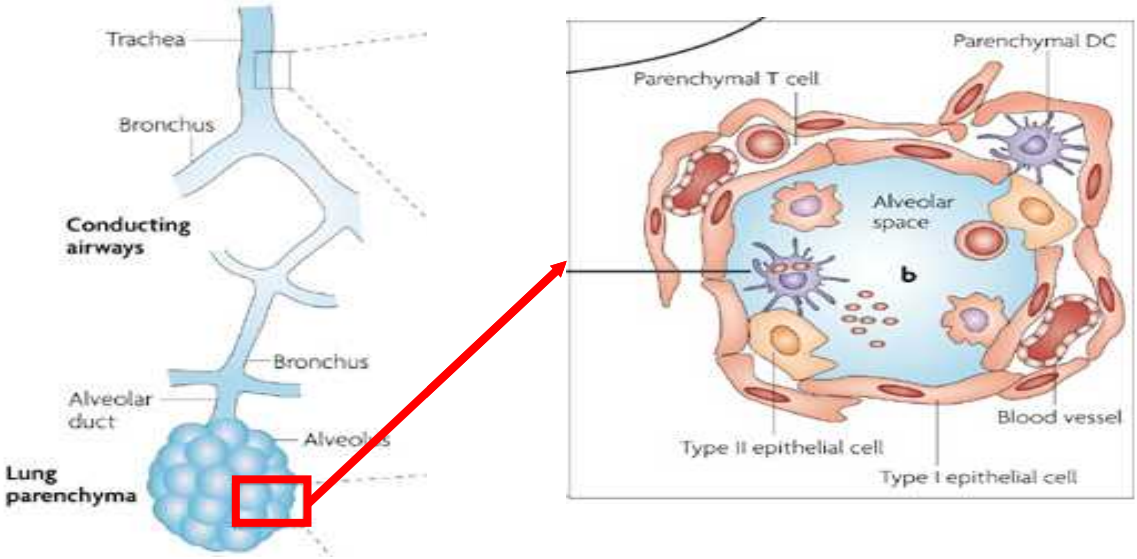


Fig 1. 인체 호흡기관의 구조 및 호흡기 점막상피세포의 분류

만일 상기의 수단으로도 인체호흡기내의 유해물질이 제거되지 않을시 최후의 방법으로서 인체 호흡기의 Type II 점막상피세포(Type I 점막상피세포의 경우 호흡에 관여)는 다양한 종류의 항미생물 펩타이드, mucins, SP (Surfactant protein), 및 케모카인분비에 따른 면역반응을 통해 침입한 유해물질들을 제거한다(11, 12). 그러나 상기 호흡기 점막상피세포에 의한 면역시스템의 붕괴시 호흡기에서의 질환이 발생하게 된다.

현재 전세계적인 조류 독감 및 신종플루의 창궐(Fig 2)은 각종 호흡기질환에 대한 예방적 차원에서 다양한 방법들을 통한 인체 호흡기 면역증강 연구에 대한 관심을 증대시키고 있다.

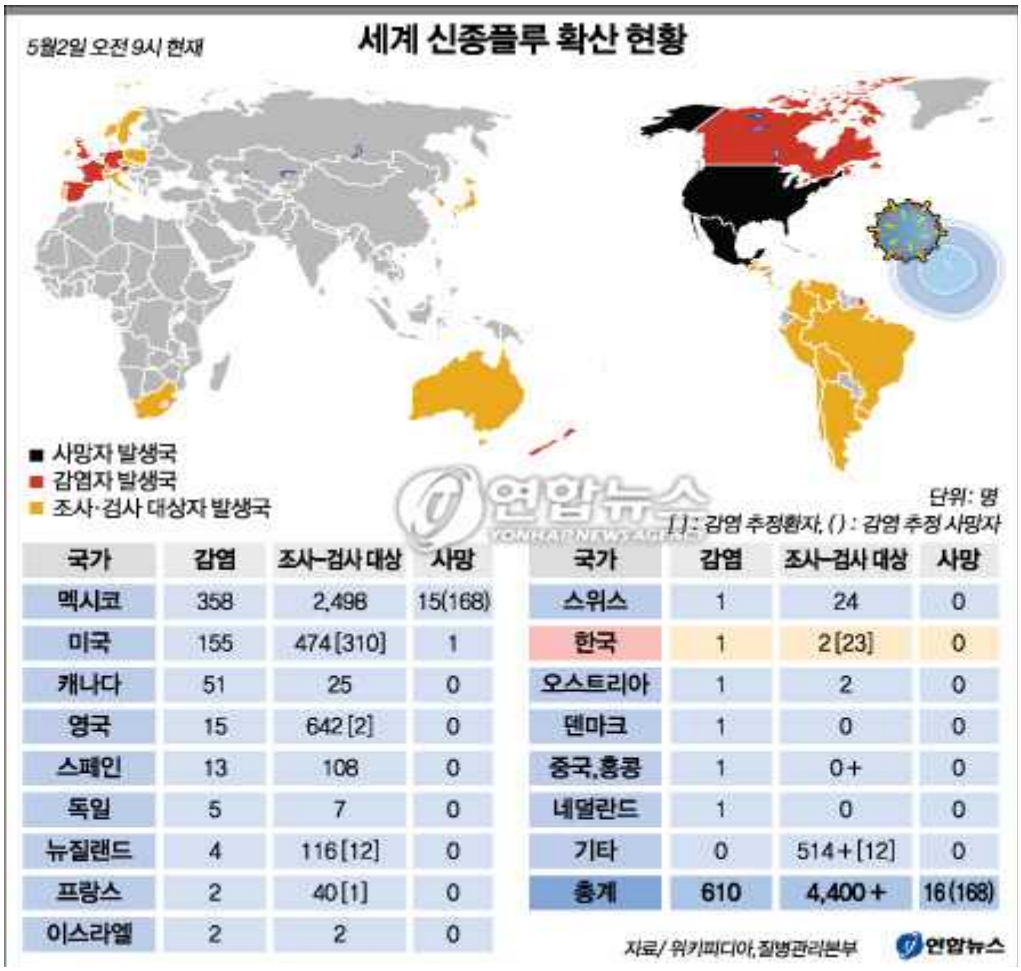


Fig 2. 세계 신종플루 확산 현황

이러한 방법의 일환으로 다양한 천연물을 이용해 호흡기 면역증강을 유도하기 위한 연구들이 폐질환에 대한 효과가 있다고 알려져 민간에서 천식 및 각종 폐질환치료제로서 이용되어 졌던 만큼 호흡기 면역증강을 위한 천연물소재로서 각광을 받고 있다(13).

그러나, 현재까지 인체 면역 및 생리기능에 미치는 동충하초와 동충하초 추출물의 영향과 관련된 연구들은 소수에 불과하며, 이들의 결과도 단순히 동충하초 추출물의 인체 면역 및 생리활성의 변화만 관찰한 연구결과들로서 동충하초에 의한 면역 및 생리활성기능과 관련된 기전연구는 매우 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구는 발아대두에서 배양한 동충하초 추출물 및 정제/분리된 유용물질이 인체의 호흡기 점막기능과 면역반응에 미치는 영향을 평가하는 한편 그 작용기전을 규명함으로서 최종적으로 인체에서 발아대두 동충하초의 면역강화 효능를 평가하고자 한다.

3. 연구개발 범위

- 균사체의 최적 배양 조건을 확립
- 발아대두 동충하초의 활성성분 분리와 구조분석 및 효능 검증
- 동충하초 추출물을 이용하여 호흡기 점막 기능 및 면역강화 평가를 위한 모델 구축
- 균사체 생산조건의 표준화
- 발아조건별 활성성분 최적 함량비 결정
- 면역활성인자 탐색 및 암세포 살해 효능 검사
- 대사성 조절인자 탐색 및 기증 분석
- 발아대두 동충하초에서 분리정제된 유용물질을 이용한 호흡기 점막 기능 및 면역강화 평가와 작용기전 연구
- 원료 생산조건 확립 및 대량 생산
- 제품화
- 동충하초 유래 생리활성물질의 대량분리 생산공정 표준화
- 면역효능 검사
- 대사성 조절인자와 탐색 및 in vitro 효능 분석
- 발아대두 동충하초의 효능 물질의 면역조절 효능 극대화 및 활용 최적화 연구

제 2 장　국내외 기술개발 현황

동충하초는 중국, 일본 등지에서 일찍이 불로장생의 비약으로 알려져 있고, 이를 이용하여 아편해독제, 병후 보양 및 강장제, 폐병 치료제, 면역증가제 등으로 가치를 인정받고 있다. 국외에서는 일찍부터 미래의 식량자원으로서 균류에 대한 관심이 집중되면서 특히 동충하초균과 같은 고등균류에 대한 연구는 기초적인 연구뿐만아니라 이를 이용하여 식품, 의약품 및 천연농약제제로서 상품화 연구가 진행 중임. 국내에서는 번데기 동충하초(*Cordyceps militaris*)와 눈꽃동충하초(누에동충하초, *Paecilomyces tenupis*)를 번데기나 누에에서 인공배양에 성공하여 실용화되고 있으며, 최근 암, 뇌졸중, 심장병과 같은 성인병에 대한 예방 및 개선효과가 발견되어 무한한 잠재력을 가진 소재로 각광받고 있다. 동충하초에서 유래된 코디세핀(Cordycepin), 다당체 등의 각종 생리활성 성분이 B cell 활성증가, 마크로파지 탐식능 활성화 등에 관여하여 항암효과를 나타냄이 보고됐다.

한편, 대두는 양질의 식물성 단백질을 많이 함유하고 있으며, 필수아미노산과 비타민 등이 풍부하며레시틴, 이소플라본 등 각종 생리활성효능을 가진 성분들이 밝혀지면서 혈행개선, 갱년기 여성치료, 고지혈증 치료 등에 널리 사용되고 있다. 현미, 대두 등 각종 발아시킨 곡류에서 GABA, 아라비녹실란 등과 같은 각종 생리활성성분이 함유되어 있음이 밝혀져 새로운 소재로 부각되고 있다. 본 연구자는 발아시킨 현미에 상황버섯을 접종하여 배양시켜 균사체를 제조하는 기술을 확립하고 천연 상황버섯보다 높은 항암 및 면역조절 효과를 나타냄을 확인함으로써 발아시킨 곡류로부터 각종 균사체의 생리활성 시너지 효과가 나타남을 확인하였음. 나아가, 발아대두로부터 동충하초와 같은 균사체를 배양 및 제조하는 기술을 개발하였으며, 선행연구를 통해 해당 소재가 면역증강, 항암, 스테미나 강화 등에 효과가 있음을 확인하였다.

지금까지 여러 가지 난치병에 대해 다양한 치료 약물을 연구 개발해 온 상황이지만 질병부위만을 효과적으로 치료하지 못하였으며, 많은 경우 상당한 부작용을 동반하는 문제점을 가지고 있고 이를 해결하기 위한 연구들이 수없이 진행되어 왔다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 비교적 부작용이 많지 않은 전통적 천연자원인 자생식물과 천연물을 이용한 생리활성물질의 탐색이 활발히 진행되고 있으나, 이미 오랫동안 수많은 연구진에 의해 추진되어왔으므로 독창성과 연구경쟁력이 떨어진다. 따라서 우리나라 고유의 기능성 특용작물을 배양체로 이용하여 항암 및 생리활성작용이 뛰어나다고 알려진 버섯균사체를 접종·배양시켜 얻은 신 개념의 신약소재는 타국가의 연구기관이 보유하지 못한 국내 고유의 독창적인 특수소재이며 다양한 약리효능을 가진 신약의 보고로서 연구개발 가치가 매우 크다고 할 수 있다.

인간이나 가축 등 모든 살아있는 포유류는 호흡을 통해 산소를 흡수하고 이산화탄소등 각종 가스성 노폐물을 체외로 내보낸다. 이 과정에서 산소 뿐 아니라 다양한 병원성 미생물과 독성물질이 함께 유입되어 감염성 질환이나 알러지, 기관지염 등의 질환이 유발된다. 호흡기에서 가장먼저 외부에서 유입된 물질에 노출이 되는 조직은 점막 상피세포 층이다. 상피세포는 면역세포와는 기능적으로 구분되어있으며 1차적인 방어체계로서의 역할을 수행한다. 점막상피세포는 물리적으로 병원성 세균과 박테리아를 차단하는 역할을 하는데, 제1형 상피세포 (type I epithelial cells)와 제2형 상피세포 (type II epithelial cells)로 구성된다. 제1형 상피세포는 산소와 이산화탄소를 교환하는 기본적인 역할을 하는데 반해, 제2형 상

피세포는 β-defensin, LL-37등 항균펩타이드(anti-microbial peptide)와 mucin등 인체방어기작에 중요한 역할을 하는 물질들을 분비하여 병원체를 공격하고, 감염이 시작될 경우 이를 퇴치할 수 있는 면역세포를 불러들일 수 있는 케모카인을 분비하고 ICAM-1같은 면역세포부착단백질들을 발현하여 면역조절기능을 가지고 있다. 따라서, 세균감염이나 알러젠 유입시 면역기능을 조절할 수 있는 기능을 지닌 세포타입이라 할 수 있다. 상피세포층 바로 아래에는 라미나 프로프리아 (Lamnia propria)라는 조직이 있어 다양한 면역세포들이 존재한다. 특히, 대식세포나 수지상세포와 같은 탐식세포가 존재하여 일차적인 면역반응 및 면역조절물질들을 분비하는 것으로 알려져 있다. 특히, 상피세포 층을 뚫고 상피세포보다 먼저 미생물 및 생리활성물질에 노출될 수 있기 때문에, 탐식세포도 점막조직에서 중요한 역할을 담당하고 있다. 따라서, 점막의 상피세포와 면역세포들이 생리활성물질의 세포 및 분자생물학적인 반응을 연구하기에 적합한 면역반응성을 지닌 모델이라 할 수 있다.

현재까지 검색된 인체 암의 50% 이상이 암 억제인자 p53, Rb 단백질의 변이가 동반되며 이외의 나머지 다른 암들도 바이러스 등에 의해 p53, pRb의 기능이 불활성화 되거나 그 밖의 여러 종류의 세포주기 조절인자와 암 억제인자들이 세포주기에 관여하는 단백질의 이상 또는 불활성화로 인해 일어나는 것으로 밝혀져 있다.

실제로 p53을 정상 발현하는 세포에 HPV E6 발현을 유도하면 세포증식이 촉진되고 있음이 밝혀졌다. p53 단백질은 대부분의 암 조직에서 유전자 돌연변이에 의해 발현이 안 되거나 그 기능이 상실되어 있으며 암의 종류에 따라 돌연변이의 형태도 각기 다름이 알려져 있다. 이와 같이 p53의 돌연변이나 기능 상실은 암 발생과 밀접한 관련이 있을 것으로 생각되나 p53의 tumor suppressor로서의 기능이 어떻게 이루어지는가에 대한 기작이 상세히 밝혀져 있지 않은 상태이다. 또한 E7 발암 유전자는 E2F와 결합하고 있는 Rb를 인산화 시켜 E2F가 유리되도록 함은 E2F에 의한 세포주기가 활성화되어 정상세포가 암화 되는데 중요한 역할을 한다.

국내외적인 기술개발 현황은 다음과 같다.

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
(주)세포활성연구소	발아현미로부터 상황버섯균사체 생산 및 유용물질 개발	항암, 기능성식품으로 제품화 (국내 및 일본, 대만 수출)
Mitotix 사	p53에 의해 유도되는 cdk 25 phosphatase의 inhibitor를 스크리닝하여 종양치료제로 개발하기 위한 임상 연구에 들어감. 또한 p53가 ubiquitin- dependent pathway를 거쳐 분해되는 것을 저해하는 small molecular organic drug을 탐색 및 개발하고 있음.	항암제 등
글락소 스미스클라인(GSK), Merk사	HPV 예방백신	자궁암 예방 백신
KRIBB 개발 연구팀	우리나라에 풍부한 감귤류 껍질(citrus peel)로부터 추출한 JBB 같은 bioflavonoid 추출물	동맥경화증, 고지혈증 등의 예방 및 치료

제 3 장　연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절　발아대두 동충하초 균사체 Master/working cell bank 구축

● PDA평판배지에서 계대안정성 조사

Fig. 3.　PDA 배지에서 계대 수별 균사체 성장속도 비교(I).

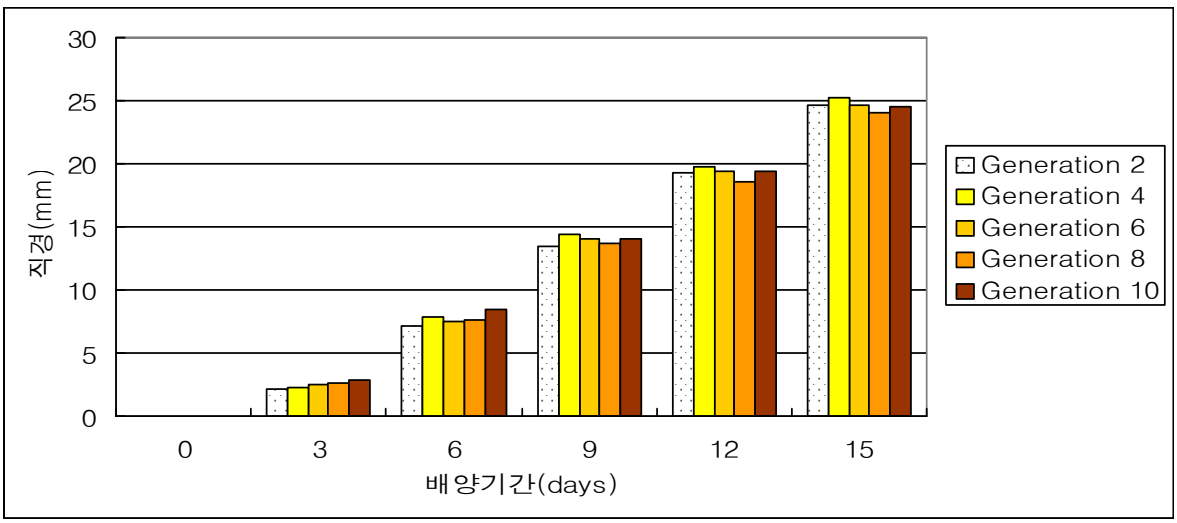


Fig. 4.　PDA 배지에서 계대 수별 균사체 성장속도 비교(II).

계대수가 각각 2, 4, 6, 8, 10 generation의 균주를 PDA 배지에서 15일간 배양하며 균사체성장속도를 직경을 측정하여 비교한 결과, 상기 Fig 3과 4에 나타난 바와같이 10계대까지 성장속도의 변화가 관찰되지 않았음으로 적어도 10계대력까지의 cell bank의 안정성을 확인하였음.

제 2 절 발아대두 동충하초 배양조건 최적화

Fig. 3. 발아대두배지에서 배양기간별 동충하초 균사체 배양.

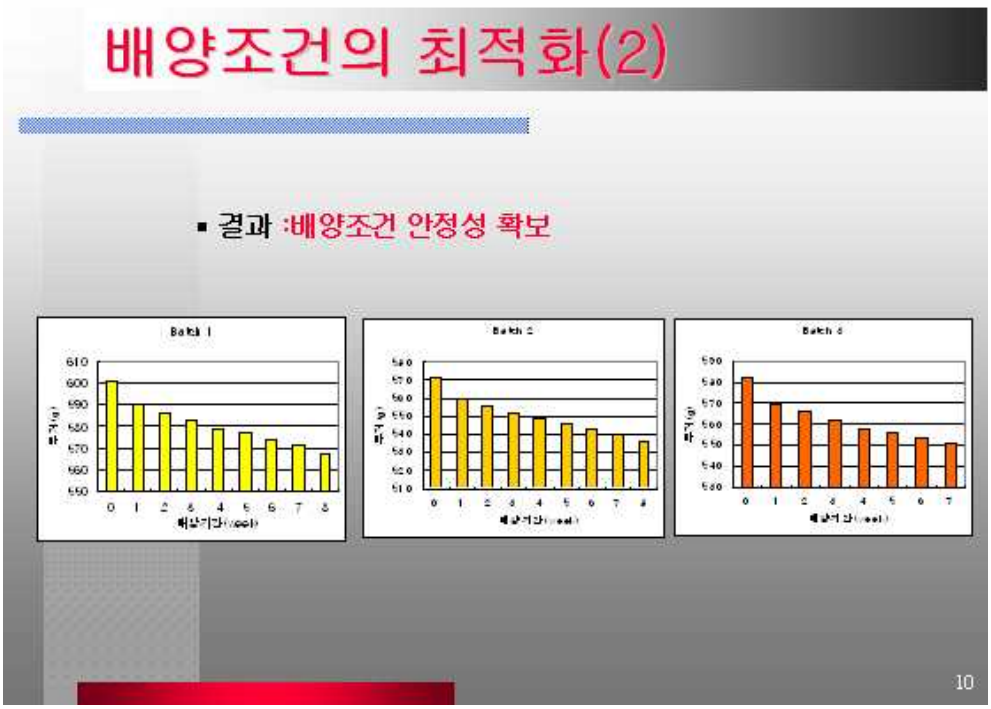


Fig. 4. 배양기간별 동충하초 균사체 배양조건의 안정성 조사.

발아대두 동충하초의 배양조건 안정성 조사를 위해 발아대두 배지에 동충하초 균사체를 접종하여 동일한 조건으로 3번 반족하여 8주간 배양한 결과 그림 3과 4와 같이 나타났음. 배양기간이 길어지면서 시료의 무게가 점차 감소되었으며 감소되는 양상이 반복 batch 실험에도 동일한 경향을 나타냄으로써 확립된 배양조건의 안정성을 확인하였음.

제 3 절 배양공정의 표준화

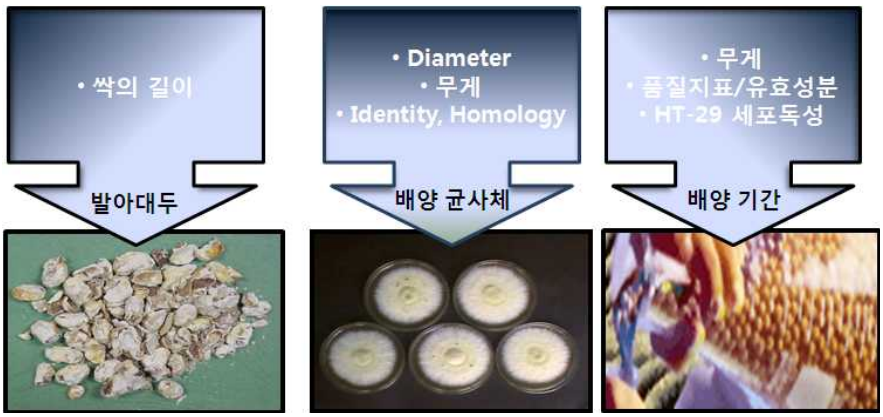


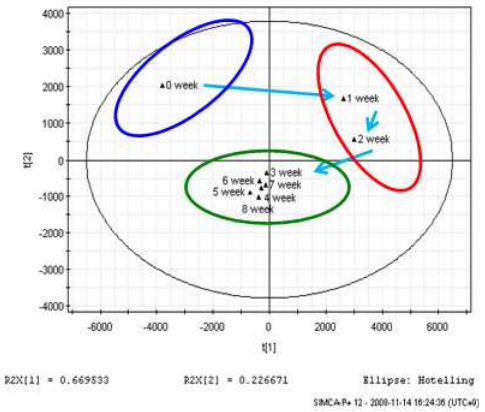
Fig. 7. 발아대두 동충하초의 배양공정 표준화 계획

- 원료(발아대두), 종균(동충하초)등을 균일하게 표준화시키고 이를 배양하여 유효성분은 HT-29 cell line에서 세포독성, 생리활성 등을 측정함과 동시에 무게, 품질지표 등을 검토하고 배양공정을 표준화 시켰다.

1. 배양 기간에 따른 생리 활성 성분 최적 함량 비율 결정

- 발아대두 동충하초의 배양조건별 생리 활성 성분의 최적 함량 비율 결정을 위해 발아대두 동충하초의 배양 시간별 대사체의 변화를 LC/MS/MS를 통하여 분석하였으며 이를 대사체학적 관점에서 다변량 통계 분석 기법인 Principal Component Analysis (PCA)분석을 통하여 해석 하였다.

A .



B.

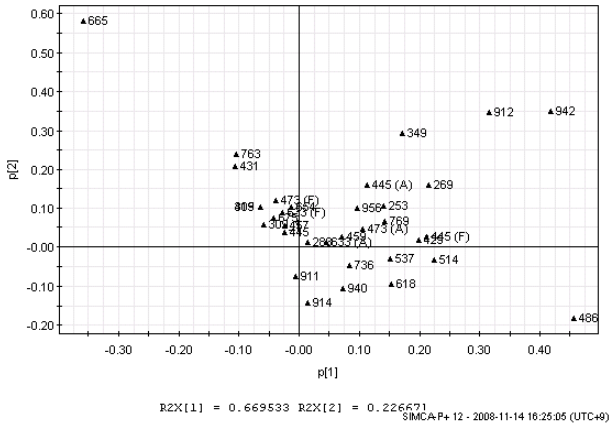


Fig. 8. 발아대두 동충하초의 배양 기간별 대사체 변화

A:대사체 변화 다변량 통계 분석의 score plot, B:대사체 변화 다변량 통계 분석의 loading plot

● 발아대두 동충하초의 배양 기간별 대사체의 변화를 분석한 결과 0주차 배양 샘플과 1, 2주 배양 샘플, 그리고 3~8주간 배양 샘플간의 유의한 차이를 나타냈으며 이를 통해 세 그룹(0주배양, 1~2주배양, 3~8주 배양)간의 확연한 대사체의 변화를 확인하였음.

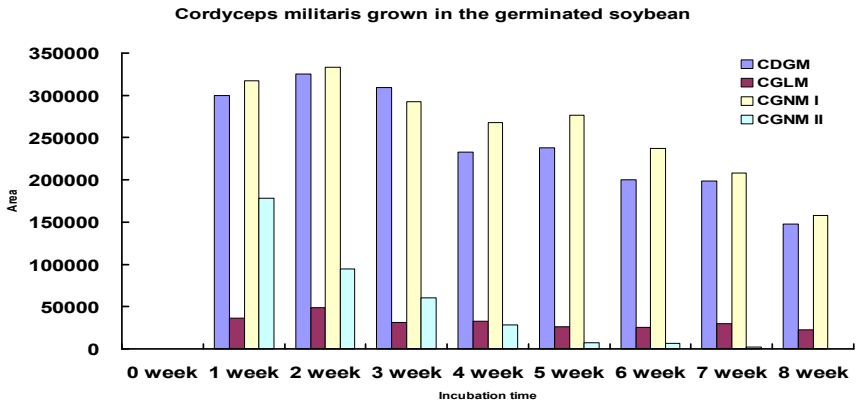
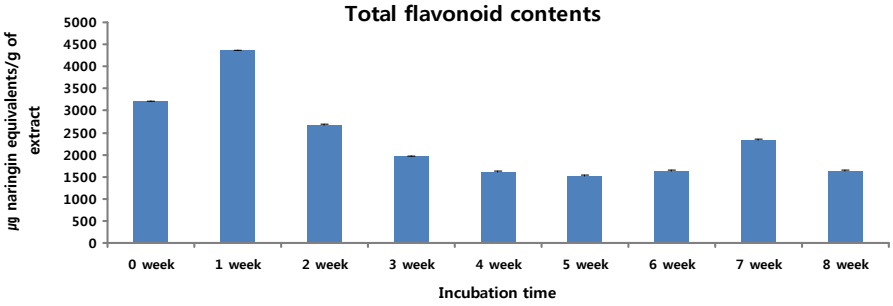


Fig. 9. LC/MS/MS 분석을 통한 4가지 생리활성 추정 물질의 배양 기간별 함량 변화

● LC/MS/MS 성분 분석을 이용하여 4가지 생리활성 물질로 추정되는 화합물의 배양 기간별 함량을 측정한 결과 발아대두 동충하초의 1~2주 배양 샘플이 가장 높은 함량을 나타냈으며, 이는 배양 시간이 증가할수록 줄어드는 것을 확인하였음.



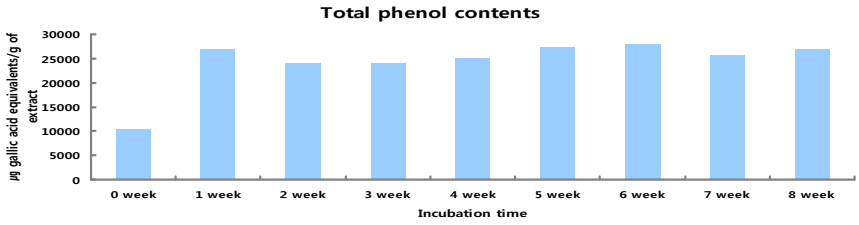


Fig. 10. 배양 기간별 총 플라보노이드 함량의 변화와 총 페놀릭컴파운드 함량의 변화

- 발아대두 동충하초의 배양 기간별 총 플라보노이드 화합물의 함량과 총 페놀릭 화합물의 함량 변화를 측정한 결과 페놀릭 화합물의 총 함량은 배양 기간에 영향을 받지 않으나 플라보노이드 화합물의 함량은 1~2주 배양이 가장 높음을 확인하였음.

- 발아대두 동충하초의 배양 기간별 생리활성 물질의 최적함량 비율은 대사체학적 관점에서의 다변량 통계 분석 법과 플라보노이드와 페놀릭 화합물의 총 함량 변화를 측정한 결과 1~2주 배양이 가장 높은 것으로 결정되었음.

2. 발아 대두 동충하초의 배양 시간별 최적 항산화 효과 검정

- 발아대두 동충하초의 배양 시기별 최적 항산화 효과를 확인하기 위하여 DPPH와 ABTS라디칼 소거 활성을 측정하였으며 FRAP 측정을 수행하였다.

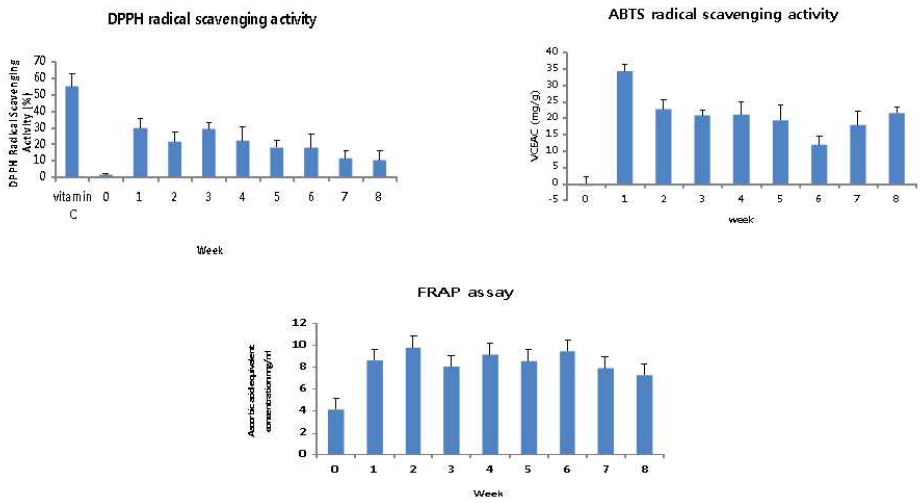


Fig. 11. 발아대두 동충하초 배양시간별 항산화 효과 측정

- 발아대두 동충하초 배양기간별 항산화 효과 측정결과 배양 1~2주에서 라디칼 소거 활성이 가장 높음을 확인 할 수 있었으며, FRAP 측정을 통해 배양 기간이 길어질수록 항산화 효과가 떨어짐을 확인할 수 있었음.

● 발아대두 동충하초의 배양 기간별 대사체 변화와 생리활성 물질의 함량 변화 그리고 항산화 효과를 확인 한 결과 생리활성 물질의 최적 함량 시기와 비율을 결정할 수 있었음.

제 4 절 원료 생산공정 표준화 및 동충하초 엑세스제조 최적조건 확립

● 발아대두 동충하초의 균사체 Master/working cell bank 구축과 배양조건의 안정성을 확인한 1차년도 연구를 기반으로 2차년도는 생리활성의 물질의 최적 함량 시기와 비율을 확립, 균사체 생산 조건의 표준화 및 엑스제조 최적 조건을 확립하고자 하였다.

1. 원료 생산공정 표준화: 건조/ 추출/ SD 및 과립화 포장

● 동일한 생리 효능을 갖는 발아대두 동충하초의 생산공정 표준화를 위해 그림과 같이 4단계로 분류하여 유효성분이 파괴되지 않는 온도, 시간을 확립하였고, 자동화 프로그램을 이용하여 원료 생산공정을 표준화함.

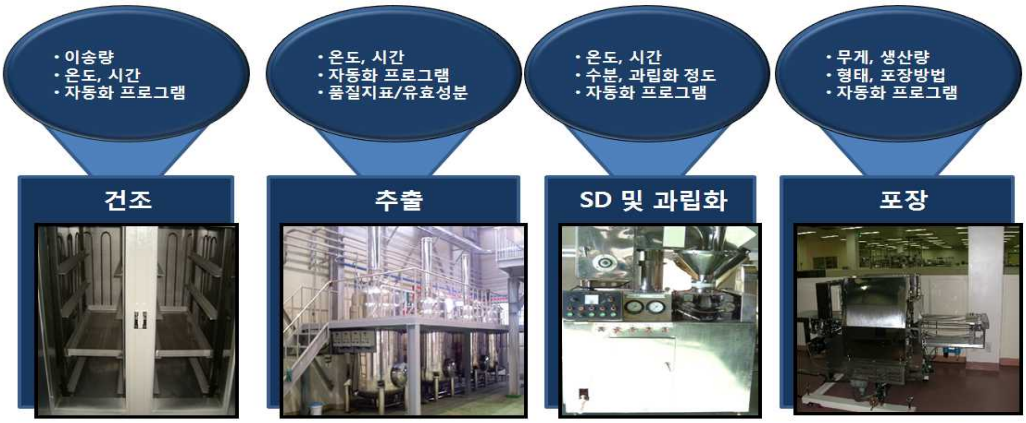


Fig. 12. 원료 생산의 표준화를 위한 공정도

2. 동충하초 엑세스제조 최적조건 확립

● 동충하초배양물을 100℃, 3시간동안 2회 열수 추출하여 60℃ 이하에서 농축시킨 후 건조시켜, 엑스 제조.
● 제조 시 작업장의 청결상태는 물론, 규정된 작업 복장을 갖추고 제조지시서에 따라 원료를 확인하고 칭량 한 뒤, 1차 추출과정에 들어감. 추출에 사용되는 청소관리 규정에 따라 청소된 추출 탱크에 칭량된 원료를 투입한 후 물 1500L/ 온도 100℃/ 3시간의 조건에서 추출함. 물 1000L/ 온도 100℃/ 3시간의 조건에서 2차 추출 후 농축에 들어감.
● 스팀압력(2kg/㎠), 진공도(700mmHg), 농축조 온도(60℃이하)를 준수하여 농축시킴.
● 송풍온도 160℃, 배풍온도 100℃에서 분무건조하여 최종 동충하초 엑스 제조조건 확립.

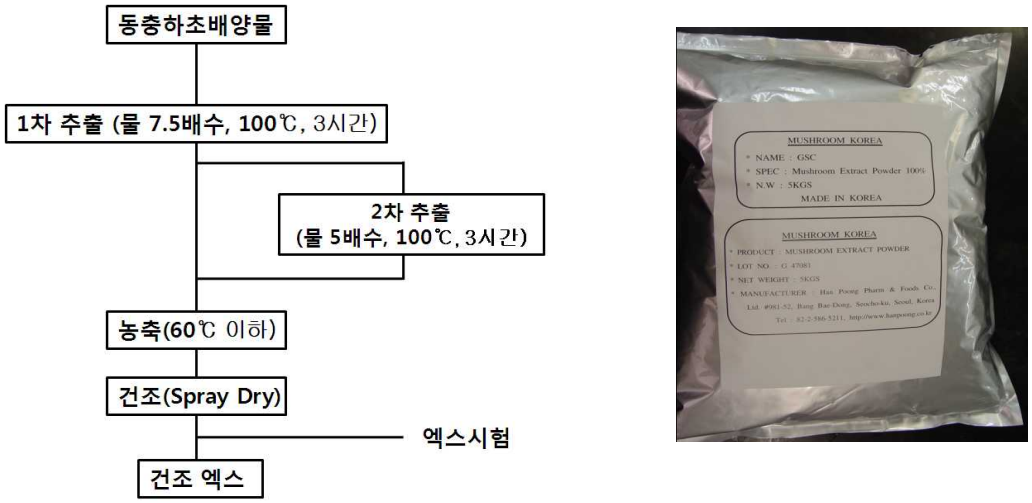


Fig. 13. 동충하초 배양물의 엑스 공정 및 건조 엑스 Powder

제 5 절 품질/ 안전관리 항목

- 안정성은 물론, 안전성을 최우선으로 하는 품질 관리를 위하여 원료, 공정, 제품에 포함되는 내용물들은 잔류농약, 중금속, 유해물질 용출실험 등 매 단계마다 다양한 관리항목으로 나눠져 검사를 실시함.

구분	내용	관리항목
원료	대두	성상, 잔류농약, 중금속, Aflatoxin
	동충하초 균사체	초기접종량, 외관, Identity, Homology
	물	먹는물 수질기준 55항목 : 미생물, 질소성분, 잔류농약, 중금속, 소독제 등
	포장지	유해물질 용출시험
공정	발아/배양/추출/건조/포장	QC 공정도에 의한 관리 : 수분, 미생물, 지표성분 등
제품	발아대두 동충하초	성상, 입도, 수분 지표성분, 유효성분 일반세균, 효모/곰팡이, 대장균(군) 잔류농약, 중금속

Table 1. 품질관리 안전 항목

제 6 절 QC 공정도에 의한 관리

- 종균, 배양, 건조, 분쇄, 추출, 분무건조 등 그림에서 설명된 공정도의 항목에 맞춰 공정과정을 진행, 원료 생산은 물론, 제품 생산의 최고 품질을 확보.

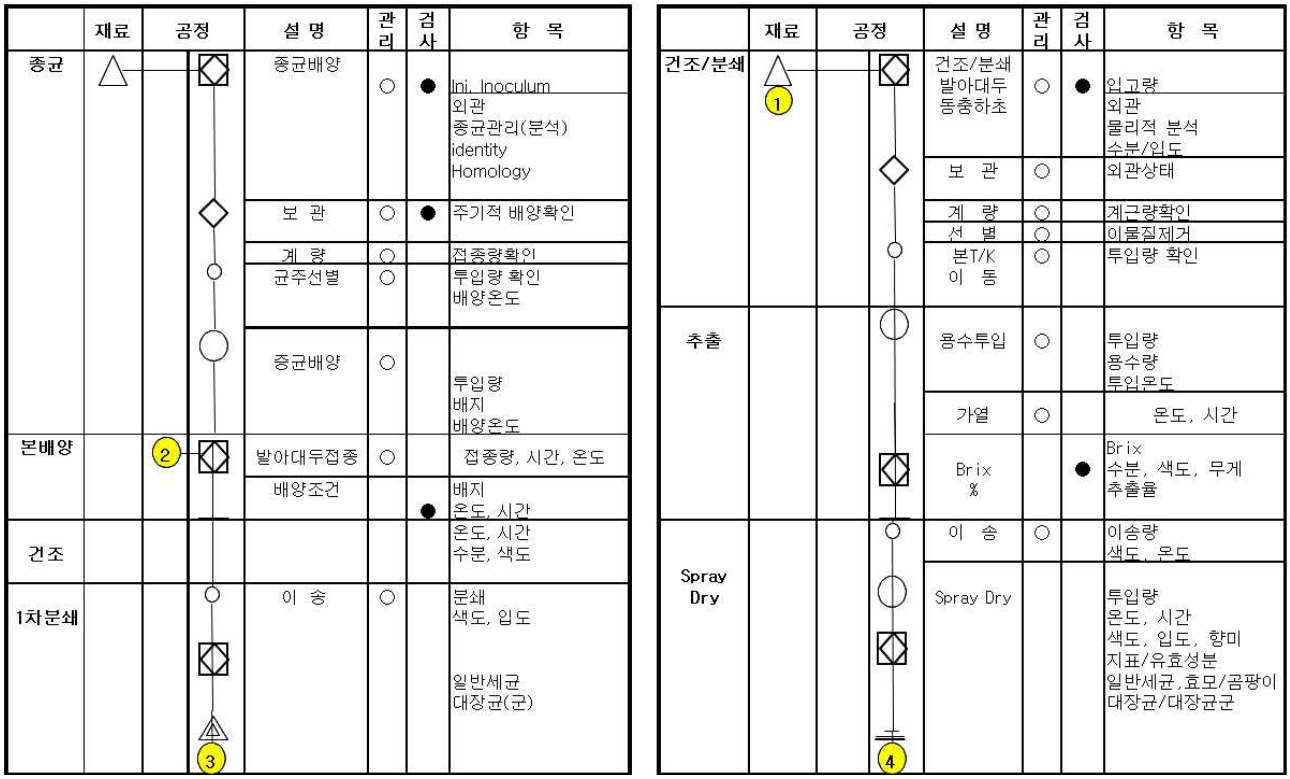


Fig. 14. QC 공정도

제 7 절 발아 조건별 생리 활성 성분 최적 함량 비율 결정

1. 발아대두 동충하초의 발아조건별 생리 활성 성분의 최적 함량 비율 결정을 위해 발아대두 동충하초의 배양 시간별 대사체의 변화를 LC/MS/MS, GC/MS를 통하여 분석하였으며 이를 대사체학적 관점에서 다변량 통계 분석 기법인 Principal Component Analysis (PCA)분석과 orthogonal partial least-square to latent structure discriminant analysis (OPLS-DA) 을 통하여 해석 하였다.

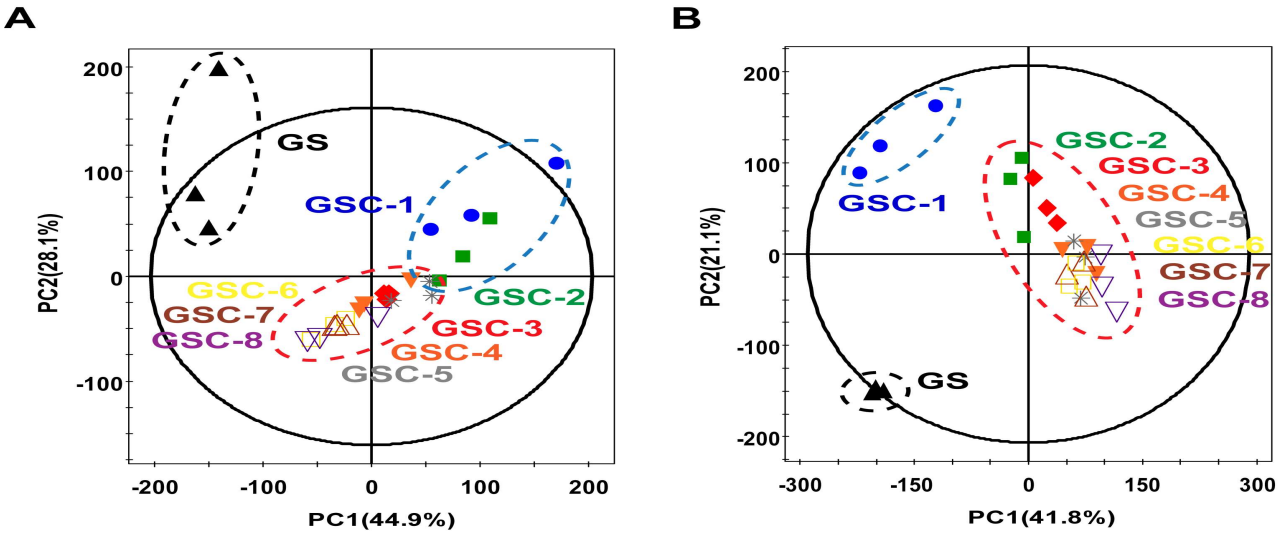


Fig. 15. 발아대두 동충하초의 배양 시기별 대사체 변화 A: LC/MS/MS 이용한 대사체 변화 다변량 통계 분석 B: GC/MS 이용한 대사체 변화 다변량 통계 분석 (GS: 0주차. GSC1~8 :주차별 배양샘플)

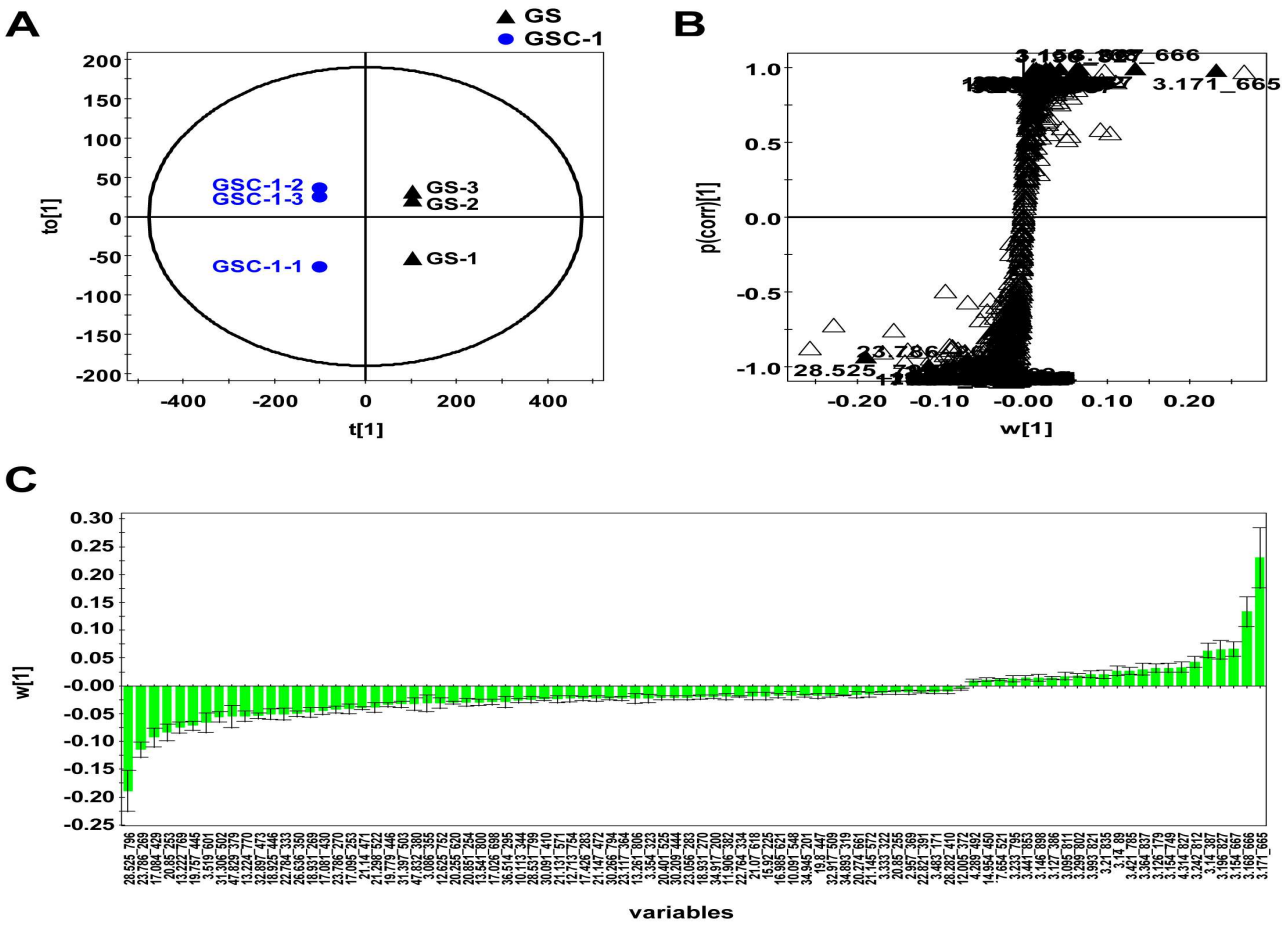


Fig. 16. LC-MS 기반 다변량분석을 통한 0주차(GS)와 1주차(GSC1) 발아대두 동충하초의 대사체분석 A: OPLS-DA score plots, B: Loading S-plot, C: cut-off value of $p < |0.01|$

Table2. LC/MS/MS를 통해 분석한 발아대두 동충하초의 2차 대사산물

no	t_R (min)	[M-H]$^-$ (*m/z*)	MS^n fragment ions (*m/z*)	tentative identification
1	17.08	429	429, 252>>223191, 169	compound **1**
2	17.42	459	459, 283>>249, 175	compound **2**
3	18.92	445	445, 268>>240, 223, 211, 195, 179, 167	compound **3**
4	19.76	445	445, 269>>240, 223, 211, 195, 179, 167	compound **4**
5	20.85	253	253>> 223, 209, 197, 167, 135	daidzein
6	21.14	473	473, 268>>240, 223, 211, 195, 179	genistein *O*-hexoside acetylated
7	22.82	957	957>>895, 795, 733, 597, 525, 457	soyasaponin Bd
8	23.78	269	269>>225, 213, 201, 181, 169, 133, 107	genistein
9	28.53	912	912>>849, 703, 615, 525, 457	soyasaponin Bc

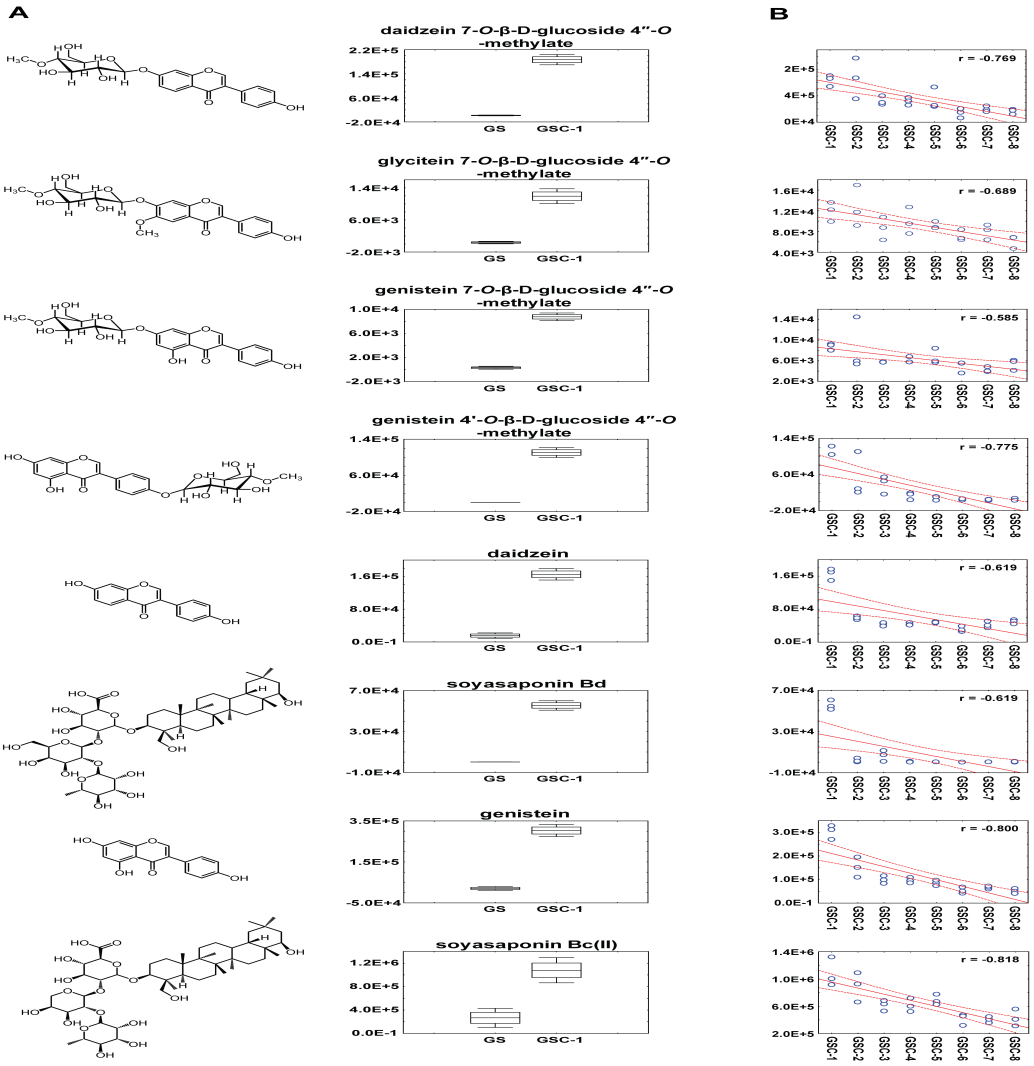


Fig. 17. 발아대두 동충하초의 배양 시기별 2차 대사산물 변화

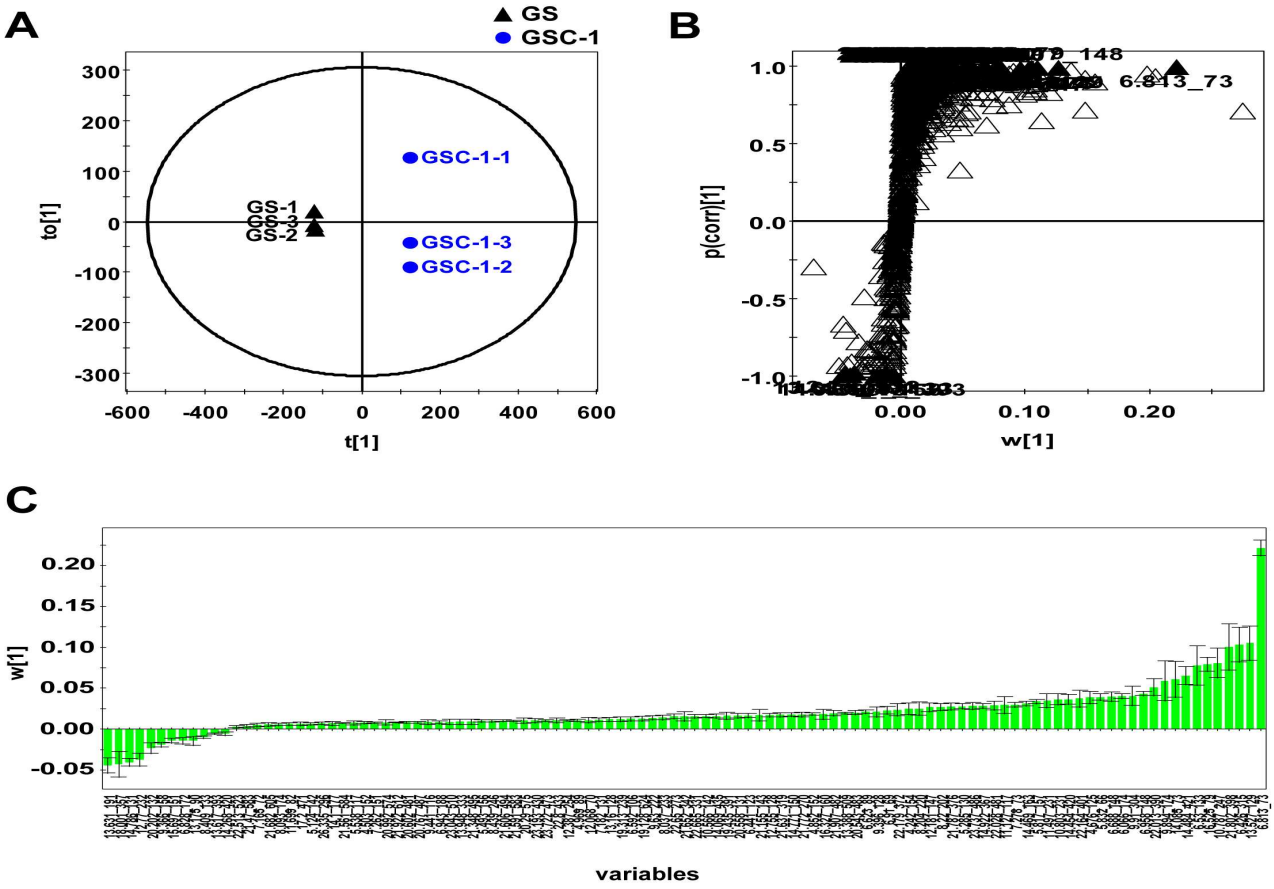


Fig. 18. GC-MS 기반 다변량분석을 통한 0주차(GS)와 1주차(GSC1) 발아대두 동충하초의 대사체분석 A: OPLS-DA score plots, B: Loading S-plot, C: cut-off value of p < |0.001|

Table 3. GC/MS를 통해 분석한 발아대두 동충하초의 1차 대사산물

no	name	t_R (min)	MS fragment ions (m/z)	derivatized[a]	p value
1	glycerol	6.53	218, 205, 147, 117, 103, 73	TMS(x3)	<0.005
2	proline	6.81	244, 216, 142, 73	TMS(x2)	<0.001
3	pyroglutamic acid	9.36	258, 230, 156, 147, 73	TMS(x2)	<0.001
4	glutamine	9.91	348, 320, 246, 147, 128, 73, 56	TMS(x3)	<0.005
5	pentitol	10.78	319, 231, 205, 147, 73, 69	TMS(x4)	<0.005
6	citric acid	12.77	465, 375, 348, 274, 211, 147, 73	TMS(x4)	<0.001
7	fructose	13.53	364, 307, 277, 217, 147, 73	TMS(x5)	<0.001
8	histidine	13.63	356, 254, 217, 154, 73	TMS(x3)	<0.001
9	inositol	14.48	612, 507, 318, 266, 218, 147, 73	TMS(x6)	<0.001
10	palmitic acid	14.78	328, 313, 145, 129, 117, 75	TMS(x1)	<0.001
11	octadecanoic acid	16.52	357, 341, 201, 129, 117, 73	TMS(x1)	<0.001
12	sucrose	21.80	361, 305, 217, 204, 147, 73	TMS(x8)	<0.005

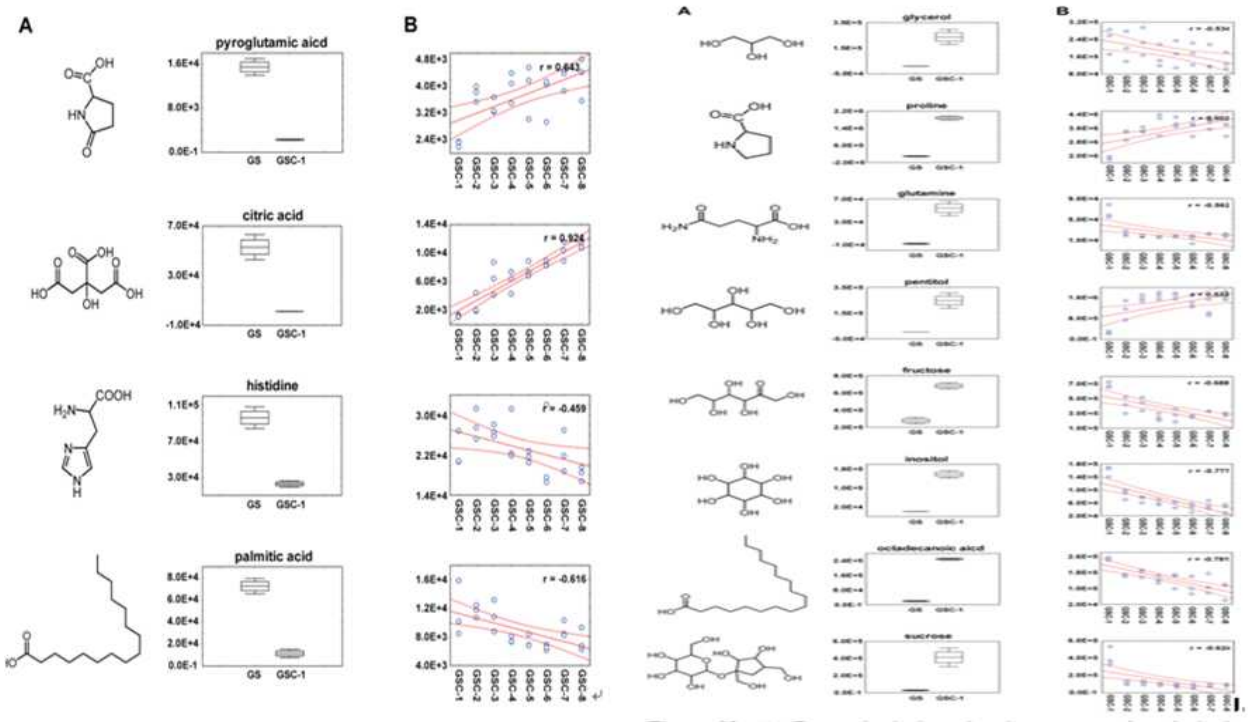


Fig. 19. 발아대두 동충하초의 배양 시기별 1차 대사산물 변화

2. LC/MS/MS 이용한 발아대두 동충하초의 배양 시기별 대사체의 변화를 분석한 결과 0주차 배양 샘플과 1, 2주 배양 샘플, 그리고 3~8주간 배양 샘플간의 유의한 차이를 나타냈으며 이를 통해 세 그룹(0주배양, 1~2주배양, 3~8주 배양)간의 확연한 대사체의 변화를 확인하였음. GC/MS를 이용한 대사체 변화 분석 결과 0주배양, 2주배양, 3~8주 배양간의 대사체 변화를 확인할 수 있었음.

3. LC/MS/MS를 이용하여 발아대두 동충하초의 대사체 분석결과 Compound 1~4(CGNMⅠ, CGNMⅡ, CDGM, CGLM)을 포함한 2차대사산물을 확인 할 수 있었으며, GC/MS 분석결과 발아대두 동충하초에 기여하는 1차 대사산물을 분석 할 수 있었음.

4. PCA분석을 통해 가장 급격하게 대사체 변화를 보인 배양 시기(0주차, 1주차)를 선별하여 OPLS-DA분석을 하여 통계적으로 유의성 있게 차이를 보이는 대사체를 확인함. 이를 발효 시간별로 분석하여 변화패턴을 확인함.

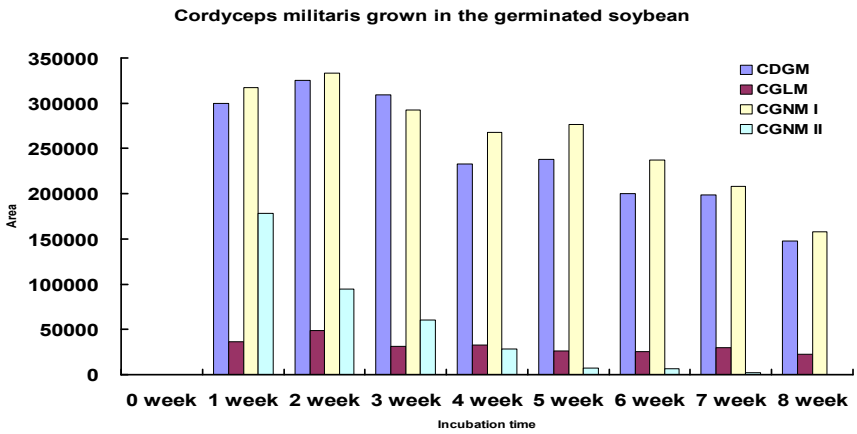


Fig. 20. LC/MS/MS 분석을 통한 4가지 생리활성 추정 물질의 배양 시간별 함량 변화

5. LC/MS/MS 성분 분석을 이용하여 4가지 생리활성 물질로 추정되는 화합물의 배양 시간별 함량을 측정한 결과 발아대두 동충하초의 1~2주 배양 샘플이 가장 높은 함량을 나타냈으며 이는 배양 시간이 증가할수록 줄어 드는 것을 확인 하였음.

제 8 절 발아 대두 동충하초의 배양 시간별 최적 항산화 효과 검정

1. 발아대두 동충하초의 배양 시기별 최적 항산화 효과를 확인하기 위하여 DPPH와 ABTS라디칼 소거 활성을 측정하였으며 FRAP 측정을 수행하였다.

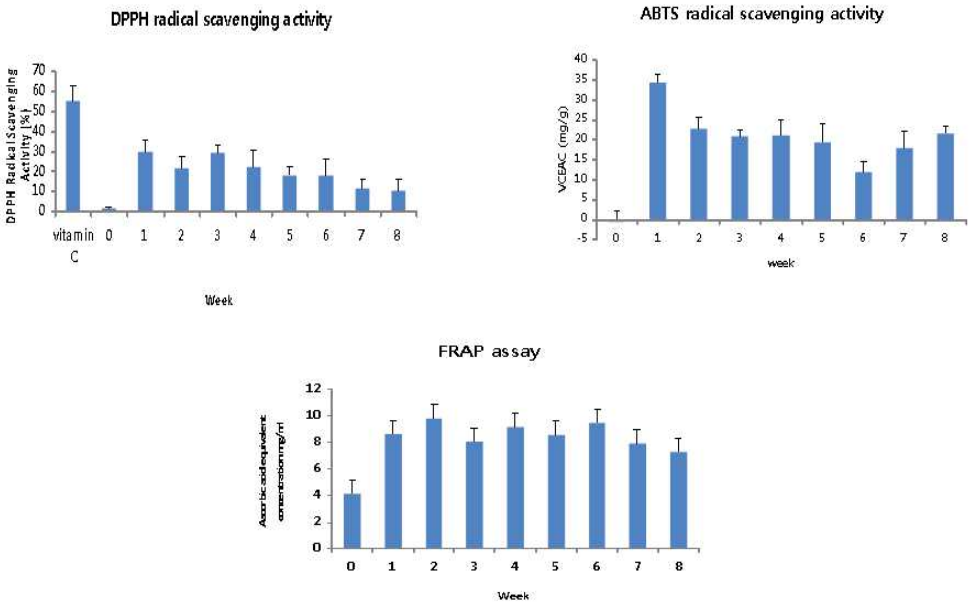


Fig. 21. 발아대두 동충하초 배양시간별 항산화 효과 측정

2. 발아대두 동충하초 배양시간별 항산화 효과 측정결과 배양 1~2주에서 라디칼 소거 활성이 가장 높음을 확인 할 수 있었으며, FRAP 측정을 통해 배양 시간이 길어질수록 항산화 효과가 떨어짐을 확인할수 있었음.

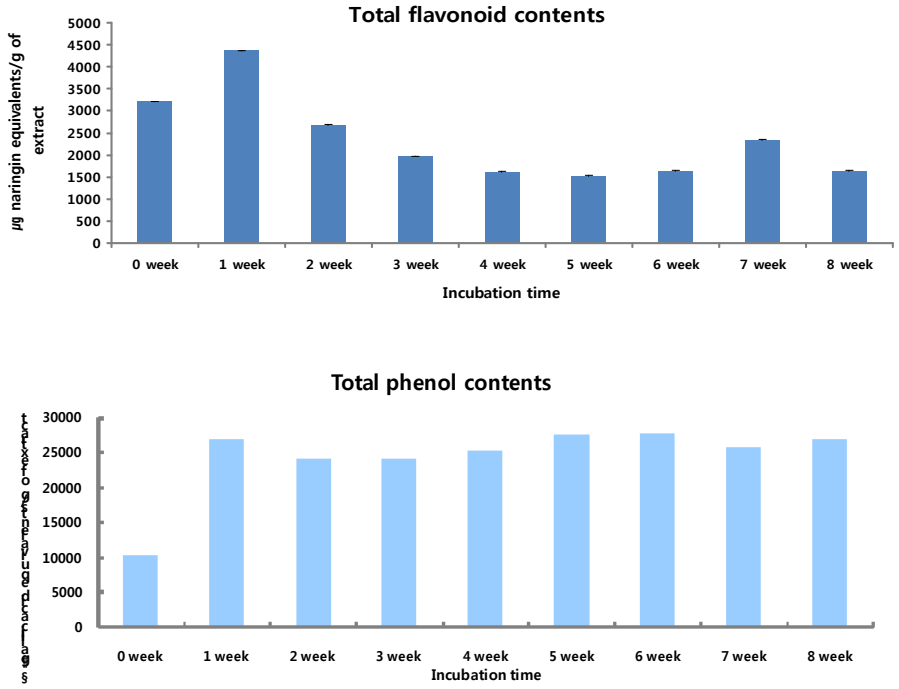


Fig. 22. 배양 시간별 총 플라보노이드 함량의 변화와 총 페놀릭컴파운드 함량의 변화

3. 발아대두 동충하초의 배양 시간별 총 플라보노이드 화합물의 함량과 총 페놀릭 화합물의 함량 변화를 측정한 결과 페놀릭 화합물의 총 함량은 배양 시간에 영향을 받지 않으나 플라보노이드 화합물의 함량은 1~2주 배양이 가장 높음을 확인 하였음.

4. 발아대두 동충하초의 배양 시기별 생리활성 물질의 최적함량 비율은 대사체학적 관점에서의 다변량 통계 분석 법과 플라보노이드와 페놀릭 화합물의 총 함량 변화를 측정한 결과 1~2주 배양이 가장 높은 것으로 결정 되었음.

5. 발아대두 동충하초의 배양 기간별 대사체 변화와 생리활성 물질의 함량 변화 그리고 항산화 효과를 확인 한 결과 생리활성 물질의 최적 함량 시기와 비율을 결정 할 수 있었음.

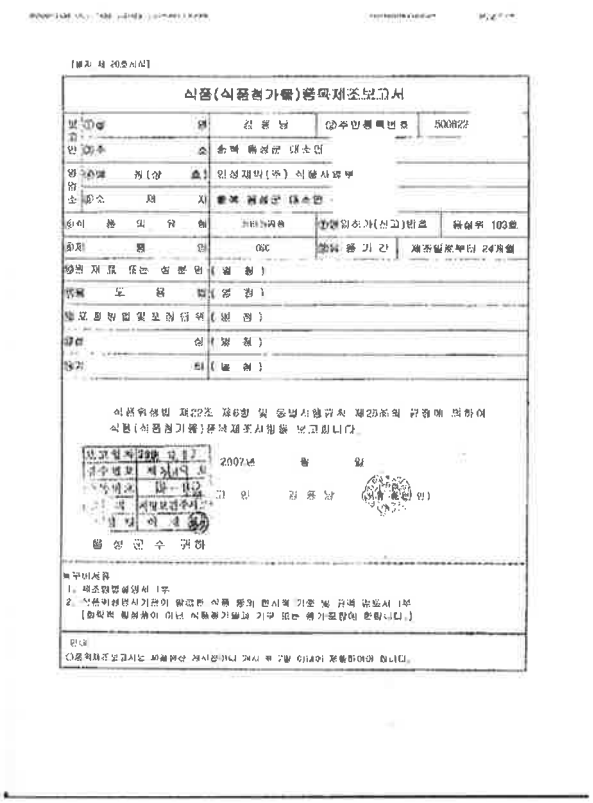
제 9 절 Bio newtraceutical 개발

1. 발아대두 동충하초의 효소화공정

발아대두 동충하초의 소화흡수율 및 유효성을 높이기 위해 발아대두 동충하초를 조분쇄한 다음 ASP. org를 37℃, 습도 78% 조건하에서 72시간 발효시킨 다음 35-37℃에서 저온 진공 건조기(본사에서 새로 개발된 건조기 : ARI Dryer)에서 건조한 다음 본말화하여 저온에서 과립화하여 제품의 원료로 사용한다.

2. 원료의 안전 및 안정성 검증

다음과 같은 공정에 의해 생산된 원료 GSC(Germinated Soybean Cordycepen)에 대해 제품화를 위해서 품목제조에 필요한 시험을 열량외 미생물 등을 검사하였다.



[별지 제 20호서식]

식품(식품첨가물)품목제조보고서

보고인	명	김 용 남	②주민등록번호 500822
업소	소	충북 옥천군 대소면	
영업의 종류	업	인성제약(주) 식품사업부	
소재지	지	충북 옥천군 대소면	
신고 또는 허가 유형		최초신고(허가)	변경신고(신고)반드시 해당 103호
유효기간	간	2년	제조일로부터 24개월
영업의 종류 또는 성분명		(결 정)	
제품 도형	형	(정 제)	
제조 방법 및 포장 형태		(분 말)	
색깔	상	(황 색)	
냄새	취	(특 이)	

식품위생법 제22조 제3항 및 동법시행규칙 제23조의 규정에 의하여 식품(식품첨가물)품목제조사항을 보고합니다.

2007년 월 일

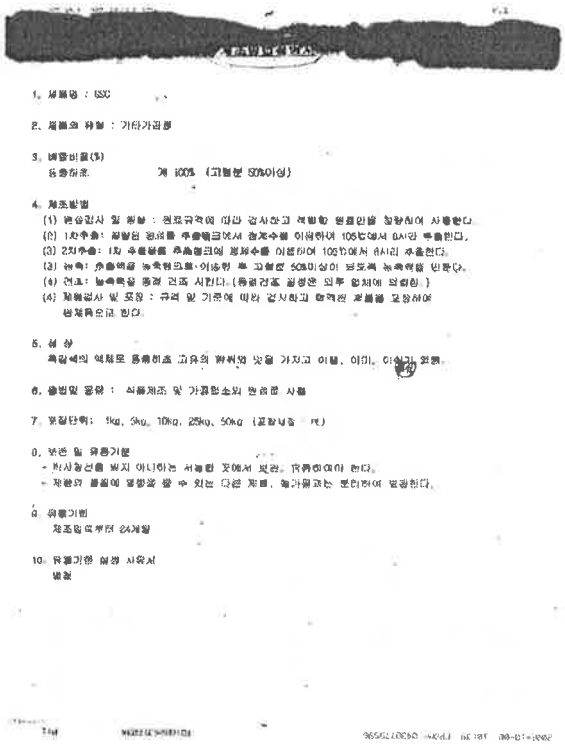
보고인 김 용 남 (인)

시장·군수·구청장 귀하

보고필증 교부	
접수번호	제 호
접수	년 월 일
처리	시장보고주시
담당	이 재

첨부서류
1. 제조방법설명서 1부
2. 식품위생법시행규칙 별표4 식품 등의 표시의 기준 및 규격 검토서 1부
[화학적 합성품이 아닌 식품첨가물과 기구 또는 용기포장의 경우 제외합니다.]

유의사항
①품목제조보고서도 제출하신 제시장에서 검사 후 같은 이내의 보통하여야 합니다.



1. 제품명 : SSC

2. 제품의 유형 : 기타가공품

3. 배합비율(%)
원종원료 계 100% (고형분 50%이상)

4. 제조방법
(1) 원료검사 및 준비 : 원료규격에 따라 검사하고 적합한 원료인지 확인하여 사용한다.
(2) 1차추출 : 정량된 원료를 추출탱크에서 정제수를 이용하여 105℃에서 8시간 추출한다.
(3) 2차추출 : 1차 추출물을 추출탱크에 정제수를 이용하여 105℃에서 8시간 추출한다.
(4) 농축 : 추출액을 농축탱크로 이송한 후 고형분 50%이상이 되도록 농축액을 만든다.
(5) 건조 : 농축액을 증발 건조 시킨다. (품질검토 결정은 외부 업체에 의뢰함.)
(6) 제품검사 및 포장 : 규격 및 기준에 따라 검사하고 적격한 제품을 포장하여 완제품으로 한다.

5. 성 상
특징색의 액체로 특유하고 고유의 향취와 맛을 가지고 이물, 이취가 없을.

6. 용법및 용량 : 식품제조 및 가공업소의 원료로 사용

7. 포장단위: 1kg, 5kg, 10kg, 25kg, 50kg (골판상자 포)

8. 보존 및 유통기한
- 직사광선을 피하고 서늘한 곳에서 보관. 변질하여야 한다.
- 제품과 품질에 영향을 줄 수 있는 다른 제품, 화학물과는 분리하여 보관한다.

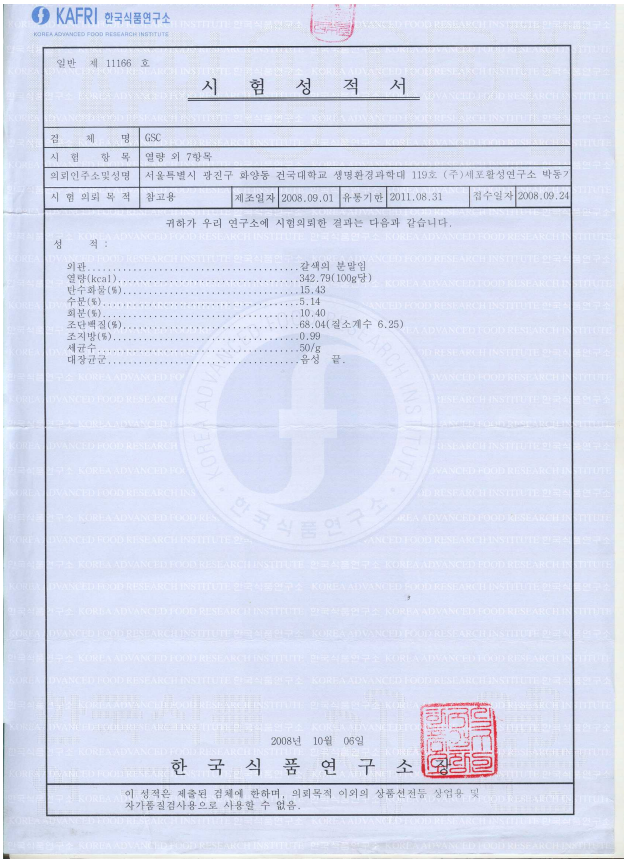
9. 유통기한
제조일로부터 24개월

10. 유통기한 설정 사유서
별첨

Fig 22. 품목제조 보고서

Fig 23. 제조 방법

2017/03/27 15:26-운영지원과/이지애



KAFRI 한국식품연구소
KOREA ADVANCED FOOD RESEARCH INSTITUTE

일반 제 11166 호

시 험 성 적 서

검 체 명	GSC						
시 험 항 목	열량 외 7항목						
의뢰인주소및성명	서울특별시 광진구 화양동 건국대학교 생명환경과학대 119호 (주)세포활성연구소 박동기						
시 험 의뢰 목 적	참고용	제조일자	2008.09.01	유통기한	2011.08.31	접수일자	2008.09.24

귀하가 우리 연구소에 시험의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

성 적 :

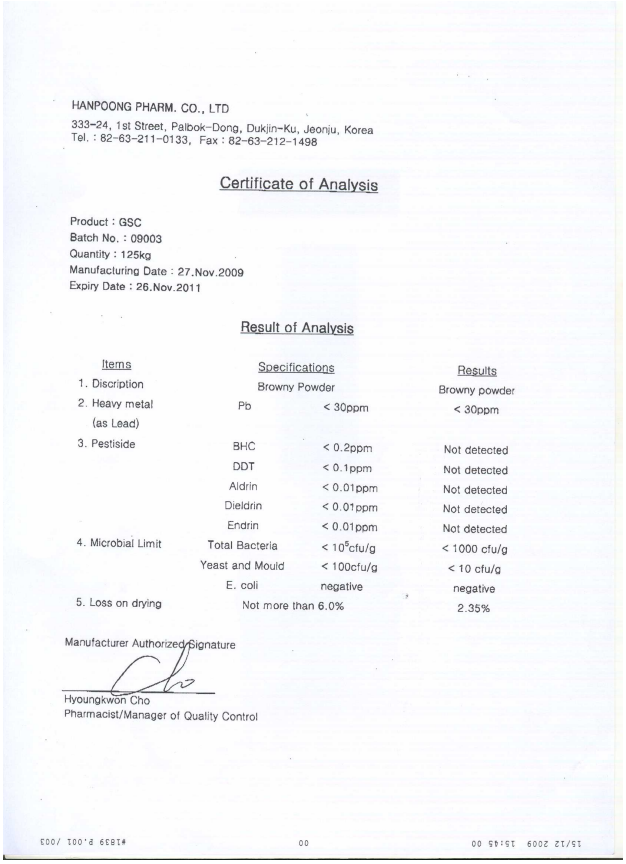
외관	갈색의 분말임
열량(kcal)	342.79(100g당)
탄수화물(%)	15.43
수분(%)	5.14
회분(%)	10.40
조단백질(%)	68.04(질소계수 6.25)
조지방(%)	0.99
세균수	50/g
대장균군	음성 끝.

2008년 10월 06일

한 국 식 품 연 구 소

이 성적은 제출된 검체에 한하며, 의뢰목적 이외의 상품선전등 상업용 및 자가품질검사용으로 사용할 수 없음.

Fig 24. GSC에 대한 성분 및 미생물 검사결과



HANPOONG PHARM. CO., LTD
333-24, 1st Street, Palbok-Dong, Dukjin-Ku, Jeonju, Korea
Tel. : 82-63-211-0133, Fax : 82-63-212-1498

Certificate of Analysis

Product : GSC
Batch No. : 09003
Quantity : 125kg
Manufacturing Date : 27.Nov.2009
Expiry Date : 26.Nov.2011

Result of Analysis

Items	Specifications		Results
1. Discription	Browny Powder		Browny powder
2. Heavy metal (as Lead)	Pb	< 30ppm	< 30ppm
3. Pestiside	BHC	< 0.2ppm	Not detected
	DDT	< 0.1ppm	Not detected
	Aldrin	< 0.01ppm	Not detected
	Dieldrin	< 0.01ppm	Not detected
	Endrin	< 0.01ppm	Not detected
4. Microbial Limit	Total Bacteria	< 10^5cfu/g	< 1000 cfu/g
	Yeast and Mould	< 100cfu/g	< 10 cfu/g
	E. coli	negative	negative
5. Loss on drying	Not more than 6.0%		2.35%

Manufacturer Authorized Signature

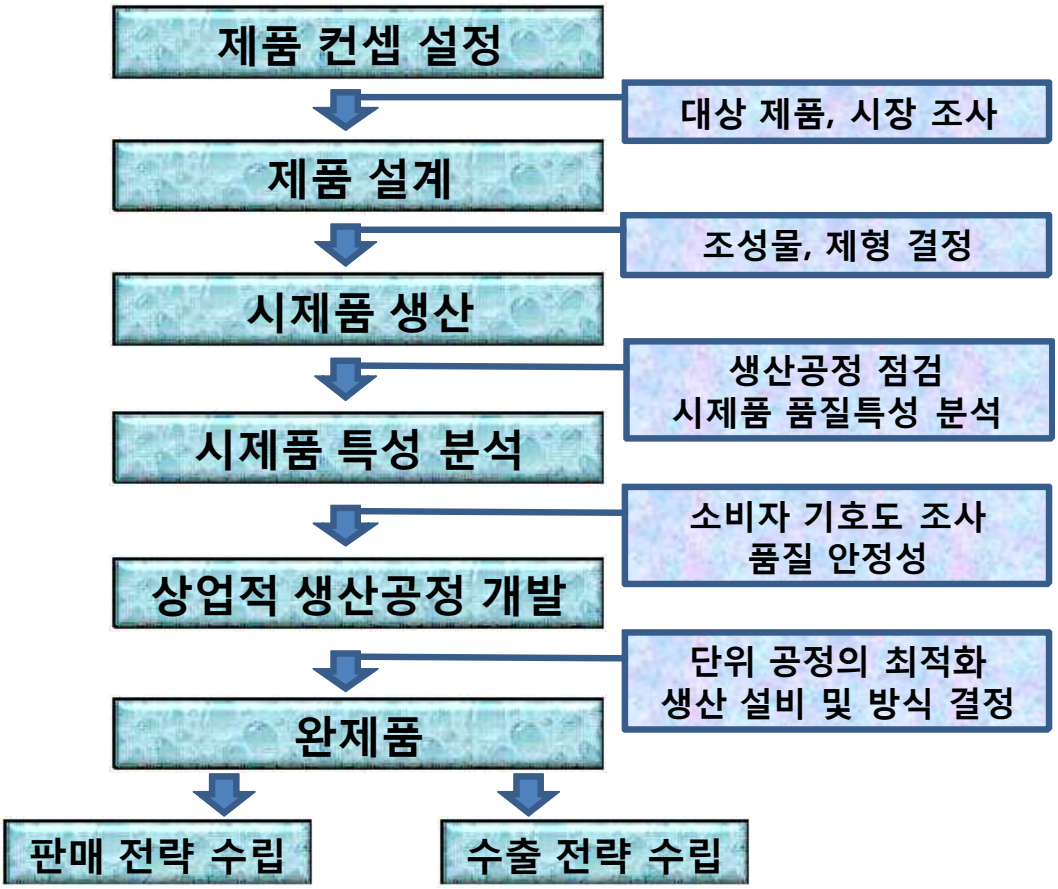
Hyoungkwon Cho
Pharmacist/Manager of Quality Control

Fig 25. 잔류 농약 검사 결과

제 10 절 제품개발

1. 제품개발에 앞서 다음과 같은 사업화 전략을 수립한 제품

<실용화 사업화 전략>



대상 제품에 대해 가격대, 소비자 기호도 등 시장조사를 통해서 개발 제품의 컨셉을 설정한 다음 조성물의 비율, 제형 등을 고려하여 제품설계에 들어간다. 이를 바탕으로 생산공정을 점검하고 시제품을 생산한다.

생산된 시제품에 대하여 소비자의 기호도, 품질의 안정성 등 시제품의 특성을 분석하고, 단위공정의 최적화 조건 설정, 생산 설비 및 방식 등을 결정하여 분 생산에 들어간다. 개발된 제품에 대해 판매 및 수출 전략을 수립한다.

2. 제품개발

발아대두 동충하초 추출분말에 대해서는 일본 제일약품공업 주식회사에서 원료를 수집하여 「판테민」이라는 상품명과 「이뮤노페린」이란 제품명으로 판매 중이며, 발아대두 동충하

초를 조분쇄한 다음 발효과정을 거쳐 과립화한 원료를 이용해서 국내에서 「우리정」이라 상표를 판매 중에 있다.

판테민

이뮤노페린

우리정

제 11 절 발아대두 동충하초 유래 생리활성물질의 분리 조건 확립

발아대두 동충하초 유래 생리 활성 물질의 최적 분리 조건을 확립하기 위해 분쇄된 발아대두 동충하초 샘플을 80% MeOH로 추출하여 이를 극성에 따른 용매를 이용하여 분획하였고 이들을 silica와 sephadex LH20을 통해 순수 화합물로 분리해 내었다(Fig 26).

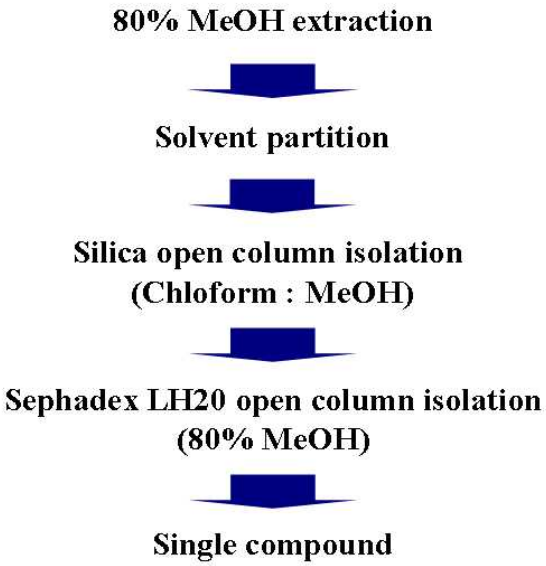


Fig 26. 발아대두 동충하초 유래 생리활성 물질 분리 모식도

확립된 분리 조건으로 대두의 추출물을 얻어 내어 발아 대두 동충하초 추출물의 성분과 비교 분석하여 기존의 대두 성분과 차이가 나는 3개의 화합물을 확인하였다(Fig 27).

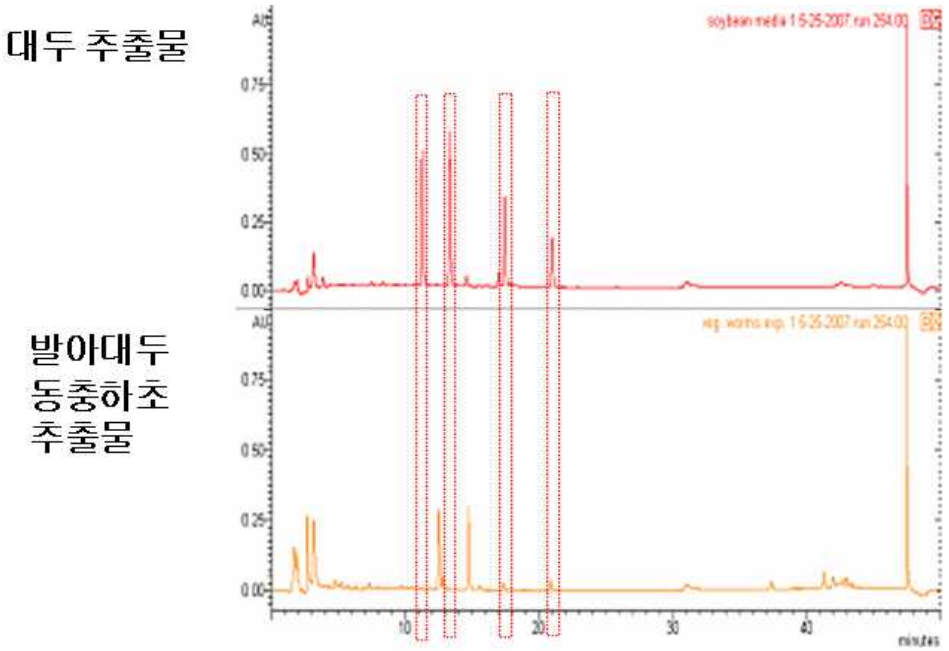


Fig 27. 대두 성분 추출물과 발아대두 동충하초 유래 추출물을 LC/MS/MS를 통해 비교 분석

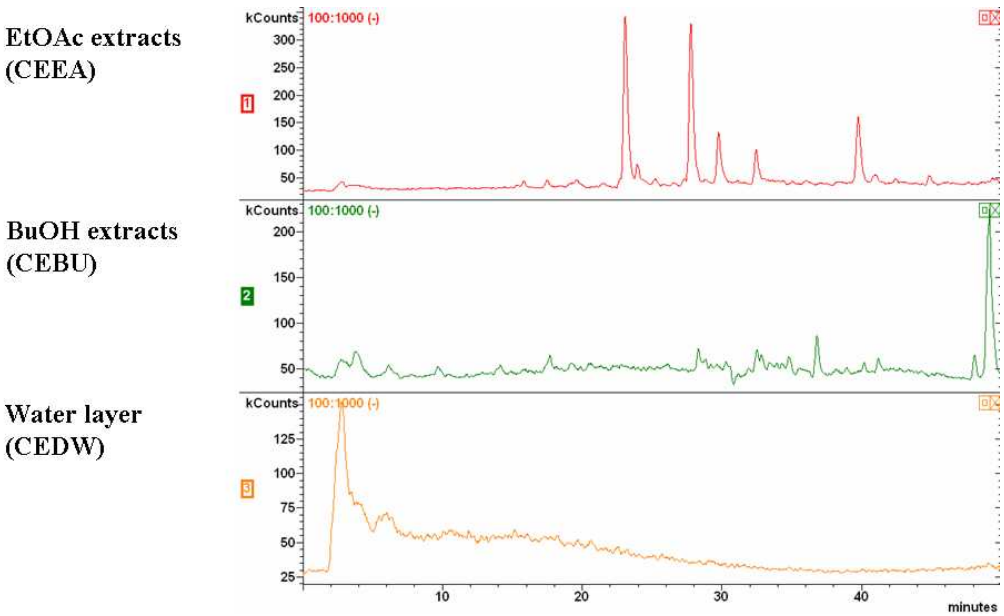


Fig 28. 유기 용매로 분획된 발아 대두 동충하초 추출물의 LC/MS/MS 분석 Total ion chromatogram

제 12 절 발아대두 동충하초 유래 생리활성물질로 추정되는 화합물의 구조 결정

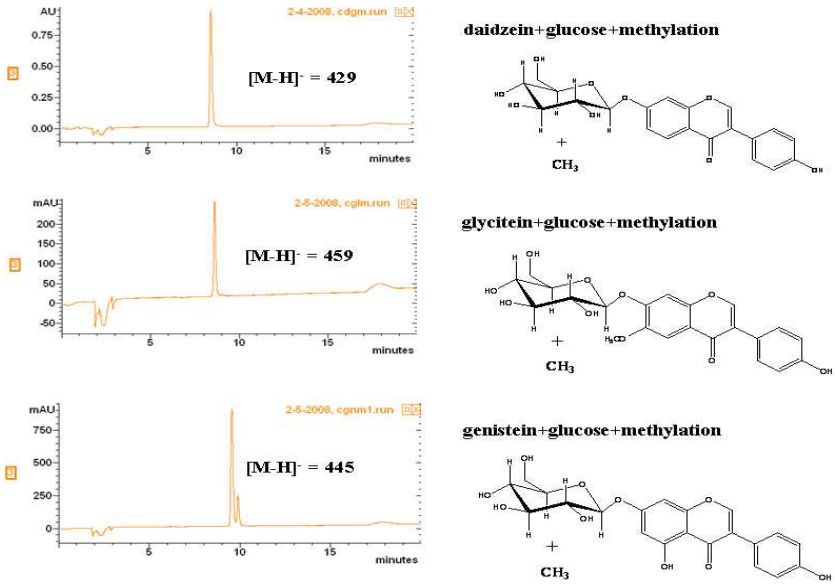


Fig 29. 분리된 순수 화합물의 LC/MS/MS 분석 결과와 예측 구조

1. LC/MS/MS 분석을 통해 발아대두 동충하초에서 생리활성물질로 추정되는 4개 화합물을 1D, 2D-NMR과 FAB-MS를 이용하여 구조 분석 및 결정

Table 4. 분리된 순수 화합물의 NMR 구조 분석 결과

CGLM	^{1}H	^{13}C	dept	HMBC	FAB-MS (*m/z*)
2	8.18 s	155.0	CH	C_3(124.3), C_4(177.9), $C_{1'}$(125.7)	
3		124.3	C		$[M+H]^+$=447.1483
4		177.9	C		Calcd for $C_{23}H_{23}O_{10}$ 447.1448
5	7.59 s	106.2	CH	C_4(177.9), C_6(149.5), C_7(153.6), C_9(153.5)	
6		149.5	C		
7		153.6	C		
8	7.29 s	105.3	CH	C_9(149.5), C_7(153.6), C_9(153.5), C_{10}(119.8)	
9		153.5	C		
10		119.8	C		
1′		125.7	C		
2′	7.39 dd, $J_{2'-3'}$= 9.0 Hz, $J_{2'-5'}$= 2.0 Hz	131.5	CH	$C_{1'}$ (125.7), $C_{4'}$ (158.8)	
3′	6.86 dd, $J_{2'-3'}$= 8.5 Hz, $J_{3'-5'}$= 2.0 Hz	116.4	CH	C_3(124.3)	
4′		158.8	C		
5′	6.86 dd, $J_{5'-6'}$= 8.5 Hz, $J_{3'-5'}$= 2.0 Hz	116.4	CH	C_3(124.3)	
6′	7.39 dd, $J_{5'-6'}$= 9.0 Hz, $J_{2'-6'}$= 2.0 Hz	131.5	CH	$C_{1'}$ (125.7), C_4 (158.8)	
1″	5.12 d, $J_{1''-2''}$= 7.5 Hz	101.8	CH	C_7(153.6)	
2″	3.54t	74.8	CH	$C_{3''}$ (77.9)	
3″		77.9	CH		
4″	3.21 t	80.6	CH	$C_{7''}$ (61.0)	
5″		77.5	CH		
6″		62.1	CH_2		
CH_3(7′-)	3.59 s	61.0	CH_3	$C_{4''}$ (80.6)	
6-OCH_3	3.94 s	56.9	CH_3	C_6(149.5)	

CDGM	^{1}H	^{13}C	dept	HMBC	FAB-MS (*m/z*)
2	8.19 s	155.1	CH	C_3(124.2), C_4(178.2), C_9(159.3), $C_{1'}$ (126.3)	
3		124.2	C		$[M+H]^+$=431.1406
4		178.2	C		Calcd for $C_{22}H_{23}O_9$ 431.1342
5	8.14 d, $J_{5,6}$= 7.5 Hz	128.4	CH	C_4(178.2), C_7(163.5)	
6	7.20 dd, $J_{5,6}$ = 9.0 Hz, $J_{6,8}$ = 2.5 Hz	117.1	CH	C_7(163.5), C_9(105.5), C_{10}(120.3)	
7		163.5	C		
8	6.31 d, $J_{6,8}$ = 2.5 Hz	105.0	CH	C_6(117.1), C_7(163.5), C_9(159.3), C_{10}(120.3)	
9		159.3	C		
10		120.3	C		
1′		126.3	C		
2′	7.38 dd, $J_{2'-3'}$= 8.0 Hz, $J_{2'-6'}$= 2.0 Hz	131.5	CH	$C_{1'}$ (126.3), $C_{4'}$ (158.9)	
3′	6.86 dd, $J_{2'-3'}$= 7.5 Hz, $J_{3'-5'}$= 2.0 Hz	116.4	CH	$C_{1'}$ (126.3), $C_{4'}$ (158.9)	
4′		158.9	C		
5′	6.86 dd, $J_{5'-6'}$= 7.5 Hz, $J_{3'-5'}$= 2.0 Hz	116.4	CH	$C_{1'}$ (126.3), $C_{4'}$ (158.9)	
6′	7.38 dd, $J_{5'-6'}$= 8.0 Hz, $J_{2'-6'}$= 2.0 Hz	131.5	CH	$C_{1'}$ (126.3), $C_{4'}$ (158.9)	
1″	5.09 d, $J_{1''-2''}$= 8.0 Hz	101.7	CH	C_7(163.5)	
2″	3.54t	75.0	CH	$C_{3''}$ (78.0), $C_{1''}$ (101.7)	
3″		78.0	CH		
4″	3.21 t	80.6	CH	$C_{7''}$ (61.0), $C_{5''}$ (77.5)	
5″		77.5	CH		
6″		62.1	CH_2		
CH_3(7′-)	3.59 s	61.0	CH_3	$C_{4''}$ (80.6)	

CGNM II	^{1}H	^{13}C	dept	HMBC	FAB-MS (*m/z*)
2	8.07 s	153.5	CH	C_3(122.7), C_4(180.4), C_9(158.4), $C_{1'}$(125.0)	
3		122.7	C		$[M+H]^+$=447.1291
4		180.4	C		Calcd for
5		162.3	C		$C_{22}H_{23}O_{10}$ 447.1291
6	6.19 d, $J_{6,8}$ = 2.0 Hz	99.3	CH	C_8(93.8), C_{10}(104.4)	
7		166.2	C		
8	6.31 d, $J_{6,8}$ = 2.0 Hz	93.8	CH	C_6(99.3), C_7(166.2), C_9(158.4), C_{10}(104.4)	
9		158.4	C		
10		104.4	C		
1′		125.0	C		
2′	7.48 dd, $J_{2',3'}$= 8.0 Hz, $J_{2',6'}$= 2.0 Hz	129.8	CH	C_3(122.7), $C_{4'}$(157.6)	
3′	7.15 dd, $J_{2',3'}$= 7.5 Hz, $J_{3',5'}$= 2.0 Hz	116.2	CH	$C_{1'}$(125.0), $C_{4'}$(157.6)	
4′		157.6	C		
5′	7.15 dd, $J_{5',6'}$= 7.5 Hz, $J_{3',5'}$= 2.0 Hz	116.2	CH	$C_{1'}$(125.0), $C_{4'}$(157.6)	
6′	7.48 dd, $J_{5',6'}$= 8.0 Hz, $J_{2',6'}$= 2.0 Hz	129.8	CH	C_3(122.7), $C_{4'}$(157.6)	
1″	4.93 d, $J_{1''-2''}$ = 8.0 Hz	100.6	CH	$C_{4''}$(157.6)	
2″	3.48 t	73.6	CH	$C_{3''}$(76.5), $C_{1''}$(100.6)	
3″		76.5	CH		
4″	3.19 t	79.1	CH	$C_{7''}$(59.4)	
5″		75.8	CH		
6″		60.6	CH_2		
CH_3(7′-)	3.59 s	59.4	CH_3	$C_{4''}$(79.1)	

CGNM I	^{1}H	^{13}C	dept	HMBC	FAB-MS (*m/z*)
2	8.07 s	155.4	CH	C_3(123.2), C_4(182.6), C_9(159.3), $C_{1'}$(125.1)	
3		123.2	C		$[M+H]^+$=447.1324
4		182.6	C		Calcd for
5		163.7	C		$C_{22}H_{23}O_{10}$ 447.1291
6	6.50 d, $J_{6,8}$ = 2.0 Hz	101.2	CH	C_7(164.8), C_8(95.9), C_{10}(108.1)	
7		164.8	C		
8	6.68 d, $J_{6,8}$ = 2.0 Hz	95.9	CH	C_6(101.2), C_7(164.8), C_9(159.3), C_{10}(108.1)	
9		159.3	C		
10		108.1	C		
1′		125.1	C		
2′	7.39 dd, $J_{2',3'}$= 8.5 Hz, $J_{2',6'}$= 2.0 Hz	131.5	CH	$C_{1'}$(125.1), $C_{4'}$(159.0)	
3′	6.86 dd, $J_{2',3'}$= 8.5 Hz, $J_{3',5'}$= 2.0 Hz	116.4	CH	$C_{1'}$(125.1), $C_{4'}$(159.0)	
4′		159.0	C		
5′	6.86 dd, $J_{5',6'}$= 8.5 Hz, $J_{3',5'}$= 2.0 Hz	116.4	CH	$C_{1'}$(125.1), $C_{4'}$(159.0)	
6′	7.39 dd, $J_{2',3'}$= 8.5 Hz, $J_{2',6'}$= 2.0 Hz	131.5	CH	$C_{1'}$(125.1), $C_{4'}$(159.0)	
1″	5.03 d, $J_{1''-2''}$ = 7.5 Hz	101.8	CH	C_7(164.8)	
2″	3.48 t	74.8	CH	$C_{3''}$(78.0), $C_{1''}$(101.8)	
3″		78.0	CH		
4″	3.19 t	80.6	CH	$C_{7''}$(61.0), $C_{3''}$(77.5)	
5″		77.5	CH		
6″		62.1	CH_2		
CH_3(7′-)	3.59 s	61.0	CH_3	$C_{4''}$(80.6)	

2. 4가지 생리활성물질로 추정 되는 화합물의 구조 결정 완료.

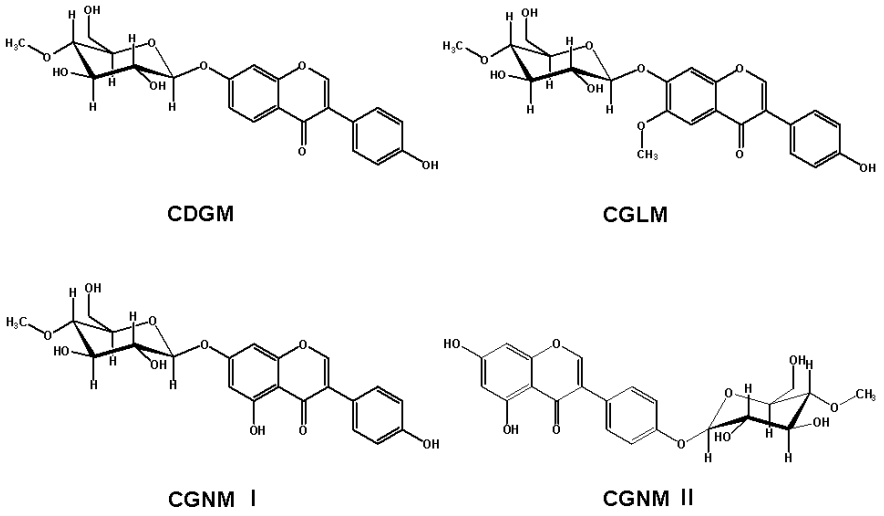


Fig. 30. 발아대두 동충하초 유래 생리활성 추정 물질의 구조

3. 4가지 생리활성물질로 추정되는 화합물의 이화학적 특성.

발아대두 동충하초에서 생리활성 물질로 추정 되는 4개 화합물을 LC/MS/MS spectrum 분석과 Mass Frontier software를 이용한 fragmentation pattern 분석을 통해 화합물의 이화학적 특성을 규명함. 이러한 결과를 바탕으로 본 화합물들의 구조 특성을 이화학적 특성과 더불어 확인하였음.

Table 2. 새로운 methylated isoflavone glucoside의 mass fragmentation pattern

No.	Chemical name	$[M-H]^-$	Mass fragmentation
1	**CDGM**	429	429, 252>>252, 223, 196, 135, 91
2	**CGLM**	459	459, 283>>267, 237, 212, 136, 92
3	**CGNM Ⅰ**	445	445, 269>>253, 238, 226, 195, 177, 135
4	**CGNM Ⅱ**	445	445, 269>>253, 238, 226, 195, 177, 135

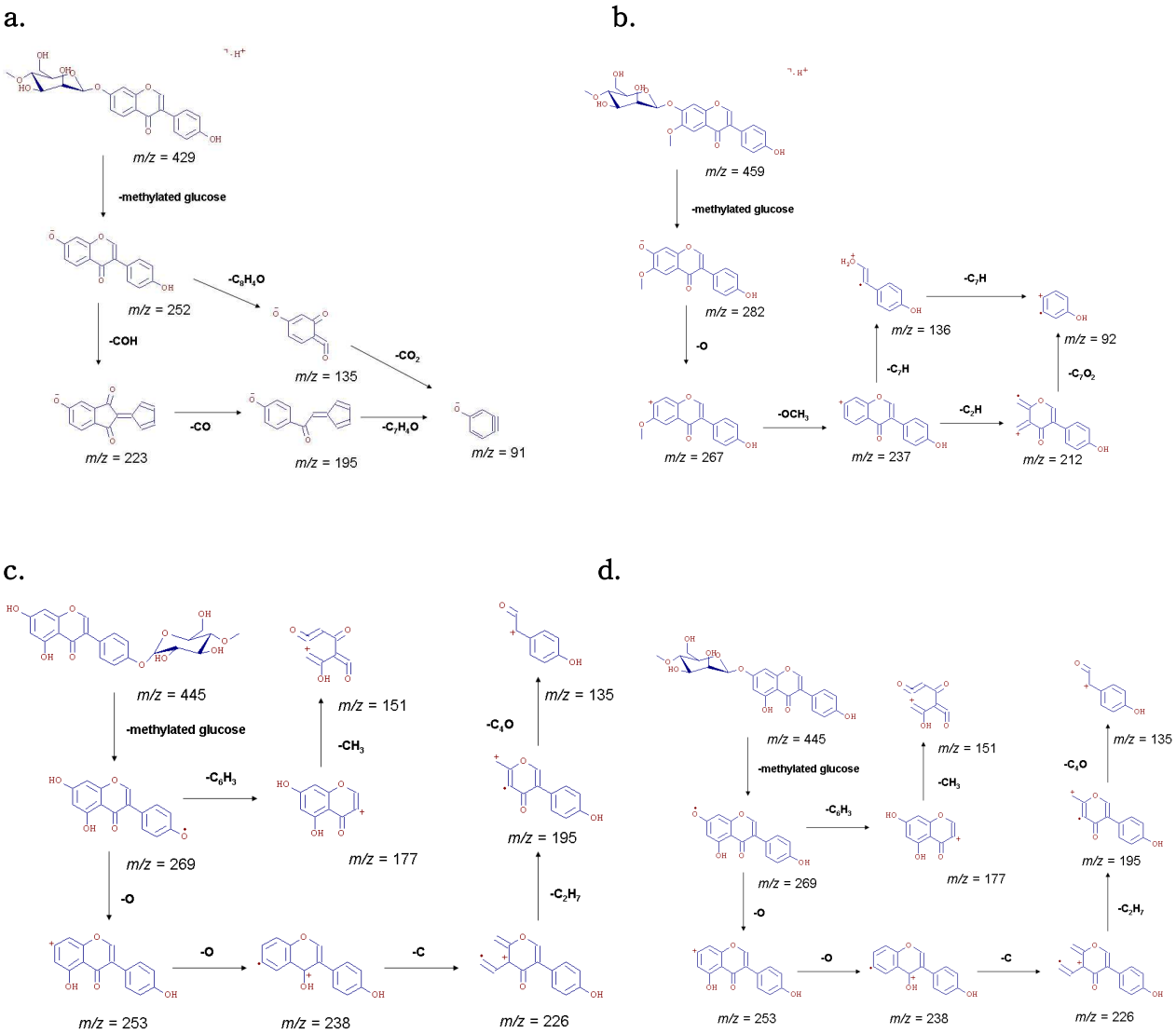


Fig 31. LC-ESI-IT-MS를 이용한 새로운 methylated isoflavone glucoside의 proposed fragmentation pathways. a; CDGM, b; CGLM, c; CGNM Ⅰ, d; CGNMⅡ.

제 13 절 발아대두 동충하초 추출물질의 효능

1. 대식세포에서의 항염증 효과

1-1. 발아대두 동충하초 추출물질의 항염증효과분석

인간대식세포(human monocytic cell line THP-1)에서 대식세포의 염증 반응에서 나타내는 여러 징후 가운데 하나인 MMP-9 activity를 zymography로 확인함.
세균성 내독소인 lipopolysaccahride (LPS)에 의해 유도된 MMP-9의 활성이 처리한 동충하초 추출물에 의해 농도 의존적으로 저해됨을 확인하였으며 세포독성 여부를 MTS assay로 확인한 결과 세포독성은 없는 것을 확인함.

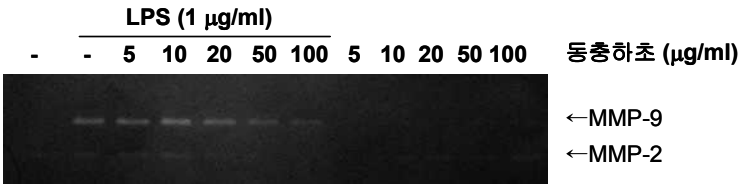


Fig. 32. 인간대식세포에서 LPS로 유도된 MMP-9의 활성저해 효과

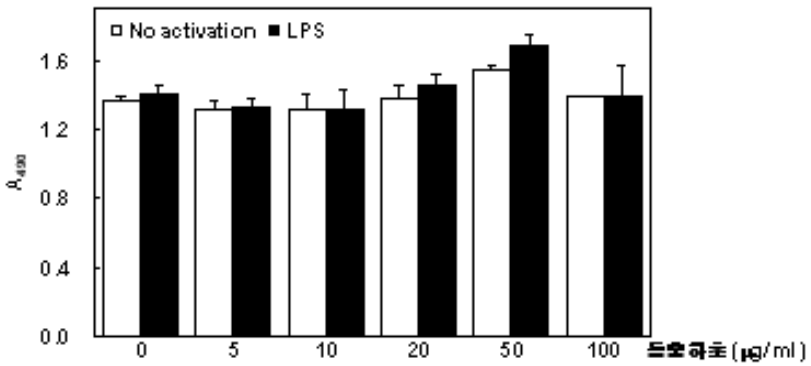


Fig. 33. 동충하초에 의한 인간대식세포의 세포독성

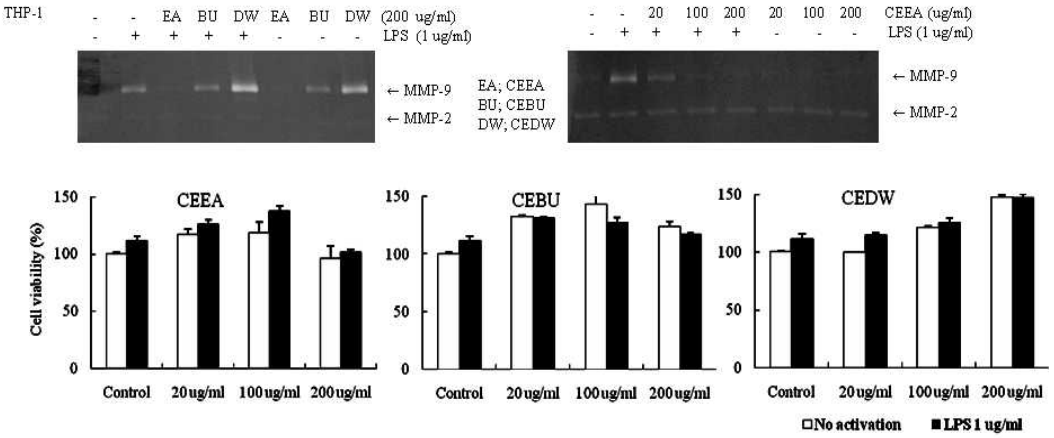


Fig.34 대식세포에서(THP-1)에서LPS로유도한MMP-9발현및세포활성평가

대식세포에서 LPS(세포내독소)로 유도되는 MMP-9의 발현저해를 Gelatin zymogram의 방법을 이용하여 확인해 본 결과, 전 처리한 발아대두 동충하초 추출물질 EA와 CEEA가 LPS로 유도되는 MMP-9의 발현을 Control과 유사 수준으로 저해됨을 확인 할 수 있었으며, 항염증 효과는 처리한 동충하초 추출물질에 농도 의존적임을 확인함(발아대두 동충하초 추출물질의 독성과 자체 MMP-9 발현의 유도를 보이지 않음).

1-2. 배양 시간별 동충하초 추출물질의 항염증 효과

사람의 keratinocyte cell line HaCaT 세포에 PMA로 유도된 COX-2 의 발현의 저해양상을 western blot을 통해 살펴본 결과 배양시간에 따른 추출물질에 의해 COX-2의 발현이 유효하게 저해되는 양상을 확인하지 못함.

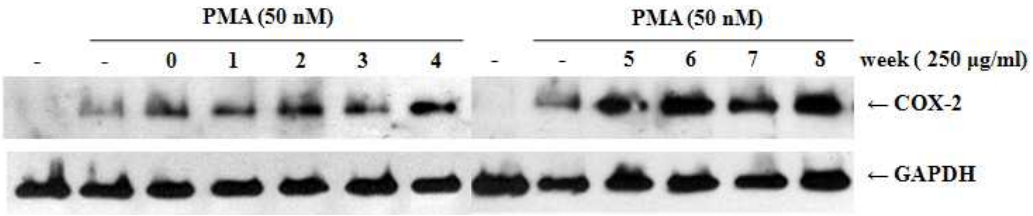


Fig.35 PMA로유도되는COX-2의발현저해

1-3. 동충하초 추출물의 T helper cell의 면역활성 및 항염증 조절기능 효과

동충하초 추출물의 면역증강(T helper cell의 증식) 및 항염증효과를 알아보고자 IL-1에 특이적으로 증식하는 T helper cell line D10S를 이용함. 마우스 T helper cell line D10S에 IL-1 β와 함께 동충하초 추출물을 처리한 후 2일 후 T helper cell의 증식여부를 MTS assay로 확인한 결과, 세포독성은 고농도(100ug/ml)에서 나타나고 이 보다 적은 농도에서는 독성이 없는 것으로 나타났으며 동충하초 추출물 자체에 의한 T helper cell의 증식 활성 효능은 관찰되지 않았으나 동충하초 추출물에 의해 IL-1에 의한 T helper cell line D10S의 증식이 20ug/ml 정도의 농도에서 어느 정도 저해됨을 나타내는 바, 항염증 조절 기능이 있는 것으로 사료됨. 또

한 NK세포(NKO)의 활성화에 미치는 효능을 확인코자 NKO세포의 성장 및 활성화여부를 측정하였으나 확인되지 않아 Cytolytic T cell의 활성화에 의한 타겟 암세포 면역활성 효능 등은 추가확인하지 않음.

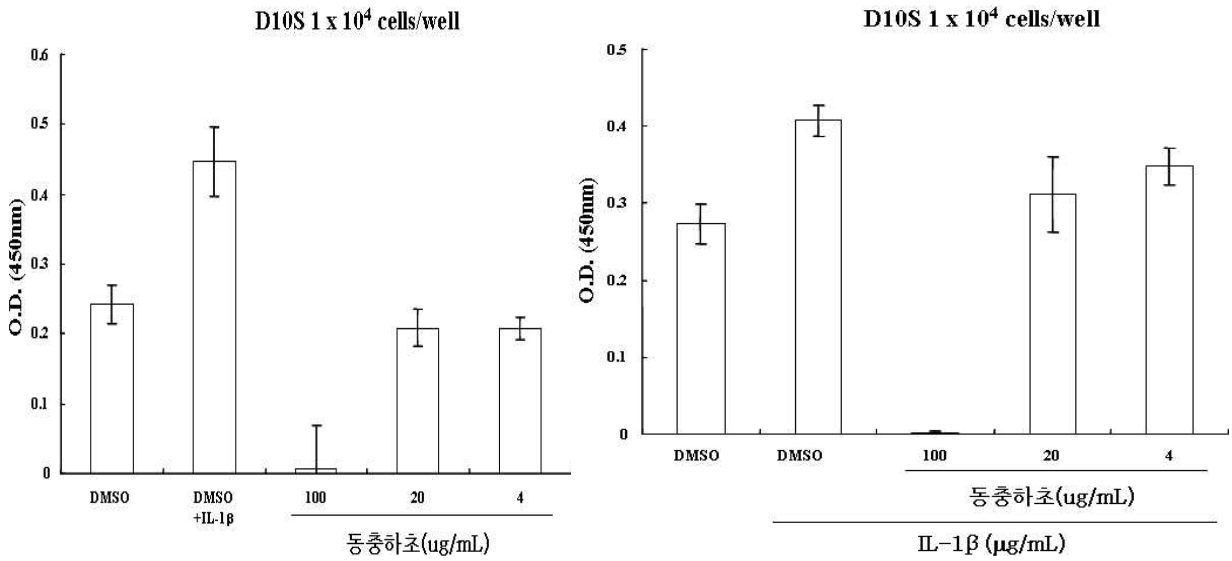


Fig.36.T helper 세포의 증식 및 IL-1에 의한T helper cell line D10S의 증식에 미치는 동충하초의 영향

2. 항암효과

1-1. 대표적인 여성암세포인 유방암(MCF-7, MDA-MB-231)과 자궁경부암세포 SiHa, 그리고 정상 keratinocyte HaCaT세포증식에 미치는 동충하초 추출물의 영향을 MTS assay를 통하여 살펴 본 결과, 배양 시간별 동충하초 추출물질의 항암 효과가 MDA-MB-231암세포의 경우 5-6주 처리 시 약간의 성장 억제를 보였으나 대부분 처리한 농도와 시간대에서 암세포의 세포증식의 감소가 나타나지 않음을 확인함(그림 37A).

배양 시간별 농도별 동충하초 추출물질의 항암 효과를 좀 더 구분하여 분석해 보기 위하여, 동충하초 추출물질 CEEA, CEBU, CEDW들을 사람의 유방암세포, 자궁경부암 세포주에 처리한 결과 CEEA추출물질에서 유방암 세포주 MCF-7의 생장이 어느 정도 억제 되는 것을 MTS assay를 통하여 확인하였으나 대조군인 HaCaT에서는 세포성장의 저해 양상이 관찰되지 않음을 확인함(그림 37B).

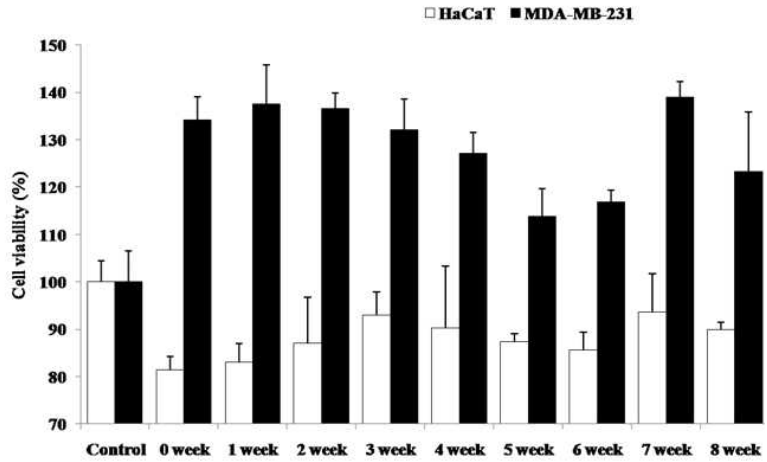


Fig 37A. 유방암 세포MDA-MB-231의 성장에 미치는 배양 시간별 동충하초 추출물질의 영향

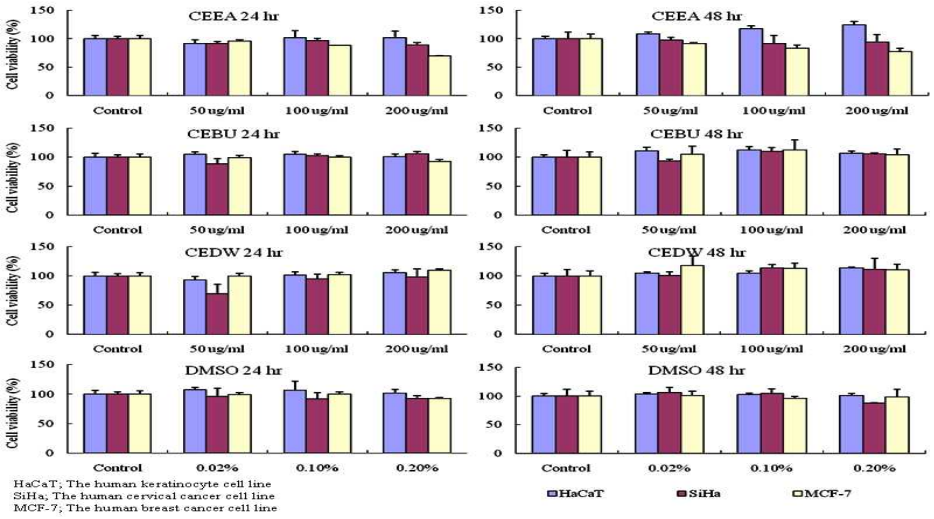


Fig 37B. 세 가지 세포주(HaCaT, SiHa, MCF-7)의 성장에 미치는 발아대두 동충하초 추출물 CEEA, CEBU, CEDW의 농도별 시간별 처리효과

3. 대사성질환 표적인자인 PPAR를 타깃으로 하는 동충하초 추출물질들의 대사조절기능후보인자 탐색

비만, 당뇨 등의 대사성질환조절인자 중 핵수용체 PARɣ는 PPAR ligand가 결합하면 PARɣ의 구조가 변환하면서 핵수용체 coactivator인 SRC-1 등과 결합하여 PPRE (PPAR response element)에 결합, 비만, 당뇨 등의 대사성질환조절인자 들의 유전자 발현을 촉진하게 된다. 핵수용체 PPARɣ와 핵수용체 coactivator인 SRC-1 사이의 결합력을 이용한 면역효소측정법(ELISA)[9]을 이용, PARɣ와 핵수용체 coactivator인 SRC-1 사이의 결합을 증가시키는 PPAR ligand 촉진제로서의 가능여부를 PPARs 촉진제 탐색법으로 1차 분석하여 본 바, 동충하초 추출물질들 중 대사성질환 표적인자

인 PPAR ligand 역할을 하는 물질이 검출되지는 않았음.

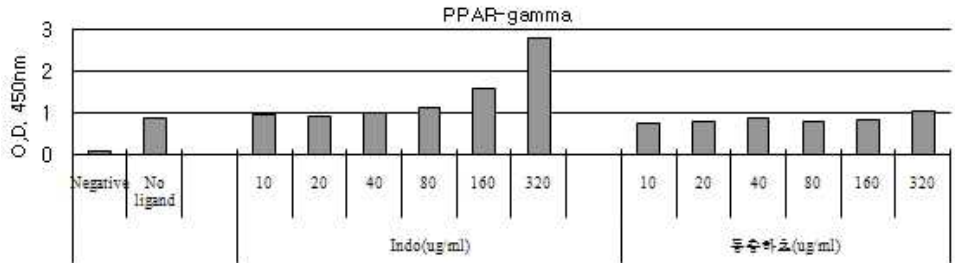


Fig 38. 대두발아 동충하초 추출물이 PARɣ와 SRC-1의 결합력을 이용한 면역효소측정법(ELISA)에 미치는 효과.

정제한 SRC-1 재조합단백질을 (8ug/ml)농도로 micreotiter well에 coating한 후 skimmed milk를 함유한 PBS로 실온에서 두 시간 정도 blocking함. PBST로 세척 후 동충하초추출물을 PARɣ와 함께 처리하여 PPARɣ와 SRC-1의 결합력은 PARɣ 특이항체를 이용하여 확인함.

제 14 절 발아대두 동충하초에서 생리활성물질로 추정되는 4개 화합물 CGNMⅠ, CGNMⅡ, CDGM, CGLM의 효능

1. 항염증효과

1-1. 세포 독성에 미치는 영향

Mouse의 macrophage cell line, RAW 264.7 세포에 CGNMⅠ, CGNMⅡ, CDGM, CGLM (5, 10 ug/ml) 을 2시간 전 처리한 후 LPS(lipopolysaccharide) (100 ug/ml) 를 처리하고 16시간 배양한 후, MTS assay 를 이용하여 세포 생존율을 확인한 결과, CGNMⅠ, CGNMⅡ, CDGM, CGLM 모두에서 세포독성이 나타나지 않음을 확인함(Fig 39).

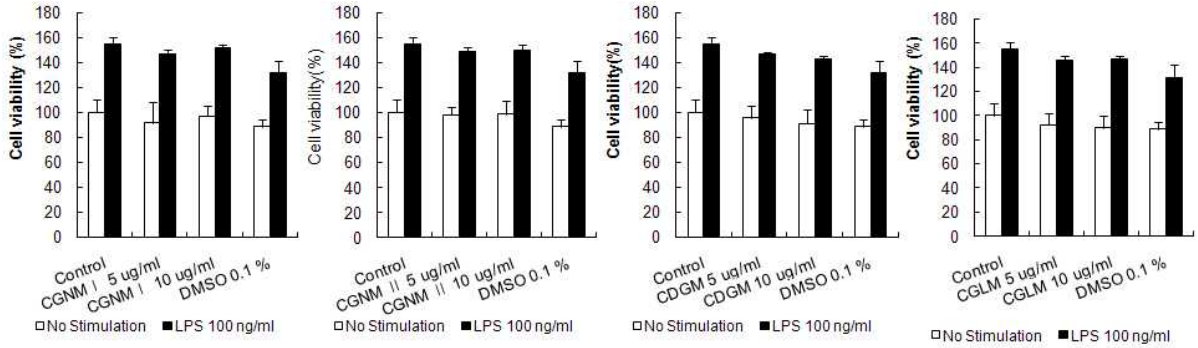


Fig 39. RAW 264.7의 세포독성에 미치는 CGNMⅠ, CGNMⅡ, CDGM, CGLM의 영향

1-2 염증성 cytokine 생성 억제 효과

RAW 264.7 세포에서 염증성 싸이토카인의 억제 효과를 ELISA kit을 이용하여 정량하였다. RAW 264.7 세포에 CGNMⅠ, CGNMⅡ, CDGM, CGLM를 5~ 10 ug/ml 농도로 2시간 전 처리한 후, LPS (100 ng/ml)를 사용하여 TNF-alpha의 생성을 유도한 후 확인한 결과, TNF-alpha 생성 억제는 CGLM에서 다른 물질에 비해 높은 억제효과를 나타내었다(Fig. 40). 이는 CGNMⅠ, CGNMⅡ, CGLM가 LPS에 의해 유도되는 염증성 싸이토카인 억제에 영향을 준다는 것을 의미하며, 다른 염증성 싸이토카인의 저해 효과도 기대됨.

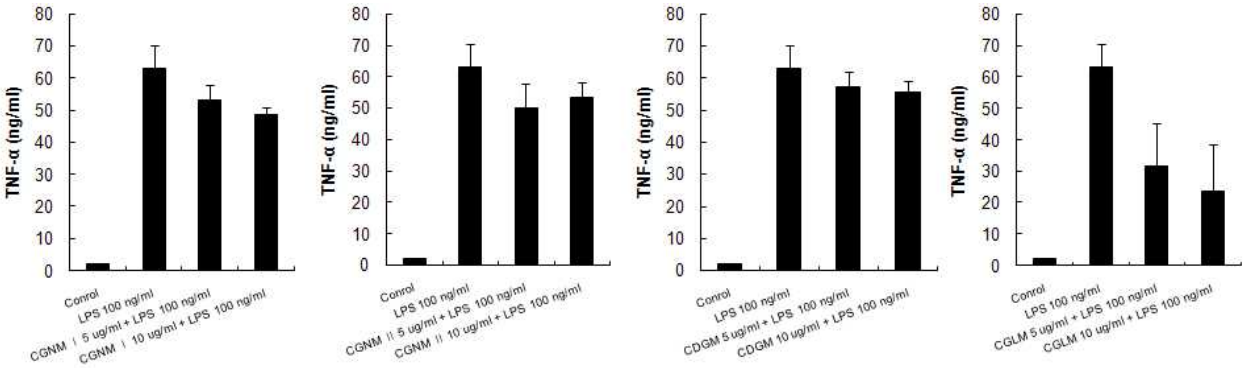


Fig 40. LPS처리한 RAW 264.7 cell에서 CGNMⅠ, CGNMⅡ, CDGM, CGLM에 의한 TNF-alpha억제 효과

1-3. CGNMⅠ, CGNMⅡ, CDGM, CGLM의 COX-2 단백질발현조절기능 분석

COX-2는 정상적인상태에서는 활성화가 관찰되지 않으나, 저상소증, LPS,사이토카인이나 성장인자 등에 의한 염증성 자극을 받게 되면 COX-2효소의 작용이 증가하게 된다. RAW 264.7 세포 (1.5X105cell/ml) 에 CGNMⅠ, CGNMⅡ, CDGM, CGLM (10ug/ml) 을 2시간 전 처리한 후 LPS(lipopolysaccharide) (100 ug/ml) 를 처리하고 16시간 배양한 후, CGNMⅠ, CGNMⅡ, CDGM, CGLM의 COX-2 단백질 발현 저해여부를 Western blotting으로 알아보았다. LPS로 유도되는 COX-2의 발현 저해에는 효과가 없는 것으로 나타남(Fig 41).

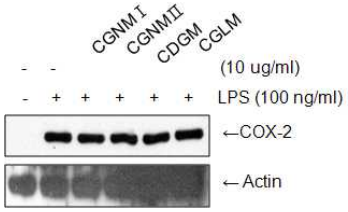


Fig 41. LPS처리한 RAW 264.7 세포에서 COX-2 단백질 발현에 미치는 CGNMⅠ, CGNMⅡ, CDGM, CGLM 효과

2. 대사성질환 표적인자인 PPAR를 타깃으로 하는 동충하초 추출물질들의 대사조절기능후보인자 탐색

PPARɣ 와 Co-activators 발현벡터가 들어간 *E.coli*를 배양, 단백질을 발현 시킨 뒤 각각의 단백질을 분리, 정제하였다. 정제된 Co-activators를 ELISA 용 모듈에 8μg/ml 의 농도로 coating 한 뒤, 각각의 샘플 (CGLM, CGNM1, CGNM2, CDGM, 그리고 Indomethacin, (1, 20μg/ml)) 과 조절인자인 PPARɣ lysate 를 함께 처리하여 1시간 동안 반응 시켜, 각 리간드 후보물질과 조절인자 간의 결합력을 확인하는 실험을 진행. 대조군으로는 리간드로 잘 알려진 Indomethacin을 샘플과 동일 농도로 사용하였다. 그 결과, Co-activator 중 TIF-2 와의 결합력이 Indomethacin 보다 높은 수준으로 나타나는 것을 확인하였으나(Fig 42), 지방세포 3T3-L1의 분화에는 영향을 미치지 않아 더 이상의 인슐린 신호전달 및 당 흡수 등에 미치는 효능은 분석하지 않음. 또한 지방세포 3T3-L1의 분화에 미치는 효능이 있는 추출물이 관찰되지 않아 비만/당뇨 동물모델 ob/ob or db/db mice 등을 이용한 추가 실험을 아니 함.

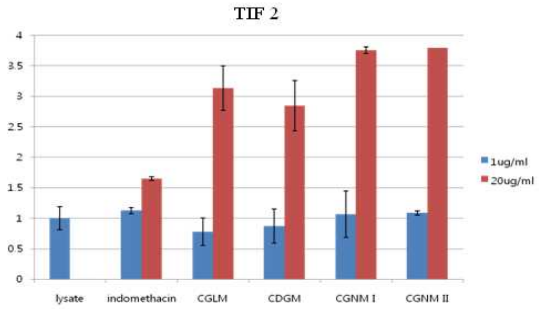


Fig 42. The effect of CGLM, CDGM, CGNM1, and CGNM2 on the binding between PPARɣ and TIF-2 in ELISA for the screening of PPARɣ ligands. The his-hPPARɣ2 lysates (16X dilution) from *E. Coli* and PPARɣ ligands (Indomethacin, CGLM, CDGM, CGNM1, and CGNM2) were added into the pre-coated GST-hTIF-2.

3. 폐암세포에서의 항암 효과

사람의 폐암 세포주 A549에서 4개의 화합물을 24 시간 동안 처리하고 세포증식정도를 MTS assay를 통하여 살펴 본 결과, 세포증식으로 유도되는 항암효과를 나타내지 않음.

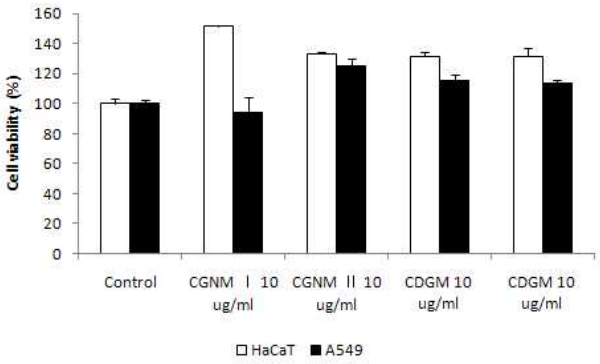


Fig. 43. A549 과 HaCaT cell에서 CGNMⅠ, CGNMⅡ, CDGM 과 CGLM의 세포독성 측정

4. 비만세포에서 항알러지 효과

RBL 2H3 세포에 PI(PMA + Ionomycin)로 유도되는 COX-2 단백질 발현저해 작용을 Westren blotting 방법을 통하여 확인함. COX-2의 생성 억제는 CGLM에서 다른 물질에 비해 높은 억제효과를 나타냄을 확인하였으며(Fig 44), 처리한 농도에서 세포 독성을 나타내지는 않음.

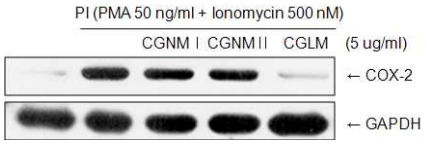


Fig. 44. 비만세포에서 PI로 유도된 COX-2의 발현 저해

Th2 type 싸이토카인 IL-13 의 promoter가 transfection된 stable cell line(RBL-2H3)에 CGNMⅠ, CGNMⅡ, CDGM, CGLM (30 uM)을 1시간 전 처리한 후 PI(PMA 50 ng/ml + Ionomycin 500 nM)를 처리하고 16시간 배양한 후, Luciferase assay를 이용하여 IL-13 promoter 활성을 확인하여 본 결과, IL-13의 promoter 활성이 CGML에 의해 다소 감소됨을 확인함.

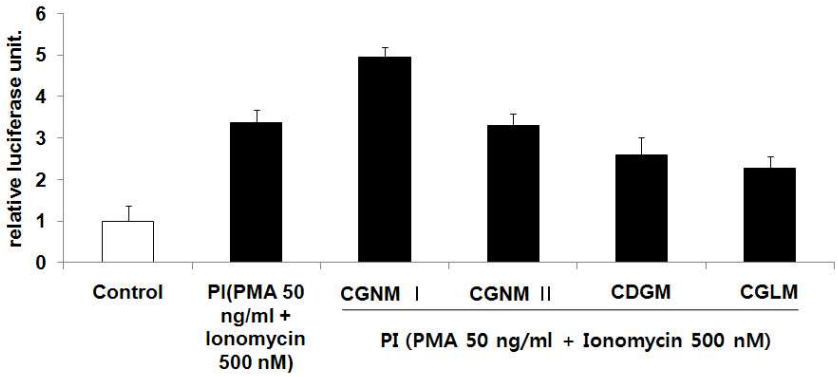


Fig. 45. IL-13의 promoter 활성 저해 효과 측정

5. 호흡기상피세포에서 항알러지 효과

호흡기상피세포에서 항알러지 효과를 알아보기 위해, 사람의 호흡기 상피세포 (NCI-H292)에 EGF (50ng/ml)를 처리하여 나타나는 염증/알러지 관련인자들(Mucin, MMP-9, COX-2, IL-8)의 발현에 미치는 동충하초추출인자들의 제어 효능을 RT-PCR, Western blot, Zymograpgy 등의 방법으로 분석함. 사람의 호흡기 상피세포 (NCI-H292)에 EGF (50ng/ml)를 처리하기 전, 각 단일 물질(20μg/ml)을 1시간 동안 전 처리 하였다. 24시간 뒤 RNA 를 추출하여 점액유전자 (MUC5AC) 의 발현여부를 RT-PCR로 확인한 결과, EGF 에 의해 유도되는 점액유전자의 발현이 억제되는 것을 확인함.

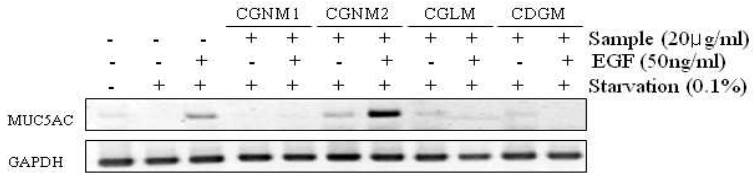


Fig. 46. EGF로 유도된 MUC5AC의 mRNA 발현에 미치는 CGNM1, CGNM2, CGLM과 DGM의 영향

사람의 호흡기 상피세포 (NCI-H292)에 EGF로 유도되는 MMP-9의 발현이 CGLM으로 인해 감소됨을 RT-PCR과 Gelatin zymogram의 방법을 통하여 확인하였으며, 처리한 물질의 농도가 세포 독성을 나타내지 않음을 확인.

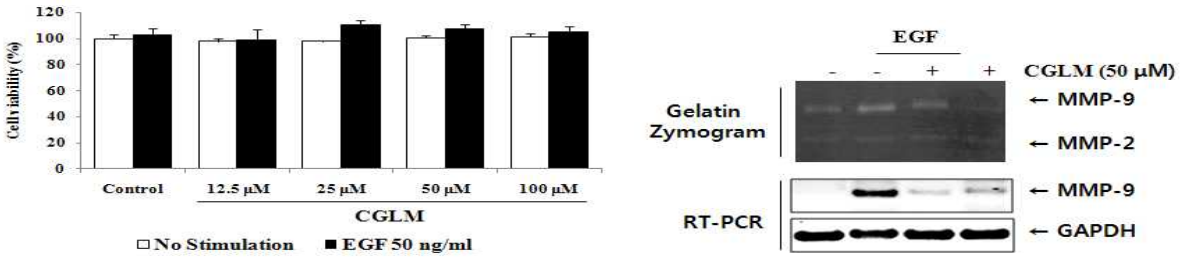


Fig. 47. EGF로 유도된 MMP-9의 mRNA, 단백질 발현에 있어서 CGLM 효과

또한, COX-2의 발현과 MUC5AC의 발현 또한 CGLM에 의해 감소됨 Western blotting과 RT-PCR을 통해 확인함.

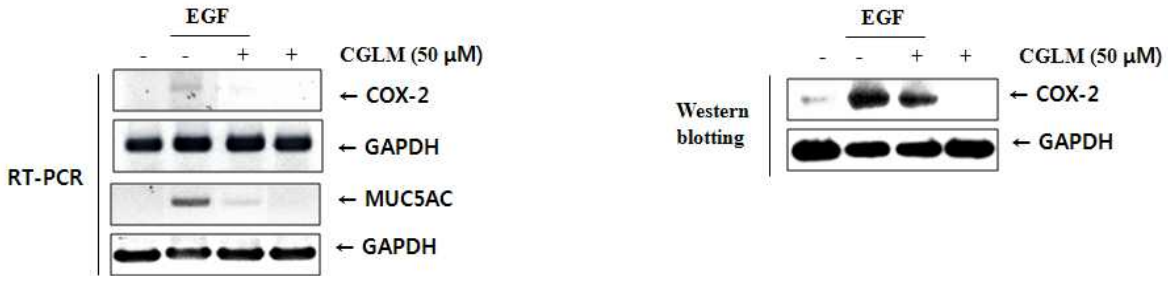


Fig. 48. EGF로 유도된 MMP-9의 mRNA, 단백질 발현에 있어서 CGLM 효과

사람의 호흡기 상피세포(NCI-H292)에 EGF로 유도되는 IL-8의 발현이 CDGM과 CGLM으로 인해 감소됨을 ELISA를 통해 확인함.

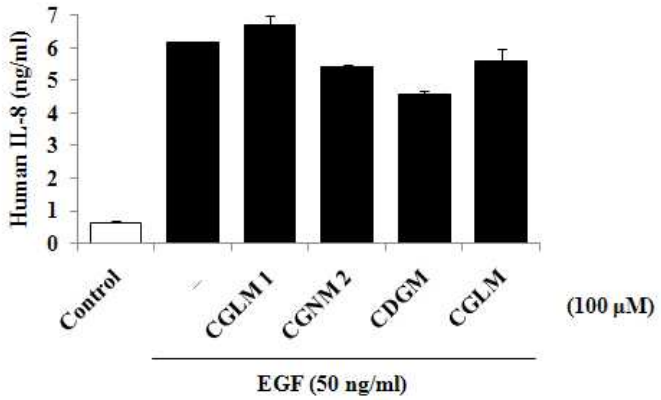


Fig. 49. EGF로 유도된 IL-8의 발현 저해효과

제 15 절 발아대두 동충하초의 호흡기 점막면역강화 기능성 평가

1. 발아대두 동충하초 추출물을 이용하여 호흡기 점막 기능 및 면역강화 평가를 위한 모델 구축

1-1. 호흡기점막의 상피세포를 이용한 평가 모델 확립

- 발아대두 동충하초가 호흡기 점막상피세포의 점막기능 및 면역반응에 미치는 영향을 조사하기에 앞서 호흡기 점막상피세포의 배양적합조건을 수립하기 위한 기초연구를 진행하였음.
- 이를 위해 대표적 호흡기 점막상피세포주인 A549 세포에 미생물의 다당체 모델로 petidoglycan을 다양한 농도, 다양한 배양시간으로 자극 시킬 때 생성되는 케모카인(Chemokine)인 IL-8 (Interleukin-8)의 양을 조사해 봄으로서 A549 세포주에서 면역조절인자의 최적발현을 위한 최적배양조건을 수립하였음(Fig 50).
- 또한 MAP kinase (Mitogen associated protein kinase)를 비롯한 다양한 세포내 신호전달

매개인자들에 대한 억제제를 이용한 연구를 통해 peptidoglycan 자극시 호흡기 점막상피세포의 IL-8 생성에 MAP kinase와 lipid raft 등의 신호전달 매개인자들이 관여한다는 사실을 규명해냄으로서 향후 발아대두 동충하초 추출물에 의한 면역반응평가시 세포내 신호전달계의 변화를 관찰할 수 있는 핵심적 기술 노하우를 축적할 수 있었음.

● 본 연구의 성과들은 세계적 학술지인 Molecular immunology (2008, Vol. 45: 1665-1673)(18)에 게제됨으로서 그 학문적 성과를 인정받았음.

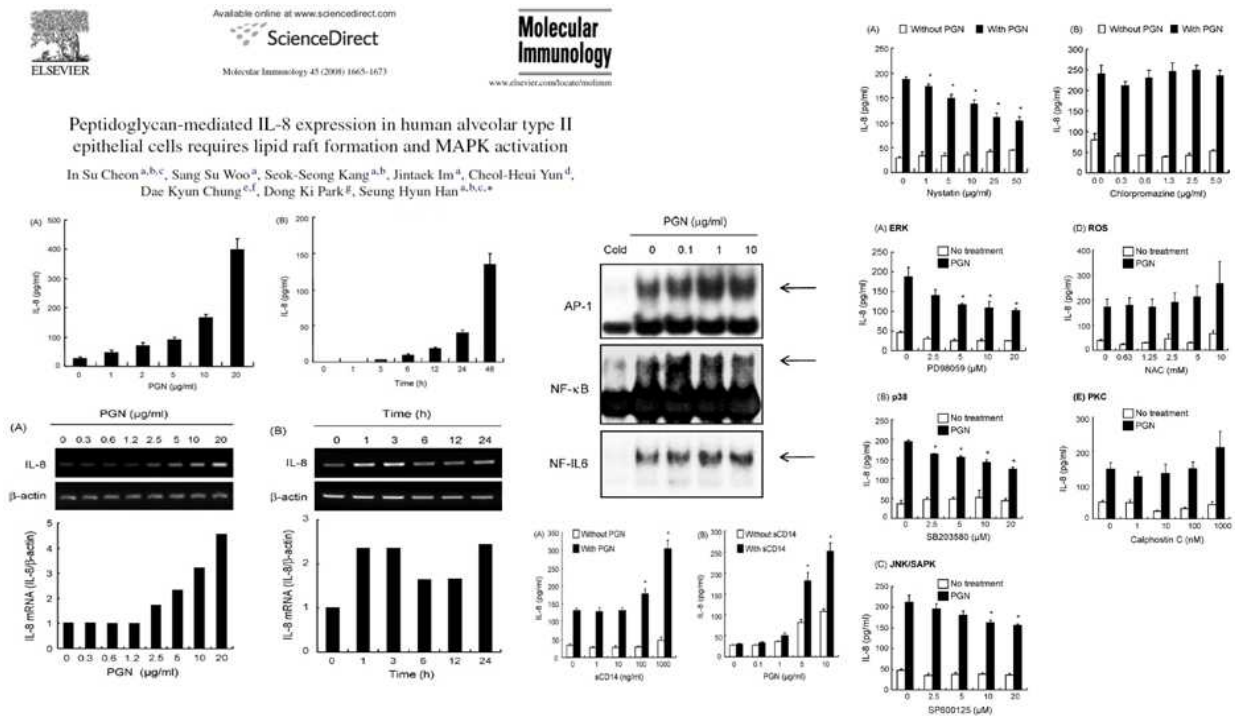


Fig 50. 호흡기 점막상피세포를 이용한 평가 모델 확립

1-2. 항균펩타이드와 계면활성단백질 발현 평가를 이용한 호흡기점막 기능평가

● 호흡기 점막상피세포들은 미생물들과 같은 항원에 지속적으로 노출되어있음으로서 이를 효과적으로 제거하기 위한 면역시스템을 발전시켜 왔으며, 여기에는 cathelicidin, defensins과 같은 항균펩타이드와 계면활성 단백질의 분비 등이 포함됨.

● 본 연구는 발아대두 동충하초가 호흡기 점막상피세포주인 A549세포의 항균펩타이드 및 계면활성 단백질 분비에 미치는 영향을 평가하기 위해 여러 가지 형태의 발아대두 동충하초 추출물로 A549세포를 자극시 mRNA수준에서 cathelicidin 항균펩타이드(anti-microbial peptide)인 LL-37과 β-defensin 1, 2, 4 및 계면활성단백질인 Surfactant protein A (SP-A), SP-D의 발현과 그 패턴을 조사하였음.

● 결과적으로 발아대두 동충하초 추출물들은 계면활성단백질의 발현에는 영향을 미치지 못했으나(데이터 미제시), 항균펩타이드들인 LL-37과 β-defensin 1, 2, 4의 발현을 대조군에 비해 유의하게 증가시켰음(Fig 51).

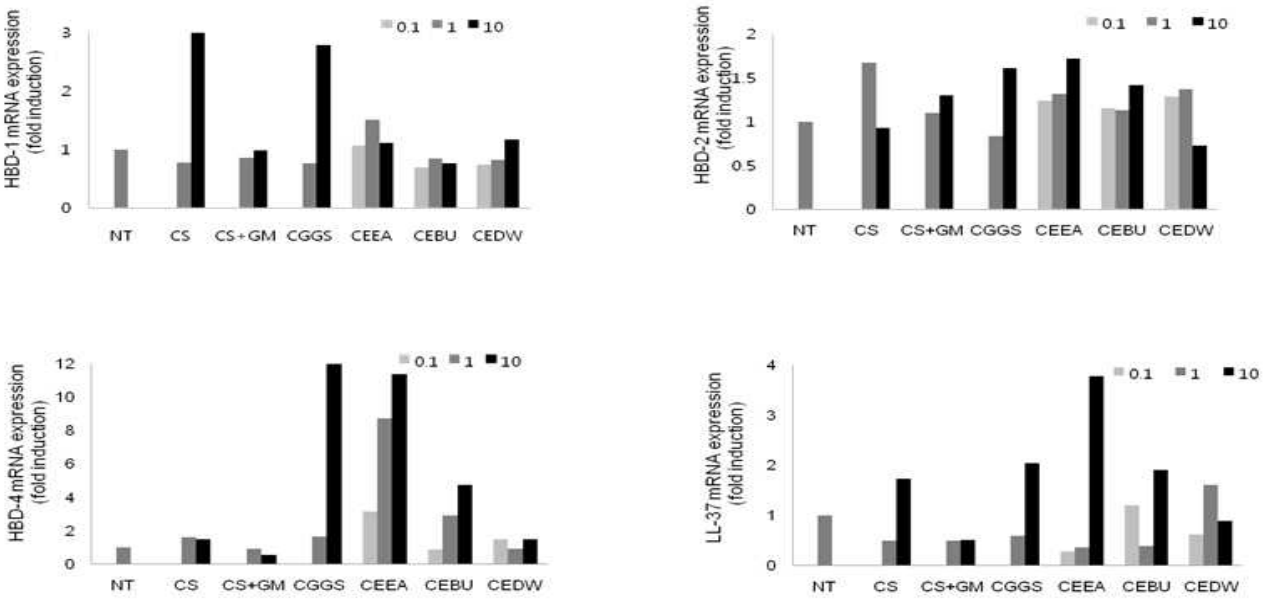


Fig 51. 발아대두 동충하초 추출물들로 자극한 A549세포주에서의 항균 펩타이드 발현 패턴

1-3. 케모카인과 싸이토카인 발현 평가를 이용한 호흡기점막 면역강화평가

- 케모카인인 IL-8 및 ICAM-1, COX-2 등은 미생물 등의 감염시 감염부위로의 호중구 등의 백혈구 이주(migration)와 염증반응에 관여함으로서 동물체의 면역반응에 직접적으로 관여한다고 알려져 있음.
- 본 연구는 발아대두 동충하초 추출물들이 호흡기 점막상피세포주인 A549의 IL-8, ICAM-1, COX-2의 발현에 미치는 영향을 조사하기 위해 real time PCR과 ELISA기법으로 각각 mRNA와 단백질 수준에서 그 발현량과 패턴을 조사하였음.
- 발아대두 동충하초 추출물들은 IL-8, ICAM-1, COX-2의 mRNA 발현을 증가시켰으며, 특히 추출물 중 한 종류인 CGGS는 단백질수준에서도 IL-8의 발현을 농도 의존적으로 증가시켰음.
- 단백질 수준에서 ICAM-1 발현에 미치는 발아대두 동충하초 추출물의 영향을 조사하기 위해 유세포분석기(Flow cytometer)를 이용하여 발아대두 동충하초 추출물 처리 후 ICAM-1 (intracellular adhesion molecule-1)의 발현패턴을 분석한 결과, 대조군과 비교하여 발아대두 동충하초 추출물 처리시 ICAM-1 발현이 증가되는 것을 관찰할 수 있었음(Fig 52).

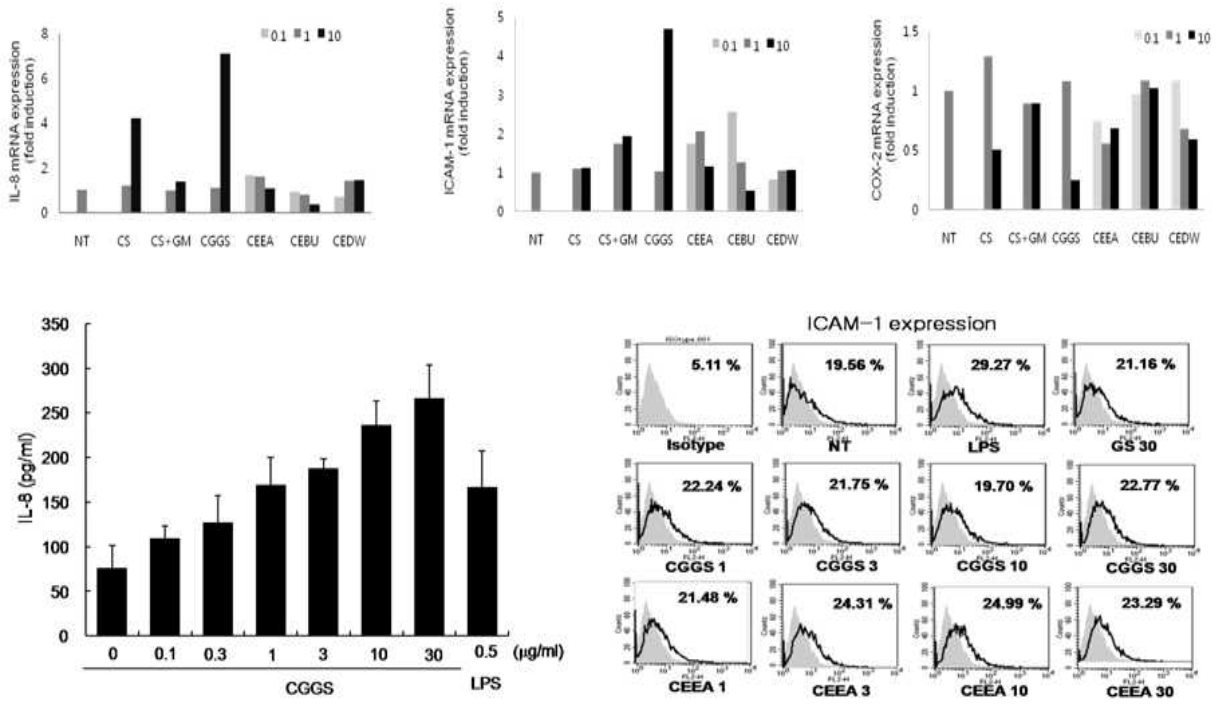


Fig 52. 발아대두 동충하초 추출물에 의한 호흡기 점막상피세포에서의 케모카인, 싸이토카인의 발현양상 평가

2. 발아대두 동충하초에서 분리/정제된 유용물질을 이용한 호흡기 점막기능 및 면역강화평가와 작용기전 연구

2-1. 분리/정제된 유용물질의 호흡기점막 기능 및 면역 강화평가 연구

- 본 연구진은 1차년도 연구에서 여러 가지 발아대두 동충하초 추출물들을 이용하여 실험한 결과 CGGS 처리시 호흡기 점막상피세포에서 면역조절인자들의 발현이 현저히 증가되는 것을 확인한 바 있음
- 이를 바탕으로 2차년도 연구에서는 혼합물상태인 CGGS에서 함유된 어떤 특정물질이 상기한 면역조절인자들의 발현을 증가시켰는지를 조사하기 위해, HPLC를 이용해 CGGS를 각각의 순수 단일물질로 분리하여 이들이 면역조절인자들의 발현에 미치는 영향을 RT-PCR기법으로 mRNA수준에서 조사하였음.
- CGGS의 여러 가지 단일물질들 중 CDGM, CGLM, 및 CGNM-1의 3가지 단일물질에 의한 면역조절인자들의 발현양상을 호흡기 점막상피세포주인 A549세포에서 조사하였음.
- 각각의 단일물질들을 A549 세포주에 처리하여 항균펩타이드인 human beta defensin (HBD)-1, 3, 4, 계면활성단백질인 SP-A, D, 점액형성물질인 Mucin-2, 3, 5A (Mucin-2, 3, 5A) 케모카인인 IL-8, MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1)과 세포부착인자인 ICAM-1의 mRNA 발현을 확인하였음.
- 항균펩타이드 발현에 미치는 CDGM, CGLM, CGNM-1의 영향을 살펴본 결과 CDGM에 의

해 HBD-4의 발현이 증가됨을 관찰할 수 있었음(Fig 53).

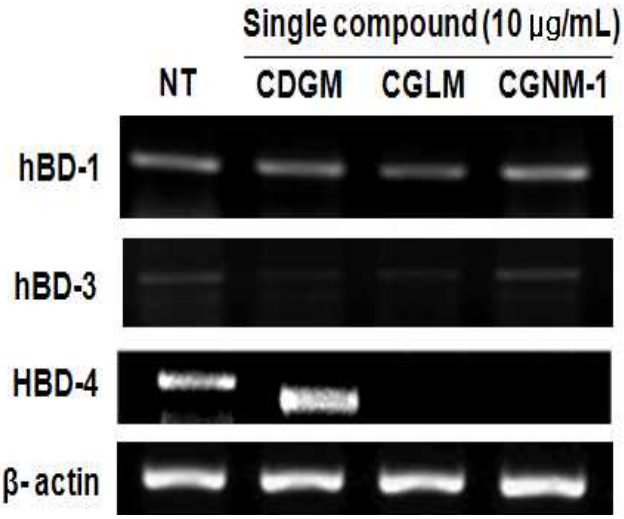


Fig 53. 발아대두 동충하초 추출물의 단일물질들이 호흡기 점막상피세포에서 항균펩타이드발현에 미치는 영향

- 다른 한편으로 발아대두 동충하초 추출물인 CGGS의 단일물질들인 CDGM, CGLM, 및 CGNM-1는 점액형성물질인 Muc 5A의 발현을 증가시켰으며 이들 중 CGNM-1에 의한 발현증가가 가장 두드러 졌음(Fig 54). 또한 계면활성 단백질인 SP-A, D의 경우 CDGM처리로 SP-A의 발현이 증가됨을 관찰할 수 있었음(Fig 55).

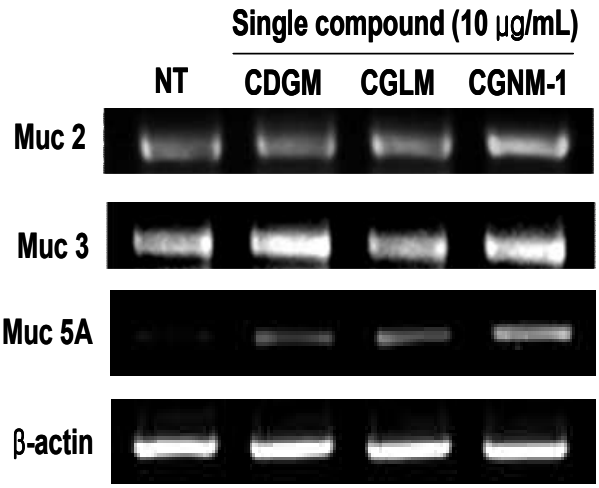


Fig 54. 발아대두 동충하초 추출물의 단일물질들이 호흡기 점막상피세포에서 점액형성물질 발현에 미치는 영향

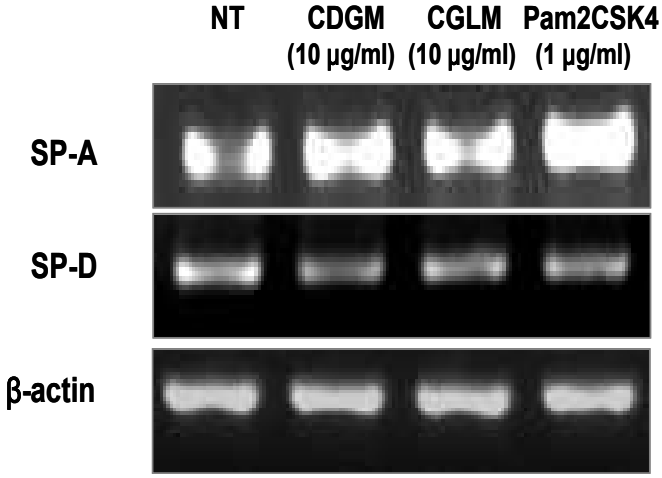


Fig 55. 발아대두 동충하초 추출물의 단일물질들이 호흡기 점막상피세포에서 계면활성단백질 발현에 미치는 영향

- CDGM, CGLM, CGNM-1에 의한 A549 세포주에서 케모카인의 mRNA 발현은 IL-8의 경우에는 발현에 큰 변화가 없었으나, MCP-1의 발현은 세가지 단일물질 모두에 의해서 발현이 증가되었음(Fig 56).

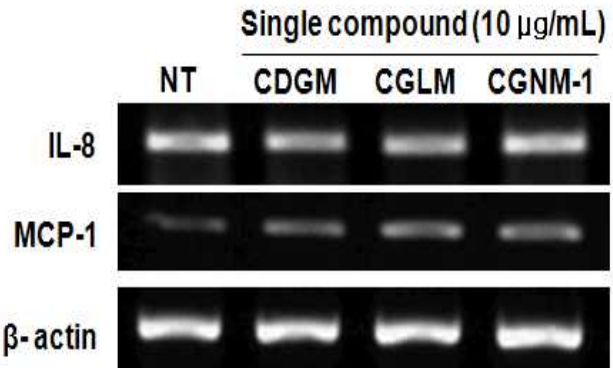


Fig 56. 발아대두 동충하초 추출물의 단일물질들이 호흡기 점막상피세포에서 케모카인의 발현에 미치는 영향

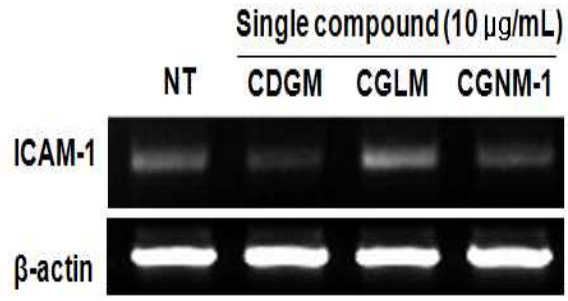


Fig 57. 발아대두 동충하초 추출물의 단일물질들이 호흡기 점막상피세포에서 세포부착인자인의 발현에 미치는 영향

- 세포 부착인자들은 면역반응 발생시 감염부위로 면역세포의 migration을 매개하는 중요한 면역관련인자로서 본 연구에서는 이중 ICAM-1의 mRNA 발현에 미치는 단일물질들의 효과를 조사하였으며, 이들 중 CGLM에 의해 ICAM-1의 발현이 다소 증가함을 확인할 수 있었음(Fig 57).
- 상기 연구결과들을 통해 본 연구진은 발아대두 동충하초 추출물인 CGGS의 단일물질들에 의해 여러 가지 면역조절인자들 중 항균펩타이드인 HBD-4, 계면활성단백질인 SP-A, 케모카인인 MCP-1, 점액형성물질인 Muc 5A 및 세포부착인자인 ICAM-1의 발현이 특이적으로 증가됨을 확인하였으며, 이를 바탕으로 본 연구진은 3년차연구에서 상기 면역조절인자들 중 가장 발현이 높았던 CDGM에 의한 SP-A의 발현과 관련된 세포내 신호전달기전을 규명하였음.

2-2. 분리/정제된 유용물질에 특이적으로 조절되는 표적인자 발굴

- 지난 1년차 연구에서 발아대두 동충하초 추출물들에 의한 면역조절인자의 발현을 RT-PCR과 ELISA를 이용해 mRNA와 단백질수준에서 조사하였으며, 상기의 결과로서 추출물들 중 하나인 CGGS에 의해 인체 호흡기 점막상피세포주인 A549세포에서 면역조절인자들 중 IL-8의 발현이 특이적으로 증가함을 확인할 수 있었음.
- 이를 바탕으로 2차년도 연구에서는 발아대두 동충하초 추출물인 CGGS에 의한 호흡기 점막상피세포에서의 IL-8 발현 및 관련된 세포내 신호전달계를 규명함으로서 세포내 신호전달물질들 중 CGGS에 의해 활성화되는 표적인자를 발굴하고자 하였음.
- 우선적으로 선행연구의 결과를 재확인하기 위해 CGGS에 의한 IL-8발현을 ELISA를 이용하여 단백질수준에서 확인한 결과 호흡기 점막상피세포에서의 IL-8 발현은 CGGS에 의해 농도의존적으로 증가함을 확인할 수 있었으며, 이러한 현상은 내독소(Endotoxin)에 대한 저해제인 polymyxin B를 전처리하였을 때도 그 발현이 감소되지 않는 것으로 볼 때 호흡기 점막상피세포에서의 IL-8발현은 내독소의 오염이 아닌 CGGS에 의한 단독효과임을 확인할 수 있었음(Fig 58).

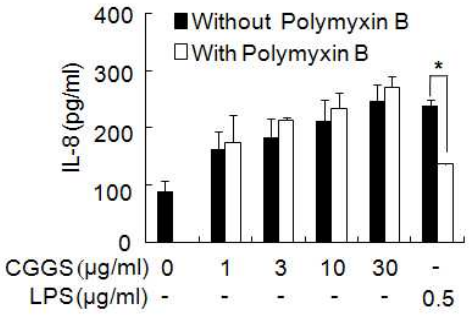


Fig 58. 발아대두 동충하초 추출물이 호흡기 점막상피세포에서 IL-8발현에 미치는 영향

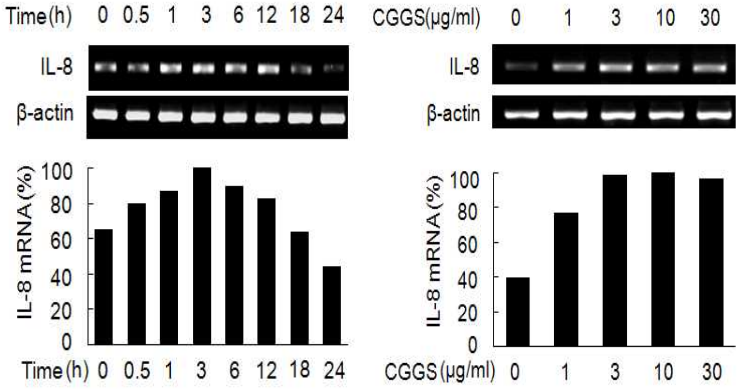


Fig 59. 발아대두 동충하초 추출물이 호흡기 점막상피세포에서 IL-8 mRNA발현에 미치는 영향

- 다른 한편으로 CGGS처리시 A549 세포주에서 농도 또는 시간 의존적으로 IL-8 mRNA 발현이 증가됨을 확인할 수 있었으며, 특히 IL-8 mRNA 발현은 1 μg/mL의 소량의 CGGS처리로도 증가함을 확인할 수 있었음(Fig 59).
- MAP kinase는 ERK, JNK, 및 p38 등의 세포내 단백질들을 의미하며, 세포내로의 신호자극시 인산화되어 전사인자의 활성 및 전사후 mRNA의 안정성을 매개하는 중요한 세포내 신호전달매개인자로서 여겨지고 있음(19).
- 본 연구에서는 CGGS에 의한 IL-8 발현의 세포내 신호전달 주요 표적인자로서 MAP kinase를 유력한 후보로 설정하여 이들의 저해제인 PD98059와 U0126(ERK 저해제), SB203580과 SB202190(p38 저해제), JNK II inhibitor와 SP600125(JNK 저해제)를 전처리한 뒤 CGGS에 의한 IL-8 발현의 변화를 ELISA로 관찰하였음.
- 그 결과 CGGS에 의한 IL-8발현이 ERK와 JNK활성의 저해로 감소되었지만 p38 활성의 저해에 의해서는 감소되는 않았던 결과에 비추어 ERK와 JNK가 CGGS에 의한 IL-8 발현의 세포내 신호전달 주요 표적인자임을 유추할 수 있었음(Fig 60).
- 다른 한편으로 CGGS에 의한 전사조절인자들의 활성을 조사하기 위해 방사선 동위원소인 (^{32}P)를 표지시킨 nucleotide에 대한 전사조절인자들의 결합활성을 조사하는 기법인 electrophoretic mobility shift assay (EMSA)를 이용하여 CGGS에 의한 전사조절인자들의 활성을 조사하였음.
- 다른 연구자들의 선행 연구결과들에 의하면 IL-8의 발현에는 AP-1, NF-IL6 및 NF-κB 등의 전사조절인자가 관여한다고 알려져 있으므로(19), 본 연구에서도 이들에 대한 활성변화를 조사되었음.
- 발아대두 동충하초 추출물인 CGGS를 처리한 A549 세포주에서 AP-1, NF-IL6 및 NF-κB의 결합활성을 조사한 결과 AP-1, NF-IL6의 결합활성은 증가되었으며 NF-κB는 유의한 영향을 관찰할 수 없었음(Fig 61).
- 이상의 연구결과들을 통해 본 연구진은 발아대두 동충하초 추출물인 CGGS에 의해 활성이 조절되는 인체 호흡기 점막상피세포내 신호전달 표적인자들로서 MAP kinase들 중 ERK와 JNK, 전사인자들 중 AP-1과 NF-IL6를 발굴할 수 있었음.

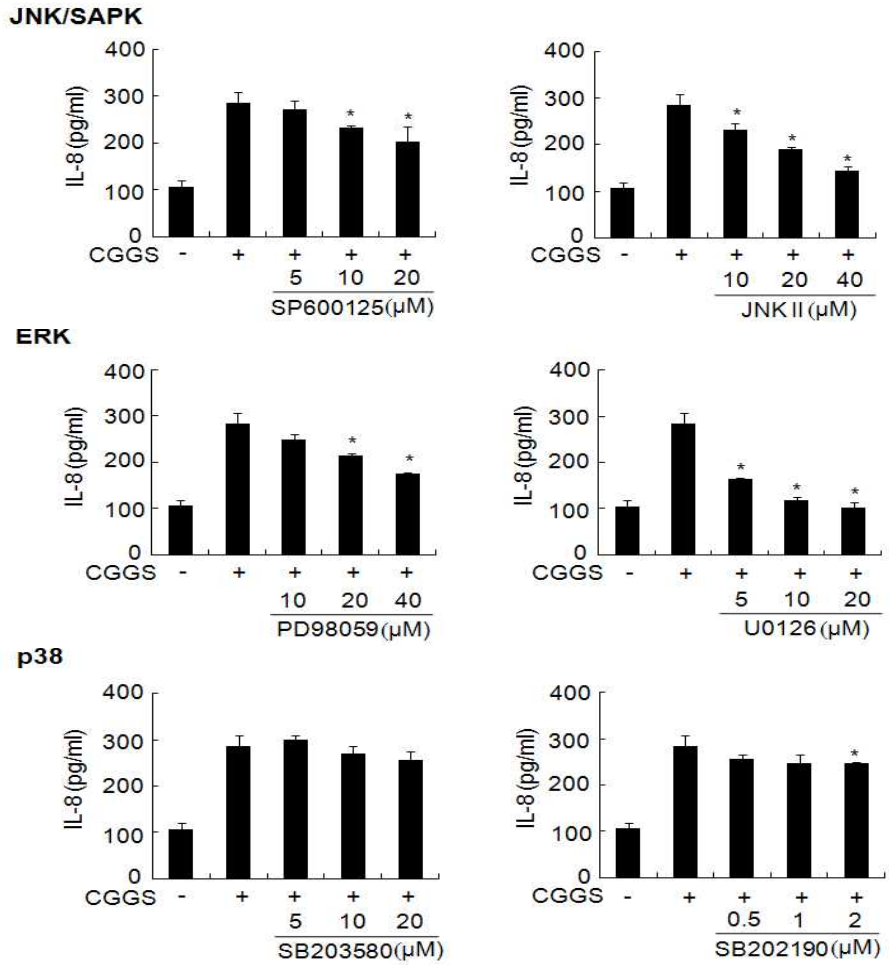


Fig 60. 발아대두 동충하초 추출물이 호흡기 점막상피세포에서 MAP kinase 활성에 미치는 영향

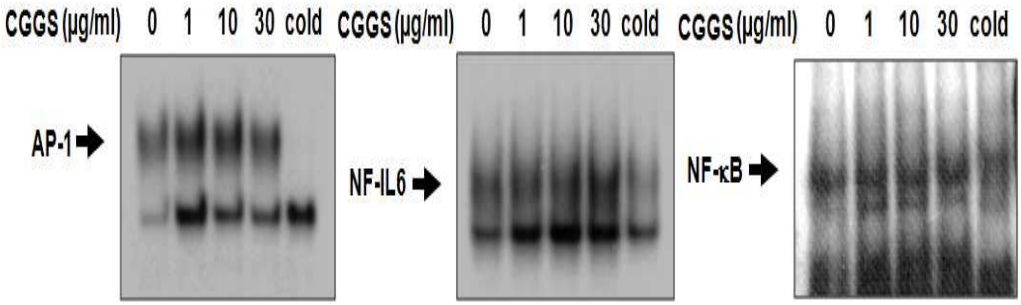


Fig 61. 발아대두 동충하초 추출물이 호흡기 점막상피세포에서 IL-8발현과 관련된 전사 인자들의 결합활성에 미치는 영향

2-3. 세포활성을 유도하는 세포수용체 및 생체막 구조 연구

- Lipid raft 또는 clathrin-coated pits는 CGGS와 같은 signal molecule의 세포내 이입 및 이에 따른 신호전달을 매개하는 세포의 중요한 생체막구조로서(20) 본 연구진은 상기 두가지 생체막구조 중 어떠한 생체막구조의 형성이 대두발아 동충하초추출물인 CGGS에 의한 면역조절인자의 발현에 관계되는지를 clathrin-coated pits형성 저해제인 chlorpromazine과 lipid

raft 형성저해제인 filipin을 이용하여 조사하였음.

- 그 결과 CGGS에 의한 IL-8의 발현은 lipid raft 형성 저해제인 filipin에 의해서는 저해되었지만 clarthin-coated pits형성 저해제인 chlorpromazine에 의해서는 저해효과를 볼 수 없었음. 따라서 CGGS에 의한 면역조절인자인 IL-8의 발현은 세포막에서의 lipid raft형성이 필수적임을 규명할 수 있었음(Fig 62).

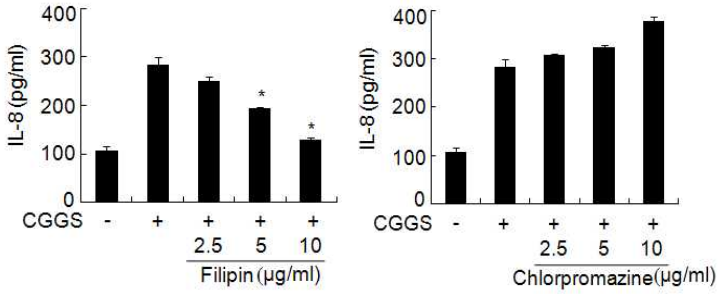


Fig 62. 발아대두 동충하초 추출물이 호흡기 점막상피세포에서 lipid raft와 clathrin-coated pits 형성에 미치는 영향

- 상기 발아대두 동충하초 추출물인 CGGS에 의한 호흡기 점막상피세포에서의 IL-8 발현 및 관련된 세포내 신호전달기전연구의 결과들은 세계적 학술지인 Molecular immunology (2010, Vol. 127: 55-61)(21)에 게제됨으로서 그 학문적 성과를 인정받았음

3. 발아대두 동충하초 유래 효능지표물질의 면역조절효능 극대화 및 활용최적화 연구

3-1. 세포내 신호전달 체계와 전사조절인자들의 활성화 연구

- 2차년도 연구를 통해 본 연구진은 발아대두 동충하초 추출물인 CGGS의 단일물질들에 의해 여러 가지 면역조절인자들 중 항균펩타이드인 HBD-4, 계면활성단백질인 SP-A, 케모카인인 MCP-1, 점액형성물질인 Muc 5A 및 세포부착인자인 ICAM-1의 발현이 특이적으로 증가됨을 확인하였으며, 3년차 연구에서는 이들의 발현을 단백질수준에서 확인하는 한편 관련된 세포내 신호전달체계 및 전사조절인자들의 활성을 조사하였음.
- 상기 면역조절인자들 중 SP-A의 발현이 CDGM에 의해 가장 유의하게 증가하였던 점에 주목하여 CDGM에 의한 SP-A의 발현과 관련된 신호전달체계 및 전사조절인자를 중점적으로 조사하였음.
- SP-A는 인체폐에서 분비되는 4종류의 계면활성단백질들 중 가장 많은 양이 분비되는 단백질로서 주로 type II 호흡기 점막상피세포에서 분비된다고 알려져 있으며, 대표적 기능으로서 SP-A는 호흡기내로 침입한 미생물, 곰팡이 및 바이러스 등을 응집시켜 이들의 병원성을 약화시키는 한편 호흡기내 자연살해세포(Natural killer cell)와 대식세포 등에 의한 이들 유해인자들의 제거를 촉진하는 등 인체 호흡기내의 면역반응을 조절하는 주요한 인자라고 알려져 있음(22, 23).
- CDGM에 의한 SP-A발현 관련기전을 조사하기에 앞서 2차년도 선행연구의 결과를 재확인하기 위해 CDGM에 의한 SP-A의 발현은 RT-PCR과 Western blotting기법을 이용하여 각각 mRNA수준(Fig 63)과 단백질수준(Fig 64)에서 재확인하였음.

- 그림 16에서 나타낸바와 같이 CDGM에 의한 호흡기 점막상피세포주인 A549세포에서의 SP-A mRNA발현은 처리농도에 의존적으로 증가하여 10 μg/mL처리시 포화상태에 이르렀으며, 그 처리시간에 있어 6시간처리시에 가장 유의하게 증가된 mRNA 발현을 관찰할 수 있었음.
- CDGM에 의한 A549 세포주에서의 SP-A 단백질발현도 mRNA발현양상과 유사하게 10 μg/mL처리시까지 처리농도에 의존적으로 증가하나 30 μg/mL처리시 더 이상 그 발현이 증가되지 않을 관찰할 수 있었음(그림 17A). 또한 처리시간에 있어서는 24시간동안의 CDGM 처리시 가장 증가된 SP-A 단백질 발현을 관찰할 수 있었음(그림 17 B). 상기의 결과들을 종합하여 이후 연구에서는 CDGM의 농도를 10 μg/mL, 처리시간의 경우 mRNA는 처리 6시간, 단백질은 24시간처리로 고정하여 연구를 진행하였음.

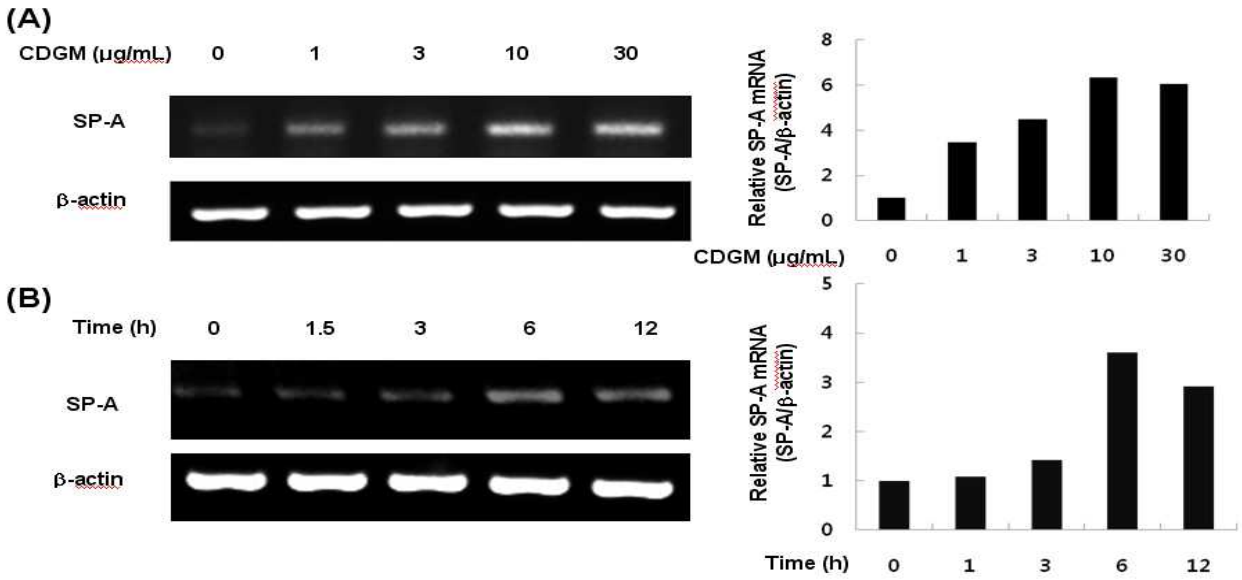


Fig 63. 발아대두 동충하초 추출물의 단일물질(CDGM)이 호흡기 점막상피세포에서 SP-A mRNA발현에 미치는 영향; (A) CDGM농도에 따른 SP-A mRNA발현변화; (B) CDGM처리시간에 따른 SP-A mRNA발현변화

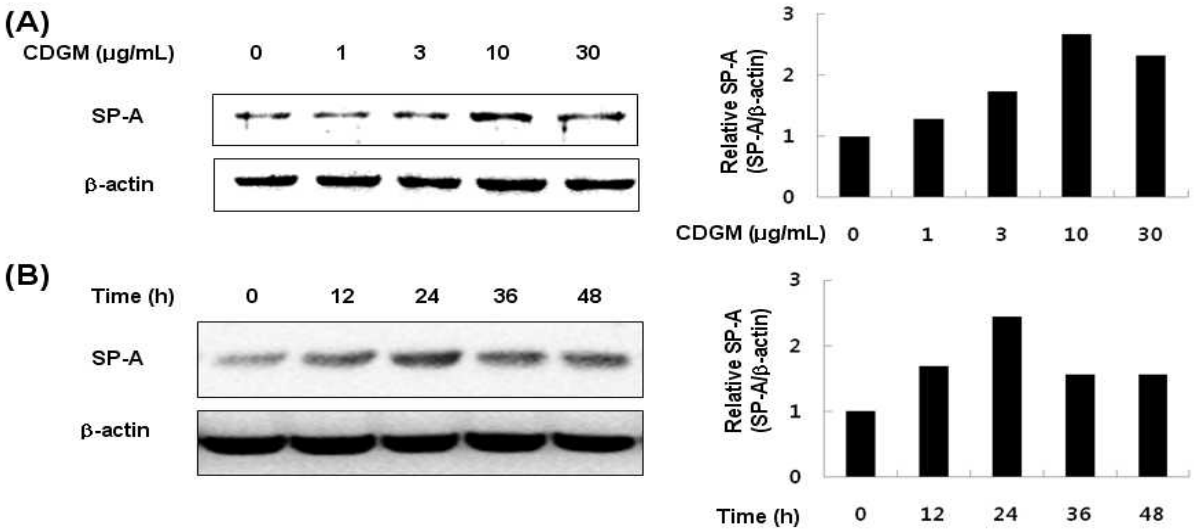


Fig 64. 발아대두 동충하초 추출물의 단일물질(CDGM)이 호흡기 점막상피세포에서 SP-A 단백질발현에 미치는 영향; (A) CDGM농도에 따른 SP-A 단백질발현변화; (B) CDGM처리시간에 따른 SP-A 단백질발현변화

- 다음 단계의 연구로서 CDGM에 의한 SP-A의 발현과 관련된 신호전달체계 및 전사조절인자활성화를 조사하기 위해 우선적으로 CDGM에 의한 SP-A 발현의 세포내 신호전달 주요 표적인자로서 MAP kinase를 유력한 후보로 설정하여 이들의 저해제인 PD98059 (ERK 저해제), SB202190 (p38 저해제), SP600125 (JNK 저해제)를 A549 세포주에 다양한 농도로 1시간동안 전처리한 후 다시 10 μg/mL농도의 CDGM처리 6시간뒤 SP-A mRNA의 발현변화를 RT-PCR기법으로 관찰하였음.
- 앞서 서술한 바와같이 ERK, JNK, 및 p38 등으로 구성되는 MAP kinase는 세포내로의 신호자극시 활성화되어 전사인자의 활성 및 전사후 mRNA의 안정성을 조절하는 중요한 세포내 신호전달매개인자로서 알려져 있음(19).

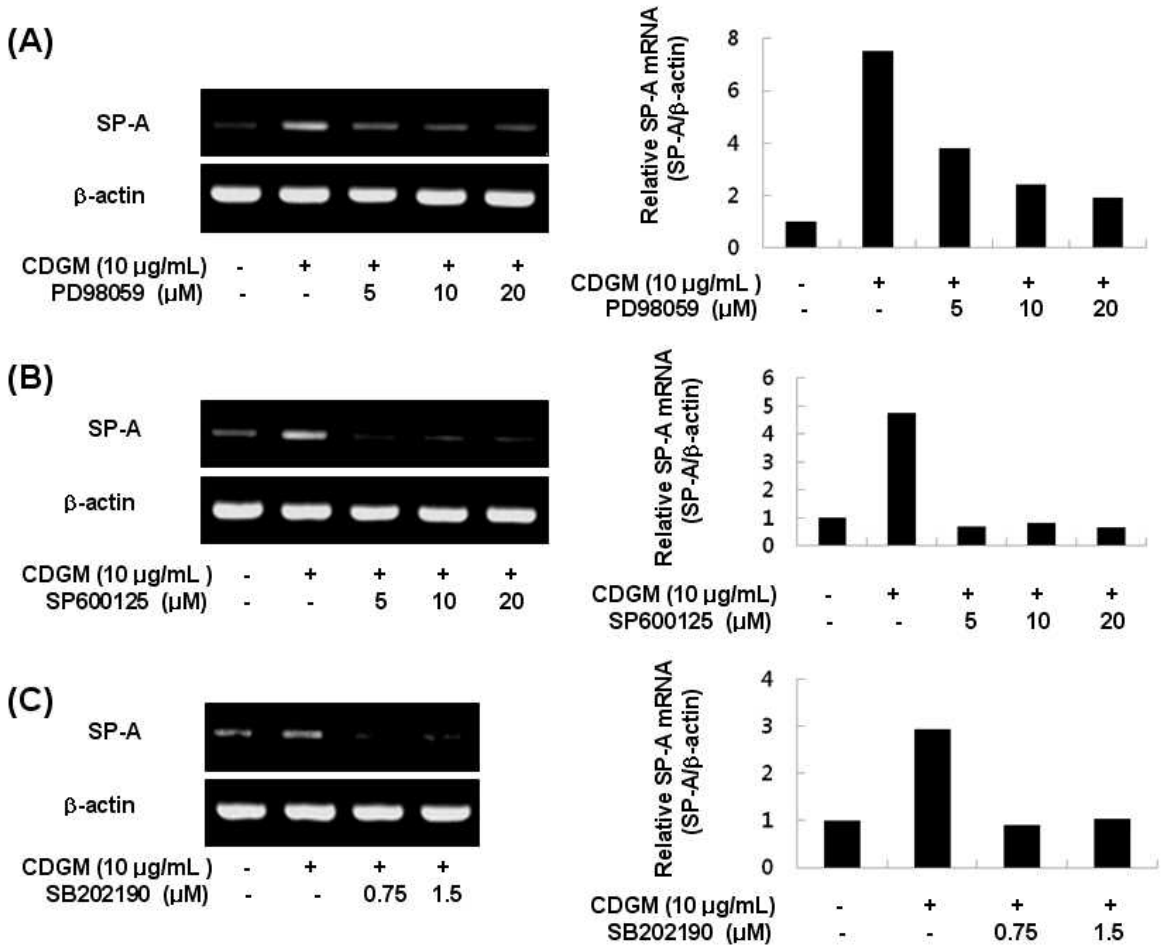


Fig 65. 발아대두 동충하초 추출물의 단일물질(CDGM)이 호흡기 점막상피세포에서 MAP kinase활성에 미치는 영향; (A) ERK활성에 미치는 CDGM의 영향; (B) JNK활성에 미치는 CDGM의 영향; (C) p38활성에 미치는 CDGM의 영향

- Fig 65는 kinase발현에 미치는 CDGM의 영향을 나타낸 결과로서 CDGM에 의한 호흡기 점막상피세포에서의 SP-A발현에는 ERK, JNK, 및 p38 MAP kinase 모두가 관여함을 관찰할 수 있었음.
- 또한 CDGM을 90분간 처리한 A549 세포주에서 핵단백질을 추출하여 DNA-binding 활성을 조사하는 EMSA기법을 통해 CDGM에 의한 호흡기 점막상피세포에서의 전사인자 활성을 조사하였음. 현재까지의 보고들에 의하면 SP-A의 발현에는 NF-κB 전사인자가 관여한다고 알려져 있으므로, 본 연구에서도 이에 대한 CDGM의 활성능을 관찰하였음.
- 결과적으로 10 μg/mL의 CDGM처리시 NF-κB전사인자의 활성이 증가함을 관찰할 수 있었으며, 그 수준은 양성대조군으로 이용한 LPS에 비해 약하나 비처리구에 비해 유의하게 증가함을 관찰할 수 있었음(Fig 66).

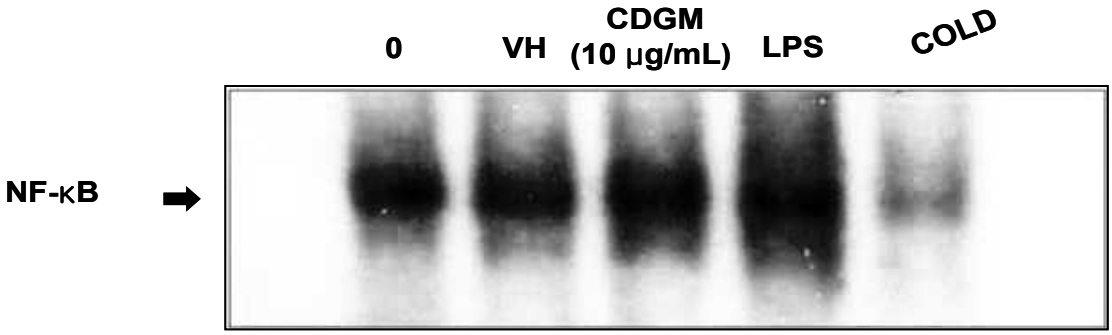


Fig 66. 발아대두 동충하초 추출물의 단일물질(CDGM)이 호흡기 점막상피세포에서 SP-A발현과 관련된 전사인자활성에 미치는 영향; VH(Vehicle control): CDGM을 용해시킨 용제인 DMSO; LPS: 양성대조군으로 사용된 *E. coli*유래 lipopolysaccharide

- 이상의 연구결과들을 통해 본 연구진은 발아대두 동충하초 추출물인 CGGS의 단인물질인 CDGM에 의한 SP-A의 발현을 mRNA와 단백질수준에서 관찰함과 함께 SP-A 발현에는 세포내 주요 신호전달물질로서 ERK, JNK, 및 p38 MAP kinase 및 NF-κB 전사인자가 관여함을 확인할 수 있었음.

3-2. 면역내성(Tolerance)유발 평가와 면역학적 안정성 연구

- 앞서의 연구들을 통해 본 연구진은 호흡기 점막상피세포에서 다양한 발아대두 동충하초 추출물의 효능을 확인할 수 있었으며, 다음단계의 연구로서 상기 발아대두 동충하초 추출물들의 효능을 극대화하기 위한 실용화관련 연구들을 진행하였음.
- 이를 위해 본 연구진은 우선적으로 발아대두 동충하초 추출물의 처리횟수와 용량에 따른 면역학적 안정성과 면역 내성유도여부를 시험하기 위하여, 발아대두 동충하초 추출물인 CGGS로부터 분리/정제한 유용물질(CDGM)을 호흡기 점막상피세포주인 A549에 6시간간격으로 고용량(10 μg/mL) 또는 저용량(1 μg/mL) 반복처리시 SP-A의 발현변화를 mRNA와 단백질수준에서 조사하였음.

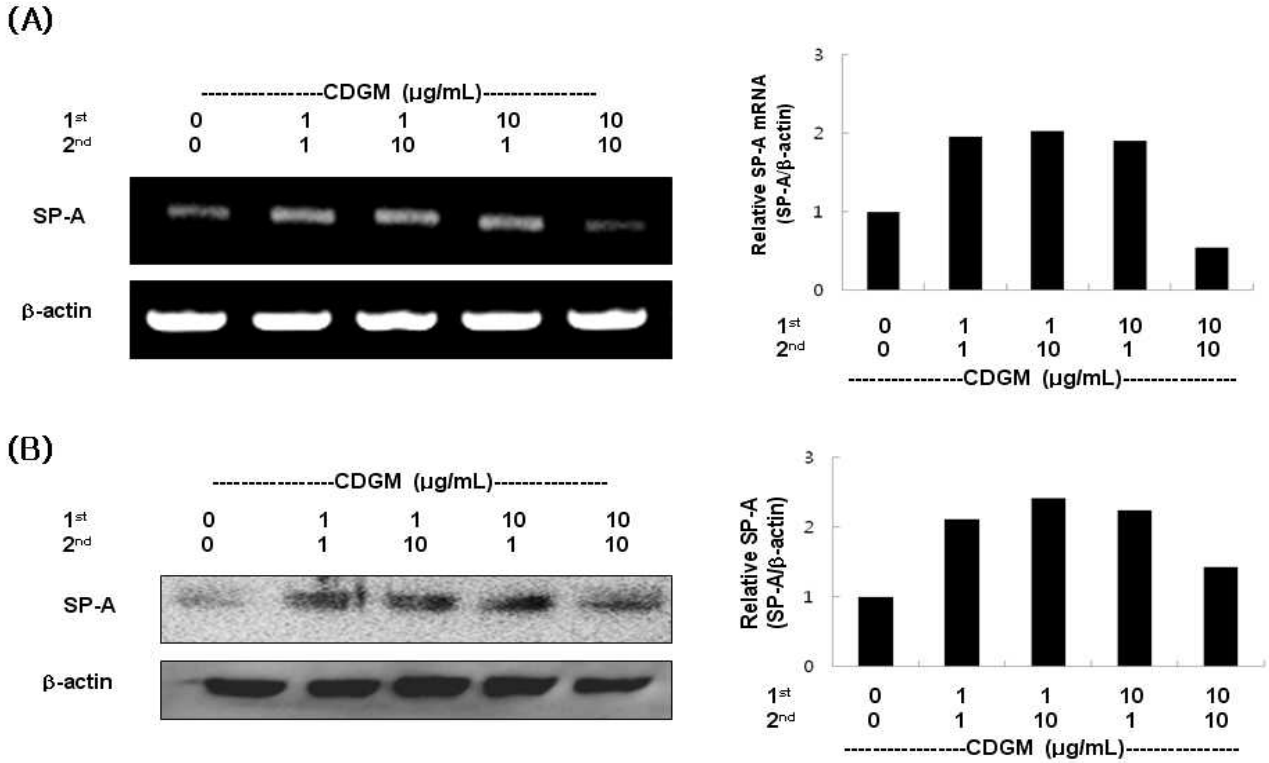


Fig 67. 호흡기 점막상피세포에서 발아대두 동충하초 추출물의 단일물질(CDGM)의 고용량 또는 저용량 반복처리시 SP-A 발현 안정성에 미치는 영향; (A) mRNA수준에서의 SP-A발현 안정성평가; (B) 단백질수준에서의 SP-A발현 안정성평가

- 결과적으로 CDGM의 저용량-저용량, 저용량-고용량 및 고용량-저용량의 반복처리시 SP-A의 발현을 저해하지 않는 등의 면역내성을 관찰할 수 없었으나, 고용량-고용량의 반복처리시 SP-A 발현이 감소되는 면역내성을 관찰할 수 있었음(Fig 67).

3-3. 작용기전을 기반으로 효능조절 작용점 예측과 효능 극대화 조건 탐색/제시

- 상기의 결과에서 본 연구진은 고용량-고용량 반복처리시 SP-A발현이 감소되는 면역내성이 발생하는 현상을 관찰하였으며, 이를 바탕으로 CDGM의 농도별 처리횟수에 따른 면역내성 유발 조건을 조사하여 CDGM의 효능 극대화하는 동시에 고용량-고용량 반복처리시에 관련된 세포내 신호전달 기전을 조사하였음.
- 이를 위해 본 연구진은 CDGM을 호흡기 점막상피세포주인 A549에 1회 또는 2회씩 고용량(10 μg/mL) 또는 저용량(1 μg/mL)으로 처리하여 SP-A의 발현변화를 mRNA수준에서 조사하였음.
- Fig 68에서와 같이 저용량의 CDGM처리시 처리횟수에 따라 SP-A 발현이 상승적으로 증가하는 현상을 관찰할 수 있었으나, 고용량의 CDGM처리시 처리횟수 증가로 SP-A발현이 감소하는 면역내성을 관찰할 수 있었음.

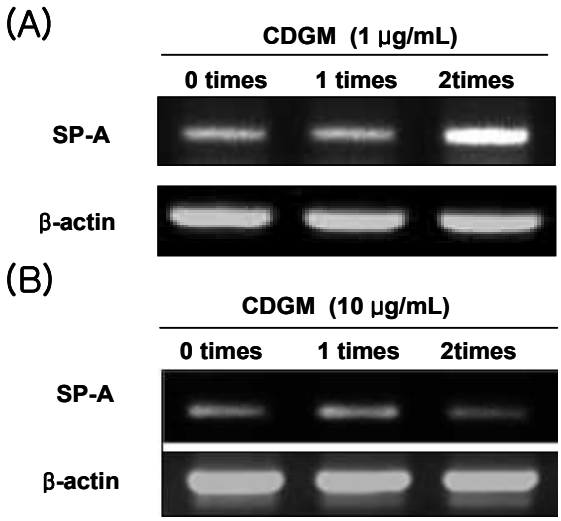


Fig 68. 호흡기 점막상피세포에서 발아대두 동충하초 추출물 단일물질(CDGM)의 농도별 처리횟수에 따른 CDGM의 효능극대화 조건탐색; (A) 저용량 CDGM처리횟수에 따른 SP-A발현변화; (B) 고용량 CDGM처리횟수에 따른 SP-A발현변화

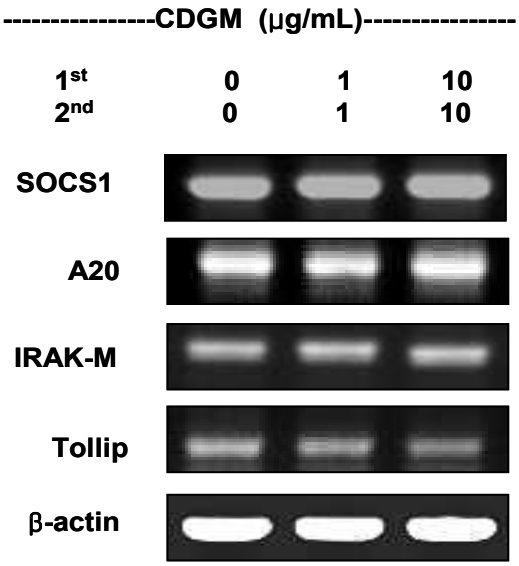


Fig 69. CDGM의 고용량 반복처리에 따른 면역내성기전 규명연구

- 고용량 CDGM의 반복처리시 발생되는 면역내성과 관련된 신호전달 기전을 규명하기 위해 본 연구진은 호흡기 점막상피세포주인 A549세포에 저용량 또는 고용량의 CDGM 반복처리 후 세포내 신호전달억제 인자들로 알려진 SOCS-1 (Suppresssor of cytokine secretion-1), A20, IRAK-M, Tollip의 발현을 mRNA수준에서 조사하였음(24).
- Fig 69에서 보듯 고용량의 CDGM의 반복처리시 SOCS-1, A20, IRAK-M 및 Tollip의 발현은 대조구와 저용량 반복처리시에 비해 유의한 차이를 나타내지 않음을 관찰할 수 있었음. 이는 CDGM의 고용량처리시 나타나는 면역내성이 상기 세포내 신호전달억제 인자들에 의한 것이 아님을 나타내며, 상기 연구결과들은 향후 ST2, TRAILR, SIGIRR 및 PI3K 등 다양한 종류의 세포내 신호전달 억제 인자들에 대한 발현조사를 통해 고용량 CDGM처리시의 면역내성기전을 규명하는 연구가 추가적으로 필요하다는 것을 제시하고 있음.
- 상기 연구의 결과들은 CDGM의 효능을 극대화하기 위한 조건으로 저용량 반복처리가 가장 효과적임을 나타내고 있음.

제 16 절 아토피 피부염에 대한 발아대두 동충하초 및 발아현미 상황버섯의 치료효과 임상 시험 보고서

1. 시험배경 및 목적

아토피 피부염은 주로 유아와 소아에 발생하는 만성 재발성 피부 질환으로 가려움이 심한 습진성 병변이 만성적으로 반복되는 것이 특징이고, 성인이 되어감에 따라 증상이 호전됨이 일반적이나 최근에는 사춘기를 넘긴 청소년과 성인에서도 증상이 지속되는 경우가 점차 증가하고 있다. 치료 및 예방을 위해서는 건조한 피부증상을 개선하기 위한 보습제 사용이 필수적이

며, 가려움증과 피부병변의 신속한 치료를 위해 항히스타민제의 전신 투여 및 부신피질 호르몬제의 도포 및 전신투여 치료가 많이 행해지고 있으며, 이외에도 자외선 치료 인터페론, Thymopentin, Cyclosporin 등이 사용되나 치료효과가 일정하지 않고 장기 사용시 부작용이 생길 가능성이 많아 제한이 있고, 근본적인 치료가 힘들어, 환자들은 민간요법 등의 다른 대체의학을 이용하다가 부작용을 겪는 사례가 늘고 있다.

본 실험은 약물이 아닌 기능성 식품을 이용하여 아토피피부염을 호전시킬 수 있는지 알아보고자 한다. 본 실험에 사용되는 건국 라파파는 대두발아 동충하초(Cordyceps)와 발아현미 상황버섯(Phellinus linteus) 균사체를 분말화한 과립형 가공식품으로 시험자가 물과 함께 간편하게 복용할 수 있다.

상황버섯은 대표적인 약용버섯으로 최근에 많은 연구가 행해져, 버섯의 다당체 또는 단백다당체에 의해 T세포, 자연살세포(NKcell), 대식세포 B세포등 면역기능이 항진됨이 보고되었다. 이러한 다당류는 정상세포에는 영향을 주지 않으면서, 면역기능을 항진시켜, 동물실험에서 암의 성장을 억제하고 생존기간을 연장함이 보고되었다. 발아현미 상황버섯 균사체를 이용한 동물 실험결과 아토피피부염의 증상을 호전시킬 수 있는 가능성을 보여주었으며 본원에서 시행한 사람의 아토피피부염에 대한 치료 효과에 대한 실험에서도 유의한 효과를 보였다. 동충하초는 예로부터 중국에서 의약품으로 사용되는 버섯의 일종이다. 최근, 동충하초의 추출물에서 항균성, 항암성이 발표되었고 항산화 효과도 보고되었으므로, 포도상구균의 집락이 많고, 이차감염으로 악화되는 아토피피부염의 만성적인 염증병변에 효과가 있을 것으로 생각된다.

2. 시험대상 및 방법

1) 시험대상

본 연구는 인하대학교병원 의학연구윤리심의위원회의 승인하에 2008년 1월부터 2월까지 병원 홈페이지 광고, 병원내 포스터 부착, 피부과 내원 환자들 가운데 임상 시험자를 모집하였다. 모집된 환자들 가운데 Hanifin과 Rajka에 의한 아토피피부염 진단기준에 적합하고, 아래의 제외 기준에 해당되지 않는, 만 3~15세의 환자 40명(남:20, 여:20)을 선정하였다
선정된 40명에게는 본 임상 시험의 목적, 시험 스케줄, 예측 가능한 위험성에 대하여 충분히 설명한 후, 시험에 참가하기로 모두 서면 동의를 받고 2008년 3월부터 8월까지 임상 시험을 시행하였다(Table 1).

제외 기준

- 본인이 원하지 않거나 동의서를 작성하지 않는 경우
- 시험 참가 1개월 내에 보습제외에 다른 전신적 또는 국소적 치료를 받은 경우
- 본 식품 외에 다른 약물이나 건강 기능성 식품을 지속적으로 복용하는 경우
- 감염성 피부 질환이 있는 경우
- 다른 전신 질환(심장, 간, 신장 등)이 있는 경우
- Rajka와 Langeland에 의거하여 중증 아토피 피부염으로 분류되는 환자
- 기타 위의 사항들 외에 임상시험 책임자의 판단으로 임상수행이 곤란하다고 판단되는 경우

Table 6. 시험자의 나이와 성별 비율(치료 시작시)

Age/Sex	Male(%)	Female(%)	Total(%)
3-9 year	11 pt(55)	12 pt(60)	23(57.5)
10-15 year	9 pt(45)	8 pt(40)	17(42.5)
Total	20 pt(50)	20 pt(50)	40(100)

2) 시험방법

(1) 발아대두 동충하초 및 발아현미 상황버섯복용법

발아대두 동충하초 및 발아현미 상황버섯은 건국대학교 농과대학 세포활성 연구소에서 만들어졌으며 정제 건조된 형태로 제작되었다. 경증, 또는 중등도의 아토피 피부염으로 진단된 40명의 소아 아토피 피부염 환자들에게 발아 현미 상황을 매일 하루 3번 식후에 복용하도록 하였다. 20kg미만의 어린이는 하루 6g, 20kg에서 40kg사이의 어린이는 하루 9g, 40kg이상의 어린이는 하루 12g의 양을 복용하였다. 치료 기간 중 사용하던 보습제 이외의 다른 치료는 하지 않았다.

(2) 임상적 평가

등록된 환자들은 시험 전, 기준일(치료 시작일), 4주, 8주, 12주(치료 종료일)째에 피부과에 방문하여 아래와 같은 항목에 대한 검사 및 평가를 시행하였다. 평가시 관측자 간의 편차를 없애기 위해 피부과 의사 1인에 의해 신체 검사를 시행하고 과거 병력, 소양증의 강도와 수면장애 유발 정도를 문진하고 모든 피부 병변을 디지털 카메라로 촬영하였다.

(2-1) Objective SCORAD 지수

Objective SCORAD 지수는, 본 연구 대상자 가운데 소아 시험자의 경우 주관적 증상인 소양증의 강도와 수면장애 유발정도를 객관적으로 답변하기 어려워 이에 의한 오차를 배제하기 위해 측정하였으며, 주관적 증상을 제외한 객관적인 신체 병변의 범위(extent %)와 홍반, 부종, 삼출/가피, 찰상, 태선화, 건조함의 정도(intensity)를 각 0-3점으로 측정하여 아래의 방법으로 치료 시작일, 치료 4주, 8주, 12주째 방문시 평가하였다.

Objective SCORAD = (0.2 X area(%)) +{ 3.5 X (erythema + edema/population + oozing/crusts + excoriations + lichenification + dryness)}

(2-2) 환자의 주관적 증상 (소양증의 강도와 수면장애 유발정도)

시험자 또는 시험자의 보호자들은 치료 시작일, 치료 4주, 8주, 12주째 방문시 주관적인 증상인 소양증의 강도(10cm-visual analogue score, 0cm; 전혀 가렵지 않음, 10cm; 상상할 수 있는 최악의 가려움)와 수면 장애 유발정도(10cm-visual analogue score, 0cm; 전혀 수면에 장애를 받지 않음, 10cm; 전혀 수면을 취할수 없는 상태)를 각0~10점으로 평가하였다.

(2-3) SCORAD 지수

SCORAD지수는 치료 시작일, 치료 4주, 8주, 12주째 방문시 측정한 각각의 Objective SCORAD지수와 환자의 주관적 증상 (소양증의 강도와 수면장애 유발정도)을 합산하여 평가하였다.

SCORAD = (0.2 X area(%)) +{ 3.5 X (erythema + edema/population + oozing/crusts + excoriations + lichenification + dryness)} + subjective score

(2-4) 환자의 종합적인 임상 반응 평가, 부작용의 평가

치료 시작일을 제외한 4, 8, 12주 방문 시 시험자 또는 시험자의 보호자가 본 시험제품에 대한 종합적인 임상 반응 평가를 하였으며(Table 7) 복용 이래 나타난 부작용을 보고하였다.

Table 7. 종합적인 임상 반응 평가 척도

Scale	Patient's global assessment of clinical response
S1	아주만족
S2	만족
S3	보통
S4	불만족
S5	아주불만족

(2-5) 혈액검사 및 혈청 Ig E, IFN-r의 측정

모든 환자들은 임상 시험 시작 전 일반 혈액 검사, 생화학 검사를 통해 전신 질환을 배제하였다. 또한, 아토피피부염 호전의 객관적 지표가 될 수 있는 혈청 내 Ig E, IFN-r를 시험 시작 전 과 시험 종료후 측정하여 임상적 호전과의 상호 연관성을 연구한다.

3) 통계적 분석

SPSS(version 12.00; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 프로그램을 이용하여, 치료 전, 4주, 8주, 12주에 평가한 Objective SCORAD지수, SCORAD지수 및 소양증의 강도, 수면장애 유발정도, 환자의 종합적인 임상 반응 평가, 혈청 IgE, IFN-r에 대해 Paired T-test로 분석하였고 통계학적 차이의 유의수준은 $p\text{-value} < 0.05$ 로 하였다.

3. 결과

1) 환자의 분포, 연령 및 성별

총 40명의 대상 환자 중 8명은 자의로 치료를 중단하였고 시험을 종료한 환자는 32명

(80%)으로 남자가 17명, 여자가 15명이었으며(Table 8), 평균 연령은 8.8±4.1세(4세~15세), 평균 유병기간은 4.8±3.5년(1~10년)이었다.

Table 8. 시험자의 나이와 성별 비율(시험 종료시)

Age/Sex	Male(%)	Female(%)	Total(%)
3-9 year	10 pt(59)	11 pt(73)	21(66)
10-15 year	7 pt(41)	4 pt(27)	11(34)
Total	17 pt(100)	15 pt(100)	32(100)

2). 임상적 평가

(1) Objective SCORAD 지수에 의한 평가

치료를 종료한 32명의 치료 전 Objective SCORAD 지수의 평균은 42.2±15.6(범위 17.4-71.5)이었으며, 4주간 치료 후에는 37.6±17.3(범위 13.9-74.1), 8주간의 치료 후에는 32.4±18.2(범위 0-69.6), 12주간 치료 후에는 32.5±15.59(범위 0-65.9)으로 치료 전과 비교하여 Objective SCORAD 지수의 감소를 보였으며 이는 통계적으로 유의하였다($p<0.05$).

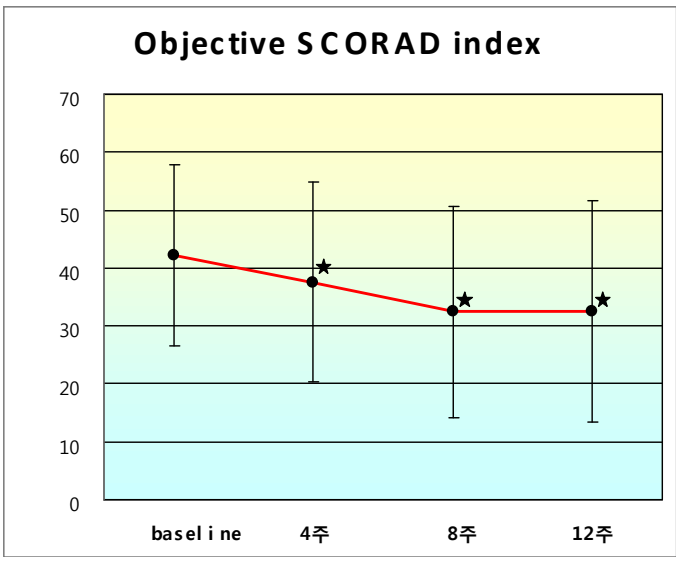


Figure 70. The Objective SCORAD indices of 32 patients. There was siginificant decrease at the each visit days (mean ± SD) (*: $p<0.05$).

(2) 환자의 주관적 증상(소양증의 강도와 수면장애의 정도)에 대한 평가

(2-1) 소양증의 강도

치료를 종료한 32명의 치료 전 소양증의 강도의 평균은 7.1±1.5(범위 3-10)이었으며, 4주간 치료 후에는 5.5±2.2(범위 1-9), 8주간의 치료 후에는 4.7±2.0(범위 1-9), 12주간 치료 후에는 3.9±2.0(범위 0-8)으로 치료 전과 비교하여 소양증의 강도는 감소를 보였으며 이는 통계적으로 유의하였다($p<0.05$).

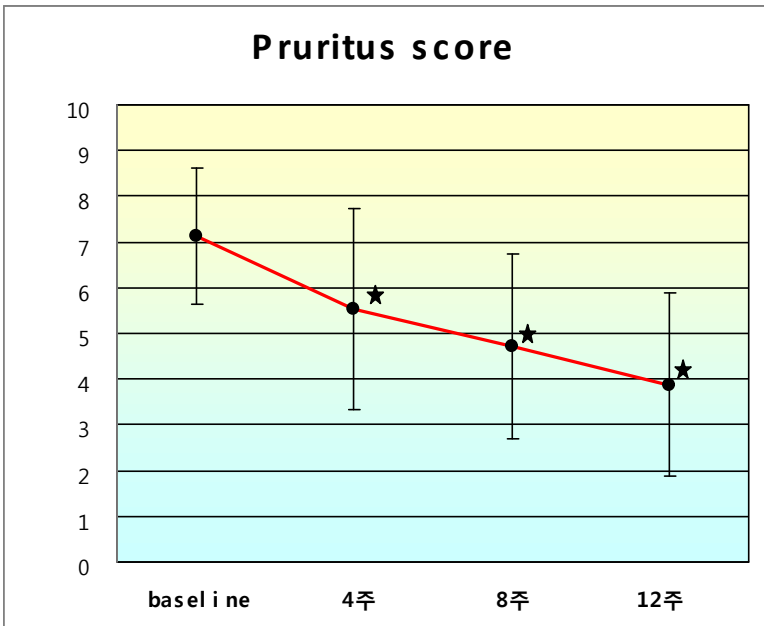


Figure 71. The pruritus score indices of 32 patients. There was siginificant decrease at the each visit days (mean ± SD) (*: $p<0.05$).

(2-2) 수면장애의 정도

치료를 종료한 32명의 치료 전 수면장애의 정도의 평균은 7.1±1.5(범위 3-10)이었으며, 4주간 치료 후에는 5.5±2.2(범위 1-9), 8주간의 치료 후에는 4.7±2.0(범위 1-9), 12주간 치료 후에는 3.9±2.0(범위 0-8)으로 치료 전과 비교하여 수면장애의 감소를 보였으며 이는 통계적으로 유의하였다($p<0.05$).

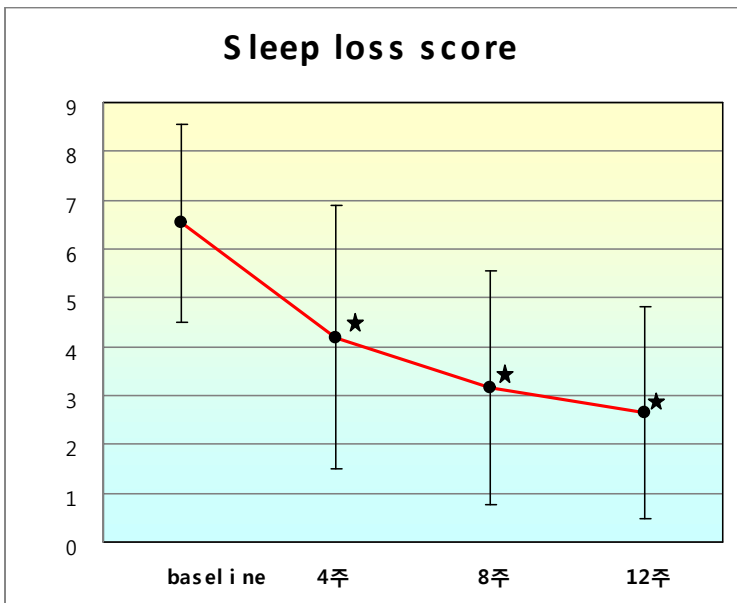


Figure 72. The sleep loss score indices of 32 patients. There was siginificant decrease at the each visit days (mean ± SD) (*: $p<0.05$).

(3) SCORAD 지수에 의한 평가

치료를 종료한 32명의 치료 전 SCORAD 지수의 평균은 55.8±17.1(범위 25.8-90.5)이었으며, 4주간 치료 후에는 47.5±20.8(범위 14.9-91.1), 8주간의 치료 후에는 40.8±20.4(범위 2-93.1), 12주간 치료 후에는 38.9±21.7(범위 0-84.2)으로 치료 전과 비교하여 SCORAD지수의 감소를 보였으며 이는 통계적으로 유의하였다($p<0.05$).

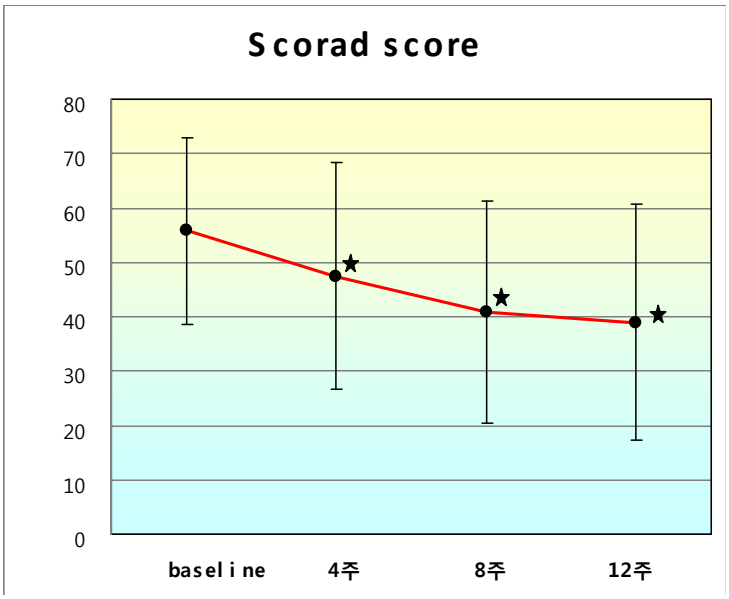


Figure 73. The SCORAD score indices of 32 patients. There was siginificant decrease at the each visit days (mean ± SD) (*: $p<0.05$).

(4) 환자의 종합적인 임상 반응 평가

시험을 종료한 32명의 환자에게 제품 복용에 대한 만족도를 시험 시작4주, 8주, 12주에 위의 <Table.7> 의 5항목으로 설문 조사하였을 때 치료가 진행될수록 '만족한다' 이상의 반응을 보인 환자들의 수가 늘어났으며, 치료 종결시 '만족한다' 이상의 평가를 한 환자가 19명(59%)으로 긍정적인 결과를 보였다. 하지만 환자의 종합적인 임상반응평가는 통계적으로 유의하지 않았다.($p=0.21$)

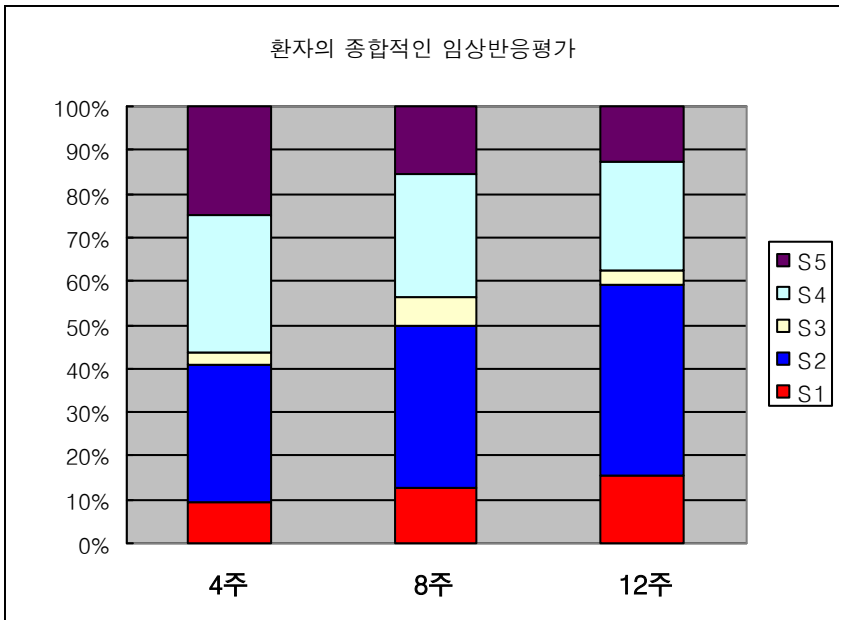


Figure 74. Change from baseline to the end of treatment for percentage of patient's global assessment scale. (S1: 아주 만족한다, S2: 만족한다, S3: 보통, S4: 불만족한다, S5: 아주 불만족한다)

(5) 혈청 Ig E

시험을 종료한 32명의 시험 전 혈청 IgE의 수치는 389.86 ± 363.3 이었으며, 12 주간의 시험 후에는 395.21 ± 247.5로 큰 변화를 보이지 않았으며 통계적으로도 유의하지 않았다 (p=0.80), (Fig. 75).

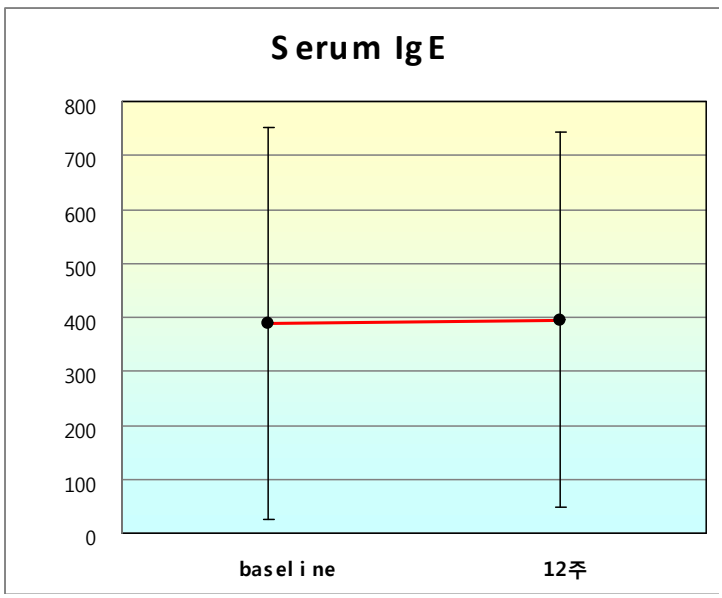


Figure 75. Change of serum IgE from baseline to the end of treatment (p=0.80)

(6) IFN-r

3) 부작용

임상 시험 종료 후 일반혈액검사, 일반화학검사, 소변검사는 모든 환자들에서 정상 소견을 보였으며 12주의 시험 기간 동안 3명의 환자에서 일시적인 홍반을 보였을 뿐, 특별한 부작용은 나타나지 않았다.

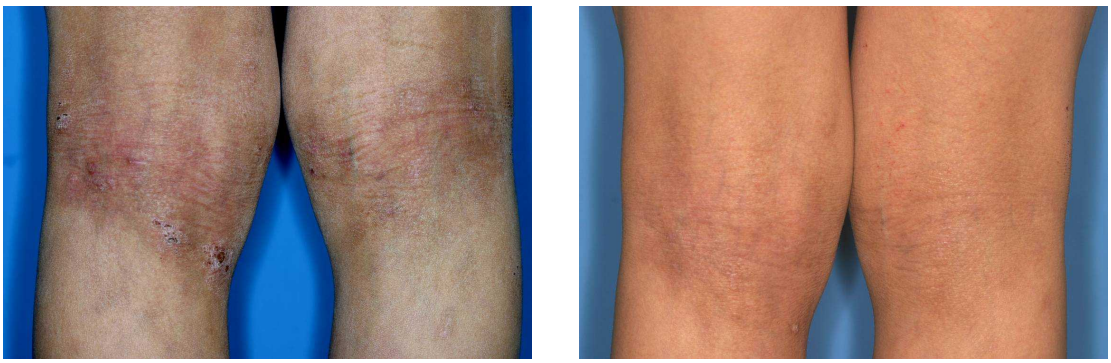


Figure 76 치료 시작전(왼쪽)에 비해 12주간의 치료후(오른쪽)의 아토피 피부염 병변이 호전된 것을 볼 수 있다(환자 No. 7).

4. 고찰 및 결론

발아현미상황버섯(*Phellinuslinteus*grownongerminatedbrownrice)은 뽕나무에 붙어 있는 상황버섯 종균을 채취하여 발아된 현미에 접종시켜 만든 기능성 곡류로, 목질진흙버섯(*Phellinuslinteus*)의 약효를 가지면서 배양이 쉽고 성장이 빨라 다생산이 가능한 장점이 있다. 또한 현미에 풍부한 arybonoxylan 성분이 IFN-ɣ의 분비 및 자연 살해 세포를 자극한다는 보고가 있다. 발아현미상황버섯은 in vitro 상에서 Th-2세포 반응에 의한 IL-4,10 분비를 억제하며, Th-1세포 반응에 의해 분비되는 IFN- ɣ의 분비를 증가 시켜 Th-1/Th-2의 불균형을 조절하여 Ig E의 분비를 억제할 수 있음이 밝혀졌다. 따라서 발아현미상황버섯은 IFN-ɣ의 분비를 통해 Th-1/Th-2의 불균형을 조절하며 Ig E의 분비를 억제할 수 있기 때문에 아토피 피부염환자에게 많은 도움이 될것으로 생각된다.

동충하초(*Cordyceps*)는 주로 곤충에 침입하여 이를 기주로 자실체를 형성하거나 충체상의 포자과를 형성하는 버섯의 일종으로 중국에서 인체에 활력을 주는 불로장생의 묘약이라고 인식되어 왔다. 또한 동충하초의 항암활성 및 면역강화, 콜레스테롤 억제, 혈당강하효과, 혈액순환 증진 등의 다양한 생리활성이 보고되어 기능성 식품으로 최근 큰 주목을 받고 있다. 그리고, 최근 여러 in vitro study에서 동충하초의 추출물에서 항균성, 항암성, 면역 억제 기능이 보고되었다. 따라서 면역기능의 이상이 중요한 병인으로 이해되는 아토피 피부염의 치료에 도움이 될 것으로 생각되며, 포도상구균의 집락이 많고, 이차감염으로 악화되는 아토피피부염의 만성적인 염증병변에도 효과가 있을 것으로 생각된다

본 시험에서는 경증 및 증등증의 아토피피부염 환자 32명을 대상으로 대두발아 동충하초

(Cordyceps)와 발아현미 상황버섯(Phellinus linteus) 균사체를 분말화한 과립형 가공식품인 건국 라파파를 매일 6~12g씩 12주간 투여하면서 objective SCORAD 지수, SCORAD지수, 환자의 종합적 임상 반응 평가, 환자의 주관적 증상인 소양증의 강도, 수면장애 유발정도, 그리고 혈청 IgE에 대한 평가를 실시하였다. SCORAD 지수는 아토피 피부염의 중등도를 평가하는데 널리 사용되는 방법으로 아토피 병변의 범위와 정도 및 주관적 증상에 대하여 평가하여 이를 수치화한다. 그러나 본 시험에서 소아환자가 포함되었기에 주관적 증상인 소양감과 수면 방해 정도를 객관화하기 어려울 가능성을 고려하여 이를 제외한 Objective SCORAD지수도 함께 평가하였다. 결과로 Objective SCORAD지수, SCORAD지수, 소양증의 강도와 수면장애 유발정도의 네가지 항목에서 모두 수치가 감소하여 긍정적인 결과를 보였으며, 치료 전후 통계적으로 유의성을 보였다($p<0.05$). 통계적 유의성을 보이진 않았으나 환자들의 종합적인 임상반응 평가도 긍정적인 결과를 보였으며 연구기간 동안 특별한 부작용은 발생하지 않았다.

결론적으로, 경증 및 중등도의 아토피 피부염 환자를 대상으로 시행한 임상 연구를 통하여 동충하초(Cordyceps)와 발아현미 상황버섯(Phellinus linteus) 균사체를 분말화한 과립형 가공식품인 건국라파파는 소아 한국인 아토피 피부염 환자에게 효과 있는 치료법이라는 것을 알 수 있었다. 또한, 기존에 알려진 약물의 장기 사용시 발생할 수 있는 다양한 부작용이 없으며, 아토피피부염에 효과가 있을 경우 기존에 알려진 약물을 복용하기 어려운 만성 질환 환자나, 기존의 약물에 대한 부작용을 걱정하는 많은 아토피 피부염 환자에게 보조 혹은 대체요법으로 사용 될 수 있을 것으로 생각된다. 하지만, 본 시험은 대조군 없이 적은 수의 환자를 대상으로 시행되었으므로 향후 더 많은 환자군을 대상으로, 적절한 대조군을 구성하여 이 약제의 용법과 사용기간, 병용요법 등에 대한 추가적인 연구가 있어야 할 것으로 생각한다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 목표달성도

구분	연도	세부연구목표	평가의 착안점 및 기준	목표의 달성도
1차 연도	2007	○균사체 Master/working cell bank 구축 ○배양조건의 최적화	○PDA평판배지에서 계대안정성여부 ○배양조건의 최적화 확립여부 -배양소재, 접종원, 배양온도, 배양기간 등	100%
		○유용기능물질 프로파일링 및 구조분석 ○ 세포내 신호전달 체계와 전사조절인자들의 활성화 기전 연구 ○ 항암 활성 관련 인자들에 대한 효과 분석 ○ 대식세포에 대한 효능분석	○분획물의 분리 조건을 확보하여, 대량분리/ 각 세부과제에 시료제공 ○발아대두 동충하초성분 LC/MS/MS 분석조건 확립 ○Toll like receptor 4/6 혹은 사이토카인 수용체를 통한 신호전달체계 억제 혹은, innate immune response 활성화 분석 ○여러 가지 암세포주에 대한 세포독성 실험 ○대식세포에서 LPS로 유도되는 MMP-9의 활성 저해. ○ 대식세포에서 LPS로 유도되는 염증성 cytokine 및 chemokine (TNF-a, IL-8 등)의 발현 저해.	100%
		○호흡기점막의 상피세포를 이용한 평가 모델 확립 ○항균펩타이드와 계면활성단백질 발현 평가를 이용한 호흡기점막 기능평가 ○케모카인과 싸이토카인 발현 평가를 이용한 호흡기점막 면역강화 평가	○호흡기점막 상피세포주의 면역 평가 실험을 위한 배양 적합조건 정립여부 ○발아대두 동충하초자극시 호흡기점막 상피세포에서 항균펩타이드와 계면활성단백질의 스크리닝과 발현패턴 분석여부 ○발아대두 동충하초자극시 호흡기점막 상피세포에서 케모카인과 싸이토카인의 스크리닝과 단백질 및 발현패턴 분석여부	100%

구분	연도	세부연구목표	평가의 착안점 및 기준	목표의 달성도
2차 연도	2008	○균사체생산 조건의 표준화 ○엑스제조 최적조건 확립	○배양 균사체 생산 품질보증(QA)과 품질관리(QC) 기준확립 및 밸리데이션여부 ○표준화된 엑스제조법 확립여부	100%
		○발아조건별 활성성분 최적함량비율 결정 ○면역 활성 인자 탐색 및 암세포 살해 효능 검사 ○대사성 조절 인자 탐색 및 기능 분석 ○ 항암 활성 물질의 암세포 사멸 기전 분석	○발아대두 동충하초유래 호흡기 점막면역강화성분 최적함량비율 결정 ○발아대두 동충하초유래 항암, 항염증성분 최적함량비율 결정 ○LC/MS/MS를 사용한 대사물질 전사 ○T helper cell 및 NK cell 활성인자 탐색 계속 및 암세포 살해 효능 검정 ○ 여러 가지 암세포에 효과 있는 여러 물질들을 분리하여 발암유전자와 항암유전자 간의 결합반응에 적용. ○대사성 조절인자 표적인자인 퍼옥시좀 증식체 활성화 수용체 (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and alpha; 퍼옥시좀 증식 활성화 수용체) 리간드 탐색 및 기능 분석: 비만세포 3T3-L1의 분화에 미치는 과정 분석 ○분리해낸 유도체를 이어 암세포 주에 적용시켜 암세포 독성 정도 측정-세포독성 메커니즘 규명	100%
		○발아대두둥충하초에서 분리/정제된 유용물질을 이용한 호흡기 점막기능 및 면역강화 평가와 작용기전 연구	○분리/정제된 유용물질의 호흡기점막 기능 및 면역강화평가 여부 ○분리/정제된 유용물질에 특이적으로 조절되는 표적인자 발굴여부 ○세포활성을 유도하는 세포수용체 규명 및 생체막 구조 연구여부	100%

구분	연도	세부연구목표	평가의 착안점 및 기준	목표의 달성도
3차 연도	2009	○원료 생산 최적조건 확립 및 대량생산 ○Bio-neutraceutical 개발 ○제품화	○발아대두 동충하초 원료 생산 품질보증(QA)과 품질관리(QC) 기준확립 및 밸리데이션 여부 ○Scale-up 및 대량생산조건확립여부 ○제형연구개발여부 ○ 경쟁력 있는 제형 2가지를 시제품으로 개발 여부(2종이상)	100%
		동충하초 유래 생리활성물질 대량분리 생산공정의 표준화 ○면역 활성 효능 검사 ○대사성 조절 인자 탐색 및 *in vivo* 효능 분석	저비용 고기능성 동충하초 생산공정의 표준화 생산공정의 표준화 ○T helper cell 활성인자 탐색: Th2 cell line D10S 활성화 여부 검정 ○Natural Killer cell의 활성여부 검사 ○Cytolytic T cell의 활성화에 의한 타겟 암세포용해 검사 ○비만세포 3T3-L1의 분화에 미치는 과정 분석, 비만세포, 근육세포 등에서 당흡수 및 인슐린 신호전달 조절 기전 분석 ○Peroxisome proliferator-activated receptor; 퍼옥시좀 증식 활성화 수용체) 리간드의 *in vivo* 효능 분석: 비만/당뇨 동물모델 ob/ob or db/db mice에 처리 비만/당뇨의 효능 검정	100%
		○발아대두둥충하초의 효능지표물질의 면역조절효능 극대화 및 활용최적화 연구	○세포내 신호전달 체계와 전사조절인자들의 활성화 연구여부 ○면역내성 (tolerance) 유발 평가와 면역학적 안정성 연구여부 ○작용기전을 기반으로 효능조절 작용점 예측과 효능 극대화 조건 탐색/제시 여부	100%

제 2 절 관련 분야에의 기여도

1. 신규소재인 발아대두 동충하초를 생산하는 최적의 방법을 확립하여 생산농가의 소득증대에 기여할 수 있게 되었다.

2. 발아대두 동충하초로부터 유용물질 프로파일링 기술과 후보물질의 구조를 규명하여 신규물질 4가지를 밝혀냈다.

3. 발아대두 동충하초로부터 호흡기 점막기능 조절물질을 발굴하여 인체면역강화제품 개발에 기여할 것이다.

4. 발아대두 동충하초로부터 대사성질환의 핵심 조절인자인 PPARɣ의 결합능력이 Indonethacin 보다 뛰어난 것으로 밝혀져 대사성 질환 예방 및 치료제 개발에 기여할 것으로 본다.

5. 발아대두 동충하초의 추출물을 이용하여 항바이러스제품으로 일본에 수출하고 있다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절. 연차별 연구성과 목표 및 성과

(단위 : 건수)

구분	특허출원	특허등록	신품종등록 (유전자원 등 포함)	논문		달성도 (%)
				국외(SCI)	국내	
1차년도	1			1	0	
2차년도	2	1		3	0	
3차년도	2	1		3	0	
계	5	2		7	0	

1. 논문 실적

① JUNG NAM CHOI, JIYOUNG KIM, MI YEON LEE, DONG KI PARK,YOUNG-SHICK HONG, CHOONG HWAN LEE*, Metabolomics revealed novel isoflavones and optimal cultivation time of Cordyceps militaris fermentation, *J Agric Food Chem.* 2010 Apr 14;58(7):4258-67.

② Eun Hee Seo, Jeongwoo Kang, Ki Hong Kim, Min Chul Cho, Sojung Lee, Hee Jong Kim, Jung Hee Ki, Eun Jin Kim, Dong Ki Park, Soo Hyun Kim, Yang Kyu Choi, Jin Man Kim, Jin Tae Hong, Do Young Yoon. Detection of Espressed IL-32 in Human Stomach Cancer Using ELISA and Immunostaining. J. Microbiol. Biotechnol. (2008), 18(9), 1606-1612.

③ In Su Cheon, Sang Su Woo, Seok-Seong Kang, Jintaek Im, Cheol-Heui Yun, Dae Kyun Chung, Dong Ki Park, Seung Hyun Han (2008.03). Peptidoglycan-mediated IL-8 expression in human alveolar type II epithelial cells requires lipid raft formation and MAPK activation. Molecular Immunology 45(6):1665-1673.

④ Jintaek Im, Jun Ho Jeon, Min Kyung Cho, Sang Su Woo, Seok-Seong Kang, Cheol-Heui Yun, Kangseok Lee, Dae Kyun Chung, Seung Hyun Han (2009.12). Induction of IL-8 expression by bacterial flagellin is mediated through lipid raft formation and intracellular TLR5 activation in A549 cells. Molecular Immunology 47(2~3):614-622.

⑤ Sun Kyung Kim, Jintaek Im, Cheol-Heui Yun, Jin Young Son, Chang Gue Son, Dong Ki Park, Seung Hyun Han (2008.09). *Armillariella mellea* induces maturation of human dendritic cells without induction of cytokine expression. Journal of Ethnopharmacology 119(1):153-159.

⑥ Young Sook Kim, Jintaek Im, Jung Nam Choi, Seok-Seong Kang, YeoJin Lee, Choong Hwan Lee, Cheol-Heui Yun, Chang Gue Son and Seung Hyun Han (2010.03). Induction of ICAM-1 by *Armillariell amellea* is mediated through generation of reactive oxygen

species and JNK activation. Journal of Ethnopharmacology 128(1):198-205.

⑦ Ji Young Han, Jintaek Im, Jung Nam Choi, Choong Hwan Lee, Hye Jin Park, Dong Ki Park, Cheol-Heui Yun, Seung Hyun Han (2010.01). Induction of IL-8 expression by *Cordyceps militaris* grown on germinated soybeans through lipid rafts formation and signaling pathways via ERK and JNK in A549 cells. Journal of Ethnopharmacology 127(1): 55 - 61

2. 학회 발표

1) 국내학회

① Jintaek Im, Jun Ho Jeon, Min Kyung Cho, Sang Su Woo, Seok Seong Kang, Cheol Heui Yun, Seung Hyun Han (2009.11) Induction of IL-8 expression by bacterial flagellin is mediated through lipid raft formation and intracellular TLR5 activation in A549 cells. The 2009 Fall Conference of The Korean Association of Immunologists, Seoul Kyoyuk Munhwa Hoekwan, Korea.

② Jintaek Im, Min Kyung Cho, Sang Su Woo, Seok Seong Kang, Jun Ho Jeon, Cheol Hei Yun, Seung Hyun Han (2009.01). Flagellin-induced IL-8 expression repuires formation of lipid rafts and activation of PKC and MAP kinases. The 3rd Meeting for Reading Research Papers of Society for the Research Molecular Microbiology, Yang Pyoung Valley, Yang Pyoung, Korea.

③ Seok-Seong Kang, In Su Cheon, Sang Su Woo, Jintaek Im, Cheol-Heui Yun, Seung Hyun Han (2007.11). Peptidoglycan induces interleukin-8 expression in a human lung epithelial cell line, A549. 55th Annual Autumn Conference of the Korean Association of Immunologists, Seoul JW Marriott Hotel, Seoul, Korea.

④ Jung Nam Choi, Jiyoung Kim, Mi Yeon Lee, Ah Jin Kim, Dong Ki Park, Choong Hwan Lee. (2009) Optimizing Cultivation Process for Bioactive Compounds Production of *Cordyceps militaris* Grown on Germinated Soybean Using Metabolomics Approach. The Korean society for Microbiology and Biotechnology.

2) 국제학회

① Jung Eun Baik, Cheol Heui Yun, Seung Hyun Han (2010.05) Calcium hydroxide attenuates the inflammatory potential of lipoteichoic acid (LTA) from *Enterococcus faecalis* by deacylating the LTA. 97th Annual Meeting of the American Association of Immunologists, Baltimore, Maryland, U.S.A.

② Jintaek Im, Min Kyung Cho, Sang Su Woo, Seok Seong Kang, Jun Ho Jeon, Cheol Hei Yun, Seung Hyun Han (2009.05). Flagellin-induced IL-8 expression requires formation of lipid rafts and activation of PKC and MAP kinases. 96th Annual Meeting of The American Association of Immunologists, Seattle, Washington. U.S.A.

③ Sung Moo Park, Byoung Shik Shim, Seok Seong Kang, Seung Hyun Han, Cheol Heui Yun (2009.02). Intranasal immunization with plasmid DNA encoding spike protein of

SARS-corona virus loaded polyethylenimine elicits antigen-specific humoral and cellular immune response. 2009 Keystone Symposia Immunlogic Memory and Host Defense, Keystone, Colorado, U.S.A.

④ Jintaek Im, Min Kyung Cho, Seok-Seong Kang, Jae Seung Yang, Cheol-Heui Yun, Seung Hyun Han (2008.04). Bacterial flagellin induced IL-8 expression via lipid raft formation and activation of PKC and MAP kinases in A549. Experimetal Biology 2008, San Diego, U.S.A.

⑤ Seok-seong Kang, Cheol-Heui Yun, Seung Hyun Han (2008.04). Peptidoglycan induces interleukin-8 expression in human alveolar typeⅡ epithelial cells. Experimetal Biology 2008, San Diego, U.S.A.

⑥ Jung Nam Choi, Jiyoung Kim, Ni Yeon Lee, Ah Jin Kim, Dong Ki Park, Choong Hwan Lee. (2009) Metabolite Profiling Based Classification and Novel Compound Identification of *Cordyceps militaris* Grown on Germinated Soybean by LC-ESI-IT-MS/MS and Multivariate Statistical Analysis. Metabolomics society's

3. 특허

1. 특허 등록

① 굼벵이를 이용한 동충하초 효소의 생산방법. 제10-0925705호

② 조류독감 예방기능이 구비된 발아대두 동충하초의 제조방법. 제10-0796303호

2. 특허 출원

① 10-2008-10251

② 10-2008-0102519

③ 준비 중

4. 기술 확보

1. 발아대두 동충하초 생산방법 최적화
2. 발아대두 동충하초에서 유용물질 프로파일링기술과 후보물질 구조규명기술
3. 발아대두 동충하초유래 신규 호흡기점막기능조절 물질 발굴과 관련기술 확보
4. 발아대두유래 신규 대사조절 물질 발굴과 관련기술 확보

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
Molecular Immunology 45 (2008) 1665–1673
Molecular Immunology
www.elsevier.com/locate/molimm

Peptidoglycan-mediated IL-8 expression in human alveolar type II epithelial cells requires lipid raft formation and MAPK activation

In Su Cheon[a,b,c], Sang Su Woo[a], Seok-Seong Kang[a,b], Jintaek Im[a], Cheol-Heui Yun[d], Dae Kyun Chung[e,f], Dong Ki Park[g], Seung Hyun Han[a,b,c,*]

[a] *Department of Oral Microbiology & Immunology and Dental Research Institute, School of Dentistry, Seoul National University, Seoul 110-749, Republic of Korea*
[b] *BK21 Program, School of Dentistry, Seoul National University, Seoul 110-749, Republic of Korea*
[c] *Laboratory Sciences Division, International Vaccine Institute, Seoul 151-818, Republic of Korea*
[d] *School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Seoul 151-921, Republic of Korea*
[e] *School of Biotechnology and Institute of Life Science and Resources, Kyung Hee University, Suwon 449-701, Republic of Korea*
[f] *RNA Inc., Suwon 449-701, Republic of Korea*
[g] *Department of Bioscience and Biotechnology, Konkuk University, Seoul 143-701, Republic of Korea*

Received 30 July 2007; received in revised form 28 September 2007; accepted 1 October 2007
Available online 7 November 2007

Abstract

Staphylococcus aureus, a major sepsis-causing Gram-positive bacterium, invades pulmonary epithelial cells and causes lung diseases. In the lung, alveolar type II epithelial cells play an important role in innate immunity by secreting chemokines and antimicrobial peptides upon bacterial infection whereas type I cells mainly function in gas-exchange. In this study, we investigated the ability of *S. aureus* peptidoglycan (PGN) to induce expression of a chemokine, IL-8, in a human alveolar type II epithelial cell line, A549. PGN induces IL-8 mRNA and protein expression in a dose- and time-dependent manner. Supplementation of soluble CD14 further enhanced the PGN-induced IL-8 expression. Interestingly, PGN-induced IL-8 expression was inhibited by nystatin, a specific inhibitor for lipid rafts, but not by chlorpromazine, a specific inhibitor for clathrin-coated pits. Furthermore, PGN-induced IL-8 expression was attenuated by inhibitors for MAP kinases such as ERK, p38 kinase, and JNK/SAPK, whereas no inhibitory effect was observed by inhibitors for reactive oxygen species or protein kinase C. Electrophoretic mobility shift assay demonstrates that PGN increased the DNA binding of the transcription factors, AP-1 and NF-κB while minimally, NF-IL6, all of which are involved in the transcription of IL-8. Taken together, these results suggest that PGN induces IL-8 expression in a CD14-enhanced manner in human alveolar type II epithelial cells, through the formation of lipid rafts and the activation of MAP kinases, which ultimately leads to activation of AP-1, NF-κB, and NF-IL6.
© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Peptidoglycan; *Staphylococcus aureus*; IL-8; Epithelial cells; A549; Signaling; MAP kinase; Transcription factor

1. Introduction

Despite frequent exposure to various pathogens during respiration, the lung maintains mucosal integrity in part through the innate immune system. Once invading pathogens enter the tracheobronchial tract, the host mucociliary movement moves the pathogens out of the respiratory tract (Machen, 2006). Pathogens that escape the host mucociliary movement can be inactivated by various antimicrobial sentinel molecules such as β-defensins, LL-37, and surfactant proteins (Kuroki et al., 2007; Rogan et al., 2006). Surviving pathogens cause disease by adhering to and invading the host epithelium or by colonizing the mucus layers (Gillespie and Balakrishnan,

Abbreviations: AP-1, activating protein 1; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; EMSA, electrophoretic mobility shift assay; IL-8, interleukin-8; LPS, lipopolysaccharide; LTA, lipoteichoic acid; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MFI, mean fluorescence intensity; NF-IL6, nuclear factor for IL-6; NAC, *N*-acetyl-L-cystein; NF-κB, nuclear factor-kappa B; PAMPs, pathogen-associated molecular patterns; PGN, peptidoglycan; ROS, reactive oxygen species; PKC, protein kinase C; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; sCD14, soluble CD14.

* Corresponding author at: Department of Oral Microbiology & Immunology, Dental Research Institute, and BK21 Program, School of Dentistry, Seoul National University, Seoul 110-749, Republic of Korea. Tel.: +82 2 740 8641; fax: +82 2 743 0311.
E-mail address: shhan-mi@snu.ac.kr (S.H. Han).

0161-5890/$ – see front matter © 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.molimm.2007.10.001

J. Microbiol. Biotechnol. (2008), **18**(9), 1606–1612

JOURNAL OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY

© The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

Detection of Expressed IL-32 in Human Stomach Cancer Using ELISA and Immunostaining

Seo, Eun-Hee[1], Jeongwoo Kang[1], Ki-Hong Kim[1], Min-Chul Cho[1], Sojung Lee[1], Hee-Jong Kim[1], Jung-Hee Kim[1], Eun-Jin Kim[1], Dong-Ki Park[1], Soo-Hyun Kim[2], Yang Kyu Choi[3], Jin Man Kim[4], Jin Tae Hong[5], and Do-Young Yoon[1]*

[1]*Department of Bioscience and Biotechnology,* [2]*Department of Biomedical Science, and*
[3]*College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea*
[4]*Department of Pathology, Chungnam National University College of Medicine, Daejeon 303-131, Korea*
[5]*College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea*

Received: December 13, 2007 / Accepted: April 14, 2008

Interleukin (IL)-32 is a recently identified proinflammatory cytokine that is one of the IL-18 inducible genes, and plays an important role in autoimmune and inflammatory diseases. We produced antibodies against IL-32 and studied the expression of IL-32 in human stomach cancer. We detected IL-32 secreted from K-562 cells which were stably transfected with IL-32 and in the sera of stomach cancer patients by a sandwich ELISA using a monoclonal antibody KU32-52 and a polyclonal antibody. In order to optimize a sandwich immunoassay, recombinant IL-32α was added, followed by the addition of a biotinylated KU32-52 into microtiter plate wells precoated with a goat anti-IL-32 antibody. The bound biotinylated KU32-52 was probed with a streptavidin conjugated to HRP. This sandwich ELISA was highly specific and had a minimal detection limit of 80 pg/ml (mean±SD of zero calibrator) and measuring up to 3,000 pg/ml. This ELISA showed no cross-reaction with other cytokines such as hIL-1α, hIL-1β, hIL-2, hIL-6, hIL-8, hIL-10, hIL-18, and hTNF-α. Intra-assay coefficients of variation were 18.5% to 4.6% (n=10), and inter-assay coefficients were 23% to 9% (n=10). The average IL-32 level in the sera of 16 stomach cancer patients (189 pg/ml) was higher than that of 12 healthy control men (109 pg/ml). Our results indicate that serum IL-32 level can be detected by using an established ELISA, and that this immunoassay and mAb KU32-09 specific for immunohistochemistry can be used in the detection of expressed and secreted IL-32 in stomach cancer patients.

Keywords: IL-32, ELISA, IHC, monoclonal antibody, stomach cancer

*Corresponding author
Phone: 82-2-450-4119; Fax: 82-2-444-4218;
E-mail: ydy4218@konkuk.ac.kr

IL-32 is a multifunctional cytokine produced by T lymphocytes, natural killer cells, monocytes, and epithelial cells [12, 19]. The gene encoding IL-32 is located on human chromosome 16p13.3 and organized into eight exons [4]. There are six splice variants (IL-32α, IL-32β, IL-32γ, IL-32δ, IL-32ε, and IL-32ξ) [9], and IL-32α is the most abundant transcript [25]. It is still controversial whether IL-32 acts on cells from outside or inside, because the newly identified isoforms of IL-32 lack the putative signal peptide [9], and the amounts of IL-32 secreted from the cells are small, compared with those in the cytosol [12]. IL-32 exhibits several properties typical of proinflammatory cytokines through nuclear factor-κB and p38 mitogen-activated protein kinases (MAPKs). IL-32 has been implicated in inflammatory disorders such as rheumatoid arthritis (RA) [3, 11, 26], *Mycobacterium tuberculosis* infection [14, 20], inflammatory bowel disease (IBD) [25], and Crohn's disease (CD) [25]; however, the pathophysiological role of IL-32 in gastric cancer remains unclear. Proinflammatory cytokines induce NO production, iNOS expression, and invasiveness of adenocarcinoma cells [18]. As described above, harmful effects on the host are also induced by chronic exposure to proinflammatory cytokines, and therefore, the exposure time must be limited by an appropriate mechanism [5, 10].

IL-18 has been studied for its biological effects on the broad spectrum of Th1- or Th2-related autoimmune diseases [17, 21, 22]. IL-1 and IL-18 belong to the IL-1 ligand family because they share structural similarity and require caspase-1 for processing [2]. IL-18 also uses a signaling pathway similar to that of IL-1 family members. They recruit IL-1 receptor-associated kinases (IRAKs), form IRAK complexes with the tumor necrosis factor receptor-associated factor-6, and activate the cascade of inhibitor of kappa B/

Journal of Ethnopharmacology 119 (2008) 153–159

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jethpharm

Armillariella mellea induces maturation of human dendritic cells without induction of cytokine expression

Sun Kyung Kim[a], Jintaek Im[a], Cheol-Heui Yun[b,c], Jin Young Son[d], Chang Gue Son[d], Dong Ki Park[e], Seung Hyun Han[a,f,*]

[a] *Department of Oral Microbiology & Immunology, Dental Research Institute and BK21 Program, School of Dentistry, Seoul National University, Seoul 110-749, Republic of Korea*
[b] *School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Seoul 151-921, Republic of Korea*
[c] *Research Institute for Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Seoul 151-921, Republic of Korea*
[d] *East-West Cancer Center, Dunsan Oriental Hospital of Daejon University, Daejon 301-724, Republic of Korea*
[e] *Department of Bioscience and Biotechnology, Konkuk University, Seoul 143-701, Republic of Korea*
[f] *Laboratory Sciences Division, International Vaccine Institute, Seoul 151-818, Republic of Korea*

ARTICLE INFO

Article history:
Received 29 March 2008
Received in revised form 31 May 2008
Accepted 19 June 2008
Available online 2 July 2008

Keywords:
Armillariella mellea
Mushroom
Innate immunity
Dendritic cells

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: *Armillariella mellea*, an edible and medicinal mushroom possessing immuno-modulating potential, has been frequently used for the treatment of infectious diseases or cancers.
Aim of the study: In order to elucidate immune-regulatory mechanisms of *Armillariella mellea*, we investigated the effect of water-soluble components from *Armillariella mellea* (AME) on the regulation of human dendritic cell (DC) maturation and activation.
Materials and Methods: Immature DCs (iDCs) were prepared by differentiating human peripheral blood CD14-positive cells with GM-CSF and IL-4. Then, iDCs were treated with AME at 2–20 μg/ml for 48 h and subjected to flow cytometry to analyze the expression of DC markers. Dextran-FITC uptake assay and enzyme-linked immunosorbent assay were performed to examine the endocytic capacity of AME-stimulated DC and their production of cytokines, respectively.
Results: iDCs stimulated with AME showed representative features during DC maturation such as up-regulated expression of CD80, CD83, CD86, both MHC class I and II molecules, and CD205, with a simultaneous decrease in the expression of CD206 and the endocytic capacity. Interestingly, AME was not able to induce the production of TNF-α, IL-12p40, or IL-10, whereas lipopolysaccharides induced a substantial increase of all of the cytokines.
Conclusion: *Armillariella mellea* induces maturation of human DCs through a unique mechanism without inducing cytokine expression.

© 2008 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Mushrooms are considered as a healthy food containing low fat and calorie with high vitamins, minerals, and fiber (Agrahar-Murugkar and Subbulakshmi, 2005). Furthermore, some mushrooms are studied for their therapeutic potential against various diseases. *Armillariella mellea* (Vahl. ex Fr.) Karst, a member of the Tricholomataceae family, is an edible mushroom which is commonly called honey mushroom. It is also a medicinal mushroom that has been used since ancient times as a therapeutic for the treatment of various human medical problems including headache, neurasthenia, insomnia, and microbial infectious diseases (Wu et al., 2007). *Armillariella mellea* contains various bioactive compounds such as armillaridin, melleolide, and armillaric acid, which are supposed to have antibiotic potential (Momose et al., 2000; Dembisky and Tolstikov, 2003). For instance, melleolide exhibits inhibitory activity against Gram-positive bacteria (Dembisky and Tolstikov, 2003). Among the constituents, the water-soluble components and polysaccharides are shown to have immune-modulating potential responsible for anti-tumor and anti-microbial activities (Shamtsyan et al., 2004; Li et al., 2005). Water

* Corresponding author at: Department of Oral Microbiology & Immunology, Dental Research Institute and BK21 Program, School of Dentistry, Seoul National University, Seoul 110-749, Republic of Korea. Tel.: +82 2 740 8641; fax: +82 2 743 0311.
E-mail address: shhan-mi@snu.ac.kr (S.H. Han).

0378-8741/$ – see front matter © 2008 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.jep.2008.06.032

Molecular Immunology 47 (2009) 614–622

Contents lists available at ScienceDirect

Molecular Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/molimm

Short communication

Induction of IL-8 expression by bacterial flagellin is mediated through lipid raft formation and intracellular TLR5 activation in A549 cells

Jintaek Im[a], Jun Ho Jeon[a], Min Kyung Cho[a], Sang Su Woo[a], Seok-Seong Kang[a], Cheol-Heui Yun[b], Kangseok Lee[c], Dae Kyun Chung[d,e], Seung Hyun Han[a,f,*]

[a] Department of Oral Microbiology & Immunology, Dental Research Institute, and BK21 Program, School of Dentistry, Seoul National University, Seoul 110-749, Republic of Korea
[b] Department of Agricultural Biotechnology and Research Institute for Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Seoul 151-921, Republic of Korea
[c] Department of Life Science, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Republic of Korea
[d] School of Biotechnology and Institute of Life Science and Resources, Kyung Hee University, Suwon 449-701, Republic of Korea
[e] RNA Inc., Suwon 449-701, Republic of Korea
[f] Laboratory Sciences Division, International Vaccine Institute, Seoul 151-818, Republic of Korea

ARTICLE INFO

Article history:
Received 18 May 2009
Received in revised form 2 September 2009
Accepted 3 September 2009
Available online 27 September 2009

Keywords:
Flagellin
IL-8
Toll-like receptor 5
Lipid rafts
A549

ABSTRACT

We investigated the mechanism for the induction of a chemokine, IL-8, by bacterial flagellins in the human alveolar type II epithelial cell line, A549. Bacterial flagellin induced expression of IL-8 mRNA and protein in dose- and time-dependent manners. IL-8 expression was inhibited by nystatin (a lipid rafts inhibitor) but not by chlorpromazine (a clathrin-coated pits inhibitor). Interestingly, Toll-like receptor 5 (TLR5) recognizing flagellins was found in the intracellular compartment of A549 but rarely on the cell surface. Flagellin-induced IL-8 expression appears to be mediated through TLR5 as determined by *in vitro* transient transfection experiment in HEK-293 cells expressing TLR5 using a reporter gene construct containing IL-8 promoter. IL-8 expression was attenuated by inhibitors for protein kinase C (PKC) and mitogen-activated protein (MAP) kinases. Furthermore, NF-κB and NF-IL6 transcription factors played an important role in the flagellin-induced IL-8 gene expression in A549 cells. Collectively, these results suggest that flagellin-induced IL-8 expression requires formation of lipid rafts, intracellular TLR activation, and subsequent activation of PKC and MAP kinases leading to the activation of the transcription factors NF-κB and NF-IL6 in human alveolar type II epithelial cells.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

When microorganisms are inhaled into the tracheobronchial tract, they are expelled by mucociliary movement of the epithelium with ciliated cells (Hippenstiel et al., 2006). If the mucociliary movement fails to eliminate the inhaled microorganisms, various anti-microbial molecules will likely inactivate them (Kuroki et al., 2007). Nevertheless, the microorganisms that survive from the host protective mechanisms may cause infectious diseases by adhering to and invading the host epithelium. However, the epithelial cells can initiate inflammatory responses by sensing pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) with their pattern-recognition receptors (PRRs) (Raymond et al., 2007).

Toll-like receptors (TLRs) are an important family of PRRs (Akira and Takeda, 2004). Each TLR senses a different PAMP in homo- or hetero-dimer forms (Liew et al., 2005). Viral constituents such as single-stranded RNA and double-stranded RNA are sensed by TLR3 and TLR7, respectively (Alexopoulou et al., 2001; Diebold et al., 2004). Meanwhile, bacterial constituents including lipoteichoic acid (LTA), lipopolysaccharide (LPS), flagellin, and unmethylated CpG DNA are primarily recognized by TLR2, TLR4, TLR5, and TLR9, respectively (Akira and Takeda, 2004). Flagellin is a major component of bacterial flagella, which provide bacterial motility and thereby plays a key role in allowing bacteria to spread out from the infection site (Salazar-Gonzalez and McSorley, 2005). Flagellin can stimulate intestinal epithelial cells to release key inflamma-

Abbreviations: AP-1, activating protein 1; APCs, antigen-presenting cells; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; EMSA, electrophoretic mobility shift assay; IL-8, interleukin-8; LPS, lipopolysaccharide; LTA, lipoteichoic acid; MAP kinase, mitogen-activated protein kinase; MFI, mean fluorescence intensity; NF-IL6, nuclear factor for IL6; NAC, N-acetyl-L-cystein; NF-κB, nuclear factor-kappa B; NOD, nucleotide-binding oligomerization domain; PAMPs, pathogen-associated molecular patterns; PGN, peptidoglycan; PKC, protein kinase C; PRRs, pattern-recognition receptors; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; TLR, Toll-like receptor; TNF, tumor necrosis factor.

* Corresponding author at: Department of Oral Microbiology & Immunology, Dental Research Institute, and BK21 Program, School of Dentistry, Seoul National University, 28 Yongon-Dong, Chongno-Gu, Seoul 110-749, Republic of Korea.
Tel.: +82 2 740 8641; fax: +82 2 743 0311.
E-mail address: shhan-mi@snu.ac.kr (S.H. Han).

0161-5890/$ – see front matter © 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.molimm.2009.09.004

4258 J. Agric. Food Chem. 2010, 58, 4258–4267
DOI:10.1021/jf903822e

JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY
ARTICLE

Metabolomics Revealed Novel Isoflavones and Optimal Cultivation Time of *Cordyceps militaris* Fermentation

Jung Nam Choi,[†] Jiyoung Kim,[†] Mi Yeon Lee,[†] Dong Ki Park,[†] Young-Shick Hong,[‡] and Choong Hwan Lee*,[†]

[†]Department of Bioscience and Biotechnology and Bio/Molecular Informatics Center, Konkuk University, Seoul 143-701, Republic of Korea, and [‡]School of Life Science and Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Republic of Korea

Germinated soybean (GS) cultivated with *Cordyceps militaris* (GSC) might be a promising efficacious source of novel bioactive compounds. In this study, the metabolome changes between GS and GSC were investigated by liquid chromatography−mass spectrometry (LC-MS) and gas chromatography−mass spectrometry (GC-MS) analysis coupled with a multivariate data set. Principal component analysis (PCA) and orthogonal projection to latent structures discriminate analysis (OPLS-DA) of GSC clearly showed higher levels of soyasaponin Bd, soyasaponin Bc(II), daidzein, genistein, four isoflavones (compounds **1**−**4**), glycerol, proline, glutamine, pentitol, fructose, inositol, octadecanoic acid, and sucrose together with lower levels of pyroglutamic acid, citric acid, histidine, and palmitic acid in GSC than in GS. The structures of compounds **1**−**4** were analyzed by mass and NMR spectroscopy and were determined to be novel isoflavone methylglycosides (daidzein 7-*O*-β-D-glucoside 4″-*O*-methylate (**1**), glycitein 7-*O*-β-D-glucoside 4″-*O*-methylate (**2**), genistein 7-*O*-β-D-glucoside 4″-*O*-methylate (**3**), and genistein 4′-*O*-β-D-glucoside 4″-*O*-methylate (**4**)). Multivariate statistical models showed that metabolic changes of GSC were maximal within 1 week after the *C. militaris* inoculation, consistent with the strongest antioxidant activity of GSC cultivated for 1 week. This metabolomics study provides valuable information in regard to optimizing the cultivation process for bioactive compound production and describes an efficient way to screen for novel bioactive compounds from GSC.

KEYWORDS: ***Cordyceps militaris*; soybean; LC-ESI-IT-MS; GC-EI-IT-MS; metabolomics**

INTRODUCTION

Fungal metabolites have been traditionally used in eastern Asia for health care in the prevention and treatment of human diseases (*1*, *2*). *Cordyceps*, which is one of the most well-known fungal traditional Chinese medicines (FTCM), has multiple pharmacological activities, and it is believed to cure various diseases (*2*). Previous research on *Cordyceps* has provided convincing experimental evidence that it possesses significant pharmacological activities (*3*). In addition, one of the most renowned medicinal fungi, *Cordyceps militaris*, has been reported to have a multitude of pharmacological properties (*4*, *5*).

C. militaris has been reported to display various biological activities such as anti-inflammatory (*5*), antifibrotic (*6*), and anticancer activities (*7*). Subsequently, several other studies have been conducted to examine the biological activities of *Cordyceps*. As a result of these additional studies, many other biologically active components have been reported such as polysaccharides, cyclic peptides, dipicolinic acidm and 10-membered macrolides (*8*−*11*). Although these components were biologically effective, obtaining large amounts of nutrients from *C. militaris* is not easy because of its high production cost and long incubation time. However, recent progress in the investigation of submerged fermentation of *C. militaris* in mixed natural culture has been made by growing *C. militaris* on germinated soybeans known to be rich in nutrients and biologically active compounds (*8*, *12*).

Recently, there has been a worldwide increase in the consumption of soybeans due to the beneficial properties of its components such as phenolic acid, flavonoids, and lignins (*13*, *14*). Many research groups have reported that these nutritional components in soybean were associated with human health benefits such as decreased risks of various cancers, heart disease, cardiovascular disease, and increased antioxidative effects (*15*−*17*). In this regard, germinated soybeans cultivated with *C. militaris* (GSC) might provide a source of novel nutraceutical compounds that reflect the biologically effective components of the two materials.

However, metabolomic studies of GSCs have not been reported to date. Metabolomics is an emerging and rapidly developing science and technology that includes a comprehensive experimental analysis of metabolite profiles, either as targeted compounds or as global metabolites (*18*). Mass spectrometry (MS) has been frequently used in earlier studies to detect and quantify the metabolome (*19*). Among the different mass spectrometry methods, LC-MS has been shown to be a powerful tool for

*Corresponding author (telephone +82-2-2049-6177; fax +82-2-455-4291; e-mail chlee123@konkuk.ac.kr).

 Published on Web 03/12/2010 ©2010 American Chemical Society

Journal of Ethnopharmacology 127 (2010) 55–61

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jethpharm

Induction of IL-8 expression by *Cordyceps militaris* grown on germinated soybeans through lipid rafts formation and signaling pathways via ERK and JNK in A549 cells

Ji Young Han[a], Jintaek Im[a], Jung Nam Choi[b], Choong Hwan Lee[b], Hye Jin Park[b], Dong Ki Park[b], Cheol-Heui Yun[c], Seung Hyun Han[a,d,*]

[a] Department of Oral Microbiology & Immunology, Dental Research Institute, and BK21 Program, School of Dentistry, Seoul National University, Seoul 110-749, Republic of Korea
[b] Department of Bioscience and Biotechnology, Konkuk University, Seoul 143-701, Republic of Korea
[c] Department of Agricultural Biotechnology and Research Institute for Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Seoul 151-742, Republic of Korea
[d] Laboratory Sciences Division, International Vaccine Institute, Seoul 151-818, Republic of Korea

ARTICLE INFO

Article history:
Received 28 July 2009
Received in revised form
21 September 2009
Accepted 22 September 2009
Available online 30 September 2009

Keywords:
IL-8
Chemokine
Cordyceps militaris
Lipid rafts
Lung epithelial cells
Innate immunity

ABSTRACT

Aim of the study: In order to elucidate immunoregulatory mechanisms of *Cordyceps militaris*, a methanol extract of *Cordyceps militaris* grown on germinated soybeans was prepared and its immunoregulatory effect in the human lung epithelial cells was investigated by examining its ability to induce IL-8 expression.

Materials and methods: *Cordyceps militaris* grown on germinated soybeans was extracted with 80% methanol (GSC4M) and used for stimulation of a human lung epithelial cell-line, A549. An enzyme-linked immunosorbent assay and reverse transcription-polymerase chain reaction were performed to examine the production of IL-8 protein and its mRNA, respectively. For the analysis of transcription factors regulating IL-8 transcriptional activation, the nuclear fraction was extracted from GSC4M-treated A549 cells and subjected to electrophoretic mobility shift assay.

Results: GSC4M induced IL-8 protein secretion and its mRNA expression from A549 cells in a dose- and time-dependent manner. GSC4M-induced IL-8 expression was inhibited by an inhibitor for lipid rafts formation but not by that for clathrin-coated pits. In addition, signaling pathways for GSC4M-induced IL-8 expression were mediated through ERK and JNK but hardly through p38 kinase. Furthermore, GSC4M augmented the DNA-binding activity of the transcription factors AP-1, NF-IL6, and NF-κB, all of which are involved in the transcriptional activation of the IL-8 gene.

Conclusion: *Cordyceps militaris* grown on germinated soybeans stimulates lung epithelial cells to produce IL-8 through lipid rafts formation and signaling pathways via ERK and JNK.

© 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Cordyceps militaris is an insect-borne fungus that has long been used as an alternative medicine due to its wide-spectrum of pharmacological activities. *Cordyceps militaris* shows anti-fibrotic, -inflammatory, -nociceptive, -oxidant, and -angiogenic activities in various animal models (Nan et al., 2001; Won and Park, 2005), and anti-cancer activity by the induction of apoptosis in HL-60, a human promyelocytic leukemia cell-line (Lee et al., 2006). Furthermore, it has been traditionally used to treat asthma and lung inflammation (Wang et al., 2007). Recently, it was reported to reduce airway inflammation in asthma, though it was less effective than chemical drugs like prednisolone or montelukast (Hsu et al., 2008). In addition, *Cordyceps militaris* was reported to have anti-viral activity against influenza A virus infection *in vivo* (Ohta et al., 2007). It can also regulate respiratory tract function by stimulating ion transport systems at airway epithelial cells (Yue et al., 2008).

Airway epithelial cells primarily function as a physical barrier against harmful substances and microbial pathogens inhaled into the lung during respiration. Once those dangerous particles enter the tracheobronchial tract, the mucociliary movement provided by airway epithelial cells works to expel them (Machen, 2006). Airway epithelial cells are also able to regulate immune responses through the production of anti-microbial peptides, mucins, surfactants, cytokines, and chemokines (Kuroki et al., 2007; Rogan et al., 2006). Of these immunoregulatory mediators, interleukin-8 (IL-8),

* Corresponding author at: Department of Oral Microbiology & Immunology, Dental Research Institute, and BK21 Program, School of Dentistry, Seoul National University, 28 Yongon-Dong, Chongno-Gu, Seoul 110-749, Republic of Korea. Tel.: +82 2 740 8641; fax: +82 2 743 0311.
E-mail address: shhan-mi@snu.ac.kr (S.H. Han).

0378-8741/$ – see front matter © 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.jep.2009.09.051

Journal of Ethnopharmacology 128 (2010) 198–205

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jethpharm

Induction of ICAM-1 by *Armillariella mellea* is mediated through generation of reactive oxygen species and JNK activation

Young Sook Kim[a,1], Jintaek Im[a,1], Jung Nam Choi[b], Seok-Seong Kang[a], Yeo Jin Lee[c], Choong Hwan Lee[b], Cheol-Heui Yun[c], Chang Gue Son[d], Seung Hyun Han[a,e,*]

[a] Department of Oral Microbiology and Immunology, Dental Research Institute, and BK21 Program, School of Dentistry, Seoul National University, Seoul 110-749, Republic of Korea
[b] Department of Bioscience and Biotechnology, Konkuk University, Seoul 143-701, Republic of Korea
[c] Department of Agricultural Biotechnology and Research Institute for Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Seoul 151-921, Republic of Korea
[d] East-West Cancer Center, Dunsan Oriental Hospital of Daejon University, Daejon 301-724, Republic of Korea
[e] Laboratory Sciences Division, International Vaccine Institute, Seoul 151-818, Republic of Korea

ARTICLE INFO

Article history:
Received 17 September 2009
Received in revised form
10 December 2009
Accepted 5 January 2010
Available online 14 January 2010

Keywords:
Armillariella mellea
Medicinal mushroom
Intercellular adhesion molecule-1
Immuno-regulation
Reactive oxygen species
MAP kinase
Transcription factors

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: *Armillariella mellea* is an edible mushroom that has been traditionally used as an alternative medicine in many countries because of its anti-microbial and anti-cancer effects.
Aim of the study: In this study, we examined the ability of *Armillariella mellea* to induce the expression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, an important cellular adhesion molecule for the recruitment of immune cells to regional inflammatory sites.
Materials and methods: A human monocytic cell line, THP-1 or human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were stimulated with *Armillariella mellea* extract (AME) and subjected to flow cytometry to examine the expression of ICAM-1 protein on the cell surface. Steady-state mRNA level of ICAM-1 was determined by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. The phosphorylation of JNK protein was examined by Western blot analysis using antibodies specific for non-phosphorylated and phosphorylated forms of JNK. For the analysis of transcription factors regulating ICAM-1 transcription, the nuclear fraction was extracted from AME-treated THP-1 cells and subjected to electrophoretic mobility shift assay.
Results: AME induced expression of ICAM-1 and its mRNA in THP-1 cells in dose- and time-dependent manners. AME-induced ICAM-1 expression was also observed on CD14-positive monocytes in human PBMC. Interestingly, AME-induced ICAM-1 production was inhibited by the specific inhibitors of reactive oxygen species (ROS) and JNK, whereas no inhibitory effect was observed when inhibitors of ERK, p38 kinase, phosphatidylinositol 3-kinase, or protein kinase C were used. Concomitantly, AME increased phosphorylation of JNK in a time-dependent fashion. DNA binding activities of NF-κB, AP-1, SP-1, and STAT-1 were increased by AME treatment.
Conclusion: These results suggest that AME induces ICAM-1 expression in human monocytic cells through ROS/JNK-dependent signaling pathways leading to the activation of NF-κB, AP-1, SP-1, and STAT-1 transcription factors.

© 2010 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Armillariella mellea (Vahl. ex Fr.) Karst, a member of the Tricholomataceae family, is an edible and medicinal mushroom containing minerals, healthy fibers, and vitamins with low fat. In China, *Armillariella mellea* is also known as Mi-Huan-Ku, which is a popular medicinal fungus used for the treatment of headache, dizziness, palsy, neurasthenia, insomnia, numbness in limbs, and infantile convulsion (Wu et al., 2007; Yang et al., 1984). In addition, *Armillariella mellea* contains various bioactive components exhibiting antibacterial activities (Dembisky and Tolstikov, 2003; Momose et al., 2000). In particular, *Armillariella mellea* manifests immunopotentiating activities that may be helpful for the prevention of infectious diseases. For instance, water-based extracts of *Armillariella mellea* (AME) enhance maturation and activation of human dendritic cells, which play an important role in the activation of the immune system (Kim et al., 2008), and damage ingested bacteria through the production of reactive oxygen species (ROS) from neutrophils (Shamtsyan et al., 2004). Moreover, *Armillariella*

* Corresponding author at: Department of Oral Microbiology and Immunology, School of Dentistry, Seoul National University, 28 Yongon-Dong, Chongno-Gu, Seoul 110-749, Republic of Korea. Tel.: +82 2 740 8641; fax: +82 2 743 0311.
E-mail address: shhan-mi@snu.ac.kr (S.H. Han).
[1] These authors contributed equally to this work.

0378-8741/$ – see front matter © 2010 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.jep.2010.01.011

특 허 증
CERTIFICATE OF PATENT

특 허 제 10-0796303 호
(PATENT NUMBER)

출원번호 (APPLICATION NUMBER) 제 2007-0062755 호
출 원 일 (FILING DATE:YY/MM/DD) 2007년 06월 26일
등 록 일 (REGISTRATION DATE:YY/MM/DD) 2008년 01월 14일

발명의명칭 (TITLE OF THE INVENTION)
조류독감 예방기능이 구비된 발아대두 동충하초의 제조방법

특허권자 (PATENTEE)
박동기(470814-1******)

서울 송파구 풍납2동 260번지 현대리버빌아파트 303동 1003호

발명자 (INVENTOR)
등록사항란에 기재

위의 발명은 「특허법」에 의하여 특허등록원부에 등록되었음을 증명합니다.
(THIS IS TO CERTIFY THAT THE PATENT IS REGISTERED ON THE REGISTER OF THE KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE.)

2008년 01월 14일

특 허 청 장
COMMISSIONER, THE KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

특 허 증
CERTIFICATE OF PATENT

특 허 제 10-0796303 호
(PATENT NUMBER)

출원번호 (APPLICATION NUMBER) 제 2007-0062755 호
출 원 일 (FILING DATE:YY/MM/DD) 2007년 06월 26일
등 록 일 (REGISTRATION DATE:YY/MM/DD) 2008년 01월 14일

발명의명칭 (TITLE OF THE INVENTION)
조류독감 예방기능이 구비된 발아대두 동충하초의 제조방법

특허권자 (PATENTEE)
박동기(470814-1******)

서울 송파구 풍납2동

발명자 (INVENTOR)
등록사항란에 기재

위의 발명은「특허법」에 의하여 특허등록원부에 등록되었음을 증명합니다.
(THIS IS TO CERTIFY THAT THE PATENT IS REGISTERED ON THE REGISTER OF THE KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE.)

2008년 01월 14일

특 허 청 장
COMMISSIONER, THE KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

2017/03/27 15:28-운영지원과/이지애

제 2 절. 실용화산업화 계획

(단위 : 건수)

구분	기술이전	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	1	3				

제 3 절 성과 활용 계획

신소재인 발아대두 동충하초로부터 신규물질 4개와 발아대두 동충하초에 대한 효능이 밝혀졌기 때문에 본 원료를 이용하여 다양한 제품생산에 활용할 계획이다. 산업체와 협의 중인 제품으로는 ①음료, ②항아토피제품, ③면역증강제 등이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 해당없음

제 7 장 참고문헌

1. Zhong, J. J.; Xiao, J. H., Secondary metabolites from higher fungi: discovery, bioactivity, and bioproduction. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2009,113, 79-150.
2. Paterson, R. R. M., Cordyceps: a traditional Chinese medicine and another fungal therapeutic biofactory? Phytochemistry. 2008, 69, 1469-1495.
3. Zhu, J. S.; Halpern, G. M.; Jones, K., The scientific rediscovery of an ancient Chinese herbal medicine: Cordyceps sinensis: part I. J. Altern. Complement Med. 1998, 4, 289-303.
4. Jung, E. C.; Kim, K. D.; Bae, C. H.; Kim, J. C.; Kim, D. K.; Kim, H. H., A mushroom lectin from ascomycete Cordyceps militaris. Biochim. Biophys. Acta. 2007, 1770, 833-838.
5. Won, S. Y.; Park, E. H., Anti-inflammatory and related pharmacological activities of cultured mycelia and fruiting bodies of Cordyceps militaris. J. Ethnopharmacol. 2005, 96, 555-561.
6. Nan, J. X.; Park, E. J.; Yang, B. K.; Song, C. H.; Ko, G.; Sohn, D. H., Antifibrotic effect of extracellular biopolymer from submerged mycelial cultures of Cordyceps militarison liver fibrosis induced by bile duct ligation and scission in rats. Arch. Pharm. Res. 2001, 24, 327-332.
7. Park, C.; Hong, S. H.; Lee, J. Y.; Kim, G. Y.; Choi, B. T.; Lee, Y. T.; Park, D. I.; Park, Y. M.; Jeong, Y. K.; Choi, Y. H., Growth inhibition of U937 leukemia cells by aqueous extract of Cordyceps militaris through induction of apoptosis. Oncol. Rep. 2005, 13, 1211-1216.
8. Ohta, Y.; Lee, J. B.; Hayashi, K.; Fujita, A.; Park, D. K.; Hayashi, T., In vivo anti-influenza virus activity of an immunomodulatory acidic polysaccharide isolated from Cordyceps militaris grown on germinated soybeans. J. Agric. Food Chem. 2007, 55, 10194-10199.
9. Lee, H.; Cho, M.; Baek, T.; Choe, Y.; Kim, J.; Hong, J.; Myung, M.; Yoon Y., Epitope Analysis of PPAR Monoclonal Antibody P48r.34A and its Application for Screening PPAR Ligands. J. Immunol. Method. 2005, 296, 125-134.
10. Machen, T.E., 2006. Innate immune response in CF airway epithelia: hyperinflammatory? American Journal of Physiology, 291, C218-230.
11. Kuroki, Y., Takahashi, M., Nishitani, C., 2007. Pulmonary collectins in innate immunity of the lung. Cellular Microbiology, 9, 1871-1879.
12. Rogan, M.P., Geraghty, P., Greene, C.M., O'Neill, S.J., Taggart, C.C., McElvaney, N.G., 2006.Antimicrobial proteins and polypeptides in pulmonary innate defence. Respiratory Research, 7, 29.
13. Wang, N.Q., Jiang, L.D., Zhang, X.M., Li, Z.X., 2007. Effect of dongchong xiacao capsule on airway inflammation of asthmatic patients. China Journal of Chinese Materia Medica 32, 1566-1568.
14. Nan, J.X., Park, E.J., Yang, B.K., Song, C.H., Ko, G., Sohn, D.H., 2001. Antifibrotic effect of extracellular biopolymer from submerged mycelial cultures of *Cordyceps*

militaris on liver fibrosis induced by bile duct ligation and scission in rats. Archives of Pharmacal Research, 24, 327-332.
15. Won, S.Y., Park, E.H., 2005. Anti-inflammatory and related pharmacological activities of cultured mycelia and fruiting bodies of *Cordyceps militaris*. Journal of Ethnopharmacology, 96, 555-561.
16. Ohta, Y., Lee, J.B., Hayashi, K., Fujita, A., Park, D.K., Hayashi, T., 2007. In vivo antiinfluenza virus activity of an immunomodulatory acidic polysaccharide isolated from *Cordyceps militaris* grown on germinated soybeans. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, 10194-010199.
17. Hsu, C.H., Sun, H.L., Sheu, J.N., Ku, M.S., Hu, C.M., Chan, Y., Lue, K.H., 2008. Effects of the immunomodulatory agent *Cordyceps militaris* on airway inflammation in a mouse asthma model. Pediatrics and Neonatology, 49, 171 - .178.
18. Cheon, I.S., Woo, S.S., Kang, S.S., Im, J., Yun, C.H., Chung, D.K., Park, D.K., Han, S.H., 2008. Peptidoglycan-mediated IL-8 expression in human alveolar type II epithelial cells requires lipid raft formation and MAPK activation. Molecular Immunology, 45, 1665-1673.
19. Hoffmann, E., Dittrich-Breiholz, O., Holtmann, H., Kracht, M., 2002. Multiple control of interleukin-8 gene expression. Journal of Leukocyte Biology, 72, 847-855.
20. Dykstra, M., Cherukuri, A., Sohn, H.W., Tzeng, S.J., Pierce, S.K., 2003. Location is everything: lipid rafts and immune cell signaling. Annual Reviews of Immunology, 21, 457-481.
21. Han, J.Y., Im, J., Choi, J.N., Lee, C.H., Park, H.J., Park, D.K., Yun, C.H., Han, S.H., 2010. Induction of IL-8 expression by *Cordyceps militaris* grown on germinated soybeans through lipid rafts formation and signaling pathways via ERK and JNK in A549 cells. Journal of Ethnopharmacology, 127: 55 - 61.
22. Betz C, Papadopoulos Th, Buchwald J, Dämmrich J, Müller-Hermelink HK, 1995. Surfactant protein gene expresssion in metastatic and micrometastatic pulmonary adenocarcinomas and other non-small cell lung carcinomas: detection by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Cncer Research, 55, 4283-4286.
23. Dempo K, Satoh M, Tsuji S, Mori M, Kuroki Y, Akino T., 1987. Immunohistochemical studies on the expression of pulmonary surfactant apoproteins in human lung carcinomas using monoclonal antibodies. Pathol. Res. Pract. 182, 669-675.
24. Liew F.Y., Xu D., Brint E.K., O'Neill, L.A., 2005. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. Nat. Rev. Immunol. 5, 446-58.
25. Abramovits W. Atopic dermatitis. J Am Acad Dermatol. 2005;53:86-93
26. Hanifin JM, Rajka G. Diagnostic features of atopic dermatitis. Acta Derm venerol(Stockh) 1980;92(Suppl):44-47
27. Rajka G. Langeland T. Grading of the severity of atopic dermatitis. Acta Derm Venerol(Stockh) 1989;144(Suppl):13-14
28. Oranje AP, Glazenburg EJ, Practical issues on interpretation of scoring atopic

dermatitis: the SCORAD index, objective SCORAD and the three-item severity score. Br J Dermatol 2007 Oct;157(4):645-8

29. Lim BO, Yamada K, Cho BG, Jeon T, Hwang SG, Park T, et al. Comparative study on the modulation of IgE and cytokine production by Phellinus linteus grown on germinated brown rice, Phellinus linteus and germinated brown rice in the murine splenocytes. Biosci Biotechnol Biochem 2004;68:2391-2394
30. Oh GS, Lee MS, Kwon J, Lee SS, Jeong JG, Shin MK, et al. Effects of oral administration of Phellinus linteus on the production of Th1- and Th2-type cytokines in mice. Immunopharmacol Immunotoxicol 2006;28:281-293
31. Lim BO, Jeon TI, Hwang SG, Moon JH, Park DK. Phellinus linteus grown on germinated brown rice suppresses IgE production by the modulation of Th1/Th2 balance in murine mesenteric lymph node lymphocytes. Biotechnol Lett 2005;27:613-617
32. 임현우, 권영민, 조수민, 윤규형, 이승정, 김하원, 이민원. 큰번데기동충하초의 사람 암세포에서의 항암효과. 생약학회지, 35(4):364-367(2004)
33. 김하원, 김영호, 채홍복, 남경숙, 이승정, 안혜숙, 정은호. Cordyceps militaris 로부터 분리한 Ergosterol Peroxide 의 한국인 암세포주에 대한 항암작용. 한국균학회지, Vol.29, No.1, p61-66, 2001.
34. Lee Seungjeong, Han Shinha, Son Hanshik, Park Eunjung, Lee Chong-Kil, You Byeongjin, Ha Nam-Joo, Kim Kyungjae. Inhibition of Proliferation of Human Breast Cancer Cell(SK-BR3) and Liver Cancer Cell(SK-Hep1) in Tissue Culture by The CCCA from Cordyceps militaris. Proceedings of The Convention of The Pharmaceutical Society of Korea, Vol. 2-2, p140, 2003. October.