[별지 19]

최 종 보 고 서

편집순서 1 (표지)

(뒷면)

주 의
(편집순서 8)

(15 포인트 고딕계열)

↑
6cm
↓

(앞면)

과제번호

육류의 등급화에 관한 연구

농림수산식품부

↑
3cm
↓

발간등록번호
11-1543000-000198-01

5cm
↓

번데기동충하초로부터 간기능 개선을 위한 기능성 소재 개발연구

(Development of functional materials for improving liver function from *Cordyceps militaris*)

강원대학교

(17 포인트 명조계열)

↑
9cm
↓

농 림 축 산 식 품 부(17포인트 명조계열)

↑
4cm
↓

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 **"번데기동충하초로부터 간기능 개선을 위한 기능성 소재개발연구"** 과제

제1세부과제: "번데기동충하초의 대량생산 및 간기능 개선 생리활성연구"
제2세부과제: "번데기동충하초로부터 대식세포 매개성 간염 치료 효능 평가"
협동연구과제: "번데기동충하초로부터 간기능을 향상시키는 기능성 물질의 개발" 의

보고서로 제출합니다.

2013 년 7 월 10 일

주관연구기관명 : 강원대학교
주관연구책임자 : 김태웅
세부연구책임자 : 박영철
연 구 원 : 윤덕효
연 구 원 : 이정찬
연 구 원 : 김은지
연 구 원 : 김혜리
협동연구기관명 : 한림대학교
협동연구책임자: 박형진
협동 연구원: 최보영

요 약 문

Ⅰ. 제 목: "번데기동충하초로부터 간기능 개선을 위한 기능성 소재 개발연구"

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성:

▶ 동충하초는 균주에 따라 암, 뇌졸중, 심장병과 같은 성인병에 대한 예방 및 개선효과가 최근 발견되어 이용가능 잠재력이 무한한 품목이지만, 번데기동충하초에 대한 채집과 분리·동정과 보존 연구가 현재 많이 진행되고 있지만, 아직 미흡한 상태이며, 보존된 번데기동충하초 균주를 이용하여 생리적인 특성을 알고 자실체 형성에 관한 연구를 체계적으로 하여 대량으로 생산하는 기술을 개발하여, 번데기동충하초를 이용하여 생리활성이 높은 우수한 기능성 식품 및 치료제로 이용할수 있는 방안을 마련하여, 국제경쟁력을 높일수 있는 제품을 생산하고자 하며,

▶ 최근에, 동충하초속의 버섯은 최근 암의 억제, 면역성 회복, 항균작용 등 다양한 약효작용이 있음이 입증되었다. 그러므로 국내에서 많이 알려져 있는 번데기동충하초를 이용하여 약리생리활성을 입증하여,

▶ 현재 많이 알려져 있는 번데기동충하초의 이용성 연구를 통해서 새로운 식품 및 치료제로서 동충하초의 이용성을 증대시키며, 산업체 및 농가소득향상을 위한 특화작물의 활용하는데 있어서의 정당성 및 타당성을 부여시키고자 하며,

▶ 본 속균 가운데 현재, 국내에서 밀리타리스동충하초(*C. militaris*)와 눈꽃동충하초(*Paecilomyces tenuipes*)는 인공적으로 버섯을 만드는데 성공하여 이에 대한 실용화가 이루어지고 있지만, 번데기동충하초는, Cordycepin이 1960년대에 항암작용이 있는 것으로 알려지고 있으며, 이외에도 다당류(polysaccharide), 기타 면역상승제들이 일려지고 있으며, 본 연구자의 실험실에서는 번데기동충하초에서 최근, militarin이라는 신물질을 추출, 정제하여 특허를 받았으며, 번데기동충하초에서 얻은 이러한 여러 물질을 이용하여 좀더 깊이 있고, 활용성이 다양한 연구가 필요한 실정이다.

▶ 제1세부과제, 제2세부과제 및 제1협동과제와 참여기업의 연구 결과로 형성된 우수 유전자를 사용한 번데기동충하초 자실체를 생산하여 번데기동충하초를 이용한 간기능 개선효과를 연구하며 동시에 및 번데기 동충하초 분획을 이용하여 간기능 개선효과를 가지는 제품의 생산을 목표로 하며,

▶ 최종적으로, 번데기동충하초 자실체를 대량생산하여, 농가소득향상을 위해 직접 활용될 수 있는 새로운 간기능 개선을 위한 기능성 식품 개발연구 및 간기능 개선치료제신기술의 개발이 본연구의 최종 목표이다.

종합적으로,

▶ 번데기 동충하초를 이용하여 간기능 개선효과 검증함과 동시에 간 기능 개선제를 개발하며,

▶ 번데기 동충하초 분획을 이용하여 간기능 개선효과를 가지는 기능성 식품을 개발하여 내수 및 수출을 증대하고자 하는 것이 본연구의 최종 연구 목표이다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는, **제1세부과제(김태웅 교수)**는 "번데기동충하초의 대량생산 및 간기능 개선작용의 생리활성연구 및 간기능 개선을 위한 신기능 소재 개발"을 하며, **제2세부세부과제(박영철 교수)**는 "번데기동충하초로부터 유래된 분획의 대식세포 매개성 간염 치료 효능을 평가하고 그 치료 기전의 연구"를 하며, **협동과제(박형진 교수)**는 "번데기동충하초로부터 간기능을 향상시키는 기능성 성분을 추출 정제하여 그 효능을 실험동물에서 검증하는 한편 지표성분의 개발"을 연구 내용으로 한다. 또한 본 연구과제를 통해서, '번데기동충하초로부터 간기능 개선을 위한 기능성 식품 개발연구' 에서 얻은 자료를 토대로 생산성 및 제품생산을 시험하여, 제품 가능성을 검토를 더불어 제품군(기능성 건강식품, 기능성 식품의 제조, 고부가 가치의 신약 제조를 시도)을 형성시켰다. 이와 같이 **제 1세부, 제2세부, 제 1 협동연구자 그리고 참여기업은 상호 유기적인 관계를 통해서 본 연구를 수행하였다.**

각 세부과제 및 협동연구별 연구내용은 다음과 같다.:

제1세부과제: "번데기동충하초의 대량생산 및 간기능 개선 생리활성연구"

김태웅 교수(강원대학교)

1. 번데기동충하초 채집 및 균주확보.
2. 번데기동충하초에 관한 형태. 유전적인 특성 및 연구자원 확보.
3. 자실체 우수균주를 선발 및 선발된 균주의 대량생산.
4. 번데기동충하초의 대량생산 방법확립 및 대량생산에 대한 효율, 균주의 활용성 연구.
5. 대량 생산 번데기동충하초의 추출 및 분획.
6. 번데기동충하초의 알콜에 의한 간 세포 손상에 대한 보호 효능 평가.
7. 약물에 의한 간세포 손상에 대한 번데기동충하초의 보호 효능평가 및 표준화를 위한 화학적인 연구.
8. 번데기동충하초의 간세포 손상에 대한 보호 효능의 생화학적 기전 규명.
9. 번데기동충하초의 Chang liver cell의 세포주기에 대한 AAP(Acetoaminophen)의 영향.
10. 번데기동충하초 추출물(CMWE)이 AAP에 유도된 신호전달 물질에 미치는 영향.

제2세부과제: “번데기동충하초로부터 대식세포 매개성 간염 치료 효능 평가”

박영철 교수(강원대학교)

1. 번데기동충하초의 염증조절 효능연구.
2. 번데기동충하초에 의한, 염증반응에 관여하는 대식 세포의 nitric oxide의 생성을 연구.
3. 번데기동충하초 추출물인, CMWE의 대식세포에 대한 세포사멸 측정.
4. 번데기동충하초에 의한, 대식세포작용 활성을 측정하여 면역반응의 강도를 연구.
5. 번데기동충하초에 의한 T-cell의 증식 측정에 의한 면역반응 평가.
6. 간 유래 대식세포(쿠퍼 세포) 매개성 간염 모델의 확립.
7. 간조직 유래 대식세포의 염증억제 효능평가.
8. 번데기 동충하초 유래물질인, cordycepin의 염증조절 효능평가.
9. Cordycepin의 대식세포 유래 세포독성물질 Nitric oxide(NO) 생성능 연구.
10. Cordycepin의 대식세포주에서 세포 생존률(cell viability) 연구.
11. Cordycepin의 염증 조절 효소 PKBα kinase 활성저해효과.
12. Cordycepin의 PKBα kinase 활성 억제 저해 기전.
13. Cordycepin의 p70S6K kinase, PDK1 kinase, PKA kinase assay 측정.

제1협동과제: “번데기동충하초로부터 간기능을 향상시키는 기능성 물질의 개발”

박형진 교수

1. 번데기동충하초로부터 간기능을 향상시키는 기능성 물질의 추출 및 정제.
2. 번데기동충하초의 기능성 물질의 간기능 개선효과 검증.
3. 흰쥐에서 TAA로 유발한 간 섬유화에 대한 번데기 동충하초 추출물의 에탄올 침전물(CMWE)의 효과.
4. TAA로 유발한 섬유화 간에서 α-smooth muscle actin 발현에 대한 CMWE의 효과.
5. TAA로 유발한 섬유화 간에서 tissue inhibitor of metalloproteinase(TIMP) 발현에 대한 CMWE의 효과.
6. 지방간에 대한 번데기 동충하초 추출물의 효과.
7. 동충하초 추출물에 의한, 체중, 간 중량, 부고환 지방중량변화.
8. 동충하초 추출물에 의한, glucose, triglyceride, cholesterol 농도 변화에 미치는 효과.
9. 동충하초 추출물에 의한, 간기능 효소 ALT 및 AST 농도 변화.
10. 동충하초 추출물에 의한 leptin 농도, SOD 활성에 미치는 효과.
11. 동충하초 추출물, CMWE가 간조직의 병리학적 소견에 미치는 효과.
12. 간독성 물질로 유발한 간 섬유화에 대한 번데기 동충하초 추출물의 효과.
13. 번데기 동충하초 추출물의 표지성분 개발.

Ⅳ. 연구 개발의 결과 정리:

1. 각 세부과제의 연구결과의 요약:

제1세부과제:

연구 제목: "번데기동충하초의 대량생산 및 간기능 개선 생리활성연구"

가. 번데기동충하초 채집 및 균주선발에 의해 번데기동충하초 대량생산 방법확립함.

- 대량생산에 대한 효율, 균주의 활용성 연구확립하였음.
- 번데기동충하초에 관한 형태. 유전적인 특성 및 자원의 연구자원 확보하였음.
- 번데기동충하초의 대량생산 방법확립 및 대량생산에 대한 효율을 확립함.
- 번데기동충하초 균주의 활용성 연구를 확립함
- 번데기동충하초 대량생산 방법확립 및 대량생산에 대한 효율 및 균주의 활용성 연구확립.
- 자실체 우수균주를 선발 및 선발된 균주의 대량생산 가능하게됨.
- 번데기동충하초에 관한 형태. 유전적인 특성 및 자원의 연구자원 확보.
- 번데기 동충하초의 배지선택성분 차별화 검토 및 대량생산 방법 확립.

나. 대량 생산 번데기동충하초의 출 및 분획:

- 번데기동충하초의 물 추출 및 알콜 침전 분획물 제조완료.
- 번데기동충하초의 추출, 분리로 얻어진 CMWE의 HPLC를 이용한 특성확인함.
- CMWE에서, HPLC를 이용한 cordycepin 및 adenosine의 확인 및 함량측정

다. 번데기동충하초의 알콜에 의한 간 세포 손상에 대한 보호 효능 평가확립.

- 약물에 의한 간세포 손상에 대한 번데기동충하초의 보호 효능평가 및 표준화를 위한 화학적인 연구 수립.
- SNP(Sodium Nitroprusside)에 의한 Chang liver cell (normal cell)의 간세포 손상을 주는 IC_{50}의 계산을 확립함.
- AAP(Acetaminophen)에 의한 Chang liver cell (normal cell)의 간세포 damage 효과를 주는 IC_{50}의 계산확립.
- 번데기동충하초의 알콜에 의한 간 세포 손상에 대한 보호 효능 평가확립.
- AAP(Acetaminophen)에 의한 Chang liver cell (normal cell)의 간세포손상 확립.
- *in vitro*에서 번데기동충하초의 알콜 및 약물에 의한 간세포 손상 보호 효능평가 확립.
- 약물에 의한 간세포 손상에 대한 번데기동충하초의 보호 효능평가 및 표준화를 위한 화학적인 연구를 확립함.
- *in vitro*에서 번데기동충하초를 이용한 간세포 손상에 대한 보호 효능의 생화학적 기작 규명함.
- 번데기동충하초 추출물(CMWE)이 AAP에 유도된 신호전달 물질에 미치는 영향을 연구함.
- 번데기동충하초 추출물(CMWE)이 PARP 및 MAP kinase에 미치는 영향을 확립함.
- 번데기동충하초 추출물(CMWE)이 acetaminophe 에 의한 간손상을 치료하는 신호전달과정(signal pathway)을 확립하였음.

제2세부과제:

연구 제목: "번데기동충하초로부터 대식세포 매개성 간염 치료 효능 평가"

가. 번데기동충하초의 염증조절 효능연구를 확립함.

- 염증반응에 관여하는 대식세포의 nitric oxide의 생성을 연구함.
- 번데기동충하초 추출물인 CMWE의 대식세포에 대한 세포사멸을 확인함.
- 식세포작용 활성을 측정하여 면역반응의 강도를 측정확인함.
- T-cell의 증식을 측정함으로써 면역반응을 간적접으로 평가하였음.

나. 간 유래 대식세포(쿠퍼세포) 매개성 간염 모델의 확립

- 대식세포 활성유도 물질인 LPS를 이용하여 생쥐간염모델을 정립함.

다. 번데기동충하초 유래 분획의 간 유래 대식세포의 염증반응 조절능 평가

- 번데기동충하초의 간조직 유래 대식세포의 염증억제 효능 효능연구확립.

라. 대식세포 매개성 간염 모델 (septic shock 모델)에서 간염증과정 치료 효능

- 간염 모델 (septic shock 모델)에서 간염증과정 치료 효능확립

마. 간 유래 대식세포(쿠퍼세포) 매개성 간염 모델에서 염증조절 효능 평가

- 간 유래 대식세포(쿠퍼세포) 매개성 간염 모델의 확립

바. 대식세포 매개성 간염 모델 치료 기전연구

- 간 유래 매개성 간염 모델에서 염증조절 효능 평가확립

사. 간 유래 대식세포(쿠퍼세포) 간염 치료 기전연구

- 번데기동충하초의 간 유래 대식세포(쿠퍼세포) 간염 치료 기전연구확립.

아. 번데기 동충하초 유래 cordycepin의 염증조절 효능을 평가하였음.

- 번데기동충하초에 의한 대식세포 유래 세포독성물질인 nitric oxide (NO) 생성능 감소 확인함.
- 번데기동충하초 추출물 및 코디세핀을 이용하여 대식세포주에서 세포 생존률(cell viability) 확인.
- Cordycepin의 염증 조절 효소 PKBα kinase 활성저해효과평가에서, PKBα kinase activity가 cordycepin을 처리했을 때 감소함을 확인함.
- Cordycepin이 staurosporin 과 함께 ATP binding site에 경쟁적으로 결합할 수 있다는 것을 확인함.
- 간염 및 간경화에 중요한 기능을 나타내는 것으로 알려진 p70S6 kinase(p70S6K)에 관한 cordycepin 의 저해효과를에서, 50μM 농도에서 80%의 억제효과를 나타냈다.
- Cordycepin이 PDK1의 활성을 저해하는지 조사한 결과, 50㎍/㎖까지 농도 의존적으로 억제경향을 보였으며, 이후 100㎍/㎖까지 유사한 억제효과를 보였다.
- Cordycepin이 PKA의 효소 활성을 저해하는지 조사한 결과, 50㎍/㎖ 농도에서 75% 정도 억제 효과를 보임을 확인함.

제1협동과제:

연구 제목: "번데기동충하초로부터 간기능을 향상시키는 기능성 물질의 개발"

가. 번데기 동충하초로부터 시료의 확보

- 번데기 동충하초로부터 간 기능을 향상 시키는 기능성 물질의 추출 및 시료 생산.

나. 1, 2 세부과제 지원.

- 1, 2 세부과제에 본 연구를 위하여 시료를 제공함.

다. 번데기동충하초로부터 간기능을 향상시키는 기능성 물질의 추출 및 정제

- 기능성 물질의 추출 및 정제확립.

라. 번데기동충하초로 부터의 기능성 물질의 간기능 개선효과 검증

- 간경화가 유발된 실험동물에서 번데기 동충하초 추출물이 간 기능의 향상 및 간 섬유화의 억제 효능에 관한 연구확립.
- 흰쥐에서 TAA로 유발한 간 섬유화에 대한 번데기 동충하초 추출물의 물 및 에탄올 침전물(CMWE)의 효과확인.
- TAA로 유발한 섬유화 간에서 α-smooth muscle actin 발현에 대한 CMWE의 효과확립.
- 간 조직에서 얻은 단백질을 전기영동법으로 분리하고 anti-α-smooth muscle actin(α-SMA) 항체를 이용하여 ECL system 에서 단백질을 정량함.
- TAA로 섬유화가 유발된 간에서는 α-SMA가 과발현 되며 CMWE는 이 단백질의 발현을 억제함을 확인함.
- TAA 처리에 의한, 혈청 AST와 ALT의 상승이 번데기동충하초 추출물인 CMWE에 의해 억제되었다.
- 또한 혈청 총 bilirubin도 감소됨. 따라서 CMWE는 TAA로 유발한 간손상을 억제하는 것으로 판단됨.
- 간 조직에서 얻은 단백질을 전기영동법으로 분리하고 anti-TIMP 항체를 이용하여 ECL system에서 단백질을 정량하였음.
- TAA로 섬유화가 유발된 간에서는 TIMP-1과 TIMP-2가 과발현 되며 CMWE는 이들 단백질의 발현을 억제함을 확인함.
- TAA로 유발한 섬유화 간에서 tissue inhibitor of metalloproteinase 발현에 대한 CMWE의 효과확인.

마. 지방간에 대한 번데기 동충하초 추출물의 효과를 확인함.

- CMWE를 50㎎/㎏/day로 투여하면 체중이(27.9±0.88g) 다소 낮아졌다
- CMWE를 50㎎/㎏/day로 투여하면 간중량이(2.47±0.10g) 다소 낮아졌다.
- 동충하초 추출물에 의해 ALT가 농도 의존적으로 유의하게 ($p<0.05$) 낮아졌다.
- 동충하초 추출물에 의해 AST는 농도 의존적으로 유의하게 ($p<0.05$) 낮아졌다.
- 혈청 leptin 농도는 CMWE를 50㎎/㎏/day 투여하면 감소하는 경향을 나타냄.
- 간 triglyceride, cholesterol함량은 CMWE를 투여하면 각각 유의하게 ($p<0.01$) 감소하였으며, 간 조직의 SOD 활성도는 CMWE를 50㎎/㎏/day 투여하면 유의하게 ($p<0.05$) 상승하였다.

바. 간독성 물질로 유발한 간 섬유화에 대한 번데기 동충하초 추출물의 효과

- 번데기동충하초 처리에서, CCl_4에 의해 간 섬유화가 유발되지 않았다.
- 번데기동충하초 처리에서, TAA에 의해 간 섬유화가 유발되지 않았다.

사. 건강기능성 식품 제조의 표준화 및 기능성 성분 및 지표성분 개발

- 각 시료의 cordycepin 함량을 HPLC를 이용하여 측정하여 cordycepin을 지표성분으로 하였으며, CMWE의 표지물질로 cordycepin을 활용함이 적절하며, 함량의 측

정은 HPLC를 이용하는 방법이 타당한 것으로 판단되었으며, 본 연구에 사용된 번데기동충하초에는 2.13㎎/g의 cordycepin이 함유된 것으로 HPLC에 의한 실험으로 확인 하였다.

2. 년차별 각 세부과제의 연구결과:

가. 1차년도 연구 내용 및 결과(요약)

연 구 범 위	연구 내용	연구 결과
(제1세부과제) 번데기 동충하초의 배지선택성분 차별화 검토 및 대량생산 방법 확립	- 번데기 동충하초 균주를 Petri-dish상에 형성되는 균주의 선발된 mating type을 이용한 자실체 형성	• 번데기 동충하초 균주인 EFCC 12448의 형성된 자실체로부터 분리된 단포자 중에서 선발된 6개의 단포자사이에서의 mating type 균주를 선발하였다. • 선발된 mating type 균주에서 형성된 자실체를 다시 단포자 분리를 하여 9개균주를 얻었고, 다시 mating type 균주 선발결과 5개의 단포자를 얻었다. • 선발된 5개의 mating type 균주를 13개의 조합으로 petri dish 상에서 배양하여 균주를 선발 • 선발된 균주는 현미배지에 접종하여 자실체 형성 확인
(제1세부과제) 재배생산 된 번데기 동충하초의 추출 및 분획 (제1세부과제) 재배생산 된 번데기 동충하초의 추출 및 분획	- 번데기동충하초의 추출, 분리, 로 얻어진 CMWE의 HPLC를 이용한 특성 연구 - 번데기동충하초의 추출, 분리, 로 얻어진 CMWE의 HPLC를 이용한 특성 연구	• 건조한 번데기동충하초 100g을 증류수 1ℓ에 넣고 초음파로 분쇄한 다음 100℃추출하여 evaporater에서 농축하여 에탄을 침전시키고 침전물을 회수한다. 이 침전물은 증류수에 용해한후에 동결건조함으로써 CMWE를 제조 • HPLC를 이용하여 CMWE의 특성을 조사하였다. HPLC는 reverse phase system으로 260nm에서 분석한 결과 8~10분사이에 주요 peak들이 관찰되었으며 CMWE는 polar 성분을 함유하고있음을 확인 • CMWE에 Cordycepin을 함유여부를 확인하기 위하여 CMWE, cordycepin, merge한 시료를 분석한 결과 동일한 retention time의 peak을

연 구 범 위	연구 내용	연구 결과
		관찰할 수 있었으며 이 peak은 merge한 시료에서 증가되어진 peak형태로 관찰할 수 있었음. 이로보아 CMWE는 cordycepin을 함유하고 있을 가능성이 있음을 추정됨.
(제1세부과제) 번데기동충하초의 알콜에 의한 간 세포 손상에 대한 보호 효능 평가	- *in vitro*에서(Normal liver cell line, Hephatoma cell line) MTT assay를 통한 CMWE의 독성 및 간기능 저해제에 대한 보호효능 평가	• CMWE에 대한 정상 간세포 독성 및 간암세포에 대한 proliferation억제 효과를 확인하기 위하여 48hr, 72hr 배양하였으며 정상 간세포에서는 독성 정도가 낮았으나 간암세포에서 줄어든 viability를 보여주었다. • 차후 실험을 위해 간기능 저해제에 대한 세포독성실험결과 정상간세포에서 SNP는 62.5μM, AAP는 1250μM, H_2O_2에서 62.5μM, ethanol에서 4mM에서 IC_{50}농도를 나타내었다.
(제2세부과제) 번데기동충하초의 염증조절 효능연구	- 염증반응에 관여하는 대식세포의 nitric oxide의 생성을 측정 - CMWE의 대식세포에 대한 세포사멸을 측정 - 식세포작용 활성을 측정하여 면역반응의 강도를 측정 - T-cell의 증식을 측정함으로써 면역반응을 간적접으로 평가	• 번데기 동충하초 에탄올 추출물(CME)의 NO생성의 억제능은 농도의 존적으로 감소하였으나 대식세포에 대한 사멸효과를 나타내었다. • 번데기 동충하초 물 추출물(CMWE)의 NO생성 억제능은 일어나지 않았으나 대식세포에 대한 사멸효과는 나타나지 않았다. • CMWE에 대한 phagocytosis assay를 수행한 결과 대식세포의 식세포작용 활성이 감소하는 것으로 나타내었다. • T cell proliferation assay으로 CMWE에 대한 T cell 분화능을 확인한 결과 강한 T cell 분화를 억제하는 것을 확인하였으며 이로인해 CMWE가 T cell에 의한 cytokine 분비를 감소시키고 T cell에 의해 활성화 되는 mast cell의 기능을 억제 할 가능성이 있음이

연 구 범 위	연구 내용	연구 결과
		추정됨.
(제3세부과제) 번데기 동충하초 추출물의 간기능 개선 효과 검증	- 간경화가 유발된 실험동물에서 번데기동충하초 추출물이 간 기능의 향상 및 간 섬유화의 억제 효능에 관한 연구.	• 6주된 수컷 Rat(S.D)에 TAA (thioacetamide)를 투여하여 간경화를 유발하였고, CMWE를 저농도와 고농도로 경구투여하여 간섬유화 억제효과를 확인함. • TAA 처리된 실험군에서는 정상대조군에 비해 체중의 증가가 더디고 상대적 간중량이 증가하며, CMWE를 처리한 실험군에서는 성장 저해가 다소 회복되는 것과 상대적 간중량의 증가를 억제하는 경향을 보여줌. 따라서 CMWE가 TAA에 의한 간손상을 억제하는 것으로 추정됨. • TAA 처리에 수반되는 혈청 AST와 ALT의 상승이 CMWE에 의해 억제되었으며 또한 혈청 총 bilirubin도 감소됨.따라서 CMWE는 TAA로 유발한 간손상을 억제하는 것으로 판단됨.

나. 2차년도 결과

연 구 범 위	연구 내용	연구 결과
(제1세부과제) 번데기동충하초의 대량생산 방법확립 및 대량생산에 대한 효율, 균주의 활용성 연구	- 대량생산 방법확립 - 대량생산에 대한 효율, 균주의 활용성 연구	• 양쪽 끝부분(B)에서 colony를 떼어 낸 번데기동충하초의 자실체의 길이나 색, 단단함 등을 비교하였을 때 더 뛰어난 결과를 얻을 수 있음을 확인하였다.
(제1세부과제) 번데기동충하초에 관한 형태. 유전적인 특성 및 자원	- 형태. 유전적인 특성 - 자원의 연구자원 확보	• 25℃의 지상층에 있는 동충하초 배양실보다는 20℃인 지하층에 있는 배양실과 농가의 버섯재

연 구 범 위	연구 내용	연구 결과
의 연구자원 확보		배사 포장에서 조금 더 뛰어난 결과를 나타내었다.
(제2세부과제) - 약물에 의한 간세포 손상에 대한 번데기동충하초의 보호 효능평가 및 표준화를 위한 화학적인 연구	- CMWE에서, HPLC를 이용한 cordycepin 및 adenosine의 확인 및 함량 측정	• 번데기동충하초에서 제조된 CMWE 중에는, adenosine 이 47.4ppm으로 0.09% 함유되어 있으며, cordycepin은 106.1ppm으로 0.21% 함유되어있는 것으로 측정되었다.
	- SNP(sodium nitroprusside)에 의한 chang (normal cell)의 cell damage 효과를 주는 IC_{50}의 계산:	• SNP를 간암세포인 Chang liver cell에 처리하였을 경우, 619.3μM에서, 50%의 cell viability의 감소, IC_{50}을 보였다.
	- 술(Ethanol)에 의한 chang liver cell(normal cell)의 cell damage 효과를 주는 IC_{50} 의 계산	• Ethanol 을 간세포에 처리하였을 경우, 514.5mM에서, 50%의 cell viability의 감소를 나타내는 IC_{50}을 보였다.
	- AAP(acetaminophen)에 의한 chang (normal cell)의 cell damage 효과를 주는 IC_{50}의 계산:	• AAP를 간세포에 처리하였을 경우, 10mM 수준에서, 50%의 cell viability의 감소, IC_{50}을 보였다.
	- 번데기동충하초 시료(CMWE)의 간보호 작용 기작	• CMWE는 정상 간세포에 어떠한 저해작용을 주지 않는다는 결과를 얻었다.
(제2세부과제) -약물에 의한 간세포 손상에 대한 번데기동충하초의 보호 효능평가 및 표준화를 위한 화학적인 연구	- 저해제인 AAP (acetoaminophen) 에 의한 정상세포(Chang liver cell)의 간세포 손상을, 번데기동충하초 추출물인 CMWE의 보호작용	• CMWE가 AAP를 간세포에 처리하였으때, 보호효과가 있음을 나타내었다.
	- 저해제인 SNP (sodium nitroprusside)에 의한 정상세포(Chang liver cell)의 간세포 손상을, 번데기동충	• 번데기동충하초 추출물(CMWE)이 SNP를 간세포에 처리하였으때, 보호효과가 있음을 확인하였다

연 구 범 위	연구 내용	연구 결과
	하초 추출물인 CMWE의 보호작용	
(제2세부과제) - 간 유래 대식세포(쿠퍼 세포) 매개성 간염 모델의 확립	- 대식세포 활성유도 물질인 LPS를 이용하여 생쥐간염모델을 정립	• 가장 많이 알려진 추출물 유래 항염증 치료제인 스티렌[애엽추출물(Aa-EE)] 을 대조약물로하여 간염치료 효과를 검증하였음.
(제2세부과제) 번데기 동충하초 유래 cordycepin의 염증조절 효능 평가	- 대식세포 유래 세포독성물질 nitric oxide (NO) 생성능 측정	• RAW264.7 세포에 번데기 동충하초 추출물을 농도별로 처리한 결과, LPS만을 처리한 대조군과 비교하여 NO의 생성량이 농도 의존적으로 감소하였다
	- 대식세포주에서 세포 생존률(cell viability) 실험 결과	• RAW264.7 세포에 번데기 동충하초 에탄올 추출물을 농도별로 처리한 결과, 25㎍/㎖ 이상의 농도에서 높은 수준의 세포 사멸이 유도되었다. 이후 코디세핀의 염증 억제효능은 25㎍/㎖ 이하의 농도에서 진행하였다.
	- Cordycepin의 염증 조절 효소 PKBα kinase 활성저해효과 평가	• PKBα kinase activity가 cordycepin을 처리했을 때 감소함을 wild type에서 비교할 수 있음.
	- Cordycepin의 PKBα kinase 활성 억제 저해 기전연구	• Cordycepin이 staurosporin 과 함께 ATP binding site에 경쟁적으로 결합할 수 있다는 것을 확인함.
(제2세부과제) 번데기 동충하초 유래 cordycepin의 염증조절 효능 평가	- Cordycepin의 p70S6K kinase assay 결과	• 간염 및 간경화에 중요한 기능을 나타내는 것으로 알려진 p70S6 kinase(p70S6K)에 관한 cordycepin의 저해효과에서, 50 μM 농도에서 80%의 억제효과를 나타냈다.
	- Cordycepin의 PDK1 kinase assay 결과	• Cordycepin이 PDK1의 활성을 저해하는지 조사한 결과, 50㎍/㎖까지 농도의존적으로 억제경향

연 구 범 위	연구 내용	연구 결과
		을 보였다. 이후 100㎍/㎖까지 유사한 억제효과를 보였다.
	-Cordycepin의 PKA kinase assay 결과	• Cordycepin이 PKA의 효소 활성을 저해하는지 조사한 결과, 50 ㎍/㎖ 농도에서 75% 정도 억제효과를 보였다.
(제3세부과제) 흰쥐에서 TAA로 유발한 간섬유화에 대한 번데기 동충하초 추출물의 에탄올 침전물(CMWE)의 효과.	- 간 조직의 섬유를 Masson's trichrome staining 법으로 염색하고 광학현미경 상에서 관찰	• TAA로 유발한 간 섬유화를 CMWE가 억제함.
(제3세부과제) TAA로 유발한 섬유화 간에서 α-smooth muscle actin 발현에 대한 CMWE의 효과.	- 간 조직에서 얻은 단백질을 전기영동법으로 분리하고 anti-α-smooth muscle actin (α-SMA) 항체를 이용하여 ECL system에서 단백질을 정량함.	• TAA로 섬유화가 유발된 간에서는 α-SMA가 과발현 되며 CMWE는 이 단백질의 발현을 억제함.
(제3세부과제) TAA로 유발한 섬유화 간에서 tissue inhibitor of metalloproteinase(TIMP) 발현에 대한 CMWE의 효과.	-간 조직에서 얻은 단백질을 전기영동법으로 분리하고 anti-TIMP 항체를 이용하여 ECL system에서 단백질을 정량함.	• TAA로 섬유화가 유발된 간에서는 TIMP-1과 TIMP-2가 과발현 되며 CMWE는 이들 단백질의 발현을 억제함.

다. 3차년도 결과

연 구 범 위	연구 내용	연구 결과
(제1세부과제) 번데기동충하초 대량 생산 방법 확립	- 원균 단포자의 위치에 따른 자실체 형성의 비교	• 인공 자실체 A와 B의 경우 자낭각이 형성 되었지만 C의 경우 자낭각이 형성 되지 않았음을 확인하였다
	- 단포자 원균으로부터 분리한 1차 계대 단포자 균을 이용한 자실체 형성의 비교	• EFCC 10304-1(5) 단포자 원균과 EFCC 10304-3(7) 단포자 원균으로부터 각각 4개씩 떼어낸 4개씩의 1차 계대균을 이용하여 서로 Mating을 시켜 인공 자실체

연 구 범 위	연구 내용	연구 결과
		를 유도했슴.
(제1세부과제) 번데기동충하초의 간세포 손상에 대한 보호 효능의 생화학적 기전 규명	-번데기동충하초의 Chang liver cell의 세포주기에 대한 AAP(acetoaminophen)의 영향	• PI 염색에 의한 FACS 분석 결과를 보면, CMWE를 각각의 최종농도 50, 100, 200㎍/㎖가 되도록 AAP와 병행투여 했을 때 Sub-G1기가 11.86%, 10.4%, 7.8%로, CMWE의 농도 의존적으로 감소되어 세포사멸을 막아주는 것을 관찰 할 수 있었다. • 이러한 결과는, 정상간세포에서 AAP에 의해 유도된 세포 독성, 즉 세포주기의 정지(cell cycle arrest)와 세포사멸에 대해 번데기동충하초 추출물(CMWE)이 간세포 보호활성이 있음을 보여주고 있다.
(제1세부과제) 번데기동충하초 추출물(CMWE)이 AAP에 유도된 신호전달 물질에 미치는 영향	- 번데기동충하초 추출물(CMWE)이 PARP에 미치는 영향	• CMWE의 병행 투여에 의해 활성화된 PARP 양이 CMWE의 농도 의존적으로 감소되는 것을 관찰할 수 있었다. • Cordycepin 농도에 의존적으로 활성화된 PARP 양이 감소된 것을 관찰할수 있었다.
	- 번데기동충하초 추출물(CMWE)이 MAP kinase에 미치는 영향	• 세포의 양에 대한 활성화된 ERK 양(p-ERK/β-actin)의 비를 확인하면, CMWE 및 cordycepin의 농도 의존적으로 p-ERK 양이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다.
		• p-ERK의 증가는, CMWE 및 cordycepin이 세포독성으로부터 간세포를 보호하는 생리활성효과가 있음을 간접적으로 보여주고 있다.
	- 번데기동충하초 추출물(CMWE)이 MAP kinase에 미치는 영향	• AAP와 CMWE를 병행 투여했을 때, 낮아진 p38 활성은 Control 그룹 수준으로 회복되지는 않았다.
		• 증가된 JNK 활성은 CMWE의

연 구 범 위	연구 내용	연구 결과
(제1세부과제)		농도 의존적으로 낮아지는 것을 관찰할 수 있었다.
번데기동충하초 추출물(CMWE)이 AAP에 유도된 신호전달 물질에 미치는 영향 (제2세부과제) 번데기동충하초 추출물(CMWE)이 AAP에 유도된 신호전달 물질에 미치는 영향	- 번데기동충하초 추출물(CMWE)이 acetaminophe 에 의한 간 손상을 치료하는 signal pathway 설명 -번데기동충하초 추출물(CMWE)이 acetaminophe 에 의한 간 손상을 치료하는 signal pathway 설명	• 정상 간세포(Chang liver cell)에서 간독성 유발물질인 AAP의 투여에 의해, 세포주기(cell cycle)가 정지되고, PARP 활성을 증가시켜 세포사멸(apoptosis)이 진행되는 것을 간접적으로 관찰하였다. 또한 MAPK (mitogen-activated protein kinase) 중 세포의 생존과 증식에 관여하는 ERK (extracellular signal -regulated kinase, p44/42 MAPK)의 활성을 감소시키고, 외부 스트레스(물리•화학적 자극)에 반응하는 JNK(c-Jun N-terminal kinase, SAPK/JNK)의 활성을 증가시키고, p38의 활성을 감소시키는 것으로 관찰되었다. 이러한 세포독성에 의한 세포사멸 진행에 대하여 번데기동충하초 추출물(CMWE)의 병행투여는, 세포의 생존을에 관여하는 ERK 활성을 증가시켜주고, 외부 스트레스에 관여하는 JNK 활성을 감소시키고, 세포주기 정지(cell cycle arrest)를 해소하여 정상적인 세포주기로 회복시켜주는 역할을 할 것으로 사료되었다. 이러한 결과는 번데기동충하초 추출물(CMWE)이 외부 자극에 의한 간세포 손상에 아주 유효한 생리활성 물질임을 알 수 있었다.
(제3세부과제) - 번데기 동충하초로부터 시료의 확보	- 번데기 동충하초로부터 간 보호효과 실험을 위한 시료의 확보	• 번데기 동충하초로부터 간 기능 향상 기능성 물질의 추출 및 시료생산완료.
(제3세부과제)	- CMWE가 체중증가에	• CMWE을 50㎎/kg/day로 투

연 구 범 위	연구 내용	연구 결과
	미치는 효과	여하면 체중이(27.9±0.88g) 다소 낮아졌다
- 번데기 동충하초 추출물의 간 기능 개선 효과 검증: 지방간에 대한 번데기 동충하초 추출물의 효과	-CMWE가 간 중량에 미치는 효과	• CMWE을 50㎎/kg/day로 투여하면 간중량이(2.47±0.10g) 다소 낮아졌다.
	-CMWE가 부고환 지방중량에 미치는 효과	• CMWE 투여에 의해 영향을 받지 않았다.
	-CMWE가 고지방식이로 유발한 혈청 glucose, triglyceride, cholesterol 농도 변화에 미치는 효과	• 혈청 glucose 농도는 CMWE에 의해서는 영향을 받지 않았다. • 혈청 triglyceride 농도는 CMWE에 의해서 영향을 받지 않았다. • 혈청 cholesterol 농도는 CMWE에 의해서는 영향을 받지 않았다.
	-CMWE가 간기능 효소 ALT 및 AST 농도 변화에 미치는 효과	• ALT가 농도 의존적으로 유의하게 (각각 $p<0.05$) 낮아졌다. • AST는 농도 의존적으로 유의하게 (각각 $p<0.05$) 낮아졌다.
	-CMWE가 혈청 leptin 농도에 미 치는 효과	• 혈청 leptin 농도는 CMWE을 50 ㎎/kg/day 투여하면 다소 감소하는 경향을 나타내었다.
	-CMWE가 간 조직 중 triglyceride 함량에 미치는 효과	• 간 triglyceride 함량은 CMWE을 투여하면 각각 유의하게($p<0.01$) 감소하였다.
	-CMWE가 간 조직 중 cholesterol 함량에 미치는 효과	• 간 cholesterol 함량은 CMWE을 투여하면 유의하게 ($p<0.05$) 감소하였다.
(제3세부과제) 지방간에 대한 번데기 동충하초 추출물의 효과	- CMWE가 간의 SOD 활성에 미치는 효과	• 간 조직의 SOD 활성도는 CMWE을 50㎎/kg/day 투여하면 유의하게 ($p<0.01$) 상승하였다
	-CMWE가 간조직의 병리학적 소견에 미치는 효과	• 고지방식이로 사육하면 간세포에 지방이 침착하였으며 그 침착 정도가 CMWE에 의해 농도 의존적으로 감소하는 경향을 나타내었다.

연 구 범 위	연구 내용	연구 결과
(제3세부과제) 간독성 물질로 유발한 간 섬유화에 대한 번데기 동충하초 추출물의 효과	- 번데기동충하초 처리에 의한 병리학적 소견 - 간의 병리학적 소견	• CCl_4에 의해 간 섬유화가 유발되지 않았다
		• TAA에 의해 간 섬유화가 유발되지 않았다.
(제3세부과제) 번데기 동충하초 추출물의 표지성분 개발	- HPLC에 의한 표지성분 검출 및 개발	• CMWE의 표지물질로 cordycepin을 활용함이 적절하며 함량의 측정은 HPLC를 이용하는 방법이 타당한 것으로 판단되었으며, 연구에 사용된 번데기동충하초에는 2.13㎎/g 의 cordycepin이 함유된 것으로 HPLC 에 의한 실험으로 확인 하였다.

Ⅴ. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 본 연구를 통한 연구성과는 다음과 같다.

가. 번데기 동충하초의 배지선택성분 차별화 검토 및 대량생산 방법 확립

- 번데기 동충하초 균주인 EFCC 12448의 형성된 자실체로부터 분리된 단포자 중에서 선발된 6개의 단포자사이에서의 mating type 균주를 선발함.
- 선발된 mating type 균주에서 형성된 자실체를 다시 단포자 분리를 하여 9개균주를 얻었고, 다시 mating type균주 선발결과 5개의 단포자를 얻었다.
- 선발된 5개의 mating type 균주를 13개의 조합으로 petri dish 상에서 배양하여 균주를 선발하였다.
- 선발된 균주는 현미배지에 접종하여 자실체 형성 확인함.
- 양쪽 끝부분(B)에서 colony를 떼어 낸 번데기동충하초의 자실체의 길이나 색, 단단함 등을 비교하였을 때 더 뛰어난 결과를 얻을 수 있음을 확인하였다.
- 25℃의 지상층에 있는 동충하초 배양실보다는 20℃인 지하층에 있는 배양실과 농가의 버섯재배사 포장에서 조금 더 뛰어난 결과를 나타내었다.

결론으로, 위의 연구를 통하여 번데기동충하초의 형태. 유전적인 연구자원을 확보하였으며, 번데기동충하초의 대량생산 방법확립 및 대량생산에 대한 효율, 균주의 활용성을 확립하였다.

나. 재배생산 된 번데기동충하초의 추출 및 분획

- 번데기동충하초의 추출, 분리방법으로 얻어진 CMWE의 특성연구
- HPLC를 이용하여 CMWE의 특성을 조사하였다. HPLC는 reverse phase system으로 260nm에서 분석한 결과 8~10분사이에 주요 peak들이 관찰되었으며 CMWE는 polar 성분을 함유하고있음을 확인 하였음.
- 번데기동충하초에서 제조된 CMWE 중에는, adenosine이 47.4ppm으로 0.09% 함유되어 있으며, cordycepin은 106.1ppm으로 0.21% 함유되어있는 것으로 측정되었음.

다. 약물에 의한 간세포 손상에 대한 번데기동충하초의 보호 효능평가 및 표준화를 위한 화학적인 연구

- SNP를 간암세포인 Chang liver cell에 처리하였을 경우, 619.3μM에서, 50%의 cell viability의 감소, IC_{50}을 보였음.
- Ethanol을 간세포에 처리하였을 경우, 514.5μM에서, 50%의 cell viability의 감소를 나타내는 IC_{50}을 보였음.
- AAP를 간세포에 처리하였을 경우, 10μM 수준에서, 50%의 cell viability의 감소하는 IC_{50}을 보였다.

결론으로, 번데기동충하초 추출물인, CMWE는 정상 간세포에 어떠한 저해작용을 주지 않는다는 결론를 얻었으며, 번데기동충하초 추출물인CMWE가 AAP를 간세포에 처리하였으때, 보호효과가 있음을 확인하였다.

라. 번데기동충하초의 염증조절 효능연구

- 번데기 동충하초 에탄올 추출물(CME)의 NO생성의 억제능은 농도의존적으로 감소됨.
- 번데기동충하초 추출물 CMWE에 대한 phagocytosis assay를 수행한 결과 대식세포의 식세포작용 활성이 감소됨.
- 번데기동충하초 추출물, CMWE에 대한 T cell 분화능을 확인한 결과 강한 T cell 분화를 억제하는 것을 확인함.

마. 번데기 동충하초 유래 cordycepin의 염증조절 효능평가

- Cordycepin의 염증 조절 효소 PKBα kinase 활성저해효과를 확인함.
- 간염 및 간경화에 중요한 기능을 나타내는 것으로 알려진 p70S6 kinase(p70S6K)에 관한, cordycepin의 저해효과에서, 50μM 농도에서 80%의 억제효과를 나타냈다
- Cordycepin이 PDK1의 활성을 저해하는지 조사한 결과, 50㎍/㎖까지 농도의존적으로 억제경향을 보였으며,. 이후 100㎍/㎖까지 유사한 억제효과를 보였다.
- Cordycepin이 PKA의 효소 활성을 저해하는지 조사한 결과, 50㎍/㎖ 농도에서 75% 정도 억제 효과를 보였음을 확인함.

바. 번데기동충하초의 간세포 손상에 대한 보호 효능의 생화학적 기전 규명

- PI 염색에 의한 FACS 분석 결과를 보면, CMWE를 각각의 최종농도 50, 100, 200

㎍/㎖가 되도록 AAP와 병행투여 했을 때 Sub-G1기가 11.86%, 10.4%, 7.8%로, CMWE의 농도 의존적으로 감소되어 세포사멸을 막아주는 것을 관찰 할 수 있었다.

이러한 결과는, 정상간세포에서 AAP에 의해 유도된 세포 독성, 즉 세포주기의 정지(cell cycle arrest)와 세포사멸에 대해 번데기동충하초 추출물(CMWE)이 간세포 보호활성이 있음을 보여주고 있다.

사. 번데기동충하초 추출물(CMWE)이 AAP에 유도 신호전달 물질에 미치는 영향.

- CMWE의 병행 투여에 의해 활성화된 PARP 양이 CMWE의 농도 의존적으로 감소되는 것을 관찰할 수 있었다.
- Cordycepin 농도에 의존적으로 활성화된 PARP 양이 감소된 것을 관찰할수 있었다.
- CMWE 및 cordycepin의 농도 의존적으로 p-ERK 양이 증가하는 것을 관찰할수 있었다.
- 증가된 JNK 활성은 CMWE의 농도 의존적으로 낮아지는 것을 관찰할 수 있었다.

이러한 결론으로, 정상 간세포(Chang liver cell)에서 간독성 유발물질인 AAP (acetoaminophen)의 투여에 의해, 세포주기(cell cycle)가 정지되고, PARP 활성을 증가시켜 세포사멸(apoptosis)이 진행되는 것을 간접적으로 관찰할수 있었으며, 또한 MAPK (mitogen-activated protein kinase) 중 세포의 생존과 증식에 관여하는 ERK (extracellular signal -regulated kinase, p44/42 MAPK)의 활성을 감소시키고, 외부 스트레스(물리·화학적 자극)에 반응하는 JNK(c-Jun N-terminal kinase, SAPK/JNK)의 활성을 증가시키고, p38의 활성을 감소시키는 것으로 관찰되었다. 이러한 세포독성에 의한 세포사멸 진행에 대하여 번데기동충하초 추출물(CMWE)의 병행투여는, 세포의 생존을에 관여하는 ERK 활성을 증가시켜주고, 외부 스트레스에 관여하는 JNK 활성을 감소시키고, 세포주기 정지(cell cycle arrest)를 해소하여 정상적인 세포주기로 회복시켜주는 역할을 할 것으로 사료되었다. 이러한 결과는 번데기동충하초 추출물(CMWE)이 외부 자극에 의한 간세포 손상에 아주 유효한 생리활성 물질임을 알 수 있었다.

아. 번데기 동충하초 추출물의 간기능 개선 효과 검증

- 번데기동충하초 추출물 CMWE가 TAA에 의한 간손상을 억제하는 것으로 추정됨.
- CMWE는 TAA로 유발한 간손상을 억제하는 것으로 판단됨.

자. 흰쥐에서 TAA로 유발한 간 섬유화에 대한, 번데기 동충하초 추출물의 에탄올 침전물(CMWE)의 효과.

- TAA로 유발한 간 섬유화를 CMWE가 억제함을 확인.
- TAA로 섬유화가 유발된 간에서는 α-SMA가 과발현 되며 CMWE는 이 단백질의 발현을 억제함을 확인.
- TAA로 섬유화가 유발된 간에서는 TIMP-1과 TIMP-2가 과발현 되며 CMWE는 이들 단백질의 발현을 억제함을 화인하였음.

차. 지방간에 대한 번데기 동충하초 추출물의 효과

- 간 triglyceride 함량은 CMWE을 투여하면 각각 유의하게($p<0.01$) 감소하였다.
- 간 cholesterol 함량은 CMWE을 투여하면 유의하게($p<0.05$) 감소하였다.
- ALT가 농도 의존적으로 유의하게(각각 $p<0.05$) 낮아졌다.
- AST는 농도 의존적으로 유의하게(각각 $p<0.05$) 낮아졌다.
- 혈청 leptin 농도는 CMWE을 50㎎/㎏/day 투여하면 다소 감소하는 경향을 나타내었다.

결론적으로, 고지방식이로 사육하면 간세포에 지방이 침착하였으며 그 침착 정도가 CMWE에 의해 농도 의존적으로 감소하는 경향을 나타내었다.

카. 간독성 물질로 유발한 간 섬유화에 대한 번데기 동충하초 추출물의 효과

- 번데기동충하초 처리에 의한 병리학적 소견으로, CCl_4에 의해 간 섬유화가 유발되지 않았다.
- 또한, 번데기 동충하초 추출물의 효과로서, TAA에 의해 간 섬유화가 유발되지 않았다.

타. 번데기 동충하초 추출물의 표지성분 개발

결론적으로, CMWE의 표지물질로 cordycepin을 활용함이 적절하며 함량의 측정은 HPLC를 이용하는 방법이 타당한 것으로 판단되었으며, 연구에 사용된 번데기동충하초에는 2.13㎎/g의 cordycepin이 함유된 것으로 HPLC에 의한 실험으로 확인 되였다.

2. 본 연구를 통한 연구성과 활용계획은 다음과 같다.

가. 국내 번데기동충하초의 채집 및 분리·동정에 의해 우수·유전자원 확보.

- Mating에 의하여 번데기동충하초의 인공자실체를 형성함을 확인함.
- 번데기동충하초의 교배형을 찾아 현미를 이용하여 대량으로 재배 할 수 있는 방법이 개발되었으므로, 현실적인 우수한 개량적된 제품의 산업화가 가능하게 되었슴.
- 이러한 우수한 번데기동충하초 자실체를 형성하여, 국내 자원의 보존 및 차별화 할 수 있다.
- 번데기동충하초의 활용도 증진을 위한 균주자원의 종 다양성 및 우수 유전자원의 확보 및 보존을 가능하게 하였슴.
- 번데기동충하초 자실체의 새로운 대량생산법 확립하여 사용이 가능히게 됨.

나. 번데기동충하초를 이용한 간기능 개선제 제조 기술 개발의 가능성.

- 번데기동충하초 자실체의 간기능 효능을 확인함.
- 간기능 보호효과 및 증진 및 치료의 목적으로 산업적 이용가치가 높으며,
- 신약 개발의 기술(특허)을 참여업체에 이전하여 산업화를 유도가 가능함.

다. 번데기동충하초를 이용한 간기능 개선제 개발:

- 번데기동충하초 자실체의 생리활성연구로서 간기능 개선특성을 규명하였슴.
- **특허출원번호: 10-2013-0088704);**

특허 명칭: 번데기동충하초 추출물을 유효성분으로 함유하는 간 기능 개선 기능성 식품조성물 및 그 제조방법

에 의하여, 번데기동충하초를 이용한 간기능개선제 개발이 가능하게 되었다.

라. 이러한 번데기동충하초 간기능 개선 연구의 결과는 더 나아가, 임상·독성·안정성 검사에 의해 과학적인 약효규명에 의하여, 국민건강과 향상에 공헌함으로 사회발전에 기여 할수 있게 될 것이다.

마. 이러한 연구는 산·학·연 협동의 꾸준한 연구를 통한 기초자료 제공 및 대체의학의 자료로 사용가능성을 제시하였으며, 국민보건의 증대로 산·학·연 협동연구의 발전 가능성이 있다.

바. 전 세계적으로 개발이 되지않은, 간기능 개선에 관련된 번데기동충하초를 이용한 다양한 연구에 의해, 기타 여러 제약을 제조할 수 있는 기초자료를 조성하였다.

사. 본 연구를 통한 업적을 보면,

SCI 논문 2편 발표, 매체(방송국) 홍보 5건, 특허 2건, 교육 지도 1건,
국외학술 발표 1건

등을 수행 하였다.

3. 앞으로의 간기능 개선에 관련된 번데기동충하초의 활용 방안:

가. 번데기동충하초의 간기능 개선 및 기타 여러 이용성을 증대할 수 있도록 참여기업인 (주)머쉬텍과 유기적인 관계를 유지하여 연구하며 연구에서 좋은 결과가 나오개 되면 참여기업과 협의하여 참여기업이 할 수 없는 일은 타 기업체와 협의하여 좋은 제품이 나오도록 최선의 노력을 하려고 한다.

나. 번데기동충하초는 지금까지 많은 연구가 되어 있는 동충하초 이지만, 아직 알려지지 않은 미지의 물질에 관련된 번데기동충하초의 이용성 연구를 통해서 새로운 식품 및 한의약 분야로의 이용성을 증대하여, 산업체 및 농가소득향상을 위한 특화작물의 활용하는데 있어서의 정당성 및 타당성을 부여하는데 있다.

SUMMARY

(영문요약문)

I. Title:

"Development of functional materials for improving liver function from *Cordyceps militaris*"

II. Purpose, contents, and results of this research:

Cordyceps species are mushrooms ethopharmacologically known in Far East Asian countries such as Korea, China, and Japan. Preparation of the species *Cordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris* have been traditionally prescribed as a tonic for longevity, endurance, and vitality (Zhou et al. 2009). Continuous scientific studies have found that these preparations are capable of exhibiting numerous pharmacological activities as anti-oxidative, anti-viral, anti-cancer, anti-fibrotic, antiinflammatory, anti-nociceptive, anti-angiogenic, anti-diabetic, and anti-obesity drugs (Ng and Wang 2005; Zhou et al. 2009).

Cordyceps militaris is a fungus that parasitizes Lepidoptera larvae and has benefits in the human body including circulatory, immune, respiratory and glandular systems. Previous studies showed various properties such as anti-angiogenesis (Yoo et al.,2004), anti-tumor and anti-diabetic (Yun et al., 2003), anti mutagenic(Cho et al., 2003) and hypoglycemic effect(Choi et al. 2004). *Cordyceps militaris*, a caterpillar-grown traditional medicinal mushroom, produces an important bioactive compound, cordycepin (3′-deoxyadenosine). Cordycepin is reported to possess many pharmacological activities including immunological stimulating, anti-cancer, anti-virus and anti-infection activities.

Cordycepin, a major component of *C. militaris,* has also been studied in anti-fungal activity (Sugar and McCaffrey, 1998), anti-herpes activity (De Julian-Ortiz et al., 1999), anti-metastatic action on some cell lines (Nakamura et al., 2005), stimulating effect on interlukin-10 production as an immune modulator (Zhou et al., 2002), effect of polyadenylation inhibition (Ioannidis et al., 1999), and anti-leukemic activity (Koc et al., 1996).

Acetaminophen (AAP)is a safe and effective analgesic when used at therapeutic levels. An overdose of AAP, however, can induce severe hepatotoxicity in experimentalanimals and

in humans. Recent advances suggest that reactive metabolite formation, glutathione depletion, and alkylation of proteins, particularly mitochondrial proteins, arekey initiating eventsin AAP toxicity.Asin other types of liver injury, the roles of oncotic necrosis and apoptosis in AAP-induced liver damage have been debated. When AAP causes extensive ATP depletion, ATP depletion-dependent necrotic cell death results. However, when fructose and glycine are used to prevent ATP depletion,necrosisis blocked and caspase dependent apoptosis increases.

MPT occurs under both fructose and glycinedeficientand sufficient conditions. The addition of cyclosporin A decreases necrosis and apoptosis.Thus,AAP toxicity is an example of"necrapoptosis," in which necrosis and apoptosis represent alternate outcomes of the same mitochondrial death pathway.

Acetaminophen (N-acety1-p-aminophenol, paracetamol, AAP) is a widely used analgesic and antipyretic agent with very few side effects at its usual therapeutic doses.1) However, it can cause centrilobular hepatic necrosis, renal failure, and even death in humans and experimental animals when taken in overdoses2) or in moderate doses in combination with other drugs or alcohol.3).

At therapeutic doses, AAP is primarily detoxified by glucuronidation and sulfation,4) with a small fraction metabolized by a cytochrome P450-dependent mixed function oxidase system to an electrophilic metabolite, N-acetyl-p-benzoquinoneimine (NAPQI).5) NAPQI is normally detoxified by glutathione (GSH) and therefore displays no significant toxicity.
After an overdose of AAP, the glucuronidation and sulfation routes become saturated and a larger fraction of the drug is available for metabolism by cytochrome P450, leading to rapid depletion of hepatic GSH levels. In addition to NAPQI, reactive oxygen species formed during AAP metabolism induces oxidative stress which in turn contributes to the cell injury process. AAP interferes with the ongoing processes of each and every intracellular compartment: mitochondria, 6) nucleus,7) plasma membrane,8) and cytoplasm.9).

We cultured Chang liver and HepG2 cells in Eagle's minimum essential medium (MEM) containing glycine (0.0075g/L) to block necroticcelldeath.AAP treatment and caspase-3 activation induced DNA fragmentation, indicating that the cells underwent apoptosis. However, DNA fragment results were not consistent with DNA laddering,acharacteristicofapoptosis,although someDNA smearing, a feature of necrosis,was observed.Thus,we concluded that the mode of AAP-induced cell death was necrapoptosis

because both necrosis and apoptosis apparently occur.

Oxidative stress-induced cell death is a mitochondria-independent pathway of AAP cytotoxicity. Early investigations into the mechanism of oxidative stress-induced cell death identified glutathione(GSH)as a critical factor in the detoxification of the reactive metabolite of AAP. While this initial breakthrough resulted in novel therapeutics trategies in the clinic, the mechanism of cell injury and liver failure is still not completely understood. In particular, the role of reactive oxygen species(ROS) in the pathophysiology of liver damage continues to be debated, despite three decades of research. Studies using a variety of experimental models have established that severe hepatocellular injury can lead to intracellular, mitochondria derived oxidant stress. Elevated hepatic and mitochondrial GSSG levels are indicators of mitochondrial ROS formation, and AAP induced cell death may be a result of oxidative cytotoxicity.

Recent studies have shown that both endogenously produced and exogenously added ROS can regulate the activity of mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways that may be involved in cellular responses, such as proliferation, differentiation, and apoptosis. Three major MAPK kinase types exist:extracellularsignal-regulated kinases(ERKs), p38 kinases, and c-Jun N-terminalkinases (JNKs). These kinases have severalisoforms generated by alternative splicing of pre-mRNA. ERKs are generally activated by mitogenic and proliferative stimuli,such as growth factors involved in cellular proliferation and differentiation.JNKs and p38 kinases are primarily activated by extracellular stresses, such as UV irradiation, inflammatory cytokines, heat, and arsenic trioxide. Activation of these protein kinases causes a variety of cellular responses, depending on the cell type. In our experimental system, AAP induced ERK activation, but not JNK or p38 kinase activation. Thus, AAP-induced oxidative stress involves ERK activation.

One of these involves the MAPKs, a family of serine/threonine protein kinases activated by many stimuli, including IGF-IR. A key MAPK pathway contains ERK1/2.

For “Development of functional materials for improving liver function from *Cordyceps militaris*” we performed the following tests and concluded that Cordyceps militaris can be considered a cytoprotective agent in vitro and in vivo testsl on drug toxicity and results from animal test.

First, in this study, we performed cytotoxicity profiles of AAP in human Chang liver

cells and evaluated the protective effect of Cordyceps militaris against AAP-induced toxicity. by measuring various factors and animal test, ent, MTT metabolism, and signal pathway of human liver cells.

Second, we performed the effects of cordycepin in LPS-stimulated macrophage and evaluated the protective effect of Cordyceps militaris against inflammation by measuring various factors and metabolism.

Third, in this study, we performed animal test to evaluate the protective effect of Cordyceps militaris by measuring various tissues and animal test, on metabolism to prove the protective funtion of Cordyceps militaris.

These observations demonstrate that Cordyceps militaris may significantly sttenuate AAP-induced toxicity. And also from the animal test to evaluate the protective effect of Cordyceps militaris , we proved the protective funtion of Cordyceps militaris on liver function.

From these results, Cordyceps militaris can be considered a cytoprotective agent in this in vitro and in vivo model on drug toxicity and results from animal test.

III. Utilization of this research:

Following impacts have been obtained from this Research.

1) Many people can use entomopathogenic fungal cultures due to collection and proper preservation of specimens and isolates. 2) It is not necessary to depend upon foreign countries for their collection and isolation. 3)Systematic classification of Korean entomopathogenic fungi could be developed. 4) Industrialization of fruit body production could be done due to their artificial fruiting. Artificial fruit bodies could be perfectly used after the investigation of the effects of their bio-active compounds. 5)Development of *Cordyceps militaris* as a new drug for pharmaceutical purposes was achieved from this research.

And the final purpose of the research was "Development of functional materials for improving liver function from *Cordyceps militaris*" showed very good enhancements of the treatment of Liver.

Therefore, Cordyceps militaris can be considered a cytoprotective agent in this in vitro and in vivo model on drug toxicity and results from animal test.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1 Cocepts of the research ····· 28

1) The purpose of research development ····· 28

2) Importance of the research ····· 29

3) Scope of the research ····· 30

Chapter 2 Industrialization of the research on domestic and foreign countries. ····· 37

1) Production and markets in Cordyceps? ····· 37

2) Industrialization and researches in Cordyceps ····· 38

3) Researches in foreigns and domestics ····· 40

Chapter 3 Contents and Results of the research ····· 44

1) Planning of yearly research project and results ····· 44

2) Research methodology ····· 53

3) Methods and Results of the research ····· 55

Chapter 4 Achievements of the research and its dedications ····· 129

Chapter 5 Utilizations of the research. ····· 134

Chapter 6 The informations obtained abroad on the research work ····· 139

Chapter 7 Research facilities ····· 146

Chapter 8 References ····· 147

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 ····· 28

제 1 절 연구개발의 목적 ····· 28

제 2 절 연구개발의 필요성 ····· 29

제 3 절 연구개발의 범위 ····· 30

제 2 장 국내외 기술개발 현황 ····· 37

제 1 절 동충하초 생산 및 시장현황 ····· 37

제 2 절 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과 ····· 38

제 3 절 동충하초의 국내외의 연구현황 ····· 40

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 ····· 44

제 1 절 년차별 연구내용 및 결과 ····· 44

제 2 절 기술 개발 접근방법 ····· 53

제 3 절 연구 수행 방법 및 결과 ····· 55

제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도 ····· 129

제 5 장 연구개발결과 성과 및 활용계획 ····· 134

제 6 장 연구개발과장레서 수집한 해외과학기술정보 ····· 139

제 7 장 연구시설 장비 현황 ····· 146

제 8 장 참고문헌 ····· 147

제 1 장　연구개발과제의 개요

제1절　연구개발의 목적

▶ 동충하초는 균주에 따라 암, 뇌졸중, 심장병과 같은 성인병에 대한 예방 및 개선효과가 최근 발견되어 이용가능 잠재력이 무한한 품목이지만, 번데기동충하초에 대한 채집과 분리·동정과 보존 연구가 현재 많이 진행되고 있지만, 아직 미흡한 상태이며, 보존된 번데기동충하초 균주를 이용하여 생리적인 특성을 알고 자실체 형성에 관한 연구를 체계적으로 하여 대량으로 생산하는 기술을 개발하여, 번데기동충하초를 이용하여 생리활성이 높은 우수한 기능성 식품 및 치료제로 이용할수 있는 방안을 마련하여, 국제경쟁력을 높일수 있는 제품을 생산하고자 하며,

▶ 최근에, 동충하초속의 버섯은 최근 암의 억제, 면역성 회복, 항균작용 등 다양한 약효작용이 있음이 입증되었다. 그러므로 국내에서 많이 알려져 있는 번데기동충하초를 이용하여 약리 생리활성을 입증하여,

▶ 현재 많이 알려져 있는 번데기동충하초의 이용성 연구를 통해서 새로운 식품 및 치료제로서 동충하초의 이용성을 증대시키며, 산업체 및 농가소득향상을 위한 특화작물의 활용하는데 있어서의 정당성 및 타당성을 부여시키고자 하며,

▶ 본 속균 가운데 현재, 국내에서 밀리타리스동충하초(*C. militaris*)와 눈꽃동충하초(*Paecilomyces tenuipes*)는 인공적으로 버섯을 만드는데 성공하여 이에 대한 실용화가 이루어지고 있지만, 번데기동충하초는, cordycepin이 1960년대에 항암작용이 있는 것으로 알려지고 있으며, 이외에도 다당류(polysaccharide), 기타 면역상승제들이 일려지고 있으며, 본 연구자의 실험실에서는 번데기동충하초에서 최근, militarin이라는 신물질을 추출, 정제하여 특허를 받았으며, 번데기동충하초에서 얻은 이러한 여러 물질을 이용하여 좀더 깊이 있고, 활용성이 다양한 연구가 필요한 실정이다.

▶ 제1세부과제, 제2세부과제 및 제1협동과제와 참여기업의 연구 결과로 형성된 우수 유전자를 사용한 번데기동충하초 자실체를 생산하여 번데기 동충하초를 이용한 간기능 개선효과를 연구하며 동시에 및 번데기 동충하초 분획을 이용하여 간기능 개선효과를 가지는 제품의 생산을 목표로 하며,

▶ 최종적으로, 번데기동충하초 자실체를 대량생산하여, 농가소득향상을 위해 직접 활용될 수 있는 새로운 간기능 개선을 위한 기능성 식품 개발연구 및 간기능 개선치료제신기술의 개발이 본연구의 최종 목표이다.

종합적으로,

▶ 번데기 동충하초를 이용하여 간기능 개선효과 검증함과 동시에 간 기능 개선제를 개발하며,

▶ 번데기 동충하초 분획을 이용하여 간기능 개선효과를 가지는 기능성 식품을 개발하여 내수 및 수출을 증대하고자 하는 것이 본연구의 최종 연구 목표이다.

제2절 연구개발의 필요성

▶ 21세기 후반은 생명과학의 획기적인 발전이 기대되는 시기로 다양한 생물 유전자원을 확보한 국가만이 선진국의 대열에 참가할 수 있는 사회가 되었다.

▶ 강원도는 산간으로 이루어진 천혜의 버섯 자원지역이지만, 아직 국내의 천연 유전자원인 버섯 균주의 채집이나 분리·동정 및 보존의 투자는 아주 미미한 실정으로, 매년 감소하고 있는 버섯자원을 채집하여 분리·동정·유전자원을 보존 이용하여 고부가 가치의 제품으로의 유도는 국가적인 차원에서 우선 중요하며, 천연자원이 풍부한 강원도에서도 중요하다.

▶ 보존한 유전자원을 이용하여 생리활성의 탐색으로 유용한 물질이 구명되면, 고부가 가치의 제품을 만들어 산업화시키는 것이 국가적인 차원에서 매우 필요하다고 중요하다.

▶ 한국에서 최근 많이 알려진, 동충하초(*Cordyceps*) 속은 800종이 있는 것으로 알려지었고, 보고된 것은 300종으로 각 종마다 형태가 다양하고 형성하는 기주가 다르므로 생리활성에도 차이가 있음으로 이에 대한 연구가 필요하다.

▶ 동충하초는 옛날부터 귀중한 한약재로써 면역력 증강, 염증억제 및 체력 증강, 결핵, 황달, 마약중독 해독제와 항암효과 등이 있으며, 버섯중에서 가장 광범위한 효과를 가지고 있는 버섯중의 하나이지만, 고부가가치 제품을 위한 체계적인 연구가 되지 않았다.

▶ 동충하초는 최근, 암의 억제, 면역성 회복, 항균작용 중요한 약효작용이 입증되고 있는 높은 부가가치의 버섯으로 국내 버섯의 시장은 약용버섯을 포함하여 현재 500억원 정도로 추산되며, 세계시장 또한 무한하다.

▶ 동충하초의 300여종 중에서 연구된 종은 중국에서 박쥐나방동충하초 한국에서는 번데기동충하초와 눈꽃동충하초만이 산업화 된 것으로 최근 연구로 암의 억제 , 면역성 회복, 항균 작용 중요한 약효작용이 입증되고 있는 높은 부가가치의 버섯으로 국내 버섯의 시장은 약용버섯을 포함하여 현재 500억원 정도로 추산되며, 세계시장 또한 무한하다.

▶ 본 책임연구자(김태웅 교수)와 공동연구원(성재모 교수)은, 최근 많이 알려진 번데기동충하초를 비롯한 동충하초의 생리활성 연구를 1995년부터 시작하여 많은 연구 결과를 얻었다. 특히 공동연구원(성재모 교수)은, 동충하초를 1985년부터 동충하초를 채집·분리·동정을 시작하여 동충하초균주를 보유하고 있으며 "한국의 동충하초"와 "강원의 버섯"에서 동충하초를 비롯한 국내의 버섯을 총 정리하여 동충하초 연구에 기틀을 마련하였다. 따라서 이러한 균주를 이용하여 식품과 의약품에 사용될 수 있는 우수한 균주를 인공적으로 대량생산하여 생리활성을 확인하며. 제1협동(박형진 교수)의 동물실험을 통하여 노랑다발동충하초의 생리활성을 검증하여 부가가치의 높은 제품을 개발하여 산업화하는 것이 필요하다.

▶ 동충하초에 관한 국내에서의 연구는 번데기동충하초와 눈꽃동충하초 2종의 연구로 이제 시작 단계이다. 본 연구의 대상인 노랑다발동충하초(*Cordyceps staphylinidaecola*)는 현재 국내의 본 연구팀에서만 보유한 균주로 우수 유전자 확보, 대량생산 및 이용성을 위한 개발은 앞으로 진행되어야 할 과제이고, 본 속균에 대한 연구는 국내·외에서 연구되지 않은 동충하초이다.

▶ 따라서, 천연자원인 번데기동충하초 자실체의 식품과 의약품으로서의 이용 개발 가능성을 고려하여, 본속균에 대한 유전자원을 확보하고, 인공적으로 자실체의 대량생산의 기술개발과 생리활성 탐색으로 식·의약품으로 개발되어 산업화된다면 국내의 기업 농가소득향상을 위한 직접적인 활용할 수 있을 뿐만 아니라, 더 나아가서는 외화 획득에도 기여하리라 본다.

제3절 연구개발의 범위

본 연구인, "번데기동충하초의 대량생산 및 간기능 개선 생리활성연구 연구"의 각 세부과제 및 협동연구별 연구내용은 다음과 같다.:

제1세부과제: "번데기동충하초의 대량생산 및 간기능 개선 생리활성연구"
김태웅 교수(강원대학교)

1. 번데기동충하초 채집 및 균주확보.
2. 번데기동충하초에 관한 형태. 유전적인 특성 및 연구자원 확보.
3. 자실체 우수균주를 선발 및 선발된 균주의 대량생산.
4. 번데기동충하초의 대량생산 방법확립 및 대량생산에 대한 효율,균주의 활용성 연구
5. 대량 생산 번데기동충하초의 추출 및 분획.
6. 번데기동충하초의 알콜에 의한 간 세포 손상에 대한 보호 효능 평가.
7. 약물에 의한 간세포 손상에 대한 번데기동충하초의 보호 효능평가 및 표준화를 위한 화학적인 연구.
8. 번데기동충하초의 간세포 손상에 대한 보호 효능의 생화학적 기전 규명.
9. 번데기동충하초의 Chang liver cell의 세포주기에 대한 AAP(acetoaminophen)의 영향.
10. 번데기동충하초 추출물(CMWE)이 AAP에 유도된 신호전달 물질에 미치는 영향.

제2세부과제: "번데기동충하초로부터 대식세포 매개성 간염 치료 효능 평가"

박영철 교수(강원대학교)

1. 번데기동충하초의 염증조절 효능연구.
2. 염증반응에 관여하는 대식 세포의 nitric oxide의 생성을 연구.
3. CMWE의 대식세포에 대한 세포사멸 측정.
4. 번데기동충하초에 의한, 대식세포작용 활성을 측정하여 면역반응의 강도를 연구.
5. 번데기동충하초에 의한 T-cell의 증식 측정에 의한 면역반응 평가.
6. 간 유래 대식세포(쿠퍼 세포) 매개성 간염 모델의 확립.
7. 간조직 유래 대식세포의 염증억제 효능평가.
8. 번데기 동충하초 유래 cordycepin의 염증조절 효능평가.
9. Cordycepin의 대식세포 유래 세포독성물질 nitric oxide (NO) 생성능 연구.
10. Cordycepin의 대식세포주에서 세포 생존률(cell viability) 연구.
11. Cordycepin의 염증 조절 효소 PKBα kinase 활성저해효과
12. Cordycepin의 PKBα kinase 활성 억제 저해 기전.
13. Cordycepin의 p70S6K kinase, PDK1 kinase, PKA kinase assay 측정.

제1협동과제: "번데기동충하초로부터 간기능을 향상시키는 기능성 물질의 개발"

박형진 교수

1. 번데기동충하초로부터 간기능을 향상시키는 기능성 물질의 추출 및 정제.
2. 번데기동충하초의 기능성 물질의 간기능 개선효과 검증.
3. 흰쥐에서 TAA로 유발한 간 섬유화에 대한 번데기 동충하초 추출물의 에탄올 침전물(CMWE)의 효과.
4. TAA로 유발한 섬유화 간에서 α-smooth muscle actin 발현에 대한 CMWE의 효과.
5. TAA로 유발한 섬유화 간에서 tissue inhibitor of metalloproteinase(TIMP) 발현에 대한 CMWE의 효과.
6. 지방간에 대한 번데기 동충하초 추출물의 효과.
7. 동충하초 추출물에 의한, 체중, 간 중량, 부고환 지방중량변화.

8. 동충하초 추출물에 의한, glucose, triglyceride, cholesterol 농도,
9. 동충하초 추출물에 의한, 간기능 효소 ALT 및 AST 농도 변화.
10. 동충하초 추출물에 의한 leptin 농도, SOD 활성에 미치는 효과.
11. 동충하초 추출물, CMEW가 간조직의 병리학적 소견에 미치는 효과.
12. 간독성 물질로 유발한 간 섬유화에 대한 번데기 동충하초 추출물의 효과.
13. 번데기 동충하초 추출물의 표지성분 개발.

1. 연구개발의 수행내용 및 범위

구분	연도	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도	2010	• **제1세부과제:** - 번데기동충하초의 배지선택 성분 차별화 검토 - 번데기동충하초 대량생산 방법 확립 - 재배생산된 번데기동충하초의 추출 및 분획 - 번데기동충하초의 알콜에 의한 간세포 손상에 대한 보호 효능 평가	• **제1 세부과제:** - 번데기동충하초 균주로 대량 생산화 확립 - 번데기 동충하초의 추출, 분리 및 특성연구 - *in vitro*에서 번데기동충하초의 알콜 및 약물에 의한 간세포 손상 보호 효능평가
		• **제2세부과제:** - 번데기동충하초 유래 분획의 간 유래 대식세포의 염증반응 조절능 평가	• **제2세부과제:** - 번데기동충하초의 염증조절 효능연구
		• **협동연구과제:** - 번데기 동충하초로부터 시료의 확보 - 번데기 동충하초 추출물의 간기능 개선 효과 검증	• **협동연구과제:** - 번데기 동충하초로부터 간 기능을 향상 시키는 기능성 물질의 추출 및 시료 생산. - 1, 2 세부과제 지원. - 간경화가 유발된 실험동물에서 번데기 동충하초 추출물이 간 기능의 향상 및 간 섬유화의 억제 효능에 관한 연구.
2차년도	2011	• **제1 세부과제:** - 번데기동충하초 대량생산 방법 확립 - 약물에 의한 간세포 손상에 대한 번데기동충하초의 보호 효능 평가	• **제1 세부과제:** - 번데기동충하초 우수균주로 대량생산화 확립 - 번데기동충하초 추출물 및 분획물의 *in vitro*에서 약물에 의한 간세포 손상 보호 효능 평가
		• **제2세부과제:** - 간 유래 대식세포(쿠퍼세포) 매개성	• **제2세부과제:** - 간 유래 대식세포(쿠퍼세포) 매개성

		간염모델에서 염증조절 효능 평가	간염 모델의 확립 - 간 유래 대식세포(쿠퍼세포) 매개성 간염 모델에서 염증조절 효능 평가확립
		• **협동연구과제:** - 번데기 동충하초로부터 시료의 확보 - 번데기 동충하초 추출물의 간 기능 개선 효과 검증 - 번데기 동충하초 추출물의 간기능 개선효과 검증	• **협동연구과제:** - 흰쥐에서 TAA로 유발한 간 섬유화에 대한 번데기 동충하초 추출물의 에탄올 침전물(CMWE)의 효과. - TAA로 유발한 섬유화 간에서 α-smooth muscle actin 발현에 대한 CMWE의 효과. - TAA로 유발한 섬유화 간에서 tissue inhibitor of metalloproteinase 발현에 대한 CMWE의 효과.
3차년도	2012	• **제1세부 과제:** - 번데기동충하초 대량 생산방법 확립 - 번데기동충하초의 간세포 손상에 대한 보호 효능의 생화학적 기전 규명	• **제1세부 과제:** - 번데기동충하초 우수균주로 대량 생산화 확립 - *in vitro*에서 번데기동충하초를 이용한 간세포 손상에 대한 보호 효능의 생화학적 기작 규명
		• **제2세부 과제:** - 간 유래 대식세포(쿠퍼세포) 매개성 간염 치료 기전연구	• **제2세부 과제:** - 번데기동충하초 유래 분획의 간 유래 대식세포(쿠퍼세포) 매개성 간염 치료 기전연구
		• **협동연구과제:** - 번데기 동충하초로부터 시료의 확보 - 번데기 동충하초 추출물의 간 기능 개선 효과 검증 - 번데기동충하초 추출물로부터 기능성분 또는 지표성분의 개발 - 본 과제의 마무리 작업.	• **협동연구과제:** - 번데기 동충하초로부터 간 기능 향상 기능성 물질의 추출 및 시료생산. - 1, 2 세부과제 지원. - 간경화가 유발된 실험동물에서 번데기동충하초 추출물이 간 기능 향상 및 간 섬유화의 억제 효능에 관한 연구. - 건강기능성 식품 제조의 표준화에 필요한 추출물의 기능성분 또는 지표성분 및 그 측정법의 개발 - 보고서 작성 및 논문 투고

2. 년차별 연구개발의 수행내용 및 범위

가. 1 차년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구내용	연구개발 범위
1차 연도 (2010)	제 1세부과제 : (김태웅 교수) 번데기동충하초의 대량생산 및 간기능 개선 생리활성 연구	- 번데기동충하초의 배지선택 성분 차별화 검토 - 번데기동충하초 대량생산 방법 확립 - 재배생산된 번데기동충하초의 추출 및 분획 - 번데기동충하초의 알콜에 의한 간 세포 손상에 대한 보호효능 평가	- 번데기동충하초 균주로 대량 생산화 확립 - 번데기 동충하초의 추출, 분리 및 특성연구 - *in vitro*에서 번데기동충하초의 알콜 및 약물에 의한 간세포손상 보호 효능평가
	제 2세부과제 : (조재열 교수) 번데기동충하초로부터 대식세포 매개성 간염 치료 효능 평가	- 번데기동충하초 유래 분획의 간 유래 대식세포의 염증반응 조절능 평가	- 번데기동충하초의 염증조절 효능 연구
	협동연구과제 (박형진 교수) 번데기동충하초로부터 간기능을 향상시키는 기능성 물질의 개발	- 번데기 동충하초로부터 시료의 확보 - 번데기 동충하초 추출물의 간기능 개선 효과 검증	- 번데기 동충하초로부터 간 기능을 향상 시키는 기능성 물질의 추출 및 시료 생산. - 1, 2 세부과제 지원. - 간경화가 유발된 실험동물에서 번데기 동충하초 추출물이 간 기능의 향상 및 간 섬유화의 억제 효능에 관한 연구.

나. 2 차년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구내용	연구개발 범위
2차 년도 (2012)	제 1세부과제 : (김태웅 교수) 번데기동충하초의 대량생산 및 간기능 개선 생리활성연구	- 번데기동충하초 대량생산 방법 확립 및 대량생산에 대한 효율, 균주의 활용성 연구 - 번데기동충하초에 관한 형태. 유전적인 특성 및 자원의 연구자원 확보 - 약물에 의한 간세포 손상에 대한 번데기동충하초의 보호 효능평가 및 표준화를 위한 화학적인 연구	- 번데기동충하초 대량생산 방법 확립 및 대량생산에 대한 효율 및 균주의 활용성 연구확립. - 번데기동충하초에 관한 형태. 유전적인 특성 및 자원의 연구자원 확보함. - 약물에 의한 간세포 손상에 대한 번데기동충하초의 보호 효능평가 및 표준화를 위한 화학적인 연구를 확립.

구분 (연도)	세부과제명	세부연구내용	연구개발 범위
	제 2세부과제 : (박영철 교수) 번데기동충하초로부터 대식세포 매개성 간염 치료 효능 평가	- 간 유래 대식세포(쿠퍼세포) 매개성 간염 모델에서 염증조절 효능 평가	- 간 유래 대식세포(쿠퍼세포) 매개성 간염 모델의 확립 - 간 유래 대식세포(쿠퍼세포) 매개성 간염 모델에서 염증 조절 효능 평가확립
	협동연구과제 (박형진 교수) 번데기동충하초로부터 간기능을 향상시키는 기능성 물질의 개발	- 번데기 동충하초 추출물의 간기능 개선 효과 검증	- 흰쥐에서 TAA로 유발한 간 섬유화에 대한 번데기 동충하초 추출물의 에탄올 침전물(CMWE)의 효과. - TAA로 유발한 섬유화 간에서 α-smooth muscle actin 발현에 대한 CMWE의 효과. - TAA로 유발한 섬유화 간에서 tissue inhibitor of metallo-proteinase 발현에 대한 CMWE의 효과.

다. 3 차년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구내용	연구 개발 범위
3차 년도 (2012-2013)	제1세부 과제: (김태웅 교수) - 번데기동충하초 대량 생산방법 확립 - 번데기동충하초의 간세포 손상에 대한 보호 효능의 생화학적 기전 규명	- 번데기동충하초 대량 생산 방법 확립	- 번데기동충하초 우수균주로 대량 생산화 확립 -유전적 특성 비교
		- 번데기동충하초의 간세포 손상에 대한 보호 효능의 생화학적 기전 규명	- *in vitro*에서 번데기동충하초를 이용한 간세포 손상에 대한 보호 효능의 생화학적 기작 규명
	제2세부 과제: (박영철 교수) - 동충하초 유래 성분 (코디세핀 및 밀리타린 등) 및 대조약물의 간 유래 대식	- 간 유래 대식세포(쿠퍼세포) 매개성 간염 치료 기전 연구	- 동충하초 유래 성분 (코디세핀 및 밀리타린 등) 및 대조약물의 간 유래 대식세포(쿠퍼세포) 매개성 간염치료 기전연구

구분 (연도)	세부과제명	세부연구내용	연구 개발 범위
	세포(쿠퍼세포) 매개성 간염 치료 기전 연구		
	협동연구과제: (박형진 교수) - Mouse model에서 번데기 동충하초 추출물의 간 기능 개선 효과 검증 - 번데기 동충하초 추출물의 표지성분 개발	- 번데기 동충하초로부터 시료의 확보	- 번데기 동충하초로부터 간 기능 향상 기능성 물질의 추출 및 시료생산.
		- 번데기 동충하초 추출물의 간 기능 개선 효과 검증	- 간경화가 유발된 mouse에서 번데기 동충하초 추출물이 간 기능 향상 및 간 섬유화의 억제 효능에 관한 연구.
		- 번데기 동충하초 추출물의 표지성분 개발	- 각 시료의 cordycepin 함량을 HPLC를 이용하여 확인함.

제 2 장　국내외 기술개발 현황

＊ 국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황과 연구결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치 등을 기술

제1절. 동충하초 생산 및 시장현황

1. 국내 제품생산 및 시장 현황:

가. 한국에서 주로 생산되는 식·약용버섯은 느타리, 표고, 양송이, 영지, 팽이, 송이와 동충하초를 들 수 있다. 이들 중 송이를 제외하고는 모두 농업 또는 임업부산물을 이용하여 인공재배하고 있으며 해를 거듭할수록 생산량은 크게 증가하고 있다.

나. 재배농작물 중에서 버섯은 어떤 작물보다도 고수익성 소득작물이다. 느타리 재배를 예로 들면, **벼농사의 2.1배, 시설고추 재배의 1.7배, 포도재배의 3.2배 및 장미재배의 1.1배에 달하는 수익성을 보이고 있다.**

다. 최근 재배하는 버섯 가운데 동충하초가 사람에게 유익한 물질 함유한 것이 발표된 후 동충하초를 이용한 많은 제품이 나오고 있다. 동충하초 중 지금 상품화되어 지금 시판하고 있는 것은 눈꽃동충하초이나 앞으로 번데기동충하초가 아주 중요한 위치를 차지하고 있다.

라. 동충하초의 시장 현황

- ▶ 아직 국내·외에서는 동충하초 제품을 이용하여 고부가 가치의 제약 생산 이루어지지 않고 있으며, 제품화된 제약 개발은 아직 초기 상태이다.
- ▶ 현재 국내에서 생산되어 판매되고 있는 동충하초의 제품은 눈꽃동충하초(*Paecilomyces tenuipes*)로 한정되어 있다.
- ▶ 밀리타리스동충하초의 경우는 자실체 형성을 위하여 계대로 배양하면 균주의 활력이 떨어져 자실체를 형성하기가 어렵지만 본 연구팀은 교배형을 만들어 일률적으로 자실체 형성시킬 수 있는 기술을 개발하였다.
- ▶ 다른 기관들에서는 밀리타리스동충하초의 인공적인 자실체의 대량생산방법 및 활력이 우수한 균주를 보관하고 있지 않기 때문에 산업적으로 이용성을 증대하거나 생리활성연구를 위한 시료의 대량 확보에 문제가 있기 때문에 연구는 노랑다발동충하초 연구를 통하여 자실체 형성 연구하는 것이 중요하다.
- ▶ 현재, 동충하초를 이용하여 만든 제품의 종류를 보면, drink, 차, 자실체의 종류로 시판되고 있다.

마. 한국 시장규모

구 분	현재의 시장규모	예상되는 시장규모
한 국 시 장 규모	300 억 원	(2020 년) 700 억 원

*** 산출근거 :**

지금 버섯을 이용하여 식품이나 약품으로 이용하는 버섯은 느타리를 비롯하여 표고, 송이, 영지, 운지, 동충하초와 그 외의 많은 버섯이 재배되고 있고 이들 버섯은 2000년 농림부 특용작물 생산실적과 한국의 버섯과학과 버섯산업(버섯 2(1) : 19-37에서 나와 있는 것 같이 앞으로 버섯 시장은 더욱 넓어져 갈 전망이다. 특히 영지버섯은 일양약품에서 영비천, 대웅제약에서 운지천 또 동충하초가 세상에 알려진 후 바로 상업화되어, 눈꽃동충하초를 이용한 제품이 남양유업의 위풍당당 등 6개회사에서 제품이 나오게 되었다. 노랑다발동충하초의 경우는 본 연구팀만이 보유하고 있으며, 좋은 결과를 얻어 식품 허가를 받을 수 있다면 앞으로 식용으로 이용할 수 있고 약용으로도 사용 할 수 있어, 본 연구를 통하여 제품만 개발된다면 어떠한 소재보다도 좋은 소재가 될 수 있다고 생각된다.

2. 국외 제품생산 및 시장 현황

가. 시장규모

○ 주시장(국가 또는 지역) : 미 국 , 일 본 , 동남아

○ 시장규모

구 분	현재의 시장규모	예상되는 시장규모
세 계 시 장 규모	1,000 억 원	(2020 년) 5,000 억 원

제2절 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

1. 산업화 방향(제품의 특징, 대상 등)

○ 선진국 및 개발도상국 현황 및 동향

▶ 동충하초 자실체를 인공적으로 형성시키는 연구는 미국과 일본에서 성공한 보고가 있으나 대량으로 생산하지는 못하고 있는 상황임.

▶ 중국에서 발생하는 박쥐나방동충하초의 균사체를 이용하여 미국과 일본에서는 동충하초를 이용하여 의약품으로 제조하여 시판하며 중국에서는 인공적으로 자실체를 형성시켜 한약제로 사용하는 연구가 활발이 진행하고 있으나 아직은 초보단계에 있다.

▶ 다양한 동충하초균주의 확보와 자실체의 대량생산의 연구는 다른 선진국에 비하여

본 연구팀이 균주의 다양성, 자실체의 형성, 대량생산 면에서 우위에 있다.

▶ 번데기 동충하초를 이용하여 간기능 개선효과 검증함과 동시에 간 기능 개선제는 현재 국외에서 생산되지 않는 것으로 조사되었으므로,

▶ 이러한, 번데기 동충하초를 이용하여 간기능 개선효과를 가지는 기능성 식품을 개발하여 수출을 증대하고자 하는 것은 바람직한 연구라고 할수 있다.

2. 국내외 관련 분야 환경변화

21세기 후반은 생명과학의 획기적인 발전이 기대되는 시기로 **다양한 생물 유전자원을 확보**한 국가만이 선진국의 대열에 참가할 수 있는 사회가 되었다. 강원도는 산간으로 이루어진 천혜의 버섯 자원지역이지만, 아직 국내의 천연 유전자원인 버섯 균주의 채집이나 분리·동정 및 보존의 투자는 아주 미미한 실정으로, **매년 감소하고 있는 버섯자원을 채집하여 분리·동정·유전자원을 보존 이용하여 고부가 가치의 제품으로의 유도는 국가적인 차원에서 우선 중요하며, 천연자원이 풍부한 강원도에서도 중요**하다. 보존한 유전자원을 이용하여 생리활성의 탐색으로 유용한 물질이 구명되면, 고부가 가치의 제품을 만들어 산업화시키는 것이 국가적인 차원에서 매우 필요하다고 중요하다.

한국에서 최근 많이 알려진, 동충하초(*Cordyceps*) 속은 800종이 있는 것으로 알려지었고, 보고된 것은 300종으로 각 종마다 형태가 다양하고 형성하는 기주가 다르므로 생리활성에도 차이가 있음으로 이에 대한 연구가 필요하다. 동충하초는 옛날부터 귀중한 한약재로써 면역력 증강, 염증억제 및 체력 증강, 결핵, 황달, 마약중독 해독제와 항암효과 등이 있으며, **버섯중에서 가장 광범위한 효과를 가지고 있는 버섯중의 하나이지만, 고부가가치 제품을 위한 체계적인 연구**가 되지 않았다.

동충하초는 최근, **암의 억제, 면역성 회복, 항균작용 중요한 약효작용이 입증**되고 있는 높은 부가가치의 버섯으로 국내 버섯의 시장은 약용버섯을 포함하여 현재 500억 원 정도로 추산되며, 세계시장 또한 무한하다. 동충하초의 300여종 중에서 연구된 종은 중국에서 박쥐나방동충하초 한국에서는 번데기동충하초와 눈꽃동충하초만이 산업화 된 것으로 최근 연구로 암의 억제, 면역성 회복, 항균 작용 중요한 약효작용이 입증되고 있는 높은 부가가치의 버섯으로 국내 버섯의 시장은 약용버섯을 포함하여 현재 500억원 정도로 추산되며, 세계시장 또한 무한하다. 본 책임연구자(김태웅 교수)와 공동연구원(성재모 교수)은, 최근 많이 알려진 번데기동충하초를 비롯한 동충하초의 생리활성 연구를 1995년부터 시작하여 많은 연구 결과를 얻었다. 특히 성재모 교수는, 동충하초를 1985년부터 동충하초를 채집·분리·동정을 시작하여 **동충하초균주를 보유**하고 있으며 **"한국의 동충하초"와 "강원의 버섯"에서 동충하초를 비롯한** 국내의 버섯을 총 정리하여 동충하초 연구에 기틀을 마련하였다.

따라서 이러한 균주를 이용하여 식품과 의약품에 사용될 수 있는 우수한 균주를 인공적으로 대량생산하여 생리활성을 확인하며. 제1협동(박형진 교수)의 동물실험을 통하여 번데기동충하초의 생리활성을 검증하여 부가가치의 높은 제품을 개발하여 산업화하는 것이 필요하다. 동충하초에 관한 국내에서의 연구는 번데기동충하초와 눈꽃동충하초 2종의 연구로 이제 시작 단계이다.

본 연구의 대상인 번데기동충하초(*Cordyceps militaris*)는 현재 국내의 본 연구팀에서만 보유한 균주로 우수 유전자 확보, 대량생산 및 이용성을 위한 개발은 앞으로 진행되어야 할 과제이고, 본 속균에 대한 연구는 **국내·외에서 연구되지 않은 동충하초이다.** 따라서, 천연자원인 번데기동충하초 자실체의 식품과 의약품으로서의 이용 개발 가능성을 고려하여, 본속균에 대한 **유전자원을 확보**하고, 인공적으로 **자실체의 대량생산의 기술 개발과 생리활성 탐색으로 식·의약품으로 개발되어 산업화된다면 국내의 기업 농가소득향상을 위한 직접적인 활용할 수 있을 뿐만 아니라, 더 나아가서는 외화 획득에도 기여하리라 본다.**

제3절 동충하초의 국내외 연구현황

1. 동충하초(冬蟲夏草)란

가. 동충하초는 모든 곤충군의 유충, 번데기, 성충 등의 전 시기에 걸쳐 침입하며 곤충을 죽게 한 후 이를 기주로 하여 충체 전반에 걸치어 자실체와 포자과를 형성하는데 이것을 동충하초라고 한다(1,2,3,4,5).

나. 대표적인 곤충기생균은 *Cordyceps*속 균이며 전 세계적으로 분포하며 현재 보고된 종만도 300여종이 된다. 동충하초는 AD800년경 Fungus-born wasp로 기록된 이래, 예로부터 중국에서 불노장생의 비약으로 결핵, 황달 등의 치료와 강장제로서의 효과가 인정되어 이용되고 있으며 주로 병후의 신체조절, 보양 등에 사용되는 한방약제로 널리 사용되고 있다(1,3,5).

다. 현재는 이를 뒷받침하기 위하여 동충하초에 관한 초창기 신종발표와 분류중심의 연구에서 최근 본 균의 이용면에 초점을 두어 연구한 결과 동충하초로부터 생리활성 탐색 연구로 분리 정제된 물질이 높은 항암효과가 실증되었고 아편중독 해독제로서의 이용 가능성이 제기 되었다.

라. 번데기동충하초(*Cordyceps militaris*)의 경우에 있어서 주성분이기도 한 quinic acid의 이성체인 Cordycepin은 항균·항암작용이 있는 것으로 밝혀지었고 본 연구팀에 의하여 자실체에서 militarin이라는 물질이 정제되어 cordycepin보다 항암효과 알리어지었다. 따라서 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 최근 국내에서도 많은 관심을 가지게 되었다.

마. 그러나 보고된 300여종 중에서 연구에 걸림돌이 되고 있는 인공 자실체의 형성 연구와 이를 이용한 생리활성의 규명 연구는 실험실 수준에서는 시행되고 있으나, 동충하초 버섯의 대량 배양생산 및 제약 또는 신물질을 위한 생리활성 물질의 정제, 구조 확인, 등이 현실적으로 필요한 분야이다.

2. 동충하초의 세계적 수준

가. 선진국 및 개발도상국 현황 및 동향

(1) 동충하초 자실체를 인공적으로 형성시키는 연구는 미국과 일본에서 성공한 보고가 있으나 **대량으로 생산하지는 못하고 있음.**

(2) 중국에서 발생하는 박쥐나방동충하초의 균사체를 이용하여 미국과 일본에서는 동충하초를 이용하여 의약품으로 제조하여 시판하며 중국에서는 인공적으로 자실체를 형성시켜 한약제로 사용하는 연구가 활발이 진행하고 있으나 아직은 초보단계에 있다(1,3,5).

(3) 다양한 동충하초균주의 확보와 자실체의 대량생산의 연구는 다른 선진국에 비하여 본 연구팀이 균주의 다양성, 자실체의 형성, 대량생산 면에서 우위에 있다.

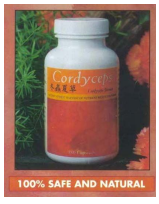
나. 주요 해당분야 국가의 현황 및 동향

(1) **중국**에서 인삼 녹용과 함께 3대 귀한 한방약재로 널리 사용되고 있다. 현재는 이를 뒷받침하기 위하여 동충하초에 관한 초창기 신종발표와 분류중심의 연구에서 최근 *Cordyceps sinensis*를 이용하여 성분분석 연구로 높은 항암 효과가 실증되어 한약재로 사용하고 있다. 성분분석은 균사체를 배양하여 이용하고 있으며 박쥐나방동충하초는 아직 인공적으로 자실체를 형성시키는 기술이 완성되지 않은 상태이므로 자실체를 이용한 산업화는 초보단계이다.

(2) 중국과 브라질, 불란서에서는 해충방제를 위하여 주로 병원성을 갖는 곰팡이를 대상으로 탐색되었으며, 실제로 *Beauveria bassiana*의 포자를 대량으로 생산하여 pine caterpillar. corn borer, eriophid mites등의 방제에 이용되고 있다.

(3) **스위스**에서는 박쥐나방동충하초(*Cordyceps sinensis*)를 이용하여 임상실험결과 마약중증중독자도 2주일 정도 복용하면 마약의 심각한 부작용을 말끔히 씻어 줄뿐만 아니라 유혹을 떨쳐 버리게 해 완전히 정상적인 사람으로 되돌려 줄 수 있다는 보고도 있다.

(4) **일본**에서는 동충하초 연구가 많이 되어 Kobayasi(1993)에 의하여 **동충하초도감**을 만들었고 생리활성에 대한 연구도 하였으며 기적을 부르는 동충하초라는 책이 나오기도 하였으나 동충하초를 이용한 산업적인 아직 초기 단계에 있다.



(5) **미국**에서는 USDA ARSEF에서 곤충기생균에 대한 균주를 수집하고 있고 Oregon State University에서 본 동충하초에 대한 연구를 본격적으로 하고 있다. 또한 박쥐나방동충하초(*Cordyceps sinensis*)를 이용하여 Ancient Healer로 tablet를 만들어 현재 판매하고 있다.

(6) 위에서 언급한 것과 같이 중국을 비롯한 미국, 일본, 영국, 소련에서는 동충하초를 채집하여 분류하여 보고하는 등 기초적인 연구를 수행하였다. 산업적으로 이용은 중국에서 잘 알려진 박쥐나방동충하초(*Cordyceps sinensis*)를 균사 배양을 하였고 자실체 형성 연구는 아직 하지 못하고 있다. 균사체를 배양하여 **의약품으로 제조**하여 시판하고 있다. 다른 동충하초의 **균주의 다양성, 자실체의 형성, 대량생산 면에서 한국이 우위에 있다.**

3. 동충하초의 국내수준

가. 국내 기술의 현황 및 수준

(1) 1984년도부터, 공동책임자(성재모 교수)가 한국의 여러 산에서 자생하는 동충하초를 채집한 후 지금까지 이에 연구를 계속하고 있다. 이 동충하초가 모든 사람에게 알게 된 것은 1994년 MBC 자연 다큐멘터리에서 한국의 버섯에서 동충하초가 소개 된 후 관심을 갖게 되었지만 체계적이고 산업적인 연구는 아직도 부진한 편이다(1,3).

(2) 한국에서는 동충하초의 연구는 최근 많이 이루어지고 있으며, 대부분 성재모 교수의 연구가 많으며, "Korean Cordyceps"라는 제목으로 미국균학회 소식지인 inoculum에 2004년 한국의 동충하초를 소개하였고 많은 동충하초 논문을 발표하였고 필요하면 동충하초를 알리기 위하여 전시회와 더불어 많은 강연을 통하여 정보를 제공받았다.

(3) 특히 한국과학재단 특성화 장려사업으로 지원하는 동충하초은행이 설립으로 현재까지 많은 균주를 수집하여 보존하고 있으며, 표본 중에서는 세계 어느 곳에 가도 볼 수 없는 것들을 많이 소장하고 있으며 균주를 분양하므로 다른 연구기관에서 연구를 할 수 있게 만들었다.

(4) 총괄과제 책임자인 김태웅교수는 세부과제 책임자인 성재모교수와 12년 동안 동충하초 연구를 하여 밀리타리스동충하초 자실체로부터 신물질인 militarin를 순수분리 정제하여 특허를 받았다. 그 외에도 붉은자루동충하초와 풍뎅이동충하초 연구를 수행하였다.

나. 관련기관들의 사업추진 현황 및 비교분석

(1) 아직 국내·외에서는 동충하초 제품을 이용하여 고부가 가치의 제약 생산 이루어지지 않고 있으며, 제품화된 제약 개발은 아직 초기 상태이다.

(2) 현재 국내에서 생산되어 판매되고 있는 동충하초의 제품은 눈꽃동충하초(*Paecilomyces tenuipes*)로 한정되어 있다.

(3) 밀리타리스동충하초의 경우는 자실체 형성을 위하여 계대로 배양하면 균주의 활력이 떨어져 자실체를 형성하기가 어렵지만 본 연구팀은 교배형을 만들어 일률적으로 자실체 형성시킬 수 있는 기술을 개발하였다.

(4) 다른 기관들에서는 밀리타리스동충하초의 인공적인 자실체의 대량생산방법 및 활력이 우수한 균주를 보관하고 있지 않기 때문에 산업적으로 이용성을 증대하거나 생리활성연구를 위한 시료의 대량 확보에 문제가 있기 때문에 연구는 노랑다발동충하초 연구를 통하여 자실체 형성 연구하는 것이 중요하다.

(5) 따라서, 눈꽃동충하초를 이용하여 만든 제품의 종류를 보면, drink, 차, 자실체의 종류로 시판되고 있다

다. 기술 개발의 타당성

(1) 일반 국민인 소비자는 새롭게 개발되는 동충하초를 선호하므로 새로운 노랑다발동충하초가 자실체 형성이 잘 되고 좋은 물질이 본 연구 결과로 얻어진다면 국민식생활의 많은 변화, 건강식품 및 자연 무공해 식품에 대한 선호 그리고 생산기술의 향상과 우량종균의 개발 등으

로 대량 생산이 가능하기 때문에 소비가 증대되고 산업화가 가능하리라 본다.

(2) 이러한 동충하초재배는 비교적 소규모로도 안정적인 수익이 확보되며, 농림업에서 복합경영이 가능한 작물로 자리잡아가고 있어 단기소득자원으로써 중요한 위치를 차지하고 있다.

(3) 동충하초는 앞으로 많은 연구를 수행하여 상품화되면 국민 생활수준의 향상으로 동충하초가 자생하는 자연환경을 동경하고 보다 자연적으로 친밀한 생활을 선호함과 동시에 건강에 대한 인식이 높아지고 있기 때문에 전망이 밝다고 본다.

(4) 따라서 이를 뒷받침 할 동충하초산업은 농업과 임업에 종사하는 사람의 경제안정과 진흥을 위하여 큰 역할을 할 것이며, 농림업에서 없어서는 안 될 산업으로 정착될 것이다. 또한 국가의 중요한 수출품으로 성장할 가능성이 있다.

(5) 이에 관련하여, (주)머쉬텍은, 성재모 교수와 함께 여러 가지 동충하초에 관한 많은 기초적인 배양법을 다년간 계속 연구하여, 기본 자료를 축적하였으며, 생화학 전공자(김태웅 교수), 의대 생리학 전공자(박형진 교수)에 의한 공동 연구로 약리생리 활성 및 동물실험을 종합적으로 연구, 분석하여 기업에서의 제품을 형성한다는 것이 큰 의미가 있다.

(6) 본 연구과제에 사용될 노랑다발동충하초속균은 기초적인 생리 활성에 대한 연구가 진행되고 있지만, 현재 이 동충하초를 이용한 식품 허가의 부족으로 상품개발이 결여되어 있어 본 연구를 앞으로 식품 허가를 얻어 산업화에 기여하려고 한다.

(7) 이러한 종합적인 공동 연구는, 다양한 자료를 축적할 수 있으며, 단독적인 개인 연구보다는, 공동 연구를 통해서 동충하초의 제품의 형성과 더불어 생화학적, 약리적 특성을 규명함으로써 제품 생산에 있어서의 타당성 및 적합성을 얻을 수 있다.

(8) 이외에도, 국내의 많은 기업들도 이러한 알려지지 않은 동충하초균에 관심이 많으므로, 공동 연구가 종료되는 시점에서 개발 참여기업에 실험의 결과자료를 제공하면, 상품 생산화에 바람직한 일이며, 이러한 서로 연계된 전공의 연구자에 의한, 공동 연구의 진척으로, 동충하초의 이용성에 있어서 좋은 결과가 나올 수 있는 것으로 확신된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 년차별 연구 내용 및 결과의 요약

1. 1차년도 연구 내용 및 결과 (요 약)

연 구 범 위	연구수행 내용 (이론적 · 실험적 접근방법)	구체적인 연구 결과
번데기 동충하초의 배지선택성분 차별화 검토 및 대량생산 방법 확립	• 번데기 동충하초 균주를 Petri-dish상에 형성되는 균주의 선발된 mating type을 이용한 자실체 형성	• 번데기 동충하초 균주인 EFCC 12448의 형성된 자실체로부터 분리된 단포자 중에서 선발된 6개의 단포자사이에서의 mating type 균주를 선발하였다. • 선발된 mating type 균주에서 형성된 자실체를 다시 단포자 분리를 하여 9개균주를 얻었고, 다시 mating type균주 선발결과 5개의 단포자를 얻었다. • 선발된 5개의 mating type 균주를 13개의 조합으로 petri dish 상에서 배양하여 균주를 선발 • 선발된 균주는 현미배지에 접종하여 자실체 형성 확인
재배생산 된 번데기동충하초의 추출 및 분획	• 번데기동충하초의 추출,분리, 로 얻어진 CMWE의 HPLC를 이용한 특성연구	• 건조한 번데기동충하초 100g을 증류수 1ℓ에 넣고 초음파로 분쇄한 다음 100℃추출하여 evaporater에서 농축하여 에탄올 침전시키고 침전물을 회수한다. 이 침전물은 증류수에 용해한후에 동결건조함으로써 CMWE를 제조 • HPLC를 이용하여 CMWE의 특성을 조사하였다. HPLC는 reverse phase system으로 260nm에서 분석한 결과 8~10분사이에 주요 peak들이 관찰되었으며 CMWE는 polar 성분을 함유하고있음을 확인 • CMWE에 Cordycepin을 함유여부를 확인하기 위하여 CMWE, cordycepin, merge한 시료를 분석한

연 구 범 위	연구수행 내용 (이론적 · 실험적 접근방법)	구체적인 연구 결과
재배생산 된 번데기동충하초의 추출 및 분획	• 번데기동충하초의 추출,분리, 로 얻어진 CMWE의 HPLC를 이용한 특성연구	결과 동일한 retention time의 peak을 관찰할 수 있었으며 이 peak은 merge한 시료에서 증가되어진 peak 형태로 관찰할 수 있었음. 이로보아 CMWE는 cordycepin을 함유하고 있을 가능성이 있음을 추정됨.
번데기동충하초의 알콜에 의한 간 세포 손상에 대한 보호 효능 평가	• *in vitro*에서(normal liver cell line, nephatoma cell line) MTT assay를 통한 CMWE의 독성 및 간기능 저해제에 대한 보호효능 평가	• CMWE에 대한 정상 간세포 독성 및 간암세포에 대한 proliferation억제효과를 확인하기 위하여 48hr, 72hr 배양하였으며 정상 간세포에서는 독성정도가 낮았으나 간암세포에서 줄어든 viability를 보여주었다. • 차후 실험을 위해 간기능 저해제에 대한 세포독성실험결과 정상간세포에서 SNP는 62.5μM, acetaminophen는 1,250μM, H_2O_2에서 62.5μM, ethanol에서 4mM에서 IC_{50}농도를 나타내었다.
번데기동충하초의 염증조절 효능연구	• 염증반응에 관여하는 대식세포의 nitric oxide의 생성을 측정 • CMWE의 대식세포에 대한 세포사멸을 측정 • 식세포작용 활성을 측정하여 면역반응의 강도를 측정 • T-cell의 증식을 측정함으로써 면역반응을 간적접으로 평가	• 번데기 동충하초 에탄올 추출물(CME)의 NO생성의 억제능은 농도의존적으로 감소하였으나 대식세포에 대한 사멸효과를 나타내었다. • 번데기 동충하초 물 추출물(CMWE)의 NO생성 억제능은 일어나지 않았으나 대식세포에 대한 사멸효과는 나타나지 않았다. • CMWE에 대한 phagocytosis assay를 수행한 결과 대식세포의 식세포작용 활성이 감소하는 것으로 나타내었다. • T cell proliferation assay으로 CMWE에 대한 T cell 분화능을 확인한 결과 강한 T cell 분화를 억제하는 것을 확인하였으며 이로인해 CMWE가 T cell에 의한 cytokine 분비를 감소시키고 T cell에 의해 활성화 되는 mast cell의 기능을 억

연 구 범 위	연구수행 내용 (이론적 · 실험적 접근방법)	구체적인 연구 결과
		제 할 가능성이 있음이 추정됨.
번데기 동충하초 추출물의 간기능 개선 효과 검증	• 간경화가 유발된 실험동물에서번데기동충하초 추출물이 간 기능의 향상 및 간 섬유화의 억제 효능에 관한 연구.	• 6주된 수컷 Rat(S.D)에 TAA (thioacetamide)를 투여하여 간경화를 유발하였고, CMWE를 저농도와 고농도로 경구투여하여 간섬유화 억제효과를 확인함. • TAA 처리된 실험군에서는 정상 대조군에 비해 체중의 증가가 더디고 상대적 간중량이 증가하며, CMWE를 처리한 실험군에서는 성장 저해가 다소 회복되는 것과 상대적 간중량의 증가를 억제하는 경향을 보여줌. 따라서 CMWE가 TAA에 의한 간손상을 억제하는 것으로 추정됨. • TAA 처리에 수반되는 혈청 AST와 ALT의 상승이 CMWE에 의해 억제되었으며 또한 혈청 총 bilirubin도 감소됨.따라서 CMWE는 TAA로 유발한 간손상을 억제하는 것으로 판단됨.

2. 2차년도 결과

연 구 범 위	연구수행 내용 (이론적 · 실험적 접근방법)	구체적인 연구 결과
번데기동충하초의 대량생산 방법확립 및 대량생산에 대한 효율, 균주의 활용성 연구	• 대량생산 방법확립 • 대량생산에 대한 효율, • 균주의 활용성 연구	• 양쪽 끝부분(B)에서 colony를 떼어 낸 번데기동충하초의 자실체의 길이나 색, 단단함 등을 비교하였을 때 더 뛰어난 결과를 얻을 수 있음을 확인하였다.
번데기동충하초에 관한 형태. 유전적인 특성 및 자원의 연구자원 확보	• 번데기동충하초형태. 유전적인 특성 • 동충하초자원의 연구자원 확보	• 25℃의 지상층에 있는 동충하초 배양실보다는 20℃인 지하층에 있는 배양실과 농가의 버섯재배사 포장(place3)에서 조금 더 뛰어난 결과를 나타내었다.

연 구 범 위	연구수행 내용 (이론적 · 실험적 접근방법)	구체적인 연구 결과
약물에 의한 간세포 손상에 대한 번데기동충하초의 보호 효능평가 및 표준화를 위한 화학적인 연구	• CMWE에서, HPLC를 이용한 cordycepin 및 adenosine의 확인 및 함량측정	• 번데기동충하초에서 제조된 CMWE 중에는, adenosine이 47.4ppm으로 0.09% 함유되어 있으며, cordycepin은 106.1ppm으로 0.21% 함유되어있는 것으로 측정되었다.
	• SNP(sodium nitroprusside)에 의한 chang liver cell (normal cell)의 cell damage 효과를 주는 IC_{50}의 계산:	• SNP를 간암세포인 Chang liver cell에 처리하였을 경우, 619.3μM에서, 50%의 cell viability의 감소, IC_{50}을 보였다.
	• 술(ethanol)에 의한 chang liver cell(normal cell)의 cell damage 효과를 주는 IC_{50}의 계산	• Ehanol 을 간세포에 처리하였을 경우, 514.5mM에서, 50%의 cell viability의 감소를 나내내는 IC_{50}을 보였다.
	• AAP(acetaminophen)에 의한 chang liver cell (normal cell)의 cell damage 효과를 주는 IC_{50}의 계산:	• AAP를 간세포에 처리하였을 경우, 10mM 수준에서, 50%의 cell viability의 감소, IC_{50}을 보였다.
	• 번데기동충하초 시료(CMWE)의 간보호 작용 기작	• CMWE는 정상 간세포에 어떠한 저해작용을 주지 않는다는 결과를 얻었다.
	• 저해제인 AAP (acetoaminophen) 에 의한 정상세포 (Chang liver cell)의 간세포 손상을, 번데기동충하초 추출물인 CMWE의 보호작용	• CMWE가 AAP를 간세포에 처리하였으때, 보호효과가 있음을 나타내었다.
	• 저해제인 SNP에 의한 정상세포(Chang liver cell)의 간세포 손상을, 번데기동충하초 추출물인 CMWE의 보호작용	• 번데기동충하초 추출물(CMWE)이 SNP를 간세포에 처리하였으때, 보호효과가 있음을 확인하였다
간 유래 대식세포(쿠퍼세포) 매개성 간염 모델의 확립	• 대식세포 활성유도 물질인 LPS를 이용하여 생쥐간염모델을 정립	• 가장 많이 알려진 추출물 유래 항염증 치료제인 스티렌[애엽추출물(Aa-EE)] 을 대조약물로하여 간염치료효과를 검증하였음.

연 구 범 위	연구수행 내용 (이론적 · 실험적 접근방법)	구체적인 연구 결과
번데기동충하초 유래 cordycepin의 염증조절 효능평가	• 대식세포 유래 세포독성물질 nitric oxide (NO) 생성능 측정	• RAW264.7 세포에 번데기 동충하초 추출물을 농도별로 처리한 결과, LPS만을 처리한 대조군과 비교하여 NO의 생성량이 농도 의존적으로 감소하였다
	• 대식세포주에서 세포 생존률 (cell viability) 실험 결과	• RAW264.7 세포에 번데기 동충하초 에탄올 추출물을 농도별로 처리한 결과, 25㎍/㎖ 이상의 농도에서 높은 수준의 세포 사멸이 유도되었다. 이후 코디세핀의 염증 억제효능은 25㎍/㎖ 이하의 농도에서 진행하였다.
	• Cordycepin의 염증 조절 효소 PKBα kinase 활성 저해효과평가	• PKBα kinase activity가 cordycepin을 처리했을 때 감소함을 wild type에서 비교할 수 있음.
	• Cordycepin의 PKBα kinase 활성 억제 저해 기전연구	• Cordycepin이 staurosporin 과 함께 ATP binding site에 경쟁적으로 결합할 수 있다는 것을 확인함.
	• Cordycepin의 p70S6K kinase assay 결과	• 간염 및 간경화에 중요한 기능을 나타내는 것으로 알려진 p70S6 kinase(p70S6K)에 관한 cordycepin의 저해효과를에서, 50μM 농도에서 80%의 억제효과를 나타냈다.
	• Cordycepin의 PDK1 kinase assay 결과	cordycepin이 PDK1의 활성을 저해하는지 조사한 결과, 50㎍/㎖까지 농도의존적으로 억제경향을 보였다. 이후 100㎍/㎖까지 유사한 억제효과를 보였다.
	• Cordycepin의 PKA kinase assay 결과	cordycepin이 PKA의 효소 활성을 저해하는지 조사한 결과, 50㎍/㎖ 농도에서 75% 정도 억제 효과를 보였다.
흰쥐에서 TAA로 유발한 간 섬유화에 대한 번데기 동충하초 추출물의 에탄올 침전물(CMWE)의 효과.	• 간 조직의 섬유를 Masson's trichrome staining 법으로 염색 하고 광학현미경 상에서 관찰	• TAA로 유발한 간 섬유화를 CMWE가 억제함.

연 구 범 위	연구수행 내용 (이론적 · 실험적 접근방법)	구체적인 연구 결과
TAA로 유발한 섬유화 간에서 α-smooth muscle actin 발현에 대한 CMWE의 효과.	• 간 조직에서 얻은 단백질을 전기영동법으로 분리하고 anti-α-smooth muscle actin (α-SMA) 항체를 이용하여 ECL system에서 단백질을 정량함.	• TAA로 섬유화가 유발된 간에서는 α-SMA가 과발현 되며 CMWE는 이 단백질의 발현을 억제함을 확인.
TAA로 유발한 섬유화 간에서 tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) 발현에 대한 CMWE의 효과.	• 간 조직에서 얻은 단백질을 전기영동법으로분리하고 anti-TIMP 항체를 이용하여 ECL system에서 단백질을 정량함.	• TAA로 섬유화가 유발된 간에서는 TIMP-1과 TIMP-2가 과발현 되며 CMWE는 이들 단백질의 발현을 억제함을 확인함.

3. 3차년도 결과

연 구 범 위	연구수행 내용 (이론적,실험적,접근방법)	구체적인 연구 결과
번데기동충하초 대량 생산방법 확립	• 번데기동충하초 원균 단포자의 위치에 따른 자실체 형성의 비교	• 인공 자실체 A와 B의 경우 자낭각이 형성 되었지만 C의 경우 자낭각이 형성 되지 않았음을 확인하였다
	• 단포자 원균으로부터 분리한 1차 계대 단포자균을 이용한 자실체 형성의 비교	• EFCC 10304-1(5) 단포자 원균과 EFCC 10304-3(7) 단포자 원균으로부터 각각 4개씩 떼어낸 4개씩의 1차 계대균을 이용하여 서로 Mating을 시켜 인공 자실체를 유도했슴.
번데기동충하초의 간세포 손상에 대한 보호효능의 생화학적 기전 규명	• 번데기동충하초의 Chang liver cell의 세포주기에 대한 AAP (acetoaminophen)의 영향	• PI 염색에 의한 FACS 분석 결과를 보면, CMWE를 각각의 최종농도 50, 100, 200㎍/㎖가 되도록 AAP와 병행투여 했을 때 Sub-G1기가 11.86%, 10.4%, 7.8%로, CMWE의 농도 의존적으로 감소되어 세포사멸을 막아주는 것을 관찰할 수 있었다. • 이러한 결과는, 정상간세포에서 AAP에 의해 유도된 세포 독성, 즉 세포주기의 정지(cell cycle arrest)

연 구 범 위	연구수행 내용 (이론적,실험적,접근방법)	구체적인 연구 결과
번데기동충하초의 간세포 손상에 대한 보호효능의 생화학적 기전 규명	• 번데기동충하초의 Chang liver cell의 세포주기에 대한 AAP (acetoaminophen)의 영향	와 세포사멸에 대해 번데기동충하초 추출물(CMWE)이 간세포 보호활성이 있음을 보여주고 있다.
번데기동충하초 추출물(CMWE)이 AAP에 유도된 신호전달 물질에 미치는 영향	• 번데기동충하초 추출물(CMWE)이 PARP에 미치는 영향	• CMWE의 병행 투여에 의해 활성화된 PARP 양이 CMWE의 농도 의존적으로 감소되는 것을 관찰할 수 있었다. • Cordycepin 농도에 의존적으로 활성화된 PARP 양이 감소된 것을 관찰할수 있었다.
	• 번데기동충하초 추출물(CMWE)이 MAP kinase에 미치는 영향	• 세포의 양에 대한 활성화된 ERK 양(p-ERK/β-actin)의 비를 확인하면, CMWE 및 cordycepin의 농도 의존적으로 p-ERK 양이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다.
		• p-ERK의 증가는, CMWE 및 cordycepin이 세포독성으로부터 간세포를 보호하는 생리활성효과가 있음을 간접적으로 보여주고 있다.
		• AAP와 CMWE를 병행 투여 했을 때, 낮아진 p38 활성은 Control 그룹 수준으로 회복되지는 않았다.
		• 증가된 JNK 활성은 CMWE의 농도 의존적으로 낮아지는 것을 관찰할 수 있었다.
	• 번데기동충하초 추출물(CMWE)이 AAP에 의한 간손상을 치료하는 signal pathway	• 정상 간세포(Chang liver cell)에서 간독성 유발물질인 AAP의 투여에 의해, 세포주기(cell cycle)가 정지되고, PARP 활성을 증가시켜 세포사멸(apoptosis)이 진행되는 것을 간접적으로 관찰하였다. 또한 MAPK (mitogen-activated protein kinase) 중 세포의 생존과 증식에 관여하는 ERK (extracellular signal-regulated kinase, p44/42 MAPK)의 활성을 감소시키고, 외부 스트레

연 구 범 위	연구수행 내용 (이론적,실험적,접근방법)	구체적인 연구 결과
번데기동충하초 추출물(CMWE)이 AAP에 유도된 신호전달 물질에 미치는 영향	• 번데기동충하초 추출물(CMWE)이 AAP에 의한 간손상을 치료하는 signal pathway	스(물리•화학적 자극)에 반응하는 JNK(c-Jun N-terminal kinase, SAPK/JNK)의 활성을 증가시키고, p38의 활성을 감소시키는 것으로 관찰되었다. 이러한 세포독성에 의한 세포사멸 진행에 대하여 번데기동충하초 추출물(CMWE)의 병행투여는, 세포의 생존을에 관여하는 ERK 활성을 증가시켜주고, 외부 스트레스에 관여하는 JNK 활성을 감소시키고, 세포주기 정지(cell cycle arrest)를 해소하여 정상적인 세포주기로 회복시켜주는 역할을 할 것으로 사료되었다. 이러한 결과는 번데기동충하초 추출물(CMWE)이 외부 자극에 의한 간세포 손상에 아주 유효한 생리활성 물질임을 알 수 있었다.
번데기 동충하초로부터 시료의 확보	• 번데기 동충하초로부터 간 보호효과 실험을 위한 시료의 확보	• 번데기 동충하초로부터 간 기능 향상 기능성 물질의 추출 및 시료생산완료.
번데기 동충하초 추출물의 간 기능 개선 효과 검증: 지방간에 대한 번데기 동충하초 추출물의 효과	• CMWE가 체중증가에 미치는 효과	• CMWE을 50㎎/kg/day로 투여하면 체중이(27.9±0.88g) 다소 낮아졌다
	• CMWE가 간 중량에 미치는 효과	• CMWE을 50㎎/kg/day로 투여하면 간중량이(2.47±0.10g) 다소 낮아졌다.
	• CMWE가 부고환 지방 중량에 미치는 효과	• CMWE 투여에 의해 영향을 받지 않았다.
	• CMWE가 고지방식이로 유발한 혈청 glucose, triglyceride, cholesterol 농도 변화에 미치는 효과	• 혈청 glucose 농도는 CMWE에 의해서는 영향을 받지 않았다. • 혈청 triglyceride 농도는 CMWE에 의해서 영향을 받지 않았다. • 혈청 cholesterol 농도는 CMWE에 의해서는 영향을 받지 않았다.

연 구 범 위	연구수행 내용 (이론적,실험적,접근방법)	구체적인 연구 결과
	• CMWE가 간기능 효소 ALT 및 AST 농도 변화에 미치는 효과	• ALT가 농도 의존적으로 유의하게(각각 $p<0.05$) 낮아졌다. • AST는 농도 의존적으로 유의하게(각각 $p<0.05$) 낮아졌다.
	• CMWE가 혈청 leptin 농도에 미치는 효과	• 혈청 leptin 농도는 CMWE을 50 ㎎/㎏/day 투여하면 다소 감소하는 경향을 나타내었다.
	• CMWE가 간 조직 중 triglyceride 함량에 미치는 효과	• 간 triglyceride 함량은 CMWE을 투여하면 각각 유의하게($p<0.01$) 감소하였다.
	• CMWE가 간 조직 중 cholesterol 함량에 미치는 효과	• 간 cholesterol 함량은 CMWE을 투여하면 유의하게($p<0.05$) 감소하였다.
	• CMWE가 간의 SOD 활성에 미치는 효과	• 간 조직의 SOD 활성도는 CMWE을 50㎎/㎏/day 투여하면 유의하게($p<0.01$) 상승하였다
	• CMWE가 간조직의 병리학적 소견에 미치는 효과	• 고지방식이로 사육하면 간세포에 지방이 침착하였으며 그 침착 정도가 CMWE에 의해 농도 의존적으로 감소하는 경향을 나타내었다.
간독성 물질로 유발한 간 섬유화에 대한 번데기 동충하초 추출물의 효과	• 번데기동충하초 처리에 의한 병리학적 소견	• CCl_4에 의해 간 섬유화가 유발되지 않았다
		• TAA에 의해 간 섬유화가 유발되지 않았다.
번데기 동충하초 추출물의 표지성분 개발	• HPLC에 의한 표지성분 검출 및 개발	• CMWE의 표지물질로 cordycepin을 활용함이 적절하며 함량의 측정은 HPLC를 이용하는 방법이 타당한 것으로 판단되었으며, 연구에 사용된 번데기동충하초에는 2.13㎎/g의 cordycepin이 함유된 것으로 HPLC에 의한 실험으로 확인하였다.

제2절 기술 개발 접근 방법

1. 연구개발의 기술개발 접근 방법

가. "번데기동충하초로부터 간기능 개선을 위한 기능성 소재개발연구"의 성공적인 수행을 위하여 번데기동충하초 자실체 대량형성과 간기능 개선을 위한 기능성 소재개발연구에 관련하여 본 연구의 구성을 보면, 본 연구는, **제1세부과제 (김태웅 교수)**는 "번데기동충하초의 대량생산 및 간기능 개선작용의 생리활성연구 및 간기능 개선을 위한 신기능 식품 개발"을 하며, **제2세부세부과제(박영철 교수)**는 "번데기동충하초로부터 유래된 분획의 대식세포 매개성 간염 치료 효능을 평가하고 그 치료 기전의 연구"를 하며, **협동과제(박형진 교수)**는 "번데기동충하초로부터 간기능을 향상시키는 기능성 성분을 추출 정제하여 그 효능을 실험동물에서 검증하는 한편 지표성분의 개발"을 연구 내용으로 한다. 또한 본 연구과제를 통해서, '번데기동충하초로부터 간기능 개선을 위한 기능성 식품 개발연구'에서 얻은 자료를 토대로 생산성 및 제품생산을 시험하여, 제품 가능성을 검토를 더불어 제품군(기능성 건강식품, 기능성 식품의 제조, 고부가 가치의 신약 제조를 시도)을 형성시킨다. 이와 같이 **제 1세부, 제2세부, 제1협동 연구자 그리고 참여기업은 상호 유기적인 관계를 통해서 본 연구를 수행하였다.**

나. 본 연구를 통해서 "번데기동충하초로부터 간기능 개선을 위한 기능성 소재개발 연구" 의 번데기동충하초의 간기능 보호 약리생리활성 규명, 또한, 번데기동충하초로부터 유래된 분획의 대식세포 매개성 간염 치료 효능을 평가하고 그 치료 기전의 연구를 비롯하여, "번데기동충하초로부터 간기능을 향상시키는 기능성 성분을 추출 정제하여 그 효능을 실험동물에서 검증하는 한편 지표성분의 개발"을 연구함으로서, 번데기동충하초의 간기능 효능을 확증하는 것을 주요 내용으로 한다. 또한 본 연구과제를 통해서, '번데기동충하초로부터 간기능 개선을 위한 기능성 식품 개발연구' 에서 얻은 자료를 토대로 생산성 및 제품생산을 시험하여, 제품 가능성을 검토를 더불어 제품군(기능성 건강식품, 기능성 식품의 제조, 고부가 가치의 신약 제조를 시도)을 기초자료로 사용할수 있다.

다. 간기능 효능의 신기능성 제품 개발 및 제품의 이용성 확대로 이어지는 동충하초 간기능 상품개발에 관한 기초자료로 사용되어 기업의 생산성 및 근거를 높이고자 한다.

라. 제1세부과제 책임자는 제1협동과제 그리고 참여기업와 유기적인 관계를 유지하여 기능성 제품군의 생산을 도모한다.

마. 제1세부과제 책임자는 제1협동과제 연구책임자와 참여기업의 상호·유기적인 관계로서, 기본 영역을 확장·이용시킬 수 있도록, 서로의 기술을 적용하여, 번데기동충하초의 연구를 통해 얻어지는 결과 자료를 토대로 제품화를 시험하여, 본 연구의 최종 단계를 완성한다.

2. 연구개발의 추진전략·방법

가. 기술정보수집 및 교환:

수집된 기초 및 응용정보는 모든 과제 책임자에게 공유하도록 한다.

나. 과제참여 기관과의 협조방안:

(1) 과제에 참여되어 있는 강원대학교의 연구진, 한림대학교의 연구진의 연구결과를 적극적으로 활용하여 목적 기능성이 있는 제품을 개발하도록 한다.

(2) 참여업체와 유기적인 대량생산화를 유도하면서 동충하초의 이용성을 증대할 수 있도록 한다.

(3) 식약청에 등재할 수 있는 이용성 데이터를 확보하여 연구과제의 종료 시에 등재할 수 있도록 한다.

(4) 또한 여러 분야에서 본 연구에 관심이 있는 교수와 협조하여 기능성이 있는 제품을 개발하도록 한다. 참여업체와 유기적인 대량생산화를 유도하면서 이용성 연구를 바탕으로 산업화 할 수 있는 기술을 선정하여 제품을 개발할 수 있도록 한다.

다. 동충하초의 활용 방안:

(1) 동충하초의 이용성을 증대할 수 있도록 참여기업인 (주)머쉬텍과 유기적인 관계를 유지하여 연구하며 연구에서 좋은 결과가 나오면 참여기업과 협의하여 참여기업이 할 수 없는 일은 타 기업체와 협의하여 좋은 제품이 나오도록 최선의 노력을 하려고 한다.

(2) 아직 알려지지 않은 노랑다발동충하초의 이용성 연구를 통해서 새로운 식품 및 한의약 분야로의 이용성을 증대하여, 산업체 및 농가소득향상을 위한 특화작물의 활용하는데 있어서의 정당성 및 타탕성을 부여하는데 있다.

라. 네트워킹사업

(1) 지역의 연구개발 혁신역량간의 네트워킹의 활성화를 통한 경쟁력 강화 및 효율성의 향상.

(2) 네트워크의 운영체계 개선을 통한 산학연관 연계활성화 및 기업지원 확대

(3) 약용작물 산업 전문인력간의 정보, 인력 및 기술교류 시스템 구축

(4) 기술 혁신 단위 (기업 및 대학)간 상호연계 및 상호 협력을 통한 시너지 창출

(5) 산업/연구/학술인력 D/B구축을 통해 동충하초의 이용성을 증대할 수 있도록 네트워킹 수행

마. 기술개발사업

(1) 약용작물인 동충하초의 이용연구인, 번데기동충하초로부터 간기능 개선을 위한 기능성 식품 개발연구"는 번데기동충하초의 이용성을 증대와 더불어, 농업증진을 위한 연구 수행이며,

(2) 대학을 구심점으로 열악한 벤처기업의 기술혁신을 제공함으로써 재도약을 할 수 있도록 기술개발 사업 추진

(3) 청정바이오 분야인 천연물 중 동충하초의 이용성 연구를 통해서 바이오산업 활성화 하므로써 지역경제의 활성화 도모한다.

(4) 연구과제 도출을 통하여 연구개발과 기업에서의 이용성을 증대할 수 있도록 실질적인 연계 추진한다.

(5) 연구를 통한 결과물들을 기존 인프라를 최대한 활용하여 식약청 등재 및 간기능 개선 시제품생산을 지원하고 기술이전 메커니즘과 전략적 연계 추진한다.

제3절 연구개발 수행 방법 및 결과

1. 제1세부과제 연구 내용 및 결과

● 연구제목: “번데기동충하초의 대량생산 및 간기능 개선 생리활성연구”
● 연구책임자: 강원대학교 김태웅 교수

가. 연구 재료 및 방법

(1) 번데기 동충하초(*Cordyceps militaris*) 균주를 이용한 Petri-dish상에 형성되는 밴드와 자실체 형성과의 관계

(가) 공시 균주 선발

본 실험에서 사용한 균주는 강원대학교 동충하초 은행(Entomopathogenic fungal culture collection, EFCC)에서 보관중인 *Cordyceps militaris* EFCC 12448균주를 사용하였다. *Cordyceps militaris* EFCC 12448 균주는 춘천시 강원대학교 연습림에서 채집하여 다포자 균주를 얻은 후, 그 다포자 균주로 현미 배지에 인공 배양 하여 인공 자실체를 형성시켰고 그 인공 자실체로부터 단포자를 분리하였다. 분리된 단포자 중에서 여섯 개의 단포자 균주를 선발한 후 단포자들 간의 mating 실험의 결과로 mating type을 얻었다(Table 1).

Table 1. Mating type of *Cordyceps militaris* EFCC 12448.

단포자균주	1	2	3	4	5	6
1		-	+	-	-	+
2			+	-	-	+
3				+	+	-
4					-	+
5						+
6						

본 실험을 위해 비교적 자실체 형성 상태가 건실한 EFCC 12448의 단포자 4번과 6번을 교배하여 나온 자실체 EFCC 12448 4×6에서 단포자 분리를 하여 13개의 단포자를 얻었다. 이 중 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 13 번의 9개 단포자를 선발하여 50% SDAY(sodium dextrose agar yeast) 액체배지 Erlenmeyer flask 100㎖에 접종한 후 25℃ 배양실에서 5일간 배양하였다. 배양된 Erlenmeyer flask 접종원을 제조 및 살균 된 현미배지에 33㎖씩 3반복 접종한 뒤, 20℃ 배양실에서 배양시킨 후 자실체를 관찰 및 조사하였다(Table 2).

Table 2. Fruit body formation of *Cordyceps militaris* EFCC 12448.

단포자 균주	1	2	3	4	5	7	8	10	13
1		+++		++		+++	+++		
2			+++	+++		++	+++		
3				++					
4					++	+++		++	
5									
7							++		+
8									
10									
13									

(나) Petri-dish 상의 A type과 B type 균주의 접종

분리한 EFCC 12448 (4×6)의 13개 단포자 중 오염이 없고 비교적 균일하게 자란 5개의 단포자 2, 3, 4, 5, 6을 선발한 후, EFCC 12448 (4×6) 2×2, 2×3, 2×4, 2×5, 2×6, 3×4, 3×5, 3×6, 4×5, 4×6, 5×5, 5×6, 6×6의 13개 조합으로 Petri-dish (50% SDAY 고체배지) 상에서 균사의 성장과 두 단포자간의 균사 융합, mating type 등을 알아보기 위하여 각각 5반복 처리하였다 (Fig. 1).

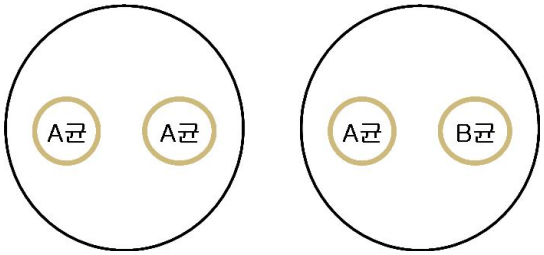


Fig. 1. Inoculation of each isolates on SDAY agar plate both sides. The combinations are EFCC 12448 (4×6) 2×2, 2×3, 2×4, 2×5, 2×6, 3×4, 3×5, 3×6, 4×5, 4×6, 5×5, 5×6, 6×6.

(다) 떼어낸 위치와 자실체와의 관계

5반복 배양된 Petri-dish 중 오염이 없고, 색과 모양이 뚜렷하며 균일하게 자란 균주를 1개씩 선발하여, 균사 선단부분을 직경 5mm cork borer로 각 3개씩의 colony를 떼어내어 Erlenmeyer flask(50% SDAY 액체배지) 100㎖에 처리한 뒤 25℃ 배양실에서 5일 배양 후, 조제 및 살균한 1,000㎖ 현미배지에 3반복 접종하였다(각 flask에 33㎖씩). colony를 떼어낸 방법과 조합은 Fig. 2. 와 같다.

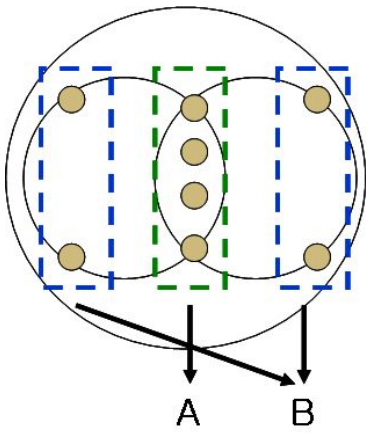


Fig. 2. Mycelial discs cut for the fruiting body production of *Cordyceps militaris* isolates. A, mycelial discs cut from the meeting region between two isolates. B, mycelial discs cut from the boundary regions of the two isolates. The combinations are EFCC 12448 (4×6) 2×2(A,B), 2×3(A,B), 2×4(A,B), 2×5(A,B), 2×6(A,B), 3×4(A,B), 3×5(A,B), 3×6(A,B), 4×5(A,B), 4×6(A,B), 5×5(A,B), 5×6(A,B), 6×6(A,B).

(2) 인공자실체의 mating type에 의한 번데기동충하초(*Cordyceps militaris*)의 우량균주 선발실험:

(가) 공시 균주 선발

본 실험에서 사용한 균주는 강원대학교 동충하초 은행(Entomopathogenic fungal culture collection, EFCC) 에서 보관중인 *Cordyceps militaris* EFCC 10304를 공시균주로 사용하였다. EFCC 10304는 제주도 한라산에서 채집한 후, Water agar 고체배지 Petri-dish에 다포자를 받아 50% SDAY(Sodium dextrose agar yeast) 고체영양배지 Petri-dish에 다포자 균주를 배양하였다. 그 다포자 균주를 이용하여 인공자실체를 형성시킨 뒤, 인공자실체에서 외관상 활력이 뛰어난 3개의 인공자실체 가닥을 임의로 선발하여 EFCC 10304-1, EFCC 10304-2, EFCC 10304-3 이라고 명명하였다. 그 자실체들에서 각각 12개씩의 단포자를 SDAY 고체영양배지

Petri-dish에 분리하였고 그 중 Petri-dish내에서의 균사의 상태 및 균일성을 비교하여 6개씩의 균주를 선발하였다(Fig. 3). 접종된 균은 24±1℃에서 11일간 배양한 후 실험 접종원으로 사용하였다.

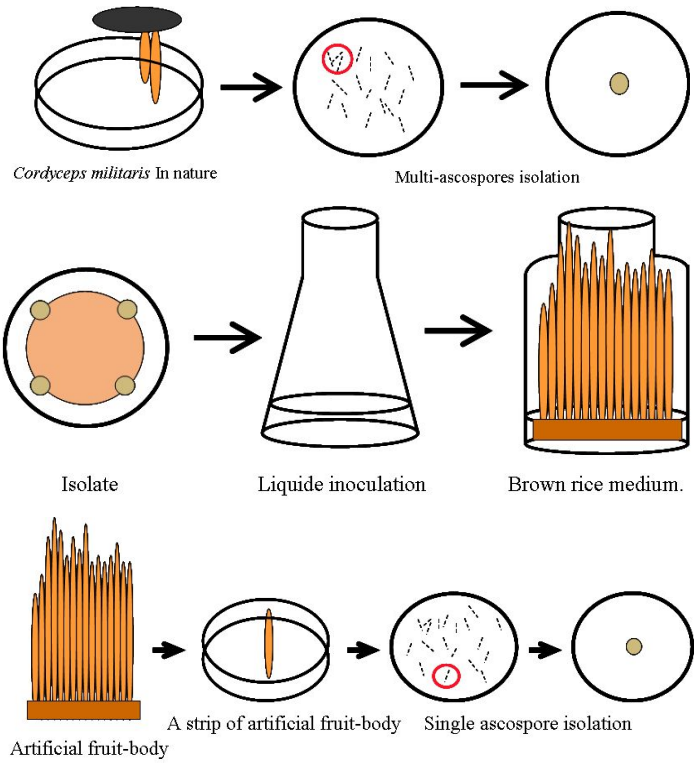


Fig. 3. Diagram of single-ascospore isolation from stromata of *Cordyceps militaris*.

(나) 각 균주들의 flask 접종원 배양

250㎖ Erlenmeyer flask에 100㎖ SDAY 액체배지를 분주한 후, Silicon plug로 flask의 입구를 막은 후 호일을 씌워 autoclave를 이용하여 121℃, 1.2 기압에서 20분간 고압 살균하여 액체배지를 제조하였다. 인공 자실체로부터 분리된 EFCC 10304-1, EFCC 10304-2, EFCC 10304-3의 각 6개씩의 단포자 균주에 번호를 부여하여 Petri-dish내에서 자란 균사 선단부분을 직경 5mm cork borer로 절단한 후 서로 다른 단포자 균주의 colony를 3개씩 접종하였다. 접종된 flask는 24±1℃의 배양실에 7일간 배양시켰다.

(다) 현미배지에서의 인공자실체 형성

배양된 각 flask들을 접종원으로 이용하여 인공 자실체를 유도하였다. 인공 자실체를 형성시킨 배지로는 1,000㎖ pp병에 현미 60g과 건조 번데기 4g, 증류수 70㎖을 넣어 autoclave를 이

용하여 121℃, 1.2 기압에서 20분간 고압 살균하였다. 이렇게 조제된 배지에 미리 배양시킨 flask 접종원을 접종하여 온도 24±1℃ 배양실에서 5일간 배양한 후, 자실체 형성을 유도하였다. 자실체 형성은 장소를 다르게 하여 3곳의 장소에서 자실체 형성을 유도하였다. Place 1은 강원대학교 지상층에 있는 25℃ 동충하초 배양실, Place 2는 강원대학교 지하층에 있는 20℃ 배양실, Place 3은 농가의 버섯재배사 포장(20℃)으로 나누어 측정을 하였고, 규모는 Place 3이 가장 컸다. 28일이 지난 후 자실체 형성 유무를 파악하고 다시 25일이 더 지난 후 형성된 자실체의 길이와 무게, 건조중량, 자실체 형태 등을 측정하여 비교하였다.

(라) 각 인공자실체 가닥에서 분리된 단포자들 간의 mating type 관계

각각의 인공자실체 가닥에서 분리된 단포자들이 mating type에 어떠한 유연관계가 있는지를 알아보기 위하여 EFCC 10304-1, EFCC 10304-2, EFCC 10304-3 각 단포자들 간의 mating type을 알아보기 위한 mating 실험을 하였다. 같은 자실체가닥에서 분리된 단포자들 간의 maitng type을 알아보기 위하여 EFCC 10304-1, EFCC 10304-2, EFCC 10304-3 각각의 6개씩의 단포자들끼리 mating 실험을 하였다. 서로 다른 자실체 가닥에서 분리된 6개씩의 단포자들 간의 mating type을 알아보기 위하여 EFCC 10304-1×EFCC 10304-2, EFCC 10304-1×EFCC 10304-3, EFCC 10304-2×EFCC 10304-3 의 단포자들 간의 조합으로 mating 실험을 하였다.

(3). 번데기 동충하초 (*Cordyceps militaris*) 균사의 위치에 따른 균사의 특성

(가) 공시 균주 선발

본 실험에서 사용한 균주는 강원대학교 동충하초 은행(Entomopathogenic fungal culture collection, EFCC) 에서 보관중인 *Cordyceps militaris* EFCC 10304를 공시균주로 사용하였다. 처음 자연에서 채집한 후, Water agar Petri-dish에 다포자를 받아 50% SDAY(Sodium dextrose agar yeast) 고체영양배지 Petri-dish에 다포자 균주를 배양하였다. 그 다포자 균주를 이용하여 인공자실체를 형성시킨 뒤, 인공자실체에서 외관상 온전한 3개의 인공자실체 가닥을 임의로 선발하여 EFCC 10304-1, EFCC 10304-2, EFCC 10304-3 이라고 명명하였고, 그 자실체들에서 각각 12개씩의 단포자를 SDAY 고체영양배지 Petri-dish에 분리하였고 그 중 Petri-dish내에서의 균사의 상태 및 균일성을 비교하여 6개씩의 균주를 선발하였다. 접종된 균은 24±1℃에서 11일간 배양한 후 Mating 실험의 접종원으로 사용하였다. Mating 실험 결과 자실체 형성 정도가 비교적 뛰어난 EFCC 10304-1(5)×3(7)의 조합을 본 실험에 공시균주로 사용하였다.

(나) 원균 단포자의 위치에 따른 자실체 형성

250㎖ Erlenmeyer flask에 100㎖ SDAY 액체배지를 분주한 후, Silicon plug로 flask의 입구를 막은 후 호일을 씌워 autoclave를 이용하여 121℃, 1.2 기압에서 20분간 고압 살균하여 액체배지를 제조하였다. 그 제조된 액체배지를 이용하여 EFCC 10304-1(5) 단포자 원균과 EFCC 10304-3(7) 단포자 원균의 petri-dish상에서 위치를 세 부분(A, B, C)으로 다르게 하여 균사 선단부분을 직경 5mm cork borer로 Colony를 떼어내어 접종한 뒤, 24±1℃ 배양실에서 4일간 균사 배양을 한 후, autoclave를 이용하여 121℃, 1.2 기압에서 20분간 고압 살균한 현미배지(현

미 60g, 건조 번데기 4g, 증류수 70㎖)에 배양된 액체 접종원을 접종하였다(Fig. 4).

(다) 단포자 원균으로부터 분리한 1차 계대 단포자 균을 이용한 자실체 형성

EFCC 10304-1(5) 단포자 원균과 EFCC 10304-3(7) 단포자 원균을 제조 및 살균된 50% SDAY(Sodium dextrose agar yeast) 고체영양배지 Petri-dish에 각각 4개씩 떼어내어 4개씩의 1차 계대균을 24±1℃ 배양실에서 균사 배양을 하였다. 그 1차 계대 단포자 균을 이용하여 서로 Mating을 시켜 인공 자실체를 유도하여 그 자실체들의 형태를 비교하여 보았다(Fig. 5).

(라) 번데기 동충하로부터의 기능성 물질의 추출 및 정제

번데기 동충하초로부터 간기능을 향상시키는 기능성 물질의 다음과 같이 추출 및 정제한다. 건조한 번데기 동충하초 100g을 증류수 1 L에 넣고 초음파로 분쇄한 다음 100℃에서 3시간 끓이는 과정을 2회 반복한다. 추출액을 Whatman 2 여과지로 여과한 다음 rotary evaporator에서 1ℓ로 감량한다. 감량시킨 추출액에 2배 용량의 냉 94% 주정(-20℃)을 혼합하고 -20℃에서 하룻밤 재운 뒤 원심분리하여(10,000rpm, 20min, 4℃) 침전물을 회수한다. 침전물을 증류수 200㎖에 용해한 다음 동결 건조한다(CMWE).

(마) 번데기 동충하로부터의 간기능 보호 효능 실험방법

① Cell Culture

사람의 간암세포인 HepG2 cell(human hepatoma cell line)과 정상세포인 Chang liver cell(human liver cell line)을 각각 한국 세포주 은행(Korea cell line bank)에서 구입하여 사용하였다. cell 배양은 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's Medium)배지에 10% Fetal bovine serum(HyClone Labs, Logan, UT), 100units/㎖ penicilling, 100㎍/㎖ streptomycin을 넣어 37℃, 5% CO_2 incubator에서 배양하였다.

② Cell Viability - MTT assay

사람의 정상 간세포인 Chang liver cell line을 10% FBS가 첨가된 DMEM배지를 이용하여 96well plate에 각 well 당 1×10^4 cell 갯수로 하여 파종한다. 24hr 이후에 1% FBS로 starvation한다. 24hr 이후에 1% FBS 첨가 후 CMWE를 0, 12.5, 25, 50, 100㎍/㎖ 농도로 처리하고 30min 배양한다. 간독성 유발물질인 sodium nitroprusside(SNP) 600μM와 acetaminophen(AAP) 15mM를 각각 처리한다.

배양 후 최종농도로 1㎎/㎖의 MTT((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl -tetrazolium bromide)시약을 넣어 2hr 배양시키고 형성된 formazan dye를 2-propanol을 이용하여 용해시켜 570nm 흡광도에서 측정하여 cell viability정도를 측정하였다.

③ High performance liquid chromatography(HPLC) 분석

KNAUER(Wellchrom HPLC-pumpK-1001,Wellchrom fast scanning spectrophotometer K-2600, and 4 channel degasser K-500) 시스템을 사용하여 분석을 진행하였다. 이동상은 초순수와 acetonitrile을 사용하였고 컬럼은 phenomenex사의 gemini C18컬럼을 사용하였으며(25°C), 시료는 CMWE는 100㎎/㎖, standard인 adenosine과 cordycepin은 Sigma-Aldrch Co.에서 구입하여 10ppm 농도로 20㎕ inject하여 분석하였다.

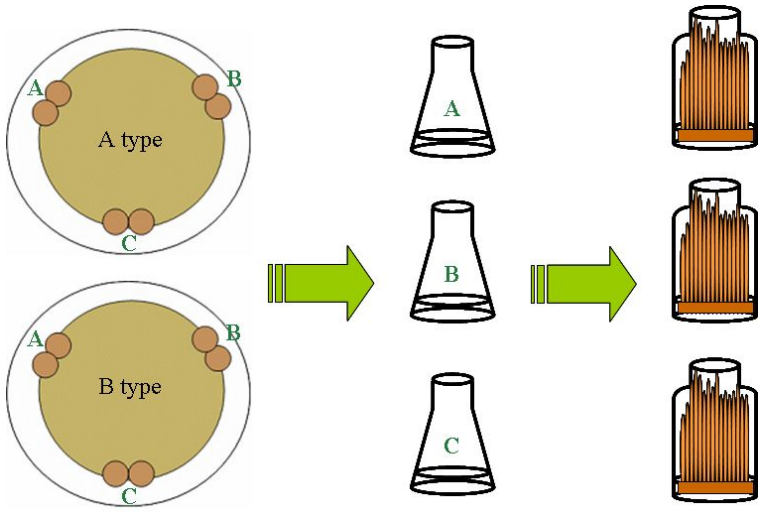


Fig. 4. Diagram of production of fruit-body from three different locations of Petri-dish colony.

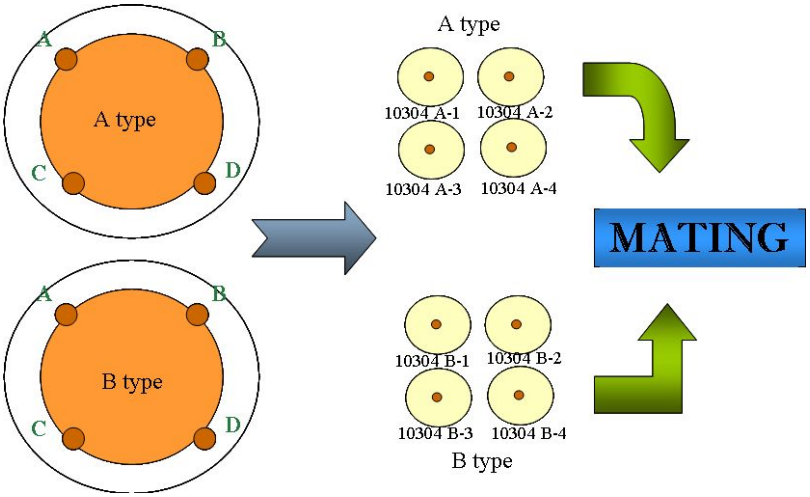


Fig. 5. Diagram showing combination of four first-generation isolates for fruit-body production.

HPLC 실험조건:

Standard : adenosine, cordycepin (in water)

Sample treatment : CMWE, 100㎎ dissolved in 1㎖ water

HPLC System : KNAUER Corp.

- Wellchrom HPLC-pump K-1001 and 4 channel degasser K-500
- Wellchrom fast scanning spectrophotometer K-2600
- Analysis software : Eurochrome 2000

Column : Phenomenex, Gemini 5μ C18 110A, 250×4.60mm 5μm

Column Temp : 25℃

Injection volume : 20㎕

Mobile phase : acetonitrile-water(5:95, v/v)

Flow-rate : 1.0㎖/min

Wavelength : 260nm

(바) 간세포 손상에 대한 보호 효능의 생화학적 기전 규명

번데기동충하초 추출물(CMWE)이 간세포 손상에 대한 보호 효능의 생화학적 기전 규명하기 위하여 세포 사멸(apoptosis) 및 생존에 관여하는 세포신호전달 물질에 대해 propidium iodide 염색법을 이용한 Flow cytometry 분석과 Western blotting 등의 방법으로 연구를 수행하였다.

① Flow cytometry 분석

AAP(acetoaminophen)에 의한 Chang liver cell의 세포주기 변화를 측정하기 위하여 propidium iodide(PI) 염색법을 수행하였다. 우선 Chang liver cell을 100mm dish에 70~80% 되도록 배양한 후, 번데기동충하초 추출물(CMWE)과 AAP를 처리하고, 24hr 배양하였다. 세포를 PBS로 2회 세척한 후, trypsin/EDTA로 떼어내고 450×g에서 5min 동안 원심분리하여 회수하였다. 세포를 1×10^6 cells/㎖이 되도록 PBS를 넣고, 5㎖의 1%(w/v in PBS) paraformaldehyde 용액을 넣고 ice bath에 15min 방치하였다. 450×g에서 5min 동안 원심분리하여 세포를 회수하고, PBS로 5㎖로 2회 반복하여 세척하였다. 원심분리하여 얻은 세포에 0.5㎖의 PBS를 넣고 5㎖의 ice-cold 70%(v/v) ethanol을 넣고 -20℃ 이하에서 12hr 이상 방치하였다. 세포를 450×에서 5min 동안 원심분리하여 ethanol을 제거 한 후, PBS 1㎖로 세척하고 다시 PBS 0.1㎖을 넣어 부유시켰다. 세포 부유액에 PI는 50㎍/㎖, DNase-free RNase는 1㎍/㎖의 최종 농도가 되도록 첨가하고 호일로 감싸 빛을 차단 한 후 30min 동안 염색을 시켰다. PI 염색된 세포를 filter하여 단일 세포만을 취해 FACS Calibur(Becton Dickinson, San Jose, CA)로 1×10^4개의 세포를 분석하였다.

② Western blotting

정상간세포인 Chang liver cell을 60mm dish에서 70~80%가 되도록 배양한 후, 1% FBS가 들어있는 배지로 24hr 배양하였다. Chang liver cell에 번데기동충하초 추출물(CMWE)을 일정

농도로 투여하고, 30분 후에 간독성 유발물질인 AAP를 투여하였다. 24hr 배양한 후 lysis buffer를 넣어 세포를 용해시키고, 15,000×g에서 20분간 원심분리하여 western blot 시료를 얻어냈다. BCA법으로 세포 lysate의 단백질 농도를 측정하여, 30㎍의 단백질이 되도록 세포 lysate를 취해 SDS-PAGE를 실행하였다. PVDF membrane으로 단백질을 transfer 시킨 후, 5% non-fat skim milk를 사용해 membrane을 blocking시키고, 원하는 항체 용액을 사용해 1차 처리하고, TBS-T로 washing한 후 2차 항체를 붙였다. 최대한 TBS-T로 붙지 않은 항체를 씻어주고, 암실에서 membrane에 ECL 용액 (Thermo Scientific, Rockford, IL)을 골고루 분주하여 X-ray film으로 감광하였다. Western blot 결과는 NIH(National Institutes of Health, USA)에서 개발한 Image J 프로그램을 이용하여 분석하였다. Image J에 의한 분석은 3회 반복하여 얻은 값의 평균값을 사용하였다.

나. 연구 결과:

(1) Petri-dish 상의 A type과 B type 균주의 접종

Petri-dish (50% SDAY 고체배지) 상에서 양쪽에 각 단포자들을 접종하여 25℃ 배양실에서 30일 배양한 후, band 형성 유무와 균의 semidiameter, color를 조사한 결과 밴드가 생긴 조합도 있었고 생기지 않은 조합도 있었으며, semidiameter의 길이도 거의 차이가 없지만 일부는 차이가 많이 나는 것들도 있었고, 색깔은 orange색과 white yellow색으로 조사 되었다(Table 3).

Table 3. Results of *Cordyceps militaris* EFCC 12448 (4×6) on petri-dish.

mating	band	A type		B type	
		semidiameter	color	semidiameter	color
2×3	O	28	orange(flat)	33	orange
2×4	×	30	orange(flat)	31	white yellow
2×5	×	26	orange(flat)	22	orange
2×6	×	23	orange(cottonly)	29	orange
3×4	O	28	orange(flat)	24	white yellow
3×5	×	33	orange(flat)	26	orange(flat)
3×6	×	20	orange(flat)	30	orange(flat)
4×5	O	33	white yellow	33	orange(flat)
4×6	O	37	white yellow	32	orange(flat)
5×6	×	31	orange(flat)	30	orange(flat)
2×2	×	35	orange(flat)	35	orange(flat)
5×5	×	30	orange(flat)	28	orange(flat)
6×6	×	37	orange(flat)	37	orange(flat)

Petri-dish에서 양쪽에 자란 균사를 배양시켜 현미배지에 접종하여 그와의 관계를 관찰한 결과 EFCC 12448 2×3, 2×5, 3×6는 band의 형성과 인공자실체 형성이 일치하였으나 나머지 조합에서는 일치 하지 않았던 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 6.).

	2	3	4	5	6
2		+	-	-	-
3			+	-	-
4				+	+
5					-
6					

A) Band formation between EFCC 12448 isolates

	2	3	4	5	6
2		+	-,+	-	+
3			-	+	-
4				-	-
5					+
6					

B) Fruiting body produced from EFCC 12448 isolates, acc. to Fig. 1.1.

C) EFCC 12448-2 × 12448-3

D) EFCC 12448-2 × 12448-6

E) EFCC 12448-3 × 12448-5

F) EFCC 12448-5 × 12448-6

G) EFCC 12448-4 × 12448-5

Fig. 6. Band formation and fruiting body formation from EFCC 12448 isolates.

(2) 떼어낸 위치와 번데기동충하초 자실체와의 관계

본 연구의 결과, 접촉부분에서 직경 5mm cork borer로 Colony를 떼어낸 조합(A)과 양쪽 끝부분에서 Colony를 떼어낸 조합(B)과의 비교에서 Fig. 2.2.의 EFCC 12448(4x6) 2x3, 2x4, 4x6 등에서 확인할 수 있듯이 양쪽 끝부분(B)에서 colony를 떼어 낸 것이 자실체의 길이나 색, 단단함 등을 비교하였을 때 더 뛰어난 결과를 얻을 수 있음을 확인하였다(Fig. 7).

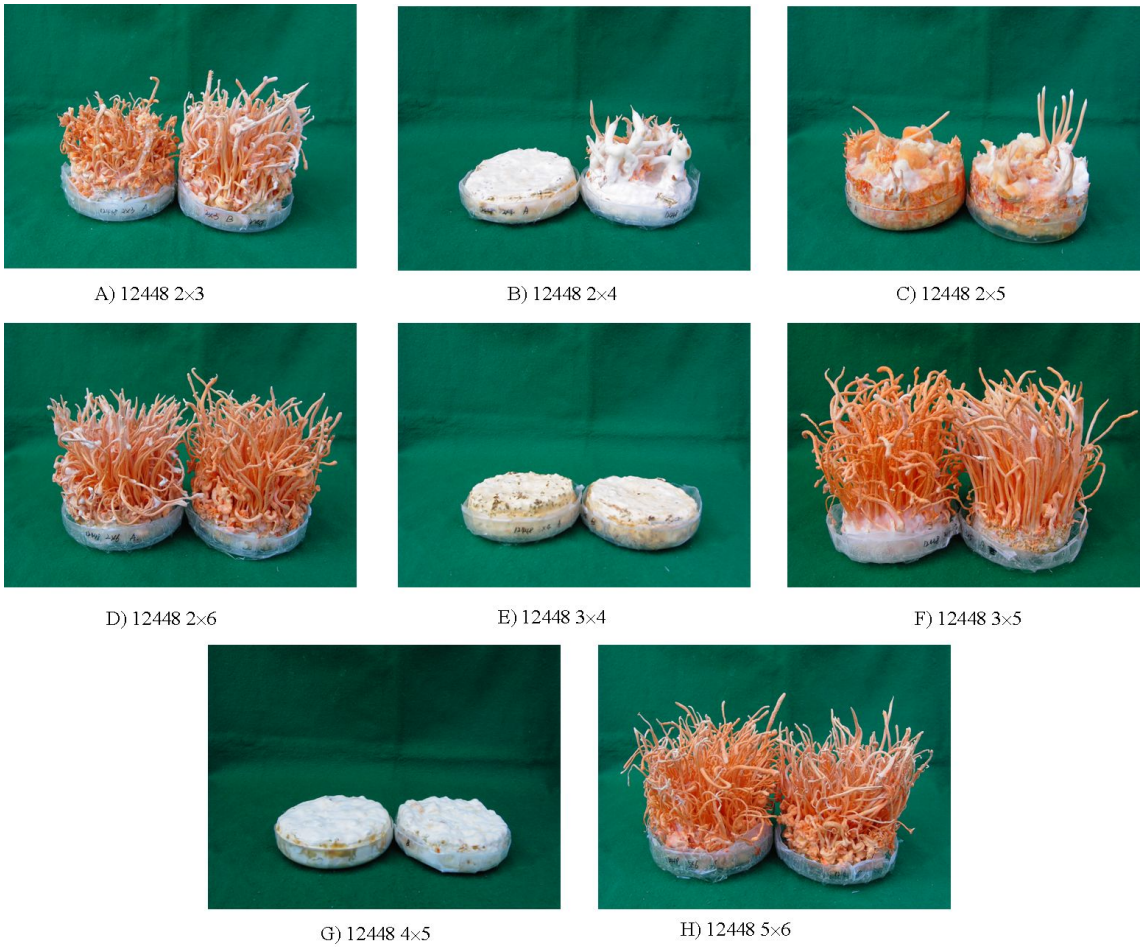


Fig. 7. Fruiting body formation from EFCC 12448 isolates acc. to Fig. 1.1. A (left) and B (right).

(3) 번데기동충하초 인공 자실체의 자낭각 형성 유무

처음 자연상태에서 얻은 다포자 균주로부터 형성시킨 인공자실체로부터 단포자를 분리한 균주인 EFCC 10304-1, EFCC 10304-2, EFCC 10304-3의 Mating Type을 나누어 보았고 자낭각이 형성된 것(+)과 자낭각을 형성하지 못한 것(-)을 비교하였다(Table 4).

Table 4. Determination of mating type of single ascospore isolates of EFCC 10304-1, EFCC 10304-2 and EFCC 10304-3.

	10304-2(4)	10304-2(5)	10304-2(8)	10304-2(10)	10304-2(11)	10304-2(12)
10304-1(3)	-	+	-	+	+	+
10304-1(4)	+	-	+	-	-	-
10304-1(5)	-	+	-	+	+	+
10304-1(6)	+	-	+	-	-	-
10304-1(8)	-	+	+	-	-	-
10304-1(11)	-	+	-	+	+	+

	10304-3(6)	10304-3(7)	10304-3(8)	10304-3(9)	10304-3(10)	10304-3(11)
10304-1(3)	-	+	-	-	+	-
10304-1(4)	+	-	+	+	-	-
10304-1(5)	-	+	-	-	+	+
10304-1(6)	+	-	+	+	-	-
10304-1(8)	+	-	+	+	-	-
10304-1(11)	-	+	-	-	+	+

	10304-3(6)	10304-3(7)	10304-3(8)	10304-3(9)	10304-3(10)	10304-3(11)
10304-2(4)	-	+	-	-	+	+
10304-2(5)	+	-	-	+	-	-
10304-2(8)	-	+	-	-	+	+
10304-2(10)	+	-	+	+	-	-
10304-2(11)	+	-	+	+	-	-
10304-2(12)	+	-	+	+	-	-

+ : perithecium formation

- : perithecium non-formation

(4) 형성된 번데기동충하초 인공 자실체의 비교

서로 다른 세 곳의 장소(Place 1. Place 2. Place 3.)에서 형성된 자실체의 건조무게를 실험용 balance를 이용하여 측정하였고, 그 결과를 그래프로 비교하였다. 장소가 다르다고 하더라도 건조 무게의 차이는 큰 차이는 없었지만 25℃의 지상층에 있는 동충하초 배양실(Place 1)보다는 20℃인 지하층에 있는 배양실(Place 2)과 농가의 버섯재배사 포장(Place 3)에서 조금 더 뛰어난 결과를 나타내었다(Fig. 8 및 9).

하나의 자실체 가닥으로부터 분리한 단포자를 이용하여 형성시킨 인공자실체의 건조중량과 서로 다른 자실체 가닥으로부터 분리한 단포자를 이용하여 형성시킨 인공자실체의 건조중량을 세 곳의 다른 장소에 따라 비교하여 본 결과 규모가 가장 큰 농가의 버섯재배사 포장에서 결과가 가장 좋게 나타났고 자실체 가닥에 따른 비교는 서로 큰 차이를 보이지 않았다 (Fig. 10 및 11).

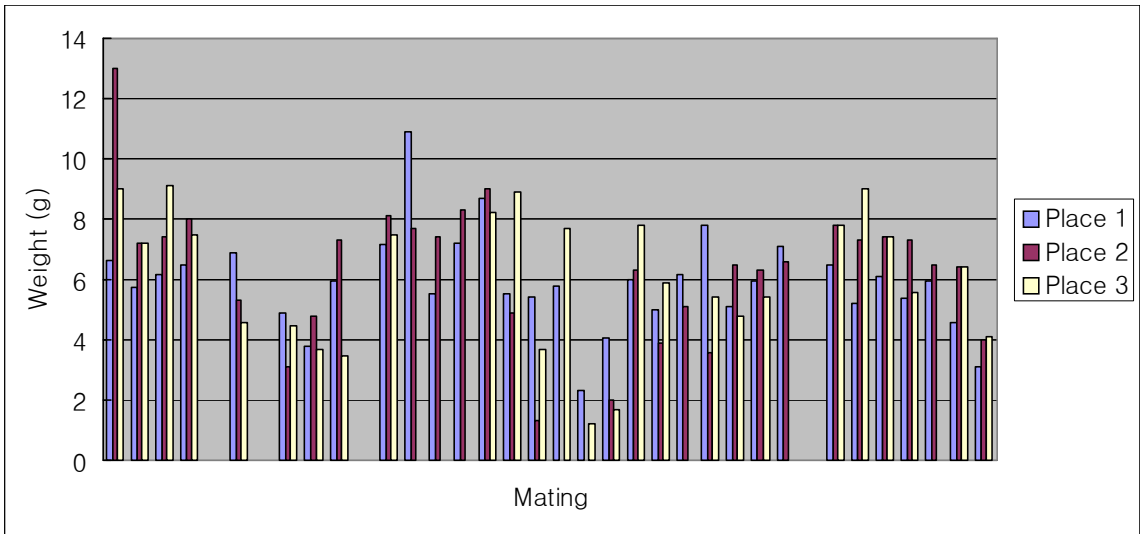


Fig. 8. Comparison of fruit-body dry weight from combination EFCC 10304-1 and EFCC 10304-2 grown in three different environmental conditions.

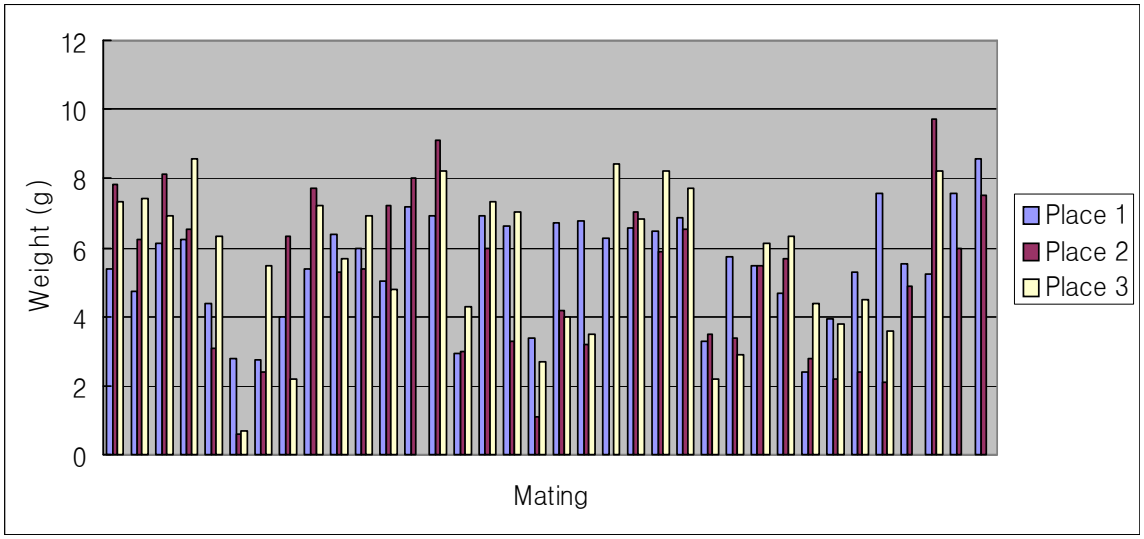


Fig. 9. Comparison of fruit-body dry weight from combination EFCC 10304-1 and EFCC 10304-3 grown in three different environmental conditions.

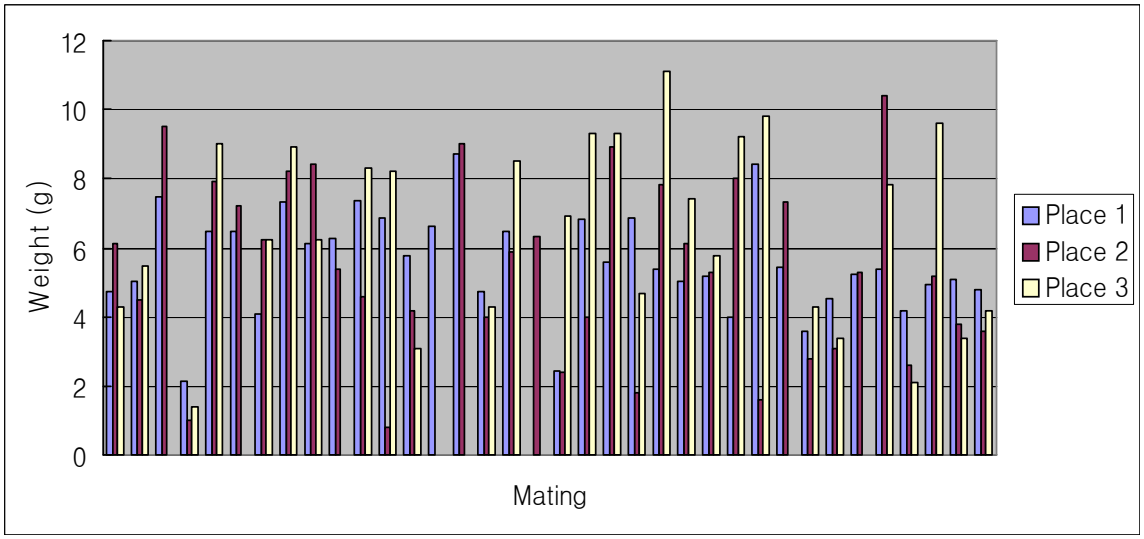


Fig. 10. Comparison of fruit-body dry weight from combination EFCC 10304-2 and EFCC 10304-3 grown in three different environmental conditions.

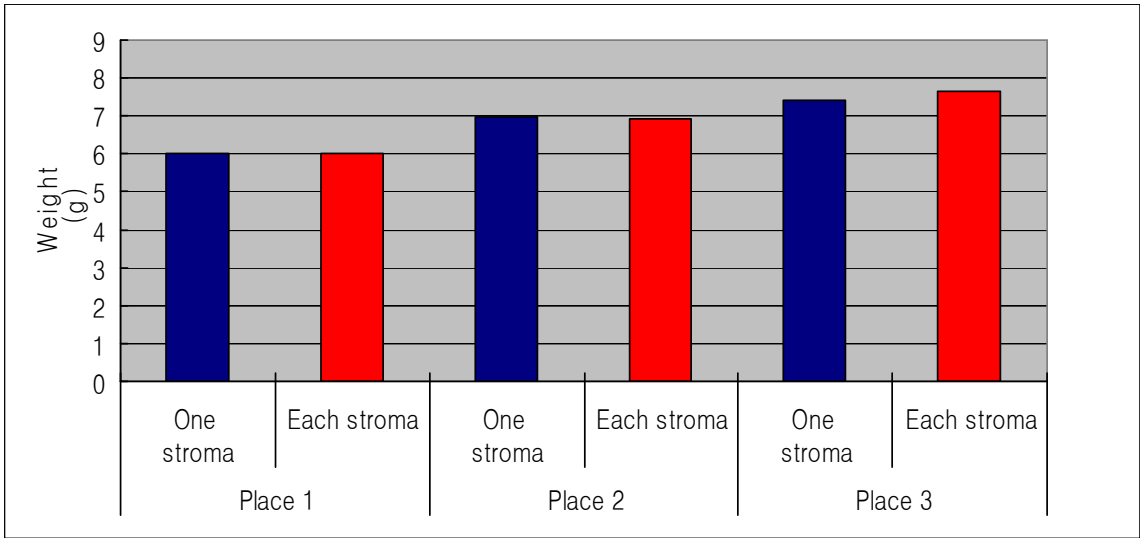


Fig. 11. Comparison of fruit-body dry weight from same or different stromata in three different environmental conditions.

(5) 원균 단포자의 위치에 따른 번데기동충하초 자실체 형성의 비교

EFCC 10304-1(5) 단포자 원균과 EFCC 10304-3(7) 단포자 원균의 petri-dish상에서 위치를 세 부분(A, B, C)으로 다르게 하여 Colony를 떼어내어 접종한 결과 A, B, C의 인공 자실체들이 서로 자실체 모양과 색, 크기가 다르게 형성되었으며 인공 자실체 A와 B의 경우 자낭각이 형성 되었지만 C의 경우 자낭각이 형성 되지 않았음을 확인하였다(Fig. 12).

Fig. 12. Fruit-body production from three different positions of Petri-dish colonies of isolates EFCC 10304-1(5) and EFCC 10304-3(7).

(6) 단포자 원균으로부터 분리한 1차 계대 단포자 균을 이용한 자실체 형성의 비교

EFCC 10304-1(5) 단포자 원균과 EFCC 10304-3(7) 단포자 원균으로부터 각각 4개씩 떼어낸 4개씩의 1차 계대균을 이용하여 서로 Mating을 시켜 인공 자실체를 유도한 결과 또한 인공 자실체들이 서로 자실체 모양과 색, 크기가 다르게 형성되었으며 자낭각의 경우도 형성 된 것이 있는 반면, 불확실하게 형성 된 것도 있음을 확인하였다(Fig. 13).

(7) 번데기동충하초 시료(CMWE)의 특성 연구

본 연구에 사용되는 번데기동충하초 시료인 CMWE의 특성을 연구하기 위하여, HPLC를 사용하여, CMWE의 구조적 특성 및 CMWE에 cordycepin이 함유되어 있는지를 조사하였다. 먼저, HPLC를 사용하여 260nm에서 특정하였을 때, CMWE는 8-10분 사이에서 여러 peak이 나타났으며, 그 결과 CMWE는 상당히 polar한 성분을 함유하고 있다는 것을 알 수 있었다.

다음으로는 CMWE에 번데기동충하초에서 발견된 cordycepin이 함유하고 있는지를 확인하여 보았다. Fig. 14-A는 CMWE의 HPLC pattern이며, Fig. 14-B는 cordycepin 의 HPLC peak이며, Fig. 14-C는 (CMWE+cordycepin)의 HPLC 결과이다. 이러한 3가지의 HPLC 분석 pattern 결과는 좀 더 자세한 mass spectra를 분석하여 보아야 확실하게 알 수 있겠지만, Fig. 14의 HPLC pattern을 통하여 CMWE는 cordycepin을 함유하고 있을 것임을 추정할 수 있었다.

Fig. 13. Fruit-body production from combinations of four different first-generation isolates.

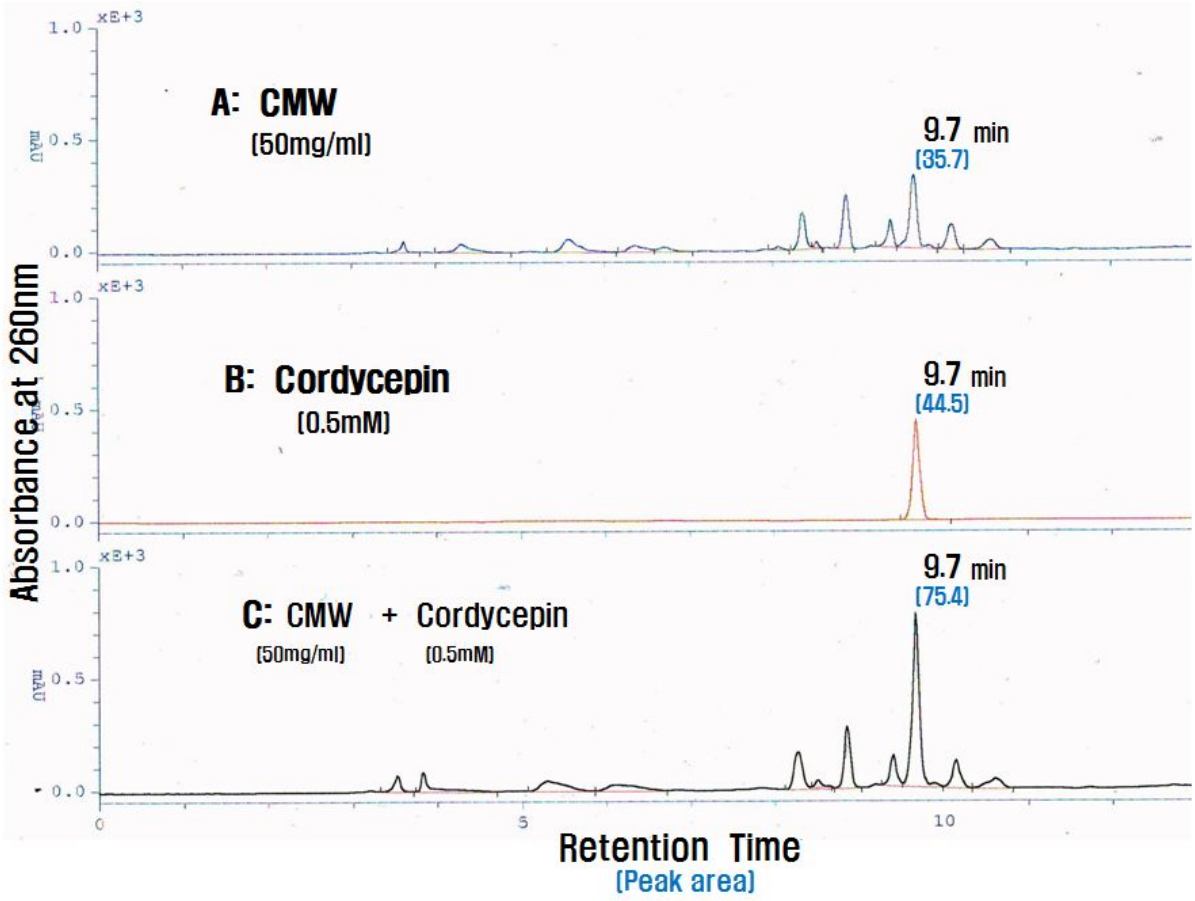


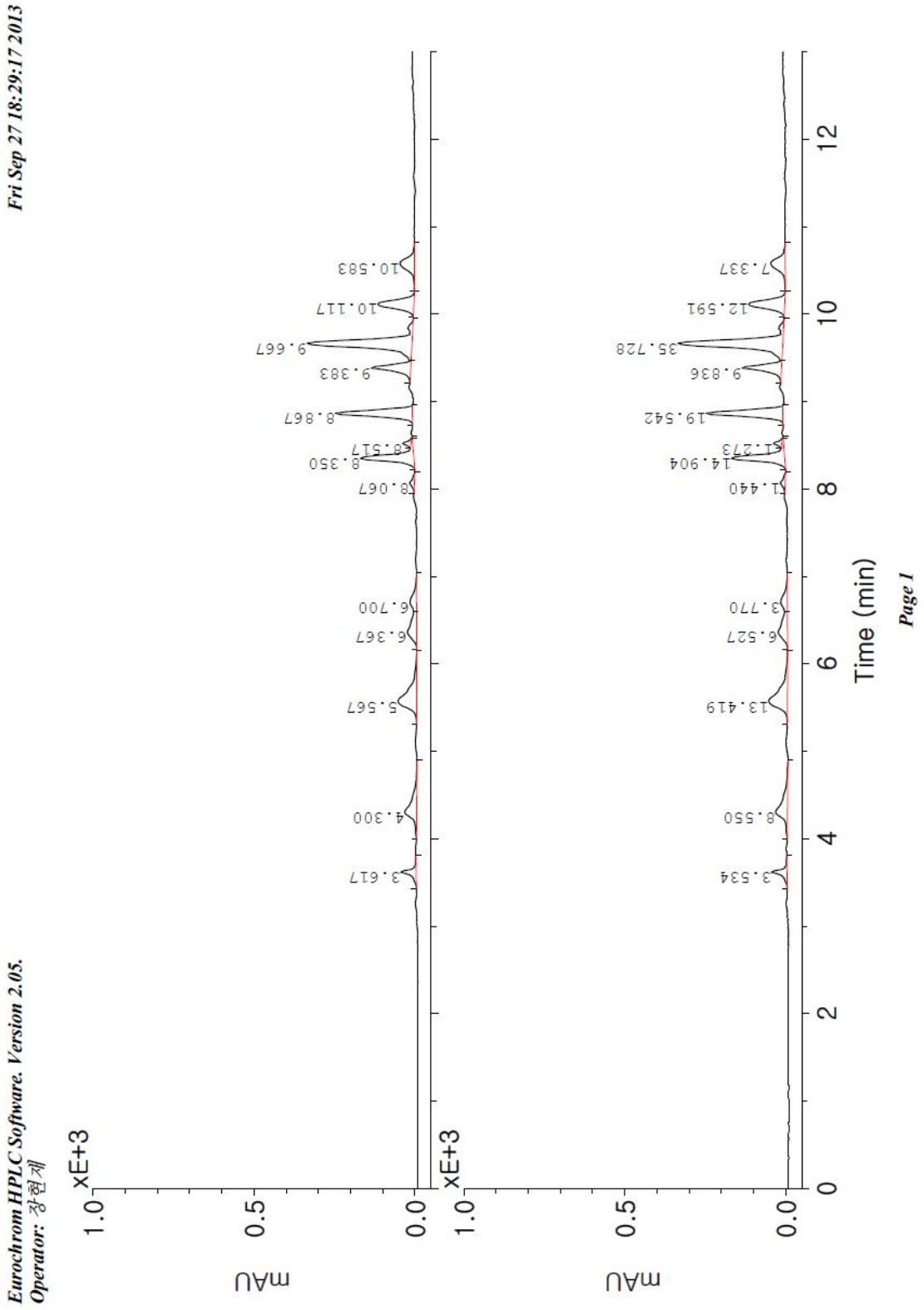
Fig. 14. HPLC에 의한 번데기동충하초 추출물인 CMWE의 특성연구.
(원본 별첨 참조: page 73-75)

(8) 번데기 동충하초로부터 제조된 CMWE에서, HPLC를 이용한 cordycepin 및 adenosine의 확인

본 연구에 사용된 번데기동충하초 시료인 CMWE 중에 생리활성 물질로 알려진 cordycepin 및 핵산 계열 물질인 adenosine의 함량을 조사하기 위하여, HPLC를 사용하여, CMWE의 구조적 특성 및 CMWE에 cordycepin 및 adenosine 이 함유되었는지를 조사하였다.

먼저, HPLC를 사용하여 260nm에서 특정하였을 때, CMWE는 3분에서 10분 사이에서 여러 peak이 나타났으며, 그 결과 CMWE는 상당히 polar한 성분을 함유하고 있다는 것을 알 수 있었다 (Fig. 15).

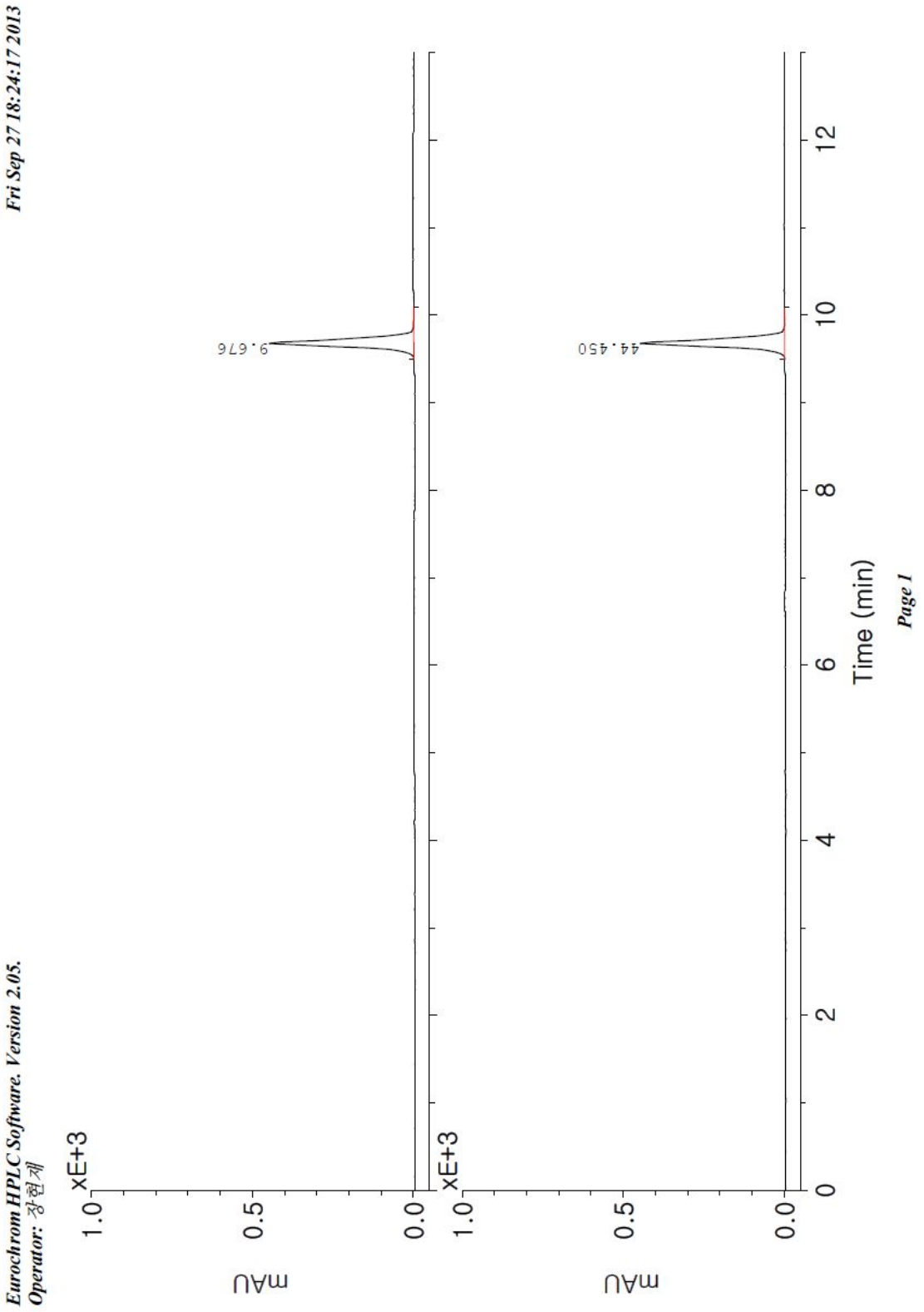
[별첨1] Fig. 14의 'A: CMW' HPLC 결과 원본



상단 그래프 : Retention time

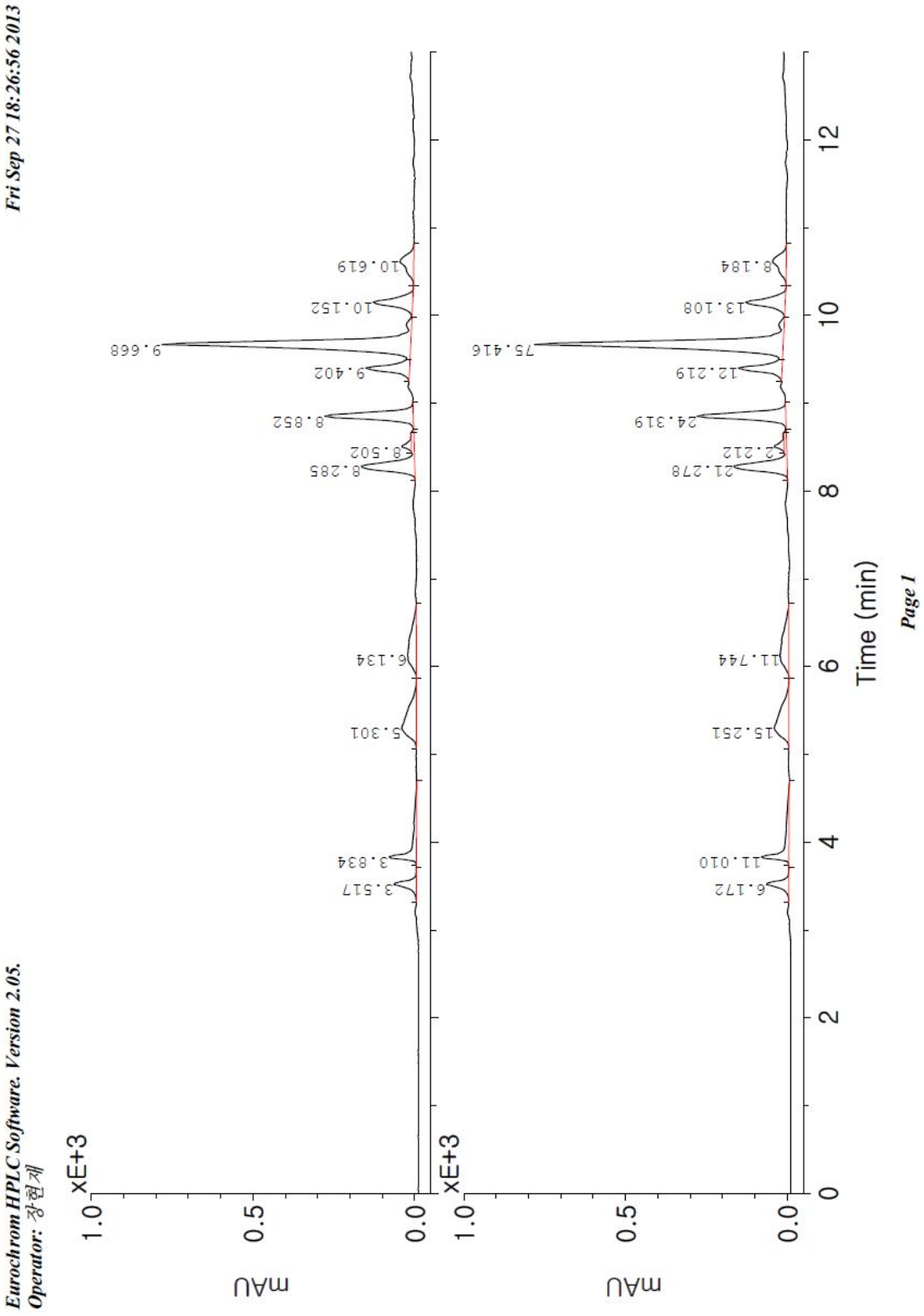
하단 그래프 : Area (mAU×Time)

[별첨2] Fig. 14의 'B: Cordycepin' HPLC 결과 원본



상단 그래프 : Retention time
하단 그래프 : Area (mAU×Time)

[별첨3] Fig. 14의 'C: CMW + Cordycepin' HPLC 결과 원본



상단 그래프 : Retention time
하단 그래프 : Area (mAU×Time)

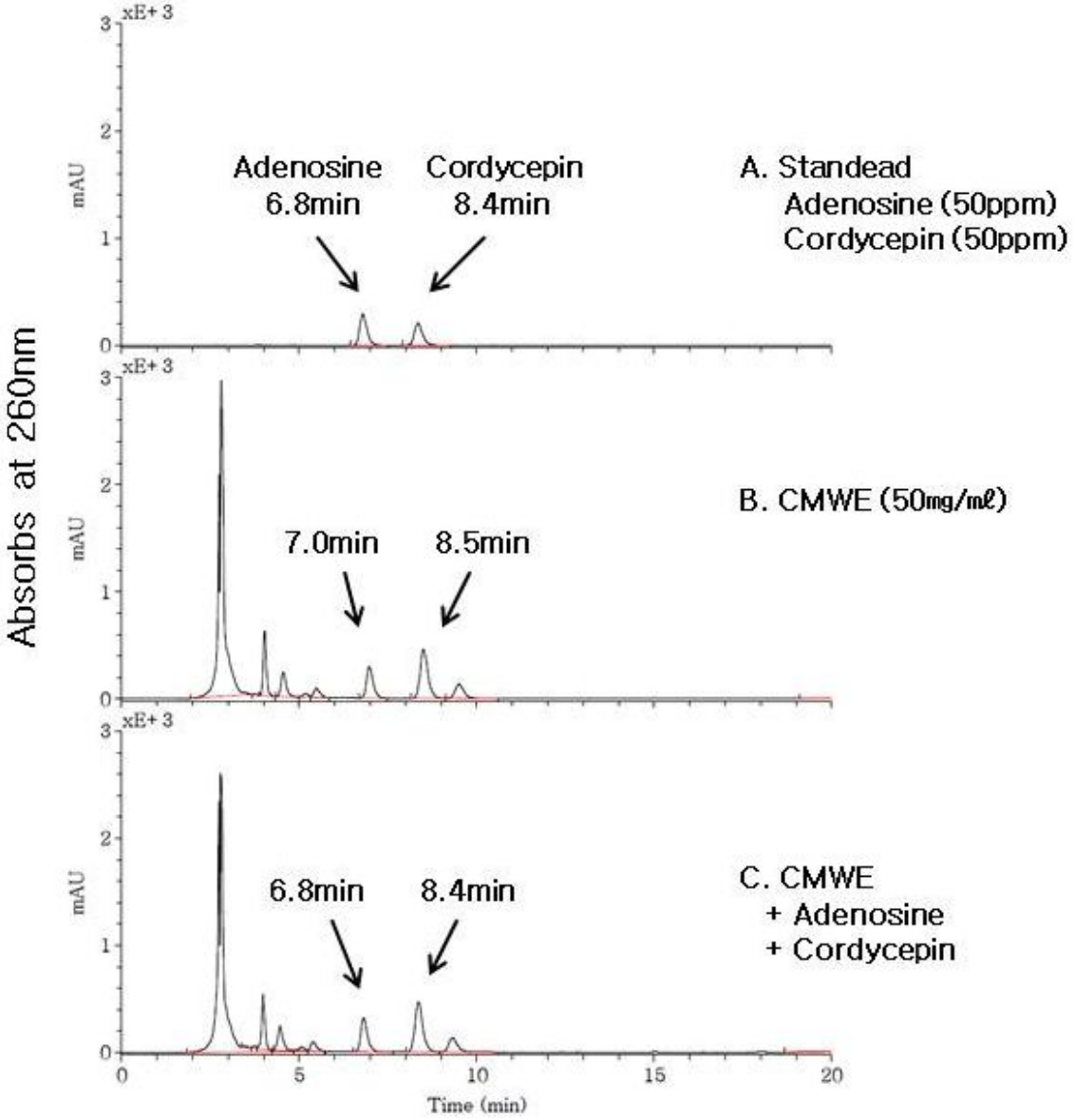


Fig. 15. 번데기동충하초에서 추출한 CMWE에 함유된 cordycepin 및 adnosine의 확인.

다음으로는 CMWE에 번데기동충하초에서 발견된 cordycepin 및 adnosine이 함유하고 있는지를 확인하여 보았다. Fig. 15에서,

A)는 Standard로 사용된 Adenosine 및 cordycepin의 HPLC pattern이며

B)는 CMWE(50㎎/㎖)의 HPLC pattern이며

C)는 CMWE(50㎎/㎖) + Standard 로 사용된 Adenosine 및 cordycepin 의 HPLC pattern 이다.

Standard물질인 adenosine은 6.8분에서 확인 되었으며, cordycepin은 8.5분에서 측정되었다.

CMWE 시료에 Standard 물질인 adenosine 및 cordycepin를 첨가하여 측정한 결과(C), 번데기동충하초 시료인 CMWE에 adenosine 및 cordycepin이 모두 함유되어 있는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 15).

(9) 번데기 동충하초로부터 HPLC를 이용한 cordycepin 및 adenosine의 함량측정

상기와 같이, 번데기동충하초 시료인 CMWE에 adenosine 및 cordycepin이 모두 함유되어 있는 것을 확인할수 있었으므로, adenosine 및 cordycepin이 CMWE에 어느정도 함유하고 있는지를 조사하였다.

Standard curve

Standard

ppm	Area	
	Adenosine	Cordycepin
0	0	0
10	10.9	8.9
25	31.1	24.7
50	68.5	54.9

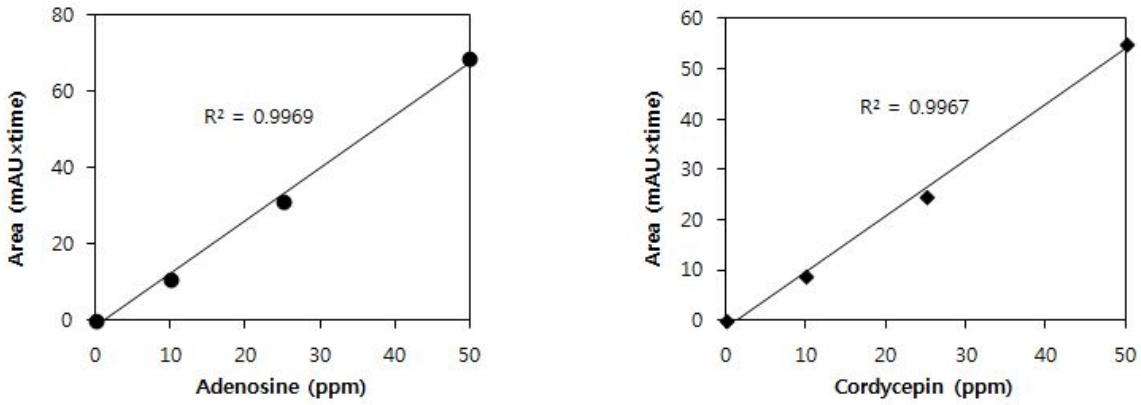


Fig. 16. 순수한 adenosine 및 cordycepin 의 standard curve.

Fig. 16 과 같이, adenosine 및 cordycepin 의 standard curve를 얻을수 있었으며, 이러한 standard curve를 이용하여, CMWE 중에 함유되어 있는 adenosine 및 cordycepin의 함량을 측정할 수 있었다.

Table 5. CMWE 중에 함유되어 있는 adenosine 및 cordycepin의 함량

CMWE	함량(Content)	
	%	㎎/g
Adenosine	0.09	0.9
Cordycepin	0.21	2.1

Table 5와 같이, 번데기동충하초에서 제조된 CMWE 중에는, adenosine이 47.4ppm 으로 0.09% 함유되어 있으며, cordycepin은 106.1ppm으로 0.21% 함유되어있는 것으로 측정되었다.

(10) 번데기동충하초 시료(CMWE)의 간보호 작용 기작

(가) 정상 간 세포(Normal cell)인 Chang liver cell에서의 번데기동충하초 추출물인 CMWE의 효과:

번데기동충하초 추출물인 CMWE가 정상 간 세포(Normal cell)인 Chang liver cell에 어떠한 작용을 일으키는지를 알아보기 위해, 번데기동충하초 추출물(CMWE)를 100, 200, 400, 800, 및 1,000㎍/㎖ 의 농도를 정상세포인 Chang liver cell에 처리하여 CMWE의 효과를 보았다 (Fig. 17).

48시간(A) 및 72시간(B) 배양하였을 때, 정상세포에 큰 효과를 주지 않는다는 것을 알아내었다. 이러한 결과는 CMWE는 정상 간세포에 어떠한 저해작용을 주지 않는다는 결과를 얻었으며, CMWE의 농도가 증가함에 따라, 800, 1,000㎍/㎖ 에서는 정상세포의 보호작용이 있음을 알 수 있었다. 결론적으로, CMWE는 정상 간세포에 어떠한 저해작용을 주지 않는다는 결과를 얻었다. Fig. 17-(C)에서는 48시간 배양에 비해 72시간 배양에서는 cell viability가 약간 떨어지는 것을 알수 있었다.

(나) 번데기동충하초 추출물인 CMWE가 간암세포(HepG2 cell) 의 억제효과:

CMWE는 정상 간세포인 Chang liver cell에 어떠한 저해작용을 주지 않는다는 결과를 얻었으므로, 다음 실험으로는 간암세포인 HepG2 cell에서 암세포 억제효과가 있는지를 실험하였다.

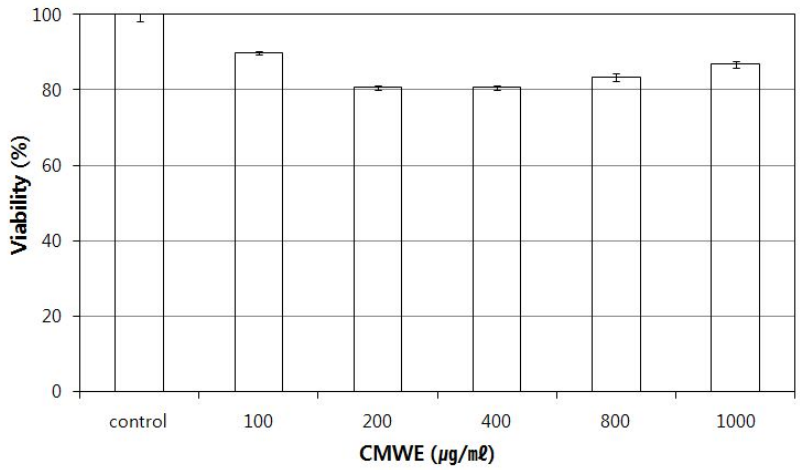
CMWE의 농도를 100, 200, 400, 800 및 1,000㎍/㎖ 의농도를 간암세포인 HepG2 cell에 처리한 결과, 농도가 증가함에 따라 암세포의 viability가 48시간 배양(A) 72시간 배양에서 감소하는 것을 알 수 있었다. 48시간 배양(A)에서는 1,000㎍/㎖ 정도의 농도가 첨가 되어야 간암세포가 57% 감소하는 것으로 나타났으며, 72시간 배양(B)에서는 400㎍/㎖ 의 CMWE 농도첨가에서 49%가 감소하였으며, 800㎍/㎖의 CMWE 첨가에서는 44%의 암세포가 cell death를 일으킨다는 것을 알수 있었다. Fig. 18-(C)에서 와 같이, 400㎍/㎖ 이상의 CMWE 농도첨가에 따라, 간암세포인 HepG2 cell에 효과가 있음을 알수 있었다 (Fig. 18.)

(11). 몇가지 저해제에 의한 정상세포(Chang liver cell)의 손상 및 각각의 저해제의 IC_{50} 측정과 번데기동충하초 추출물인 CMWE의 보호 효과

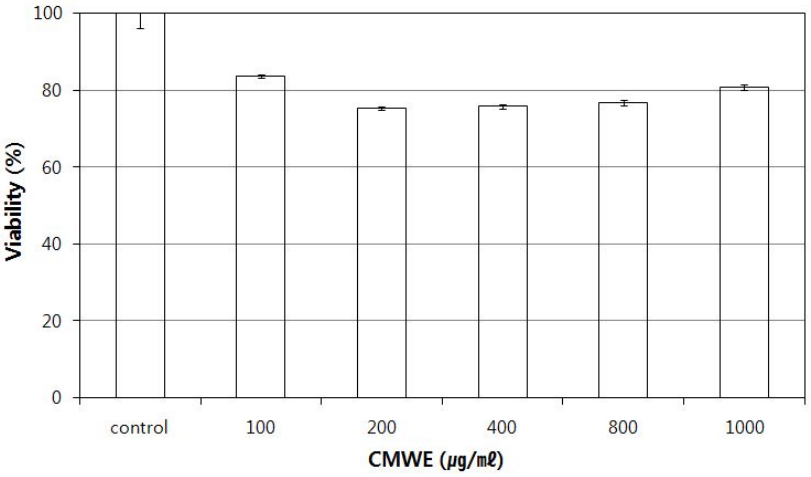
앞에서, CMWE는 정상 간세포인 Chang liver cell에 어떠한 저해작용을 주지 않는다는 결과 및 간암세포인 HepG2 cell에서 암세포를, 400㎍/㎖ 이상의 CMWE 농도첨가에 따라, 간암세포인 HepG2 cell을 억제 시킬수 있다는 결론을 얻었으므로, 다음의 실험에서는, 몇가지 저해제 (SNP, AAP, H_2O_2)에 의한 정상세포(Chang liver cell)의 손상을, 번데기동충하초 추출물인 CMWE가 보호해줄수 있는지를 실험을 위하여, 각각의 저해제의 농도를 결정하기 위한 실험을 하였다.

대표적인 간기능 저해제(SNP, AAP, ethanol)를 선택하여, 정상세포(Chang liver cell) 의 손상을 주는 IC_{50}을 측정하였다.

A.



B.



C.

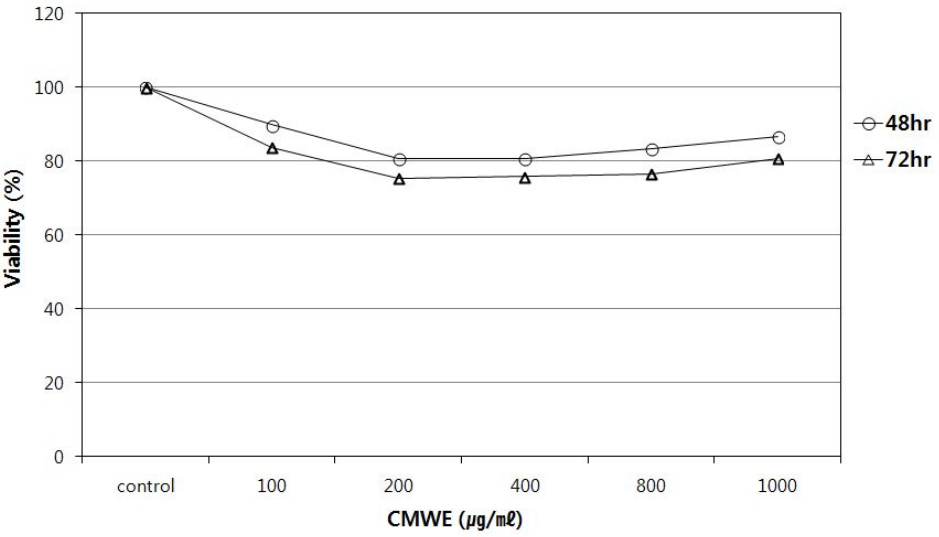
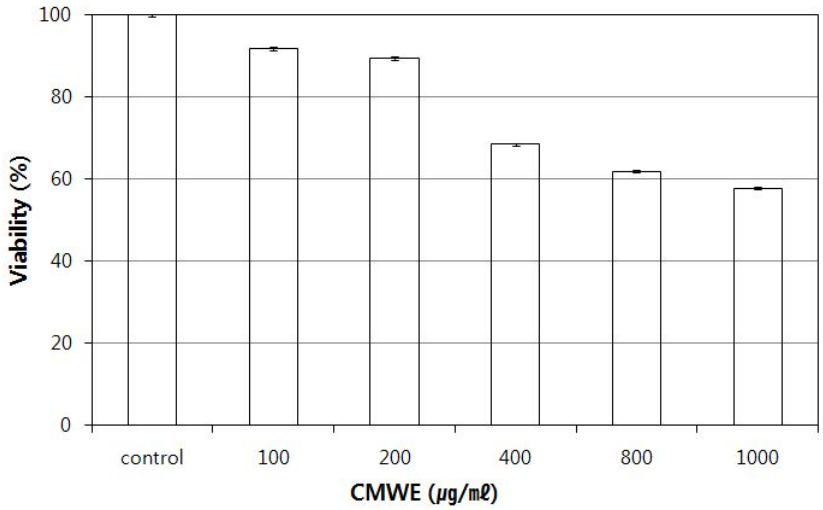
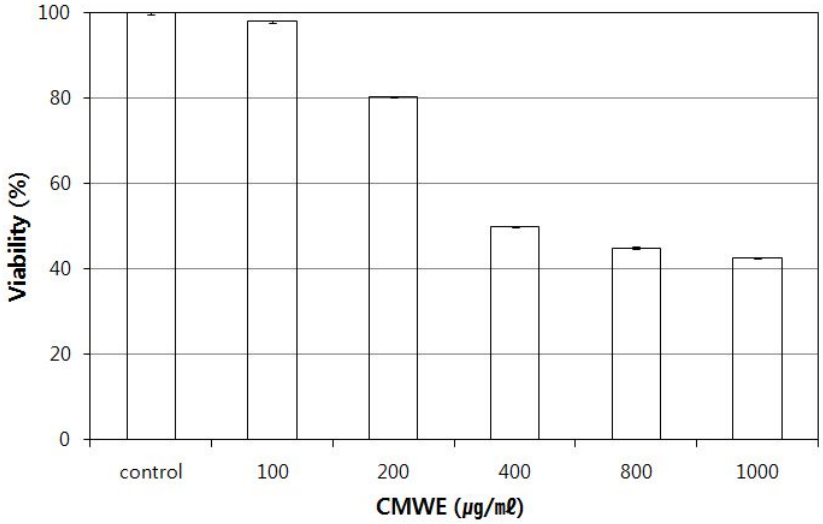


Fig. 17. Chang liver cell (normal)에 대한 CMWE의 효과(48시간 및 72시간 배양 효과).

A.



B.



C.

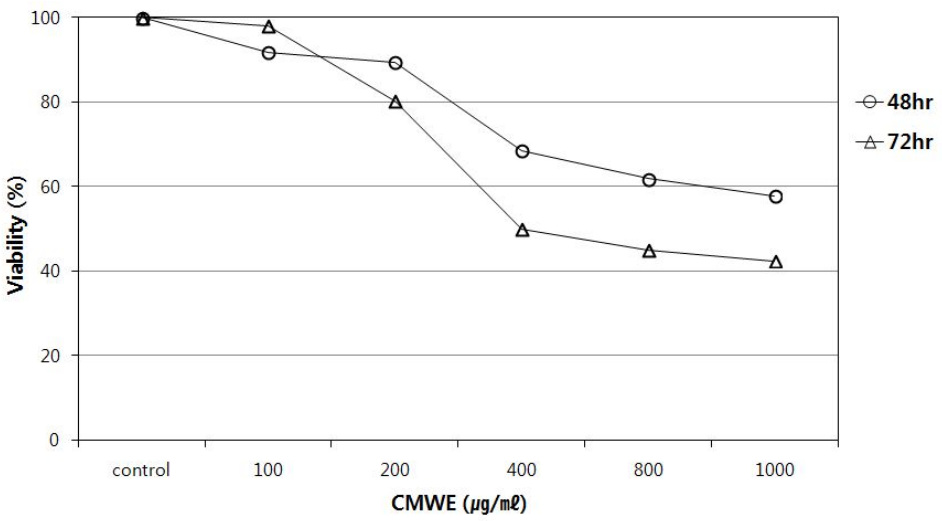


Fig. 18. HepG2 cell (cancer cell)에 대한 CMWE 효과(48시간 및 72시간 배양 효과).

(가) SNP(sodium nitroprusside)에 의한 Chang liver cell(normal cell)의 cell damage 효과를 주는 IC_{50}의 계산:

SNP에 의한 정상세포(Chang liver cell)의 손상을 비교하기 위하여, 저해제로서의 SNP의 농도를 결정하기 위한 실험을 하였다,

0, 250, 500, 750, 1,000μM의 SNP의농도를 정상세포인 Chang liver cell($1x10^4$cell/well)에 처리하였을 경우, 619.3μM에서, 50%의 cell viability의 감소를 나타내는 IC_{50}을 보였다(Fig. 19 및 20).

(나) SNP에 의한 Chang liver cell(normal cell)의 IC_{50}에서의 cell damage 효과:

상기의 실험 결과, 619.3μM의 SNP에서, 50%의 cell viability의 감소를 나내내는 IC_{50}을 보였으므로, 600μM의 SNP에서 간세포(Chang liver cell)에서의 영향을 확인 하였다.

결과, 600μM의 SNP에서 간세포(Chang liver cell)에 대략 50~60%의 간 생존율 주는 것으로 재확인 되었다(Fig. 21).

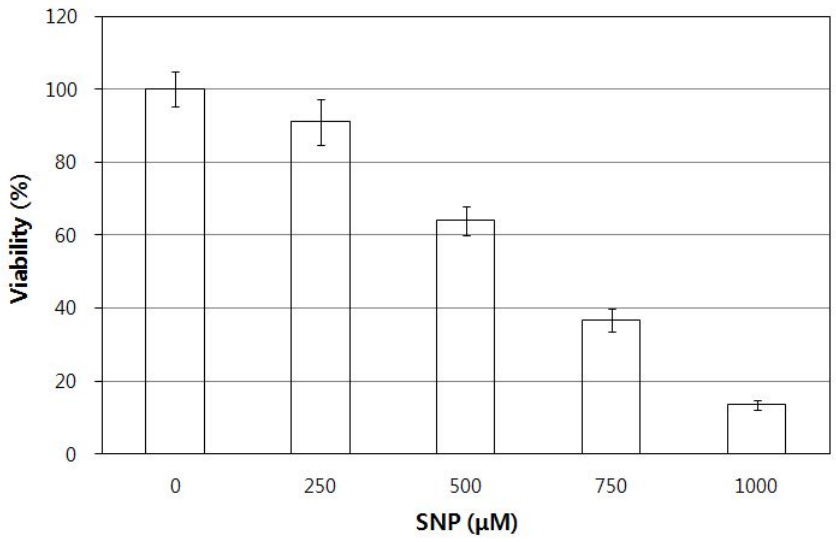
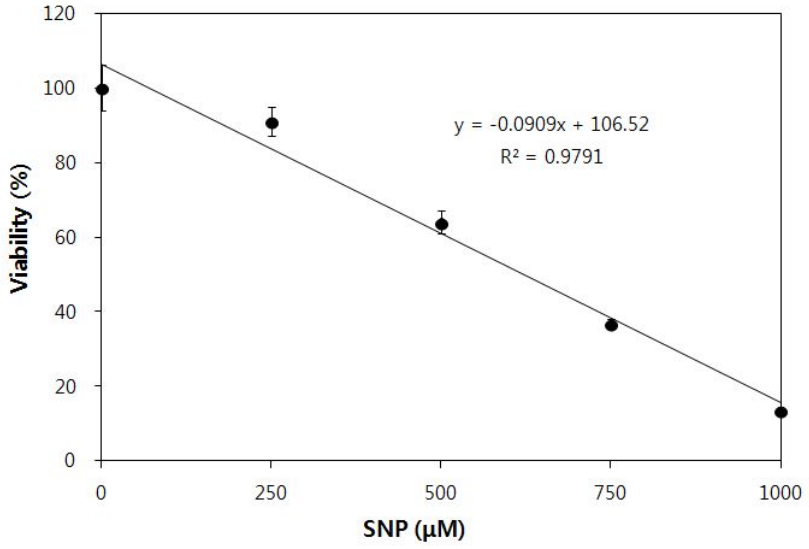


Fig. 19. 여러 SNP 농도에 따른 간세포(Chang liver cell) 손상.



IC 50 : 619.3μM

Fig. 20 . 여러 SNP 농도에 따른 간세포(Chang liver cell) 손상율 계산 결과.

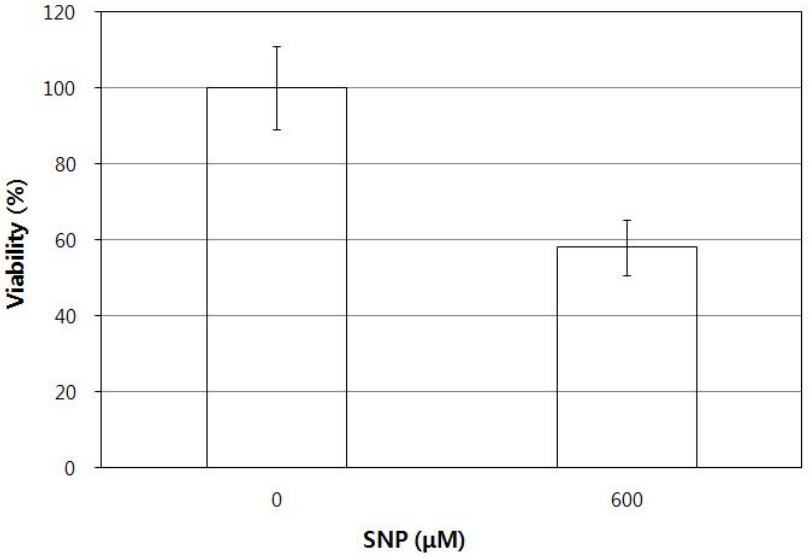


Fig. 21. 600μM의 SNP에서 간세포(Chang liver cell) 손상율.

(다) 술(Ethanol) 에 의한 Chang liver cell (normal cell)의 cell damage 효과를 주는 IC_{50}의 계산:

Ethanol에 의한 정상세포(Chang liver cell) 의 손상을 비교하기 위하여, 저해제로서의 ethanol의 농도를 결정하기 위한 실험을 하였다,

0, 100, 200, 300, 400, 500mM의 ethanol 의 농도를 정상세포인 Chang liver cell($1x10^4$ cell/well)에 처리하였을 경우, 514.5mM에서, 50%의 cell viability의 감소를 나내내는 IC_{50}을 보였다.(Fig. 22 및 23).

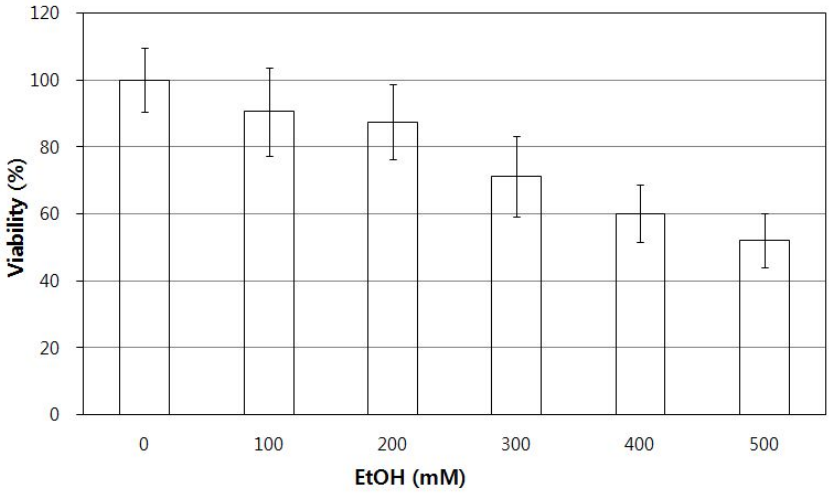
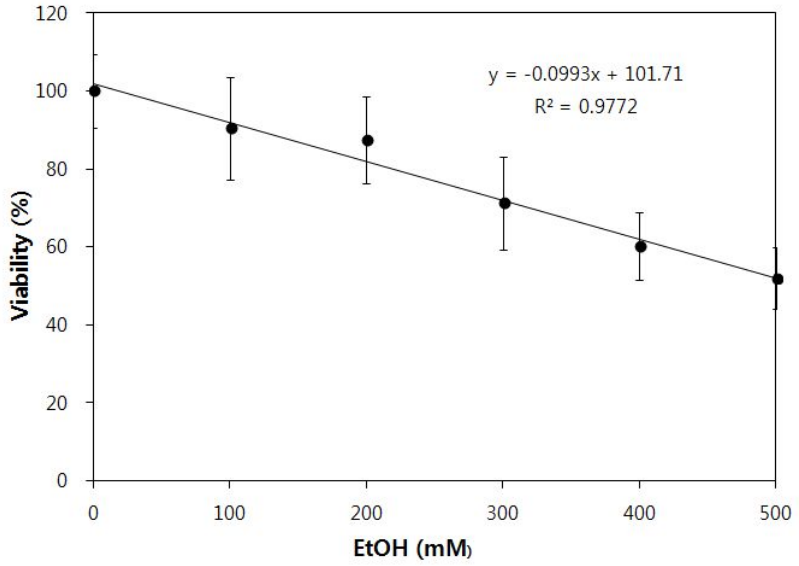


Fig. 22. 여러 ethanol 농도에 따른 간세포(Chang liver cell) 손상.



IC 50 : 514.5 mM

Fig. 23. 여러 SNP 농도에 따른 간세포(Chang liver cell) 손상율 계산 결과.

(라) Ethanol 에 의한 Chang liver cell(normal cell)의 IC_{50} 에서의 cell damage 효과:

상기의 실험 결과, 514.5mM의 SNP 에서, 50%의 cell viability의 감소를 나내내는 IC_{50}을 보였으므로, 600μM의 SNP에서 간세포(Chang liver cell)에서의 영향을 확인 하였다.

결과, 500mM의 ethanol 농도에서 간세포(Chang liver cell) 손상은 70~80%의 간생존율 주는 것으로 재확인 되었다(Fig. 24).

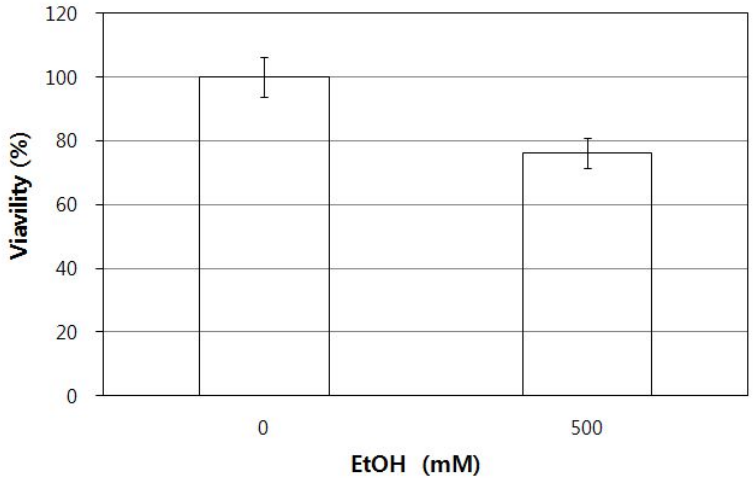


Fig. 24. 500mM의 ethanol에서 간세포(Chang liver cell) 손상율.

(마) AAP(acetaminophen)에 의한 Chang liver cell(normal cell)의 cell damage 효과를 주는 IC_{50}의 계산:

AAP(acetaminophen)에 의한 정상세포(Chang liver cell) 의 손상을 비교하기 위하여, 저해제로서의 AAP의 농도를 결정하기 위한 실험을 하였다,

0, 5, 10, 20, 40mM의 AAP의농도를 정상세포인 Chang liver cell(1×10^4 cell/well)에 처리하였을 경우, 10mM 수준에서, 50%의 cell viability의 감소를 보이는 IC_{50}을 보였다.(Fig. 25 및 26).

(바) AAP에 의한 Chang liver cell(normal cell)의 IC_{50}에서의 cell damage 효과:

상기의 실험 결과, 10mM의 AAP 에서, 50%의 cell viability의 감소를 나내내는 IC_{50}을 보였으므로, 7.5mM 및 15mM의 AAP에서 간세포(Chang liver cell)에서의 영향을 확인 하였다.

결과, 7.5mM의 AAP에서는 간세포(Chang liver cell)에 대략 70%의 간 생존율 주는 것으로 재확인하였으며(Fig. 27), 15mM의 AAP에서는 간세포(Chang liver cell)에 대략 20%의 간생존율을 나타내었다(Fig. 28).

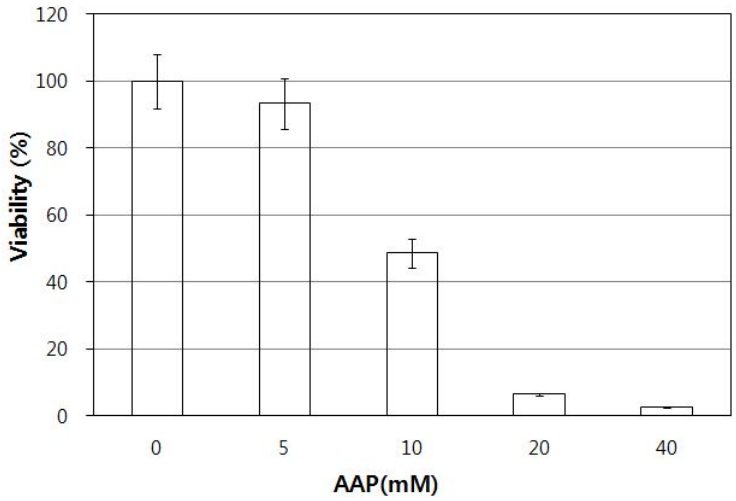


Fig. 25. 여러 AAP 농도에 따른 간세포(Chang liver cell) 손상.

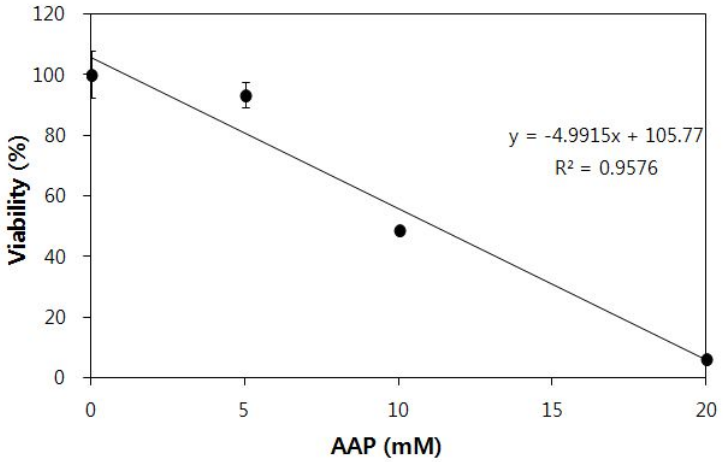


Fig. 26. 여러 AAP 농도에 따른 간세포(Chang liver cell) 손상율 계산 결과.

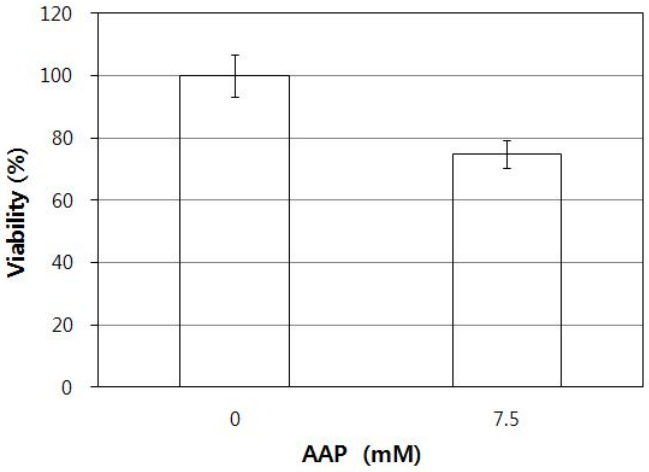


Fig. 27. 7.5mM의 AAP에서 간세포(Chang liver cell) 손상율.

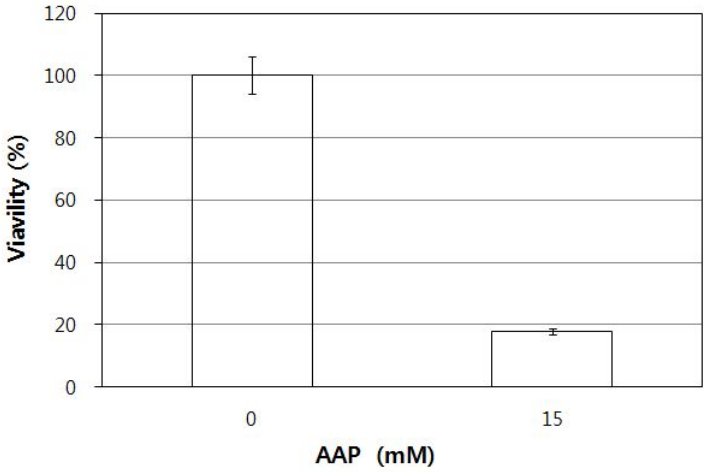


Fig. 28. 15mM의 AAP에서 간세포(Chang liver cell) 손상율.

(12) 번데기동충하초 시료(CMWE)의 간보호 작용 기작

(가) 정상 간 세포인 Chang liver cell에서의 번데기동충하초 추출물인 CMWE의 효과:

번데기동충하초 추출물인 CMWE가, 정상 간 세포인 Chang liver cell에 어떠한 작용을 일으키는지를 알아보기 위해, 번데기동충하초 추출물(CMWE)를 0, 12.5, 25, 50, 100, 200㎍/㎖의 농도를 정상세포인 Chang liver cell에 처리하여 CMWE의 효과를 보았다(Fig. 19).

24시간 배양하였을 때, 정상세포에 어떠한 독성을 주지 않는다는 것을 알아내었다. 이러한 결과는 CMWE는 정상 간세포에 어떠한 저해작용을 주지 않는다는 결과를 얻었으며, CMWE의 농도가 낮은 12.5 및 25㎍/㎖에서는 정상세포의 보호작용이 있음을 알 수 있었다. 결론적으로, CMWE는 정상 간세포에 어떠한 저해작용을 주지 않는다는 결과를 얻었다(Fig. 29).

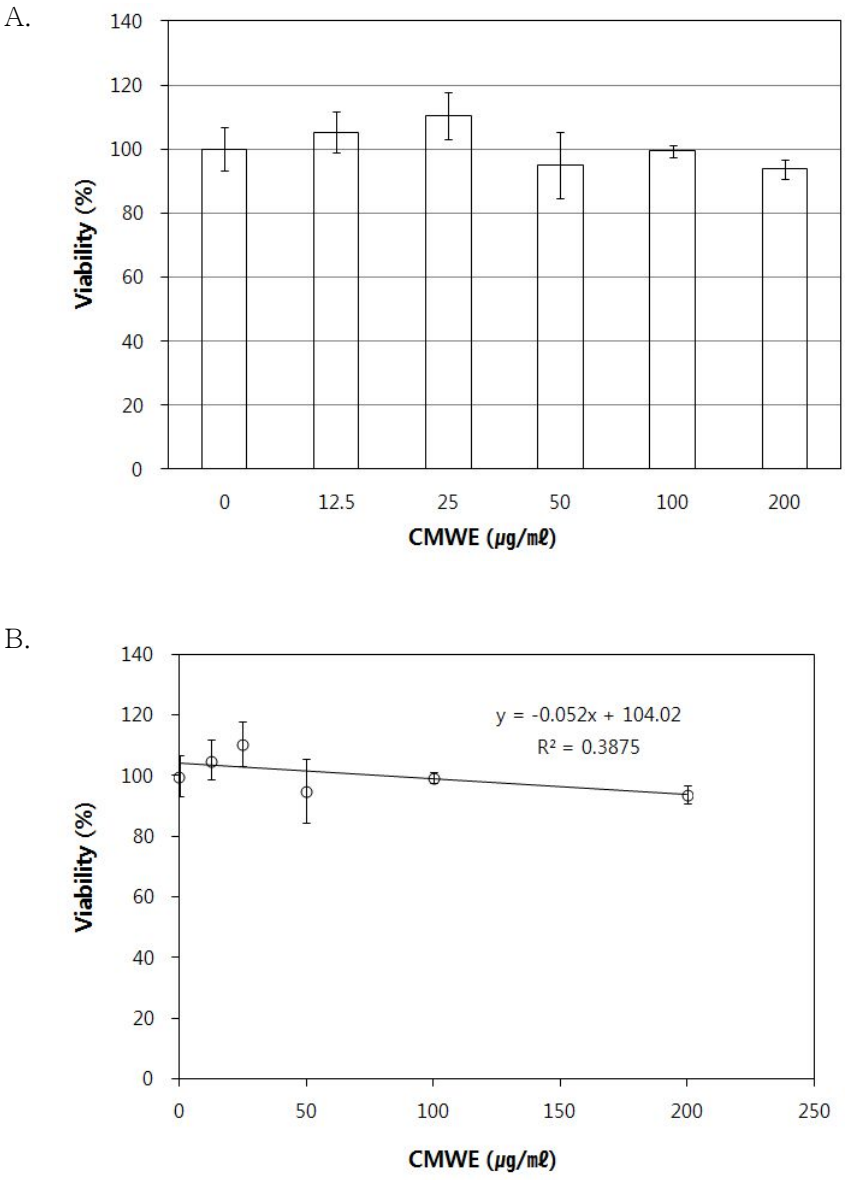


Fig. 29. Chang liver cell (normal)에 대한 CMWE의 효과

(13) 몇가지 저해제에 의한 정상세포(Chang liver cell)의 손상 및 번데기 동충하초 추출물인 CMWE의 보호 효과

몇가지 저해제(SNP, AAP)에 의해 정상세포인 Chang liver cell이 손상되었을 때, 번데기동충하초 추출물인 CMWE가 간세포를 보호해줄수 있는지를 실험하였다.

(가) 저해제인 AAP(acetoaminophen)에 의한 정상세포(Chang liver cell)의 간세포 손상의, 번데기동충하초 추출물인 CMWE에 의한 보호작용:

지금까지의 실험에서, 정상세포인 Chang liver cell(1×10^4 cell/well)에 처리하였을 경우, AAP는 10mM 수준에서, 50%의 cell viability의 감소를 나타내는 IC_{50}을 보였다. 그러므로, AAP에 의한 간세포 손상을, 번데기동충하초 추출물인 CMWE의 보호 작용을 실험하기 위하여, CMWE를 12.5, 25. 50, 100㎍/㎖ 각각 처리한후, 저해제인 AAP를 7mM(IC_{25})로 처리하여, CMEW의 간세포 보호작용의 효과를 실험하였다.

7mM AAP를 처리한 그룹이 아무처리도 않은 그룹에 비해 간세포 독성이 유발되었고, CMWE를 여러 농도로 병행투여 했을 때 AAP만 처리한 그룹보다는 높게 나타났으며, 이러한 결과는 CMWE가 AAP를 간세포에 처리하였을때, 보호효과가 있음을 나타내었다.(Fig. 30).

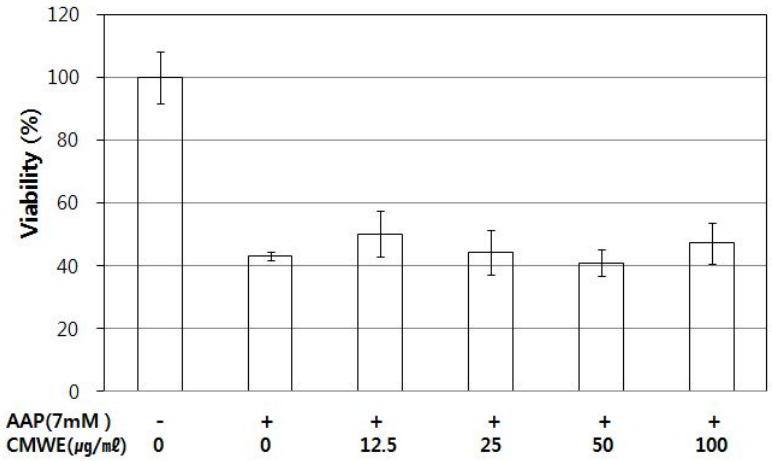


Fig. 30. Chang liver cell(normal)에 저해제인 AAP를 처리하였을 때, CMWE의 보호효과.

나) 저해제인 SNP(sodium nitroprusside)에 의한, 간세포(Chang liver cell) 손상에 대한, 번데기동충하초 추출물인 CMWE의 보호작용:

상기의 실험에서, 정상세포인 Chang liver cell(1×10^4 cell/well)에 처리하였을 경우, SNP는 619.3μM 수준에서, 50%의 cell viability의 감소를 나타내는 IC_{50}을 보였다.

그러므로, SNP에 의한 간세포 손상을, 번데기동충하초 추출물인 CMWE의 보호작용을 실험하기 위하여, CMWE를 12.5, 25. 50, 100㎍/㎖ 각각 처리한후, 저해제인 SNP 600μM 를 처리하여, CMEW의 간세포 보호작용을 실험하였다.

아무처리도 않은 그룹, 600μM SNP를 처리한 그룹, SNP와 여러 CMWE 처리한 그룹을 비교하였을 때, CMWE를 12.5 및 25㎍/㎖를 처리한 후, SNP 600M를 처리한 그룹에서는, SNP만 처리한 그룹보다는 높게 나타났으며, 이러한 결과는 번데기동충하초 추출물(CMWE)이, 저해제인 SNP로 간세포를 손상시켰을 때, 보호효과가 있음을 확인하였다(Fig. 31).

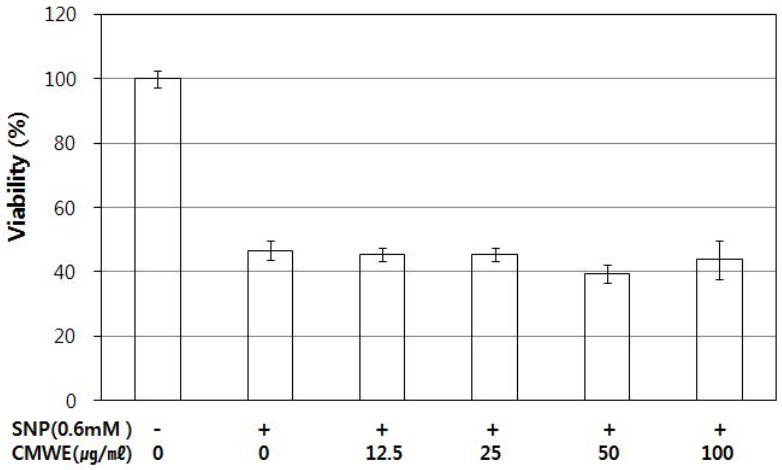


Fig. 31. Chang liver cell(normal)에 저해제인 SNP를 처리하였을 때, CMWE의 보호효과.

(14) 번데기동충하초 추출물인 CMWE의 간세포 손상에 대한 보호 효능의 생화학적 기전 규명

(가) Chang liver cell의 세포주기에 대한 AAP(Acetoaminophen)의 영향

세포가 성장하고 분열하기 위해서는 세포주기를 거치게 된다. 앞선 연구결과에서 번데기동충하초 추출물인 CMWE 단독으로는 세포생존에 영향을 주지 않았고 AAP와 같이 처리할 경우 AAP에 의한 세포사멸을 저해하는 경향을 보였기에, CMWE가 세포주기에 어떤 영향을 미치는 알아보기 위해, 세포의 DNA binding dye인 propidium iodide(PI) 염색법을 실시하였다. PI 염색법은 AAP와 CMWE를 단독 또는 병행 처리하여 24hr 배양한 후, 각 세포에 존재하는 DNA 양을 FACS(Fluorescence-Activated Cell Sorter, Flow Cytometry)로 측정함으로써 그 주기를 확인할 수 있었다.

Fig. 32는 PI 염색에 의한 FACS 분석 결과를 보여주고 있다. Fig. 32.A 는 각각의 그룹에서 세포주기의 변화를 알아보기 위해 선택된 세포의 범위를, Fig. 32.B는 Fig. 32.A에서 선택된 세포에 대해 PI 염색된 결과를 그래프로 보여주고 있다. Fig. 32.B 그래프에서 M1은 세포주기의 Sub-G1기, M2는 G0/G1기, M3는 S기, M4는 G2/M기에 해당되며, Control 그룹은 세포의 전형적인 세포주기를 보여주고 있다.

Fig. 32에 대한 결과를 세포주기에 맞게 다시 그래프로 그리면, Fig. 33.A와 같이 나타낼 수 있다. Fig. 33.A에서 정상간세포에 7mM AAP의 처리하면, 세포주기에서 G2/M기가 감소하고

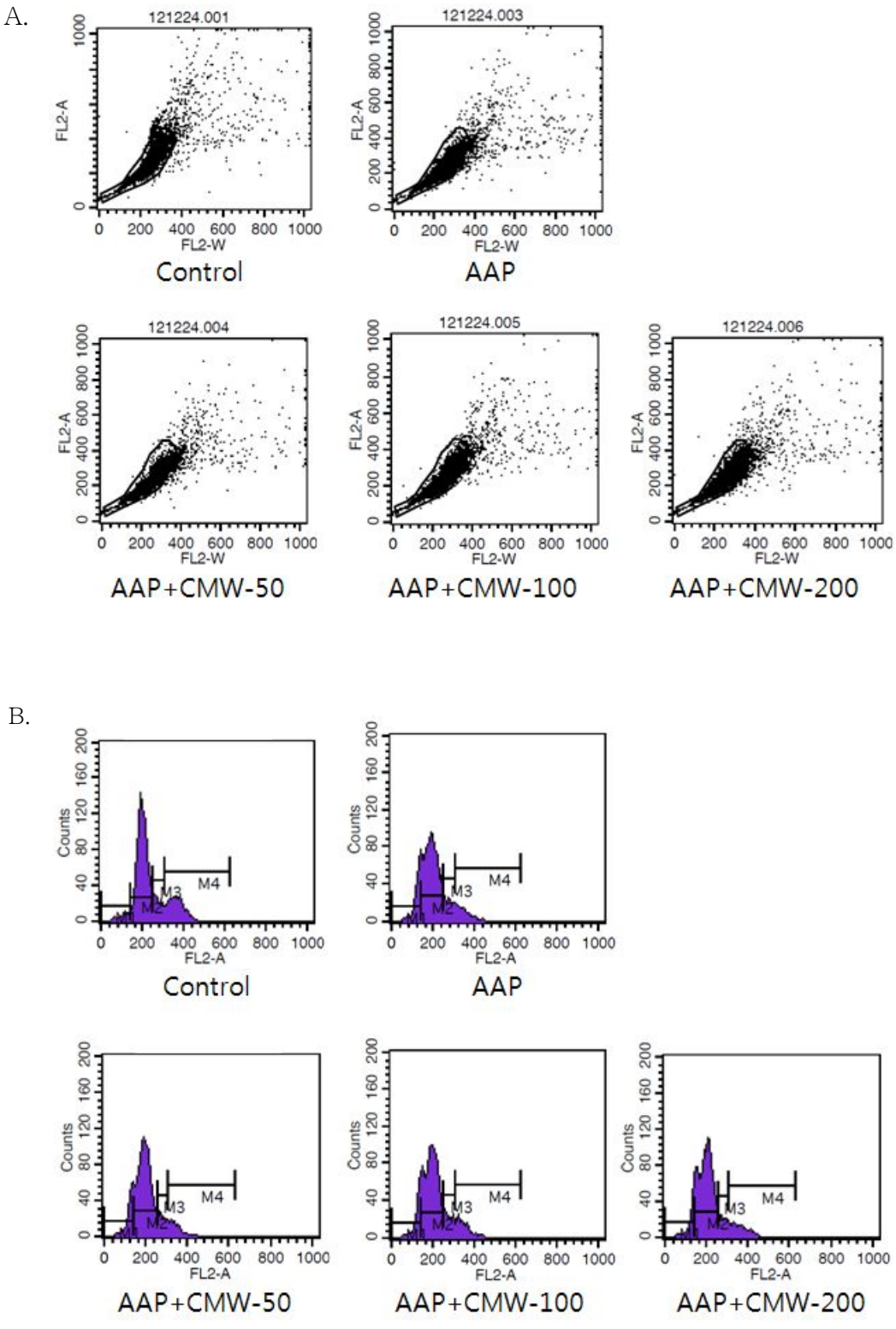


Fig. 32. 번데기동충하초 추출물(CMWE) 및 7mM AAP를 처리한 Chang liver cell에서 propidium iodide 염색법을 이용한 Flow cytometry 분석 결과.

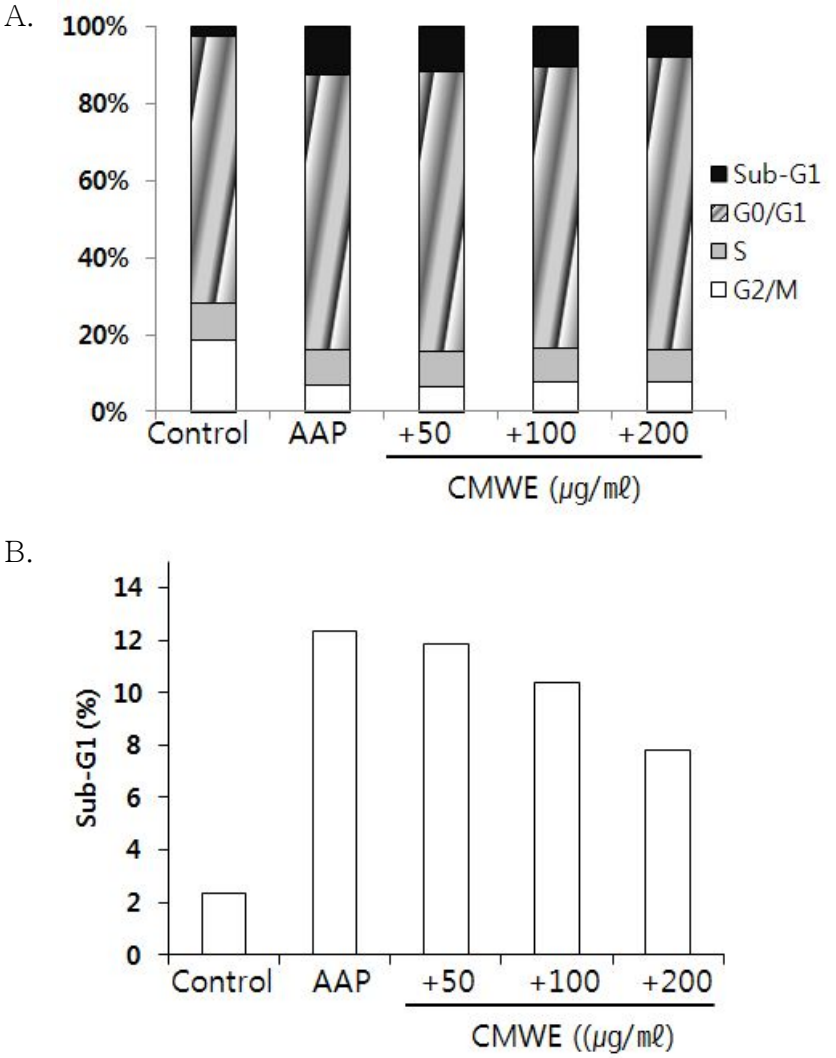


Fig. 33. 번데기동충하초 추출물이 AAP를 처리한 Chang liver cell의 세포주기에 미치는 영향.

Sub-G1기가 증가하는 것을 관찰할 수 있으며, 이러한 Sub-G1기의 증가는 세포의 apoptosis 과정에서 특징적으로 나타나는 현상으로 알려져 있다. 또한, AAP에 의해 증가된 Sub-G1기는 CMWE의 병행투여에 의해 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보였다. 이러한 결과는 Fig. 20.B에서 보다 자세하게 보여주고 있다. Fig. 20.B에서 Control 그룹의 Sub-G1기는 2.35%이고, 7mM AAP의 투여에 의해 12.37%로 증가되는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 CMWE를 각각의 최종농도 50, 100, 200㎍/㎖가 되도록 AAP와 병행투여 했을 때 Sub-G1기가 11.86%, 10.4%, 7.8%로, CMWE의 농도 의존적으로 감소되어 세포사멸을 막아주는 것을 관찰 할 수 있었다.

이러한 결과는, 정상간세포에서 AAP에 의해 유도된 세포 독성, 즉 세포주기의 정지(cell cycle arrest)와 세포사멸에 대해 번데기동충하초 추출물(CMWE)이 간세포 보호활성이 있음을 보여주고 있다.

(나) 번데기동충하초 추출물(CMWE)이 AAP에 유도된 신호전달 물질에 미치는 영향

앞선 연구결과(Fig. 32 및 33)에서 번데기동충하초 추출물(CMWE)가 AAP에 의해 유도된 세포사멸을 막아주는 것을 관찰 할 수 있었는데, 이러한 현상이 정상간세포에서의 신호전달 물질에서도 동일한 효과가 있는지를 알아보기 위하여 세포사멸에 관여하는 PARP(Poly(ADP-ribose)polymerase), ERK(extracellular signal-regulated kinase, p44/42 MAP kinase), JNK (c-Jun N-terminal kinase, SAPK/JNK), p38 등의 신호전달 단백질에 대하여 Western blot 실험을 수행하였다.

① 번데기동충하초 추출물(CMWE)이 PARP에 미치는 영향

일반적으로 PARP(Poly(ADP-ribose)polymerase)는 손상된 DNA의 복구를 돕는 효소로 알려져 있으며, 세포사멸의 과정의 후반부에서 작용하는 신호전달 단백질로 보고되고 있다. 이러한, PARP는 세포독성이 유발되면 DNA 손상이 일어나고, 이러한 손상된 DNA를 복구하기 위하여, 116kDa의 비활성형의 PARP에서 일부 단백질이 잘려나가 89kDa의 활성형 PARP(Cleaved PARP)로 작용하는 것으로 알려져 있다.

본 연구에서는 번데기동충하초 추출물(CMWE)이 간독성에 의한 세포사멸에 관여하는지 알아보기 위하여 PARP에 대해 Western blot 실험을 수행하였고, Fig. 34와 같은 결과를 관찰할 수 있었다. Fig. 34..A는 7mM AAP에 의해 활성화된 PARP(Cleaved PARP)에 대한 Western blot 결과를 보여주고 있고, Fig. 34.B는 활성화된 PARP의 비율을 그래프로 보여주고 있다. DMSO 투여군(2 lane)은, CMWE를 DMSO에 녹였기 때문에 동일한 양의 DMSO를 넣어, Control 그룹과 같은 대조군으로 사용하였다.

Fig. 34.A와 Fig. 34.B에서 보는 바와 같이, 7mM AAP(3 lane)에 의해 활성화된 PARP의 양이 늘어난 것을 확인할 수 있었고, CMWE의 병행 투여에 의해 활성화된 PARP 양이 CMWE의 농도 의존적으로 감소되는 것을 관찰할 수 있었다. 또한, CMWE에 함유되어 있는 cordycepin에 대해서도 각각 10, 20, 50, 100μM로 AAP와 병행 투여했을 때에도 CMWE와 유사한 패턴을 보였고, cordycepin 농도에 의존적으로 활성화된 PARP 양이 감소된 것을 관찰할 수 잇었다.

이러한 CMWE 및 cordycepin의 병행투여에 의해 세포사멸의 마지막 단계에서 작용하는 활성화된 PARP의 감소된 결과는, 세포독성에 의한 신호전달과정의 초기에 CMWE 및 cordycepin이 세포독성을 감소시키는 역할을 하였고, 이로인해 PARP 활성이 낮아진 것으로 사료되었다. 추후 실험은 세포의 생존에 관여하는 MAPK(Mitogen-activated protein kinase)인 ERK, JNK, p38 등의 활성 변화에 대해 실험을 수행하였다.

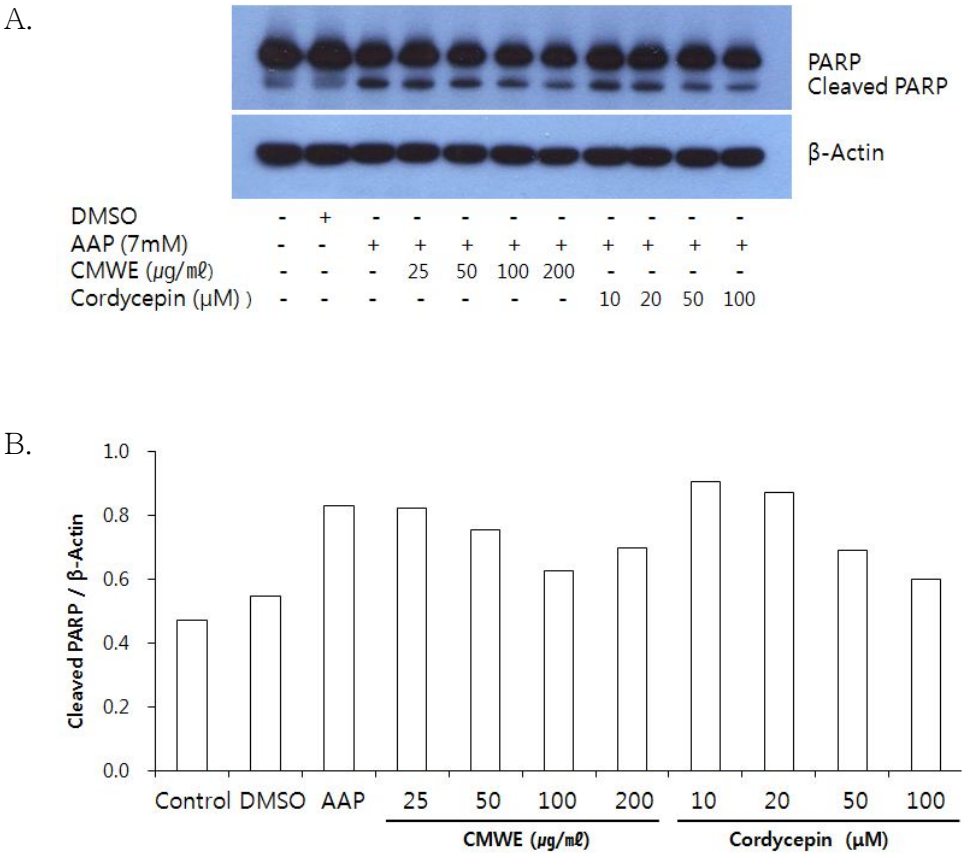


Fig. 34. 번데기동충하초 추출물(CMWE)이 PARP의 활성에 미치는 영향.

② 번데기동충하초 추출물(CMWE)이 MAP kinase에 미치는 영향

일반적으로 MAPK는 성장인자 등이 세포막에 위치한 수용체를 활성화하면 이 신호를 세포막으로부터 핵으로 전달함으로써 세포의 성장과 분화를 조절하는 주요 신호전달 물질이다. 대표적으로 ERK, JNK, p38 등의 단백질이 있고, protein kinase cascade를 통하여 활성화된 후, 여러 가지의 표적 유전자의 발현을 조절함으로써 세포 반응을 유발하는 것으로 알려져 있다. 세포의 생존 및 증식에는 ERK 경로를 활성화하고, 세포 외부의 stress 및 염증성 cytokine은 주로 JNK와 p38의 경로를 활성화하는 것으로 알려져 있다.

본 연구에서는, 번데기동충하초 추출물(CMWE)이 세포독성으로부터 정상간세포를 보호하기 위하여 MAPK에 어떠한 영향을 주는지 알아보고자 하였다. 첫 번째로, 세포의 생존과 증식에 관여하는 신호전달 단백질로 알려져 있는 ERK에 대해, CMWE 및 cordycepin이 ERK 단백질의 활성에 영향을 주는지 실험을 진행하였다(Fig. 35).

Fig. 35.A에서와 같이, 세포독성 유발물질인 7mM AAP의 투여에 의해 ERK의 활성(p-ERK)이 감소된 것을 관찰할 수 있었다. CMWE 및 cordycepin의 병행투여에 의해서는 p-ERK의 양이 다소 증가하는 경향을 보였지만 확연한 증가는 관찰되지 않았다. 그렇지만, Fig. 35.B에서와 같이 세포의 양에 대한 활성화된 ERK 양(p-ERK/β-actin)의 비를 확인하면, CMWE 및 cordycepin의 농도 의존적으로 p-ERK 양이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다.

즉, 정상간세포에서 세포독성이 유발되었음에도 CMWE 및 cordycepin의 투여에 의해 세포

의 생존 및 증식에 관여하는 p-ERK의 증가는, CMWE 및 cordycepin이 세포독성으로부터 간세포를 보호하는 생리활성효과가 있음을 간접적으로 보여주고 있다.

두 번째로, 세포에 활성 산소종이나 염증성 cytokine, UV 등의 물리·화학적 외부 스트레스에의해 활성화되는 JNK와 p38 단백질에 대해 Western blot 실험(Fig. 23)을 수행하였다.

Fig. 36.A에서와 같이 7mM AAP에 의해 세포독성이 유도되면 Control 그룹에 비해 JNK의 활성(p-JNK)이 증가되고, p38의 활성(p-p38)은 다소 감소되는 것을 관찰할 수 있었다. 독성유발 물질인 AAP와 CMWE를 병행 투여 했을 때, 낮아진 p38 활성은 Control 그룹 수준으로 회복되지는 않았지만, 증가된 JNK 활성은 CMWE의 농도 의존적으로 낮아지는 것을 관찰할 수 있었다.

CMWE에 의한 JNK의 활성 변화는 Fig. 23.B에서와 같이, 동일한 세포에 대한 활성화된 JNK의 비(p-JNK/β-actin)를 확인해 보면, 세포독성의해 증가된 JNK의 활성이 CMWE의 병행투여에 의해 농도의존적으로 Control 그룹과 같은 수준으로 감소되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 36.B).

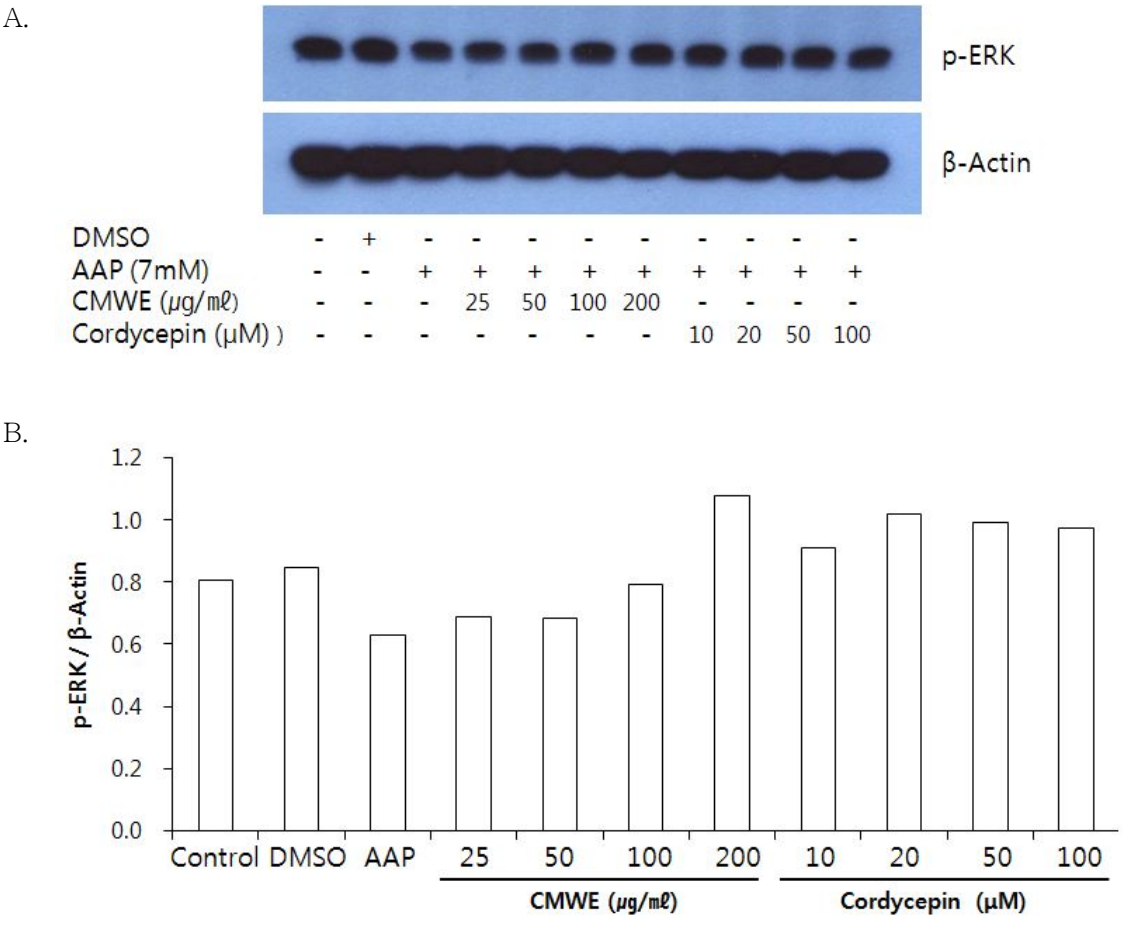


Fig. 35. 번데기동충하초 추출물(CMWE)이 ERK 활성에 미치는 영향.

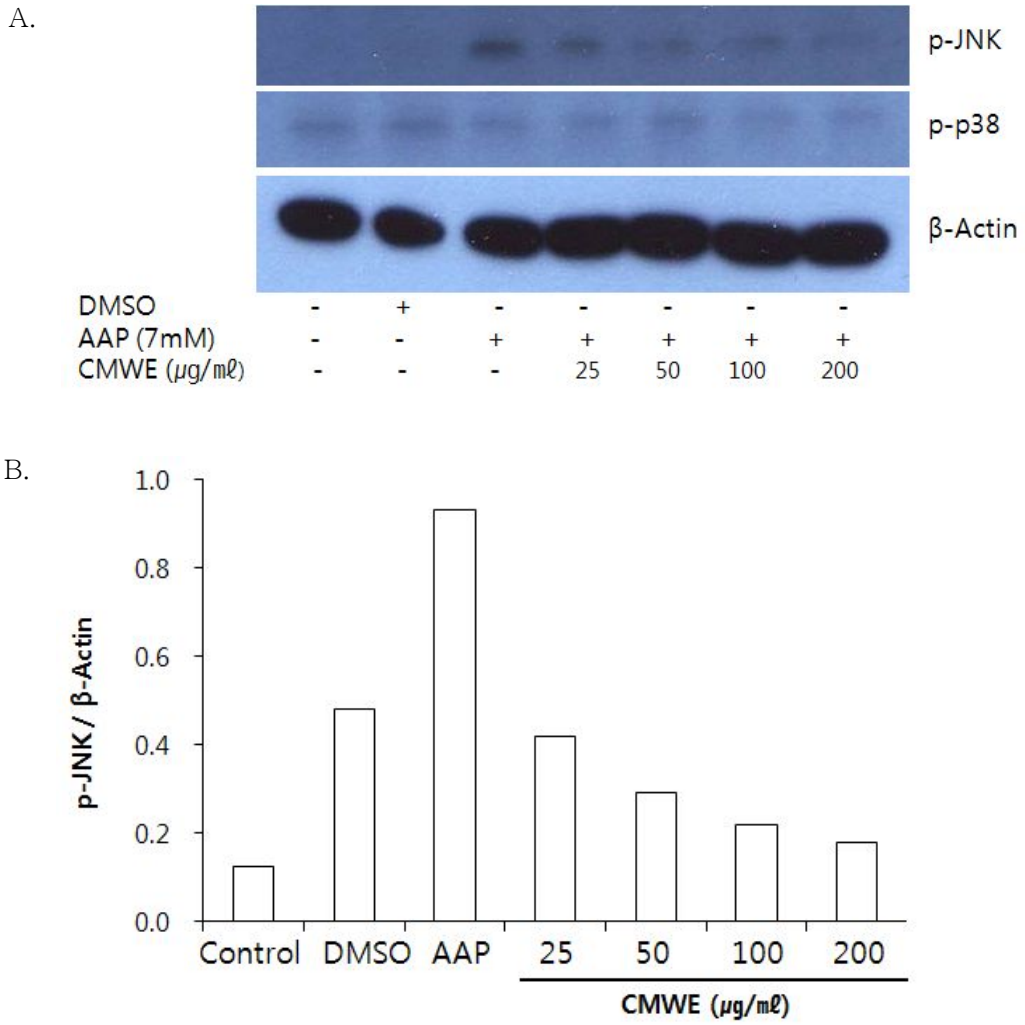


Fig. 36. 번데기동충하초 추출물(CMWE)이 JNK 및 p38 활성에 미치는 영향.

(15) 번데기동충하초 추출물(CMWE)이 acetaminophe 에 의한 간손상을 치료하는 signal pathway의 설명자료

요약하자면, 본연구에서는 정상 간세포(Chang liver cell)에서 간독성 유발물질인 AAP(Acetoaminophen)의 투여에 의해, 세포주기(cell cycle)가 정지되고, PARP 활성을 증가시켜 세포사멸(apoptosis)이 진행되는 것을 간접적으로 관찰하였다. 또한 MAPK (mitogen-activated protein kinase) 중 세포의 생존과 증식에 관여하는 ERK (extracellular signal-regulated kinase, p44/42 MAPK)의 활성을 감소시키고, 외부 스트레스(물리·화학적 자극)에 반응하는 JNK(c-Jun N-terminal kinase, SAPK/JNK)의 활성을 증가시키고, p38의 활성을 감소시키는 것으로 관찰되었다. 이러한 세포독성에 의한 세포사멸 진행에 대하여 번데기동충하초 추출물(CMWE)의 병행투여는, 세포의 생존을에 관여하는 ERK 활성을 증가시켜주고

(Fig. 35), 외부 스트레스에 관여하는 JNK 활성을 감소시키고(Fig. 36), 세포주기 정지(cell cycle arrest)를 해소하여 정상적인 세포주기로 회복((Fig. 32, Fig. 33)시켜주는 역할을 할 것으로 사료되었다. 이러한 결과는 번데기동충하초 추출물(CMWE)이 외부 자극에 의한 간세포 손상에 아주 유효한 생리활성 물질임을 알 수 있었다(Fig. 37).

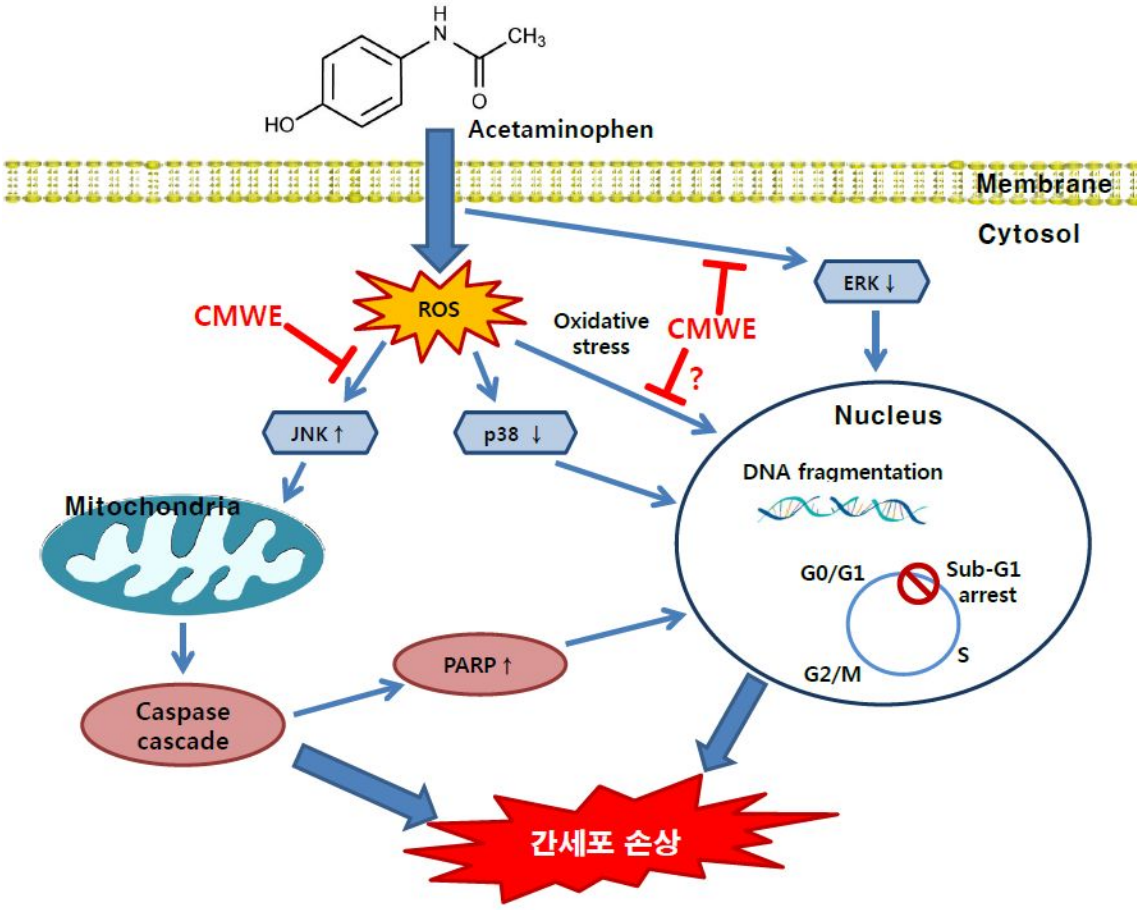


Fig. 37. Acetaminophen에 의한 간손상을 번데기동충하초 추출물(CMWE)이 치료하는 signal pathway의 설명자료.

2. 제2세부과제 연구 내용 및 결과

● 연구제목: "번데기동충하초로부터 대식세포 매개성 간염 치료 효능 평가"
● 연구책임자: 강원대 박영철 교수

가. 제2세부과제 연구 내용:

(1) 대식세포 유래 세포 독성물질 Nitric oxide(NO) 생성능 측정(CMEE, CMWE)

- 대식세포 배양 및 NO assay

마우스 대식세포주인 RAW264.7를 penicillin (100 IU/㎖) 및 streptomycin (100 ㎍/㎖)과 10%의 FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지를 이용해서 1×10^6cell/㎖의 농도로 조절한 후, 96-well plate에 접종하고, 5% CO2 및 37℃에서 18시간 동안 전배양하였다 (Cho et al., Eur. J. Pharmacol. 398: 399-407, 2000). 이후 배지를 제거하고 4배 농도로 조제된 시험물질 50㎕(최종농도 CME - 12.5, 25, 50, 100, 200, 400㎍/㎖, CMWE - 1.5625, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200㎍/㎖)와 50㎕의 LPS (최종농도 1㎍/㎖) 함유 배지를 동시에 처리하여 배양하였다. 24시간 후 상층액을 100㎕씩 또 다른 96-well plate에 옮기고 NO 정량은 Griess 용액 (0.5% naphthylethylenediamine dihydrochloride, 5% sulfanilamide, 25% H_3PO_4)을 이용하여 실시하였다. 표준물질로 sodium nitrite (0에서 100μM) 를 사용하여 검량선을 작성하였다.

(2) 대식세포주에서 세포 생존률(cell viability) 측정

- MTT assay

세포성 면역활성 효과를 검증하기 위한 선행실험으로서, 번데기 동충하초 에탄올 추출물(CME) 및 번데기 동충하초 물 추출물(CMWE) 이 나타내는 세포생존에 미치는 효과를 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphinyltetrazolium bromide) assay법을 이용하여 분석하였다(Cho et al., Eur. J. Pharmacol. 398; 399-407, 2000). 96-well plate에 1×10^6의 세포를 plating하고 37℃에서 각 면역실험 조건에 상응하는 배양시간 동안 CO_2 incubator에서 배양한다. 이후 10㎕ MTT 용액(stock concentration : 5㎎/㎖)을 첨가하고 3시간 동안 추가반응을 유도하였다. 반응 종료 및 formazan crystal 용해를 위해 각 well에 100㎕ MTT stopping solution(10% Sodium dodecyl sulfate in 0.01M HCl)을 추가적으로 첨가하였다. 세포 생존율은 MTT가 formazan으로 환원된 양을 570nm에서 흡광도를 측정하여 얻어진 OD 값을 통해 산출하였다.

(3) 대식세포의 탐식작용 assay

Mouse 대식세포주인 RAW264.7을 penicillin (100 IU/㎖) 및 streptomycin (100㎍/㎖)과 10%의 FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지를 이용해서 1×10^6cell/㎖의 농도로 조절한 후, 12-well plate에 접종하고, 5% CO_2 및 37℃에서 18시간 동안 전배양하였다(Cho et al., Eur. J. Pharmacol. 398: 399-407, 2000). 이후 배지를 제거하고 새 배지 800㎕로 교체해준 후 5배 농도로 조제된 시험물질 200㎕를 처리하여 배양하였다. 6시간 후 상층액을 제거하고 빛을 차단한 상태에서 5% FBS를 포함한 PBS에 FITC-dextran을 1㎎/㎖로 조제하여 1㎖ 처리하고 배양하였다. 이 이후의 실험은 모두 빛을 차단한 상태에서 진행한다. 30분 후 FITC-dextran을 제거

하고 PBS로 4-5회 세척한 뒤 세포를 모아 3.7% formaldehyde로 고정시킨 후 Flow cytometry를 통해 형광정도를 측정하였다.

(4) Th1/Th2 분화 조절 효과 평가

Balb/c mouse로부터 무균조작으로 spleen을 적출하고 주사기를 이용하여 차가운 RPMI 1640 배지로 splenocyte를 분리하였다. 분리된 splenocyte를 원심분리로 모은 후 0.83% ammonium chloride-20mM Tris buffer (pH 7.4)를 이용하여 적혈구를 용해시켰다. 다시 Hanks' balanced salts solution 및 RPMI 1640 배지로 3회 세척 후 10% FBS 함유 RPMI 1640 배지를 이용하여 세포를 1×10^7cells/㎖ 농도로 96-well plates에 접종한다. 여러 농도의 시료와 Concanavaline A(ConA)를 10㎍/㎖의 농도로 동시에 처리하고 48시간 동안 배양하였다. 그 후 상층액을 채취하여 MTT assay를 통해 T 세포 분화능을 확인하였다.

(5) 번데기동충하초 유래 분획의 간 유래 대식세포의 염증반응 조절능 평가를 위한 간염모델 확립

밀리타리스 동충하초가 대식세포 매개성 간염에 관한 치료효과가 있는지를 확인하기 위해, 대식세포 활성유도 물질인 LPS를 이용하여 생쥐간염모델을 정립하였다. 특별히 LPS에 의한 간염 발생빈도가 크지 않기 때문에 간대사 장애 유도 물질인 D-galactosamine 병용 처리하여 각 조건에서 유발되는 간염발생 상태를 비교하여 보았다. 이를 위해 PBS로 조제된 1㎎/㎏ 농도의 LPS 혹은 10㎍/㎖ 및 600㎎/㎏로 조제된 각 약물들을 혼합하여 6 주령된 25g 정도되는 생쥐의 복강에 투여하였다. 24시간 후 각 생쥐들을 희생시킨 후 복부정맥으로부터 혈액을 채취하여 혈청을 준비하고 간을 적출하여 PBS에 세척한 후 냉동 보관하였다. 간 기능 평가는 간 유래 효소인 AST, ALT 및 LDH를 준비된 혈청으로부터 측정하여 확인하였다. 실험방법의 적정성을 확보하기 위해 현재 가장 많이 알려진 추출물 유래 항염증 치료제인 스티렌[애엽추출물 (Aa-EE)]을 대조약물로하여 간염치료 효과를 검증하였다.

(6) 간 유래 대식세포(쿠퍼세포) 매개성 간염 모델에서 염증조절 효능 평가

(가) 번데기 동충하초 유래 cordycepin의 염증조절 효능평가

① 대식세포 유래 세포독성물질 nitric oxide (NO) 생성능 측정:

마우스 대식세포주인 RAW264.7를 penicillin (100 IU/㎖) 및 streptomycin (100㎍/㎖)과 10%의 FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지를 이용해서 1×10^6cell/㎖의 농도로 조절한 후, 96-well plate에 접종하고, 5% CO_2 및 37℃에서 18시간 동안 전배양하였다 (Cho et al., Eur. J. Pharmacol. 398: 399-407, 2000). 이후 배지를 제거하고 4배 농도로 조제된 시험물질 50㎕와 50 ㎕의 LPS (최종농도 2㎍/㎖) 함유 배지를 동시에 처리하여 배양하였다. 24시간 후 상층액을 100㎕씩 또 다른 96-well plate에 옮기고 NO 정량은 Griess 용액 (0.5% naphthylethylenediamine dihydrochloride, 5% sulfanilamide, 25% H_3PO_4)을 이용하여 실시하였다. 표준물질로 sodium nitrite (0에서 100μM) 를 사용하여 검량선을 작성하였다.

② 대식세포주에서 세포 생존률(cell viability) 실험:

세포성 면역활성 효과를 검증하기 위한 선행실험으로서, 번데기 동충하초 추출물이 나타내는 세포생존에 미치는 효과를 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphinyltetrazolium

bromide) assay법을 이용하여 분석하였다. (Cho et al., Eur. J. Pharmacol. 398; 399-407, 2000) 96-well plate에 1×10^6의 세포를 plating하고 37℃에서 각 면역실험 조건에 상응하는 배양시간 동안 CO_2 incubator에서 배양한다. 이후 10㎕ MTT 용액 (stock concentration : 5㎎/㎖)을 첨가하고 3시간 동안 추가반응을 유도하였다. 반응 종료 및 formazan crystal 용해를 위해 각 well에 100㎕ MTT stopping solution (10% Sodium dodecyl sulfate in 0.01M HCL)을 추가적으로 첨가하였다. 세포 생존율은 MTT가 formazan으로 환원된 양을 570nm에서 흡광도를 측정하여 얻어진 OD 값을 통해 산출하였다.

③ Cordycepin의 염증 조절 효소 PKBα kinase 활성저해효과 평가:

Kinase assay 결과 역시 cordycepin를 처리한 군과 control로써 DMSO만 처리한 군을 비교해 보았을 때 PKBα kinase activity가 cordycepin을 처리했을 때 감소함을 wild type에서 비교하였다.

④ Cordycepin의 PKBα kinase 활성 억제 저해 기전연구:

Cordycepin이 PKB의 어떤 아미노산 부분과 결합하는지를 확인하기 위해 Akt mutant form을 이용하여 kinase assay를 수행하였다.

⑤ Cordycepin의 p70S6K kinase assay 실험:

대사성(비알코올성) 지방간은 간 조직에 지방이 많이 끼여 있는 것으로 우리나라와 선진국에서 흔한 간질환이다. 그래서 대사성 지방간은 인슐린 저항성을 비롯한 각종 만성 대사장애를 유발해 정상적인 간 기능을 방해한다. 만성화될 경우 간염이나 간경화로 발전한다. 그래서 간염 및 간경화에 중요한 기능을 나타내는 것으로 알려진 p70S6 kinase(p70S6K)에 관한 cordycepin의 저해효과를 측정하여 보았다.

⑥ Cordycepin의 PDK1 kinase assay 실험:

Akt(PKB)는 phosphoinositide-dependent protein kinase(PDK1)에 의해 인산화 된다고 연구되어 있다. Cordycepin이 PDK1의 활성을 저해하는지 조사하여보았다.

⑦ Cordycepin의 PKA kinase assay 실험:

Protein kinase A(PKA)는 cAMP-dependent protein kinase로 간세포에서 매우 높게 활성화 상태가 유지되고 있으면 간염발생과도 관련있는 것으로 보고되어져 있다. 따라서 cordycepin이 PKA의 효소 활성을 저해하는지 조사하여 보았다.

나. 제 2세부과제 연구결과:

(1) 면역세포활성 억제효과 평가

(가) 번데기 동충하초 에탄올 추출물

① 대식세포 유래 세포독성물질 nitric oxide(NO) 생성능 측정

마우스 대식세포주인 RAW264.7를 penicillin(100IU/㎖) 및 streptomycin(100㎍/㎖)과 10%의 FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지를 이용해서 1×10^6cell/㎖의 농도로 조절한 후, 96-well plate

에 접종하고, 5% CO_2 및 37℃에서 18시간 동안 전배양하였다(Cho et al., Eur. J. Pharmacol. 398: 399-407, 2000). 이후 배지를 제거하고 4배 농도로 조제된 시험물질 50㎕와 50㎕의 LPS (최종농도 1㎍/㎖) 함유 배지를 동시에 처리하여 배양하였다. 24시간 후 상층액을 100㎕씩 또 다른 96-well plate에 옮기고 NO 정량은 Griess 용액(0.5% naphthylethylenediamine dihydrochloride, 5% sulfanilamide, 25% H_3PO_4)을 이용하여 실시하였다. 표준물질로 sodium nitrite (0에서 100μM)를 사용하여 검량선을 작성하였다. RAW264.7 세포에 번데기 동충하초 에탄올 추출물을 농도별로 처리한 결과, LPS만을 처리한 대조군과 비교하여 NO의 생성량이 농도 의존적으로 감소하였다(Figure 1).

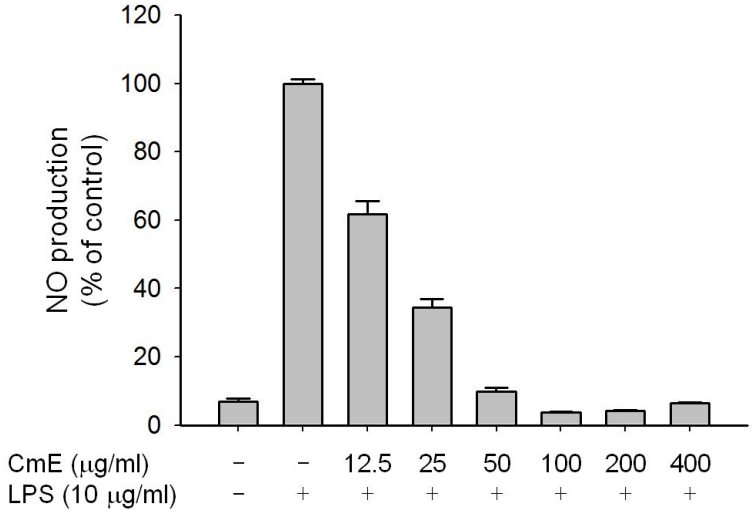


Figure 1. Effect of *Cordyceps millitaris* ethanol extract on NO production.

② 대식세포주에서 세포 생존률(cell viability) 실험 결과

세포성 면역활성 효과를 검증하기 위한 선행실험으로서, 번데기 동충하초 에탄올 추출물이 나타내는 세포생존에 미치는 효과를 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 - diphinyl-tetrazolium bromide) assay법을 이용하여 분석하였다. 96-well plate에 1×10^6의 세포를 plating 하고 37℃에서 각 면역실험 조건에 상응하는 배양시간 동안 CO_2 incubator에서 배양한다. 이후 10㎕ MTT 용액 (stock concentration : 5㎎/㎖)을 첨가하고 3시간 동안 추가반응을 유도하였다. 반응 종료 및 formazan crystal 용해를 위해 각 well에 100㎕ MTT stopping solution (10% Sodium dodecyl sulfate in 0.01M HCL)을 추가적으로 첨가하였다. 세포 생존율은 MTT가 formazan으로 환원된 양을 570nm에서 흡광도를 측정하여 얻어진 OD 값을 통해 산출하였다. RAW264.7 세포에 번데기 동충하초 에탄올 추출물을 농도별로 처리한 결과, 25㎍/㎖ 이상의 농도에서 높은 수준의 세포 사멸이 유도되었다(Figure 2). 낮은 농도의 실험군에서도 높은

수준의 세포사멸이 유도되었기 때문에, 번데기 동충하초 물 추출물(CMWE)을 사용하여 실험을 진행하였다.

(나) 번데기 동충하초 물 추출물

① 대식세포 유래 세포독성물질 nitric oxide(NO) 생성능 측정

RAW264.7 세포에 번데기 동충하초 물 추출물을 농도별로 처리한 결과, LPS만을 처리한 대조군과 비교하여 NO의 생성량이 감소하지 않았다(Figure 3).

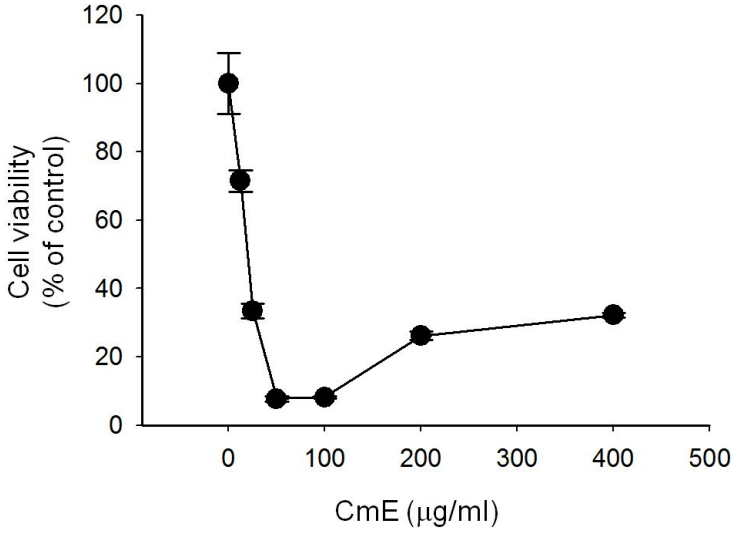


Figure 2. Effect of *Cordyceps millitaris* ethanol extract on cell viability.

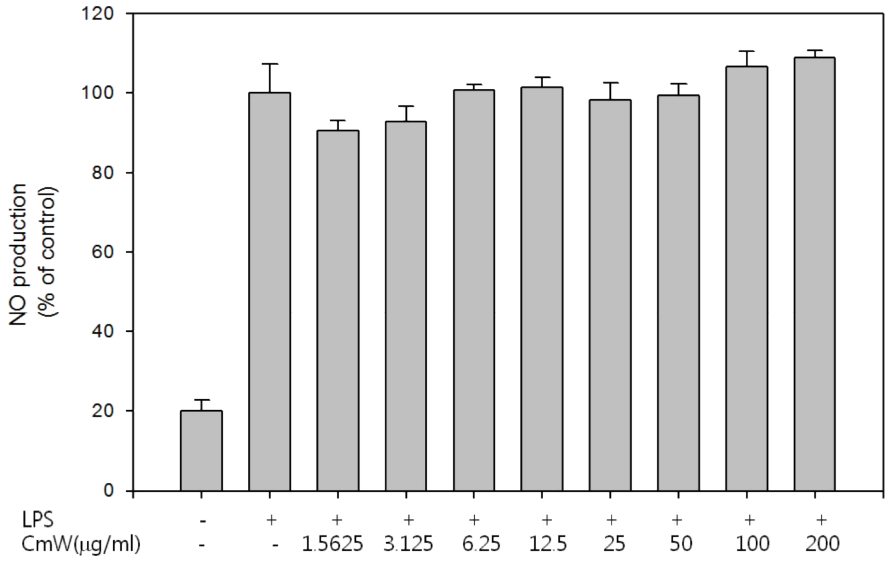


Figure 3. Effect of *Cordyceps millitaris* water extract on NO production.

②) 대식세포주에서 세포 생존률(cell viability) 실험 결과

RAW264.7 세포에 번데기 동충하초 물 추출물을 농도별로 처리한 결과, 모든 실험군에서 세포 사멸이 일어나지 않았다(Figure 4).

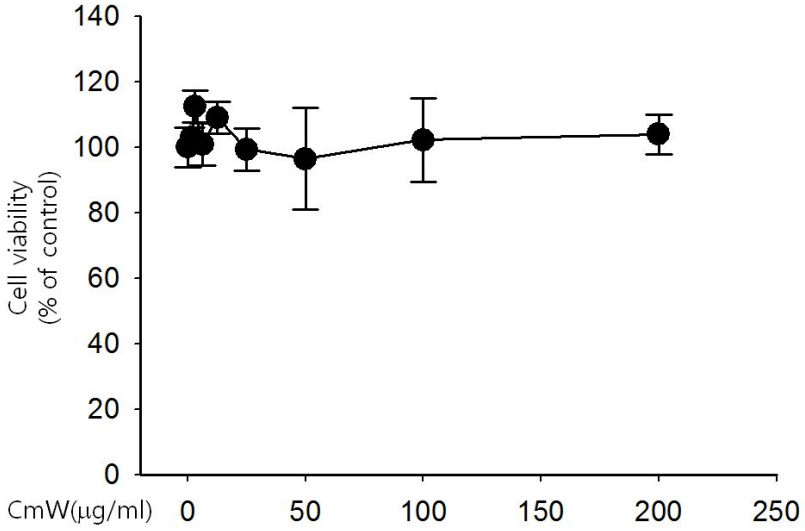


Figure 4. Effect of *Cordyceps millitaris* water extract on cell viability.

③ 대식세포의 탐식작용 assay

Mouse 대식세포주인 RAW264.7을 penicillin(100IU/㎖) 및 streptomycin(100㎍/㎖)과 10%의 FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지를 이용해서 1×10^6cell/㎖의 농도로 조절한 후, 12-well plate에 접종하고, 5% CO_2 및 37℃에서 18시간 동안 전배양하였다(Cho et al., Eur. J. Pharmacol. 398: 399-407, 2000). 이후 배지를 제거하고 새 배지 800㎕로 교체해준 후 5배 농도로 조제된 시험물질 200㎕를 처리하여 배양하였다. 6시간 후 상층액을 제거하고 빛을 차단한 상태에서 5% FBS를 포함한 PBS에 FITC-dextran을 1㎎/㎖로 조제하여 1㎖ 처리하고 배양하였다. 이 이후의 실험은 모두 빛을 차단한 상태에서 진행한다. 30분 후 FITC-dextran을 제거하고 PBS로 4-5회 세척한 뒤 세포를 모아 3.7% formaldehyde로 고정시킨 후 Flow cytometry를 통해 형광정도를 측정하였다. RAW264.7 세포에 번데기 동충하초 물 추출물을 농도별로 처리한 결과 농도 의존적으로 식세포작용 활성이 최대 약 20% 감소하는 것으로 나타났다(Figure 5-A and 5-B).

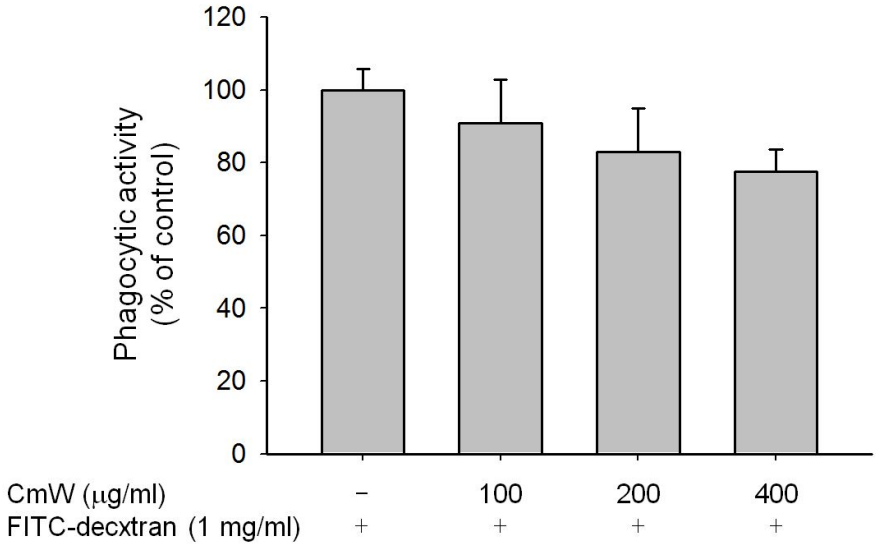


Figure 5-A. Effect of *Cordyceps millitaris* water extract on phagocytic activity.

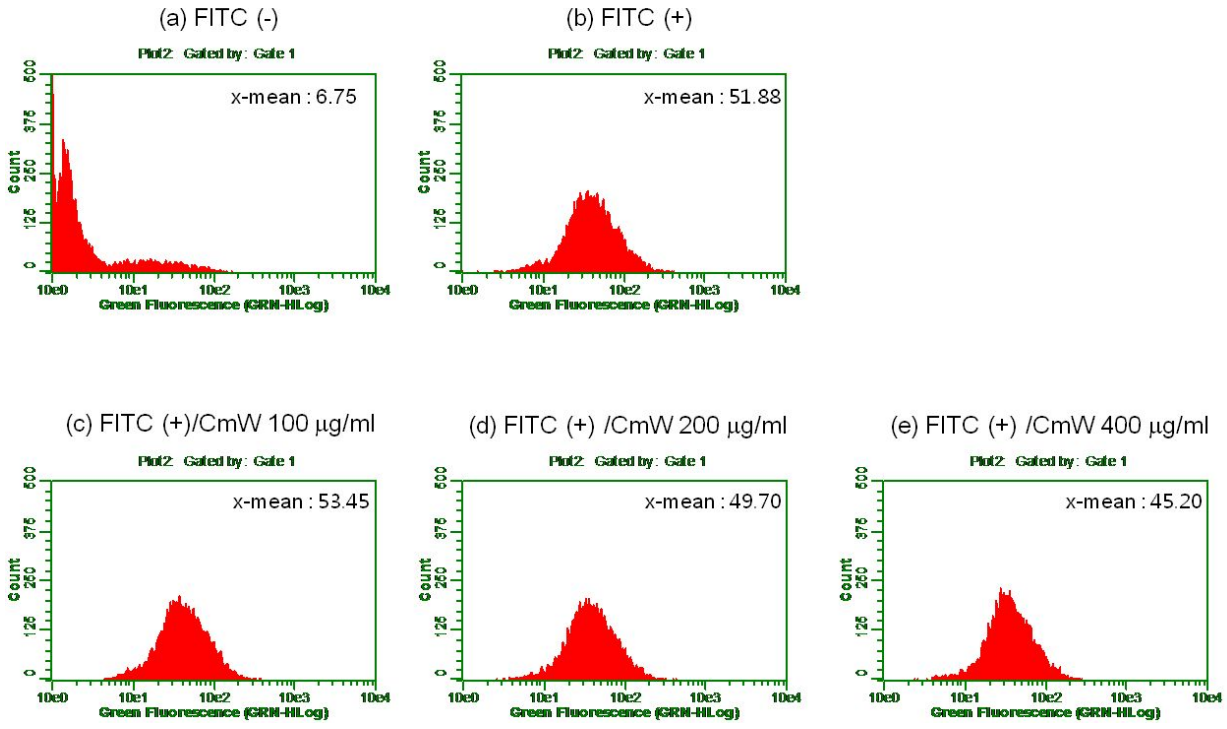


Figure 5-B. Effect of *Cordyceps millitaris* water extract on phagocytic activity.

④ Th1/Th2 분화 조절 효과 평가

Balb/c mouse로부터 무균조작으로 spleen을 적출하고 주사기를 이용하여 차가운 RPMI 1640 배지로 splenocyte를 분리하였다. 분리된 splenocyte를 원심분리로 모은 후 0.83% ammonium chloride-20mM Tris buffer (pH 7.4)를 이용하여 적혈구를 용해시켰다. 다시 Hanks' balanced salts solution 및 RPMI 1640 배지로 3회 세척 후 10% FBS 함유 RPMI 1640 배지를 이용하여 세포를 1×10^7cells/㎖ 농도로 96-well plates에 접종한다. 여러 농도의 시료와 Concanavaline A(ConA)를 10㎍/㎖의 농도로 동시에 처리하고 48시간 동안 배양하였다. 그 후 상층액을 채취하여 MTT assay를 통해 T 세포 분화능을 확인하였다. Stimuli를 처리하지 않은 군과 각각의 Stimuli를 처리한 군을 비교하였을 때, T 세포로의 분화능이 확연하게 감소된 것을 확인할 수 있다. 특히 가장 낮은 농도인 100㎍/㎖로 CMWE를 처리한 군에서도 강력한 T 세포 분화 억제 활성을 볼 수 있다. 이러한 현상들은 CMWE 분획이 T 세포의 분화능을 억제하고 그로 인한 각종 사이토카인의 분비를 감소시킴으로써 T 세포에 의해 활성화 되는 비만세포의 기능을 억제한다고 추론할 수 있다(Figure 6).

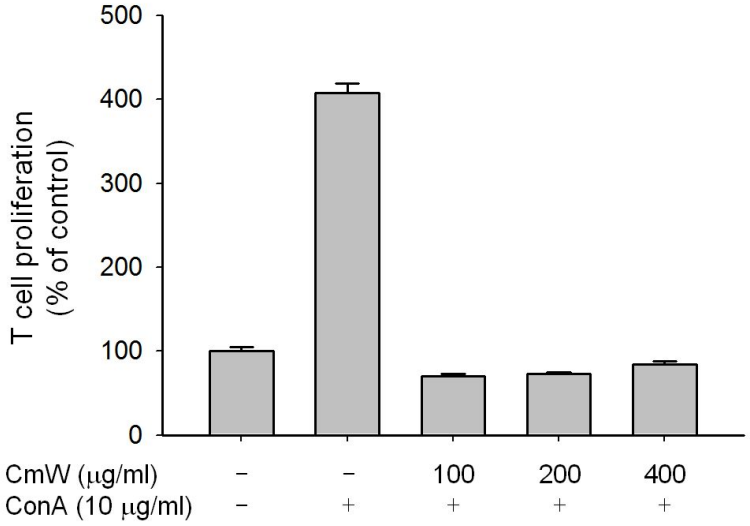


Figure 6. Effect of *Cordyceps millitaris* water extract on T cell proliferation.

(2) 간염모델 확립

(가) 연구 수행 방법

밀리타리스 동충하초가 대식세포 매개성 간염에 관한 치료효과가 있는지를 확인하기 위해, 대식세포 활성유도 물질인 LPS를 이용하여 생쥐간염모델을 정립하였다. 특별히 LPS에 의한 간염 발생 빈도가 크지 않기 때문에 간대사 장애 유도 물질인 D-galactosamine 병용 처리하여 각 조건에서 유발되는 간염발생 상태를 비교하여 보았다. 이를 위해 PBS로 조제된 1㎎/㎏ 농도의 LPS 혹은 10 ㎍/㎖ 및 600㎎/㎏로 조제된 각 약물들을 혼합하여 6 주령된 25g 정도되는 생쥐의 복강에 투여하였

다. 24시간 후 각 생쥐들을 희생시킨 후 복부정맥으로부터 혈액을 채취하여 혈청을 준비하고 간을 적출하여 PBS에 세척한 후 냉동 보관하였다(Figure 7). 간 기능 평가는 간 유래 효소인 AST, ALT 및 LDH를 준비된 혈청으로부터 측정하여 확인하였다. 실험방법의 적정성을 확보하기 위해 현재 가장 많이 알려진 추출물 유래 항염증 치료제인 스티렌[애엽추출물 (Aa-EE)]을 대조약물로 하여 간염치료 효과를 검증하였다(Figure 8).

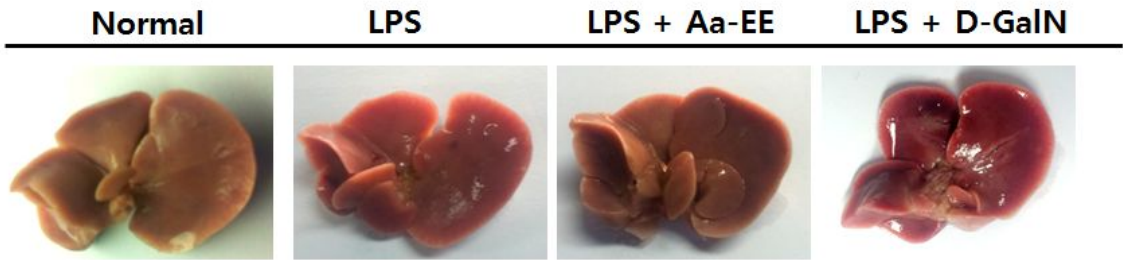


Figure 7. Photos of liver treated with LPS or LPS/D-galactosamine.

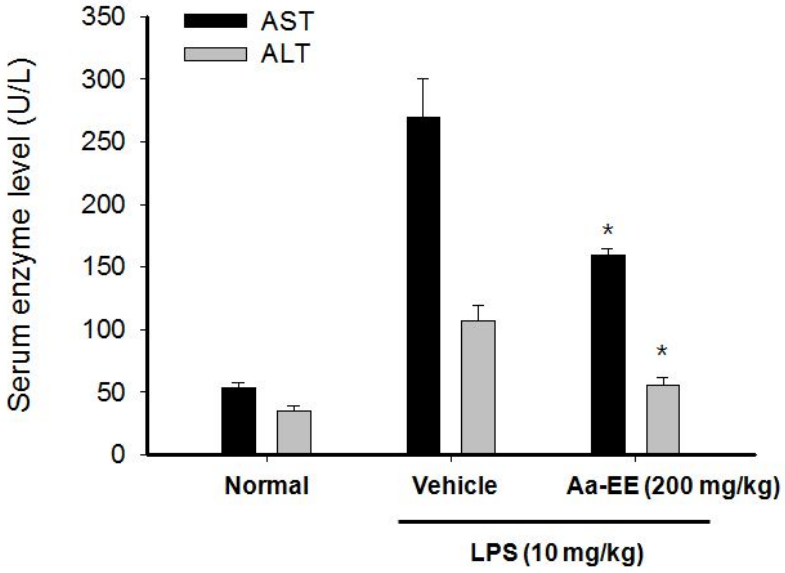


Figure 8. Serum levels of ALT and AST under LPS treated condition in mice.

또한 발생된 간염이 대식세포 매개에 의해 진행되는지를 확인하기 위해 LPS에 의해 처리된 대식세포로부터 활성화되어 있는 여러 염증 조절 단백질들의 발현을 웨스턴 법을 이용하여 검토하여 보았다. 웨스턴 블롯은 아래와 같이 진행하였다. 간조직을 lysis buffer를 이용하여 용해시킨 후 세포질 단백질을 12,000×g에서 15분간 원심 분리한다. 그 후 동일한 양의 단백질을 10% SDS-polyacrylamide gels에서 전기영동하고 Wet-blotting transfer 방법을 이용하여 PVDF

membranes으로 단백질을 transfer한다. Membrane을 5% skim milk를 포함하는 blocking buffer에서 반응시킨 후 특정 단백질에 특이한 1차 항체를 4℃에서 하루 동안 반응시켰다. 이후 2차 항체를 적용한 다음 ECL chemiluminescence로 반응 정도를 확인하였다(Figure 9).

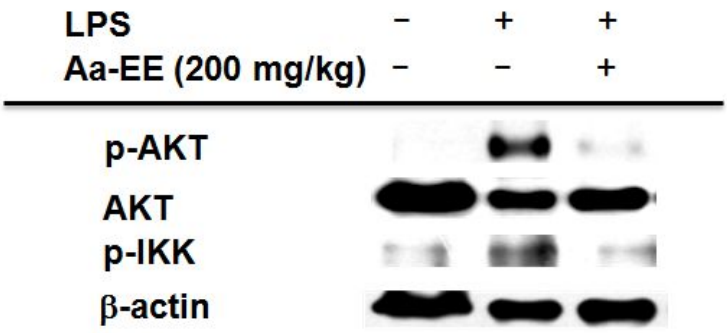


Figure 9. The phosphorylated levels of Akt and IKK from LPS-treated liver.

상기와 같은 방법으로 번데기동충하초 물 추추물의 LPS 유도 간염 치료효과를 검정하여 보았다. Figure 10의 결과에서처럼 번데기동충하초 ALT 및 AST 둘다 감소시키는 경향을 보였다. 다만 애엽처럼 강력한 억제효과를 나타내지는 않았다.

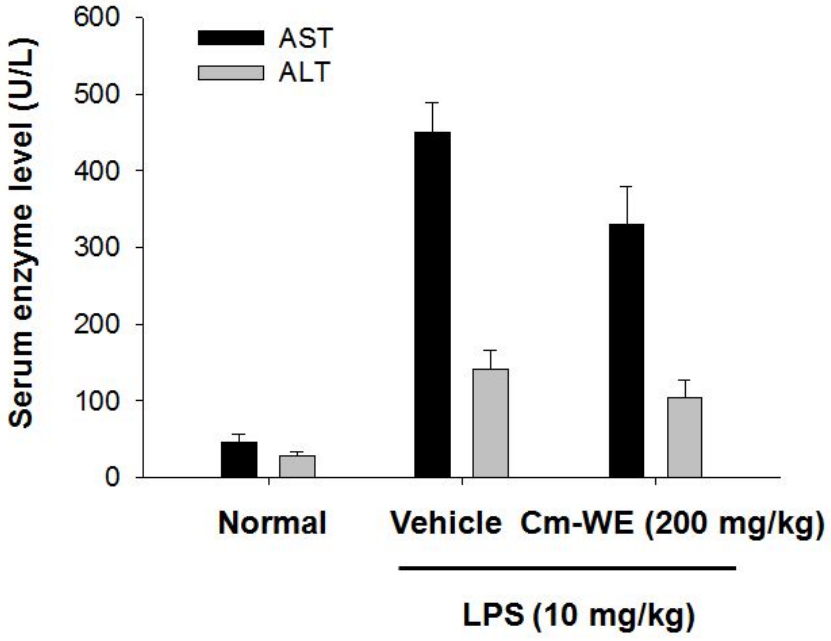


Figure 10. Effect of Cordyceps millitaris extract on serum ALT and AST in mice.

(3) 간 유래 대식세포(쿠퍼세포) 매개성 간염 모델에서 염증조절 효능 평가

(가) 번데기 동충하초 유래 Cordycepin의 염증조절 효능평가

① 대식세포 유래 세포독성물질 nitric oxide(NO) 생성능 측정

RAW264.7 세포에 번데기 동충하초 추출물을 농도별로 처리한 결과, LPS만을 처리한 대조군과 비교하여 NO의 생성량이 농도 의존적으로 감소하였다(Figure 11).

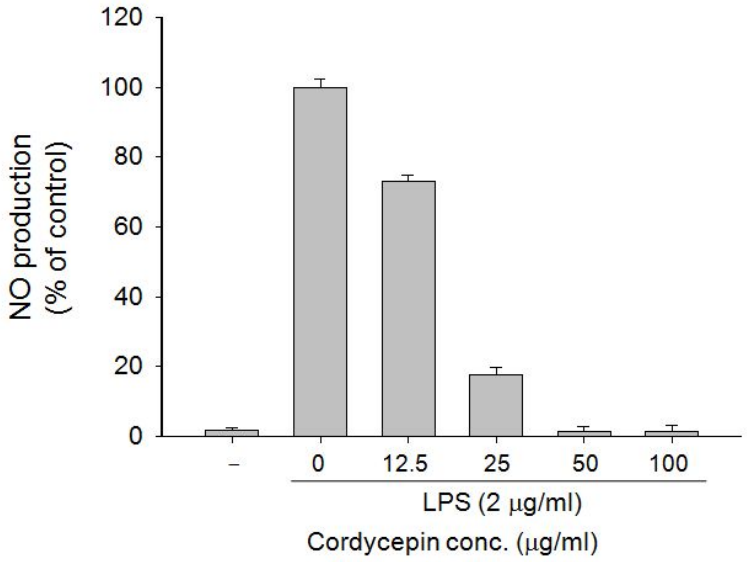


Figure 11. Effect of cordycepin on NO production.

② 대식세포주에서 세포 생존률(cell viability) 실험 결과

RAW264.7 세포에 번데기 동충하초 에탄올 추출물을 농도별로 처리한 결과, 25㎍/㎖ 이상의 농도에서 높은 수준의 세포 사멸이 유도되었다. 따라서 이후 cordycepin의 염증 억제효능은 25㎍/㎖ 이하의 농도에서 진행하였다(Figure 12).

③ Cordycepin의 염증 조절 효소 PKBα kinase 활성저해효과 평가

Kinase assay 결과 역시 cordycepin를 처리한 군과 control로써 DMSO만 처리한 군을 비교해 보았을 때 PKBα kinase activity가 cordycepin을 처리했을 때 감소함을 wild type에서 비교할 수 있었다(Figure 13).

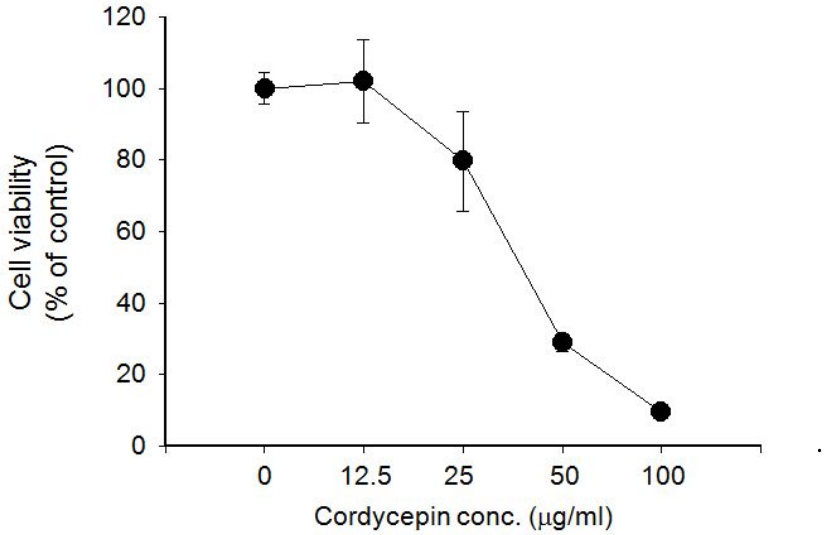


Figure 12. Effect of cordycepin on the viability of macrophages.

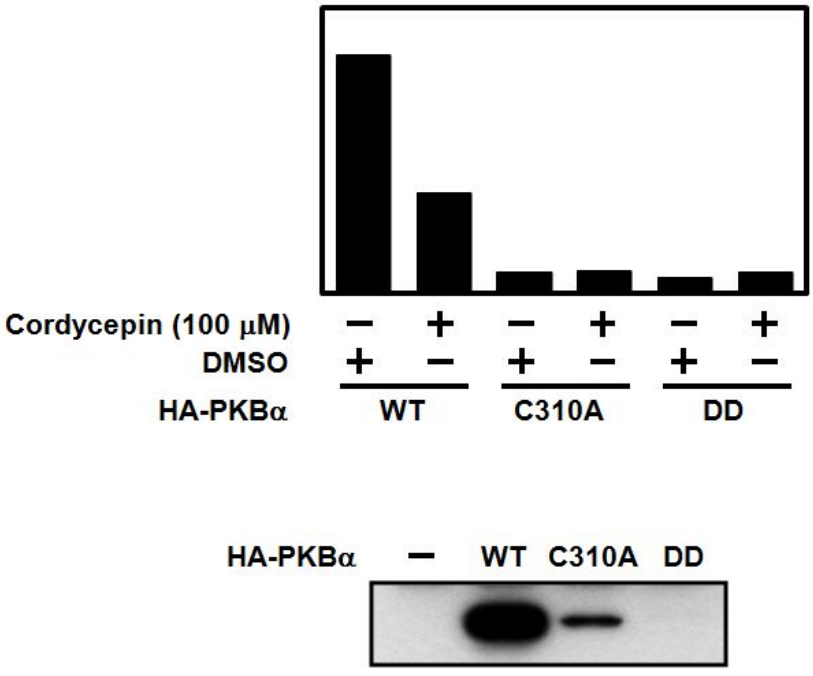


Figure 13. Effect of cordycepin on PKBα kinase activity.

④ Cordycepin의 PKBα kinase 활성 억제 저해 기전연구

Cordycepin이 PKB의 어떤 아미노산 부분과 결합하는지를 확인하기 위해 Akt mutant form을 이용하여 kinase assay를 수행하였다. Figure 14에서처럼 Akt Cys300에 결함하는 hydroquinonedms 억제 효과가 감소한 대신 cordycepin은 변화를 나태지 않았다. 이는 적어도 Cys300번 아미노산은 cordycepin의 활성과는 관련이 없음을 시사한다. ATP binding site에 결합하는 staurospoin과의 combination treatment에서는 kinase 활성 저해 효과가 상승되지 않았다(Figure 15). 이는 Cordycepin이 staurosporin과 함께 ATP binding site에 경쟁적으로 결합할 수 있다는 것을 시사한다.

⑤ Cordycepin의 p70S6K kinase assay 결과

대사성(비알코올성) 지방간은 간 조직에 지방이 많이 끼여 있는 것으로 우리나라와 선진국에서 흔한 간질환이다. 그래서 대사성 지방간은 인슐린 저항성을 비롯한 각종 만성 대사장애를 유발해 정상적인 간 기능을 방해한다. 만성화될 경우 간염이나 간경화로 발전한다. 그래서 간염 및 간경화에 중요한 기능을 나타내는 것으로 알려진 p70S6 kinase(p70S6K)에 관한 cordycepin의 저해효과를 측정하여 보았다. 그림에서처럼 50μM 농도에서 80%의 억제효과를 나타냈다(Figure 16).

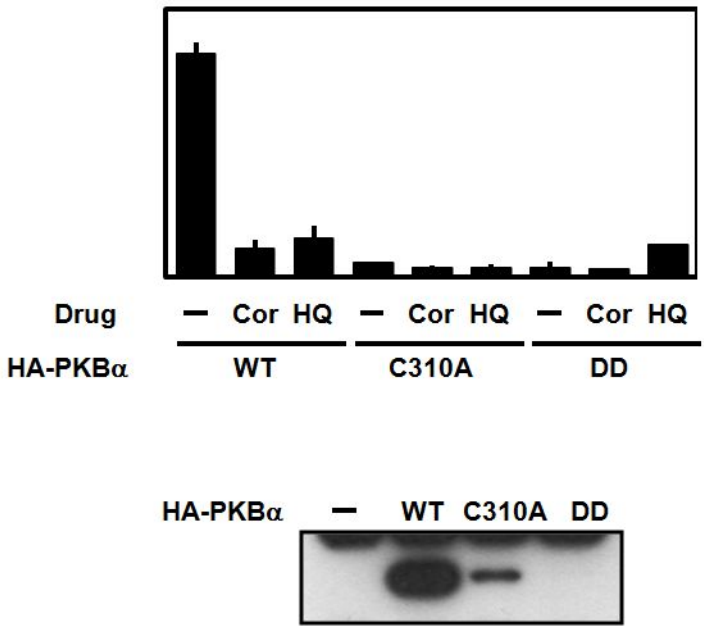


Figure 14. Effect of cordycepin and hydroquinone on the kinase activity of PKBα wild type and mutant forms.

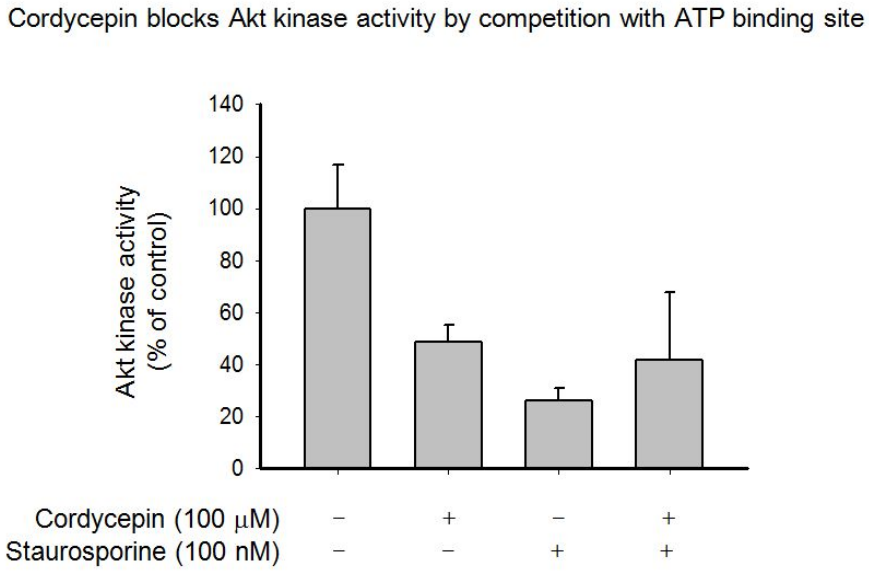


Figure 15. Combination treatment of cordycepin with staurosporin in AKt kinase assay.

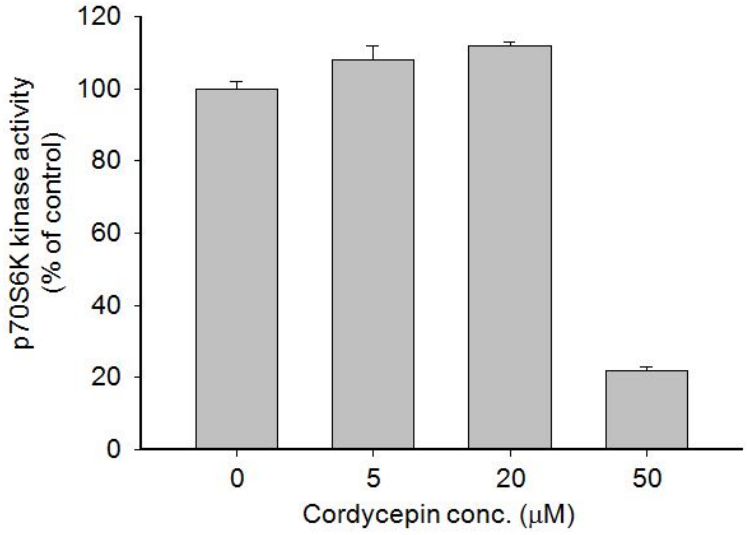


Figure 16. Effect of *Cordyceps millitaris* extract on p70S6K kinase assay.

⑥ Cordycepin의 PDK1 kinase assay 결과

Akt (PKB)는 phosphoinositide-dependent protein kinase (PDK1) 에 의해 인산화 된다고 연구되어 있다. Cordycepin이 PDK1의 활성을 저해하는지 조사하여보았다. 결과에서처럼 50㎍/㎖까지 농도의존적으로 억제경향을 보였다. 이후 100㎍/㎖까지 유사한 억제효과를 나타냈다 (Figure 17).

⑦ Cordycepin의 PKA kinase assay 결과

Protein kinase A(PKA)는 cAMP-dependent protein kinase로 간세포에서 매우 높게 활성화 상태가 유지되고 있으면 간염발생과도 관련있는 것으로 보고되어져 있다. 따라서 cordycepin이 PKA의 효소 활성을 저해하는지 조사하여 보았다. 아래 그림에서처럼 50㎍/㎖ 농도에서 75% 정도 억제 효과를 보였다(Figure 18).

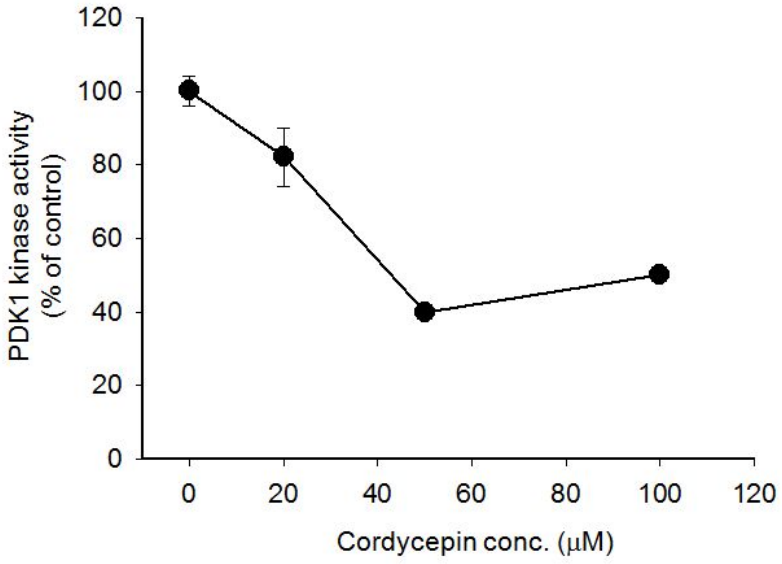


Figure 17. Effect of *Cordyceps millitaris* extract on PDK1 kinase assay.

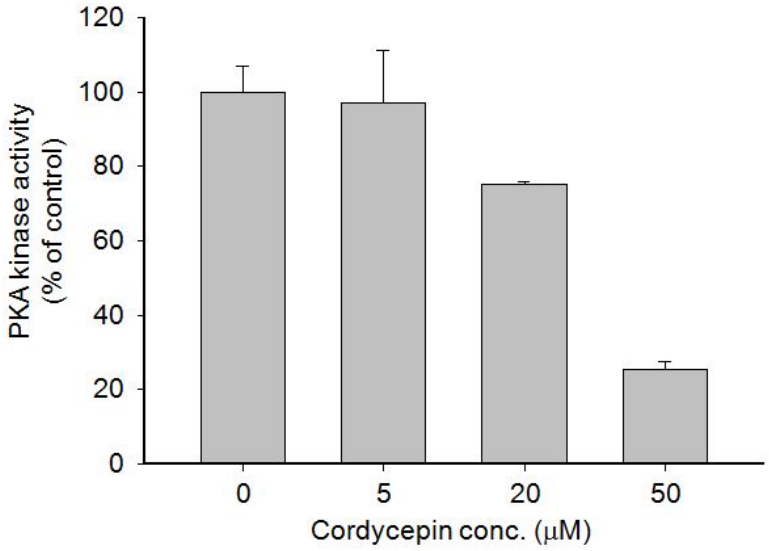


Figure 18. Effect of *Cordyceps millitaris* extract on PKA kinase assay.

3. 협동연구과제 연구 내용 및 결과

● 연구제목: "번데기동충하초로부터 간기능을 향상시키는 기능성 물질의 개발"
● 연구책임자: 한림대학교 박형진 교수

가. 번데기 동충하초로부터 유효성분의 추출 및 부분 정제

본 연구에서는 주식회사 머쉬텍에서 재배한 번데기 동충하초를 사용하였다. 건조된 번데기 동충하초의 조분말을 중량의 10배에 해당하는 증류수와 혼합하고 105℃에서 3시간 동안 가열 추출한 다음 추출액을 감압 농축하여 물 추출물(CMWE)을 얻었다.

농축된 CMWE에 2배 용량의 냉(-20℃) 에탄올을 혼합하고 -20℃에서 12시간 방치하였다. 에탄올 혼합물을 원심분리(10,000rpm, 4℃, 20min)하고 침전물을 동결건조하여 CMWE를 얻었다.

CMWE가 TAA로 유발한 간 섬유화를 억제하므로 Sephadex G-100 column을 이용하여 그 특성을 분석하는 한편 차년도 연구에서 각 peak fraction의 활성을 연구하기 위해 각 peak fraction을 회수하여 동결건조하였다.

나. 간 섬유화에 대한 번데기 동충하초 추출물의 효과

(1) 연구 방법

(가) 간 섬유화 유발

Spraque-Dawley계 흰쥐 수컷(6 주령)에게 thioacetamide(TAA)로 간 섬유화를 유발하였다.

TAA는 생리식염수에 녹인 후 200㎎/kg을 3일에 1회씩 10회 복강 주사하였다. 대조군에서는 생리식염수만을 복강 주사하였다.

(나) 번데기 동충하초 추출물 투여

TAA로 유발한 간 섬유화에 대한 번데기 동충하초 추출물(CMWE)의 억제효과를 관찰하기 위하여 CMWE를 100㎎/kg(CMWE1) 또는 200㎎/kg(CMWE2) 씩 36일간 매일 경구 투여하였다.

(다) 간의 병리조직학적 변화 분석

실험이 종료되면 흰쥐를 마취하고 간의 좌우 엽에서 각각 2개의 절편을 채취하여 10% formladehyde 용액으로 고정한 후 paraffin으로 포매하였다. 4㎛ 두께의 절편을 제작한 후 H&E(hematoxylin and eosin) 염색과 MT(Masson's trichrome) 염색을 시행하고 광학현미경을 이용하여 간 섬유화를 관찰하였다.

간 섬유화 정도를 정량적으로 나타내기 위하여 간 조직에서 섬유화의 정도를 다음과 같이 구분하고 점수화 하였다. Score 0: no fibrosis, score 1: portal fibrosis, score 2: periportal fibrosis, score 3: septal fibrosis, score 4: cirrhosis.

(라) 간에서 단백질 발현 분석

① Western blotting

액체 질소 속에 냉동 보관한 간 조직을 균질분쇄하고 단백질 량을 정량한 다음 SDS-polyacrylamide gel를 이용하여 전기영동법으로 단백질을 분리하였고, 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane에 옮겼다. Membrane을 5% skim milk로 blocking한 후, 1:1,000으로 희석된 1차 항체 anti-α-smooth muscle actin (α-SMA), anti-tissue inhibitor of metalloproteinases type I(TIMP-1), anti-tissue inhibitor of metalloproteinases type 2 (TIMP-2)를 4℃에서 하룻밤 반응시킨 뒤 2차 항체를 반응시켰다. TBST로 세척이 끝난 후 ECL system을 이용하여 단백질을 탐지했다.

② Immunohistochemistry

간 조직 절편을 파라핀 제거와 함수과정을 거친 뒤 peroxidase blocking solution으로 20분간 반응시킨 후 pepsin 처리를 하였다. 비특이 반응을 줄이기 위하여 정상 혈청으로 1시간 반응시킨 후 TBST로 세척하고 1:100으로 희석된 1차 항체 anti-TIMP-1, anti-TIMP-2를 4℃에서 하룻밤 반응시켰다. 2차 항체를 실온에서 30분간 반응시킨 후 Vectastain ABC reagent로 추가 반응시킨 뒤 Chemmate DAB kit로 반응시켜 조직절편의 갈색반응을 확인 후 수세하였다. Hematoxylin으로 대조염색 후 탈수과정을 거쳐 봉입하고 현미경으로 관찰하였다.

(2) 연구결과

(가) 번데기 동충하초 추출물에 따른 간조직의 형태학적 변화

육안 소견 상 TAA 투여군에서 간의 표면은 매끄럽지 못하고 작은 결절로 덮여 있었으며 색깔도 선분홍색이 아니었다.번데기 동충하초 추출물 투여군은 표면이 매끈하거나 다소의 결절로 덮여 있었다. 간 조직의 collagen 침착정도를 확인하기 위하여 Masson's trichrome(MT) 염

색을 실시하였다(Fig. 1).

TAA만을 투여한 동물에서는 문맥과 문맥 혹은 문맥과 중심정맥을 잇는 섬유화가 관찰되었다. 이러한 간 섬유화로 정상 간엽이 위축되거나 혹은 재생성 성장으로 팽창성 결절을 생성하고 있어 간 경변의 전형적인 형태를 관찰할 수 있었다.

TAA와 함께 번데기 동충하초 추출물을 100㎎/㎏으로 투여한 TAA+CMWE1군에서는 간문맥을 연결하는 미약한 섬유화가 관찰되었다.

TAA와 함께 CMWE를 200㎎/㎏으로 투여한 TAA+CMWE2군에서는 문맥과 문맥주위에서 섬유화가 관찰되었으나 팽창성 재생결절은 관찰되지 않았다.

(나) 간 섬유화 지수 측정

간 섬유화의 정도를 3인이 독자적으로 점수화하여 다음과 같은 결과를 얻었다(Fig. 2). 대조군의 간에서는 섬유화 징후가 전혀 관찰되지 않았으며 TAA만을 투여한 군에서는 간문맥간 사이, 혹은 간문맥과 중심정맥사이의 뚜렷한 섬유화와 결절의 형성이 관찰되어 score가 3.5±0.45를 나타내었다.

TAA와 함께 번데기 동충하초를 100㎎/㎏ 또는 200㎎/㎏으로 투여한 TAA+CMWE1, TAA+CMWE2 투여군에서 각각 score가 2.7±0.62와 2.2±0.40을 나타내었으며 TAA+CMWE2군의 score는 TAA군에 비하여 유의하게($p<0.05$) 낮았다.

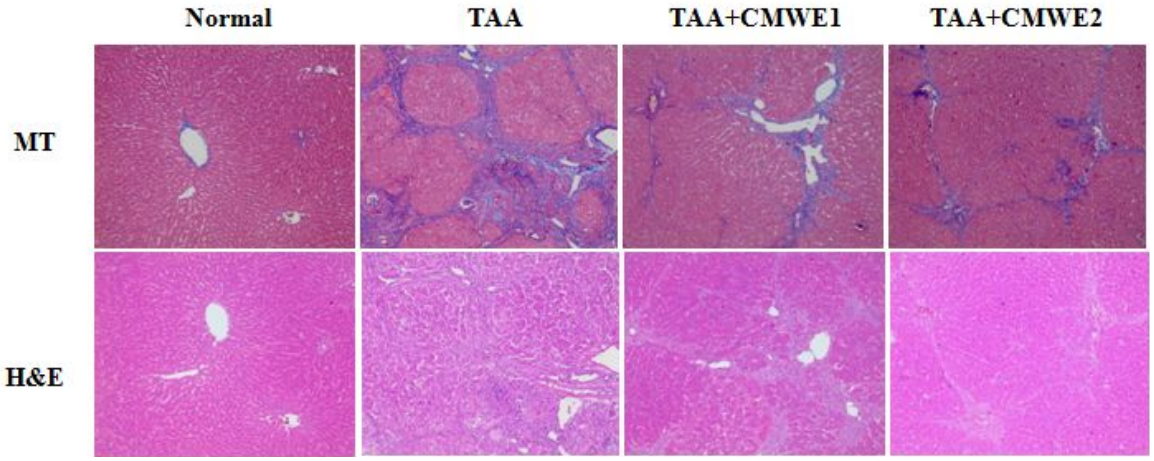


Fig. 1. 흰쥐에서 TAA로 유발한 간 섬유화에 대한 CMWE의 효과. 간조직을 Masson's trichrome staining 법을 이용하여 섬유화를 관찰한 결과 TAA는 간 경변을 유발하였으며 동충하초 추출물은 TAA의 작용을 억제하였다.

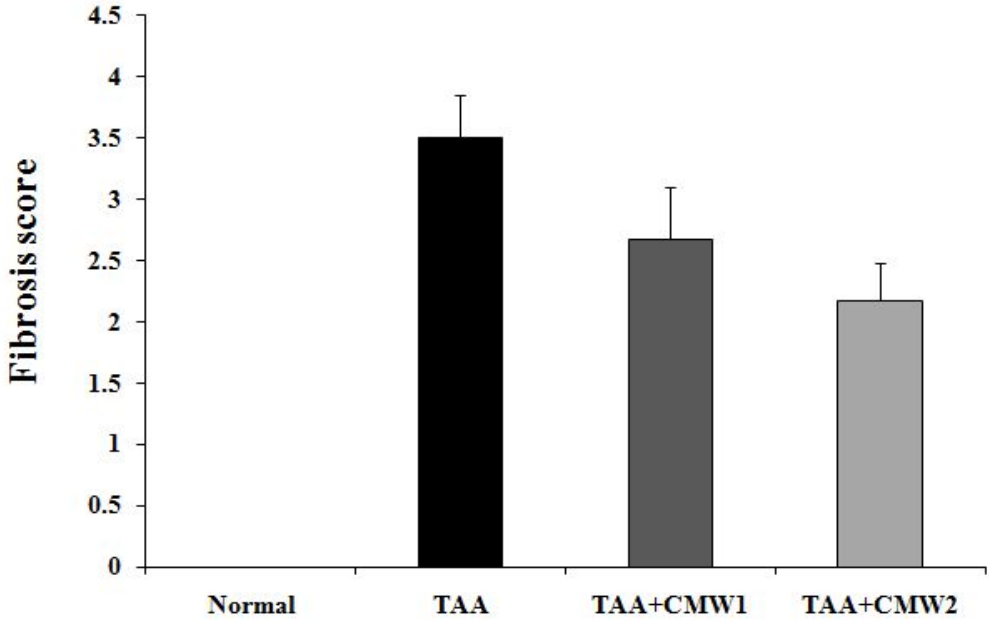


Fig. 2. 흰쥐에서 TAA로 유발한 간 섬유화 지수에 대한 CMWE의 효과. 간 조직을 Masson's trichrome 법으로 염색한 후 섬유화의 정도를 3인이 점수화 하였다.

(다) 간 조직의 TIMP-1과 TIMP-2 발현 분석: Western blot

Extracellular matix(ECM)의 주 생산 세포인 성상세포의 활성도와 ECM 분해를 억제하는 anti-tissue inhibitor of metalloproteinase(TIMP)의 발현을 측정하였다(Fig. 3).

TAA를 투여한 TAA군의 간에서 α-SMA 발현이 크게 증가하였으며 이러한 변화는 동충하초 추출물을 100㎎/㎏(TAA+CMWE1) 또는 200㎎/㎏(TAA+CMWE2) 씩 투여하면 현저히 감소하였다.

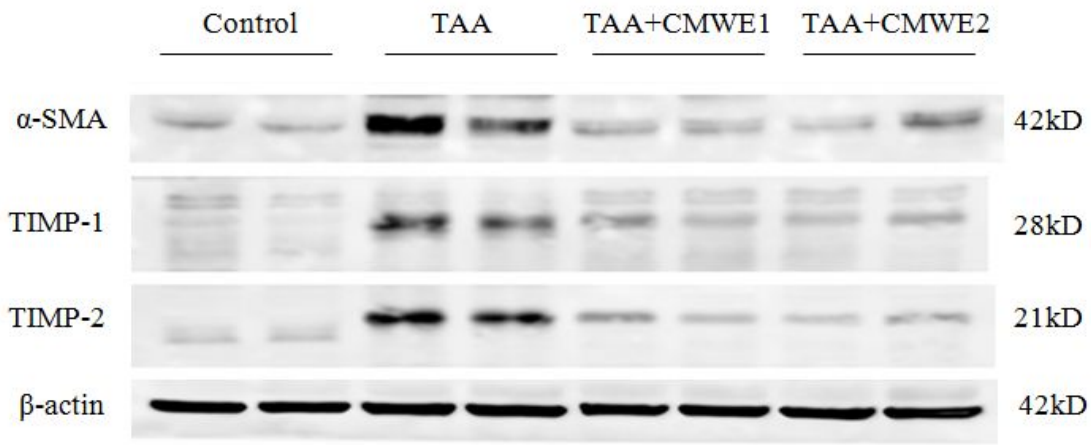


Fig. 3. 흰쥐에서 TAA로 간 섬유화가 유발된 간에서 α-SMA , TIMP-1, TIMP-2 발현에 대한 CMWE의 효과. CMWE는 TAA로 유발된 α-SMA , TIMP-1, TIMP-2 발현을 억제하였다.

또한 ECM 분해를 억제하는 단백질인 TIMP-1과 TIMP-2의 발현이 TAA군의 간에서는 크게 증가하였으며 이러한 변화는 동충하초 추출물에 의해 현저히 억제 되었다.

(라) 간 조직의 TIMP-1과 TIMP-2 발현 분석: Immunohistochemistry

간 조직에서 TIMP-1과 TIMP-2 발현에 대한 번데기 동충하초 추출물의 효과를 면역조직화학법으로 관찰하였다(Fig. 4).

TAA 투여군에서는 대조군과 비하여 TIMP-1, TIMP-2 양성인 세포수가 증가하였으며 이러한 증가는 동충하초 추출물을 100㎎/㎏(TAA+CMWE1) 또는 200㎎/㎏(TAA+CMWE2) 씩 투여하면 농도 의존적으로 억제되었다.

(마) Sephadex G-100을 이용한 CMWE의 chromatogram

CMWE의 분자적 특성을 Sephadex superfine G-100으로 gel-filtration 결과를 Fig. 5에 제시하였다. CMWE는 Sephadex superfine G-100 chromatography에서 두 개의 큰 peak로 분리되었다.

• Column matrix: Sephadex G-100, Column size: 3 x 45 cm, Fraction size: 1.5 ㎖/fraction, Mobile phase: 증류수, Wave length: 290 nm,

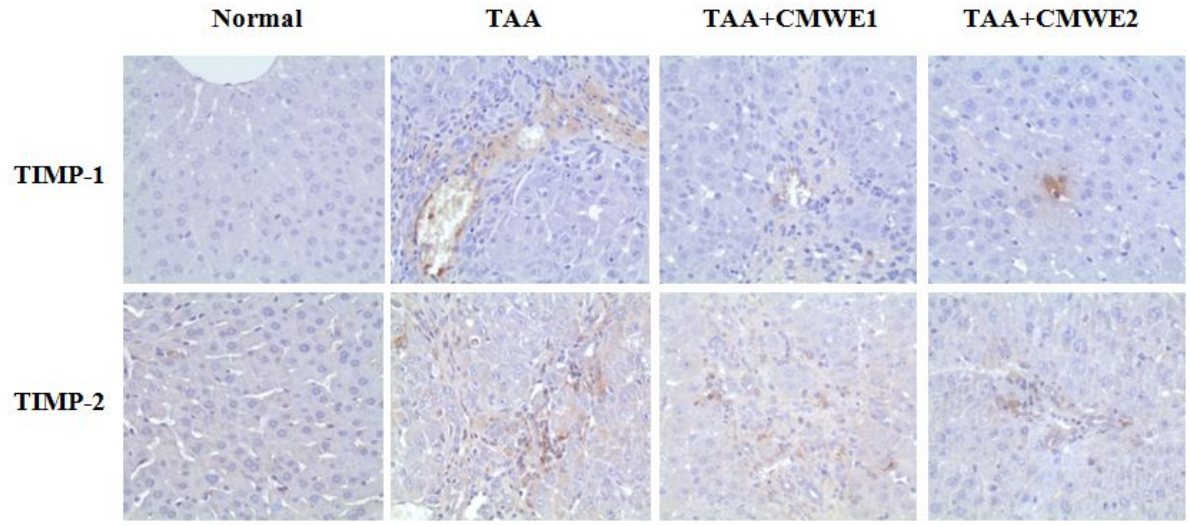


Fig. 4. 흰쥐에서 TAA로 간 섬유화가 유발된 간에서 TIMP-1, TIMP-2 발현에 대한 CMWE의 효과. CMWE는 TIMP-1과 TIMP-2 발현을 농도 의존적으로 억제하였다.

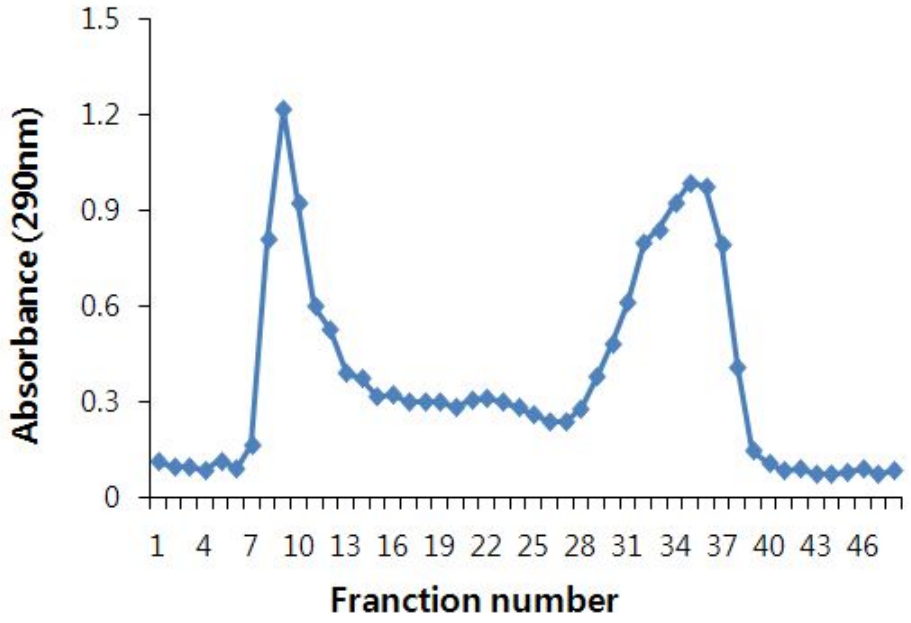


Fig. 5. CMWE의 Sephadex G-100을 이용한 gel-filtration chromatogram.

다. 지방간에 대한 번데기 동충하초 추출물의 효과

(1) 실험방법

(가) 비 알코올성 지방간 유발

5주령의 수컷 C57BL/6N 마우스를 온도(21±2℃)와 광주기(12 light/dark)가 조절되는 사육실에서 일주일간의 적응 기간을 거친 후 60% 고지방 식이를 24주간 자유급여 하여 지방간을 유발 하였다.

(나) 번데기 동충하초 추출물 투여

고지방식이로 유발한 지방간에 대한 번데기 동충하초 추출물(CMWE)의 억제효과를 관찰하기 위하여 CMWE를 12.5㎎/kg, 25㎎/kg 또는 50㎎/kg 씩 24주간 매일 경구 투여하였다.

(다) 간의 병리조직학적 변화 분석

간 조직의 일부를 액체질소에서 급속 냉동한 후 동결절편을 만들고 Oil Red O 법으로 염색한 다음 광학현미경을 이용하여 간세포 내에 지방이 침착 정도를 관찰하였다.

간 조직 일부를 10% formaldehyde 용액으로 고정한 후 paraffin으로 포매하였다. 4μm 두께의 절편을 제작한 후 hematoxylin & eosin (H&E) 염색과 Masson's trichrome(MT) 염색을 실시하고 광학현미경을 이용하여 간 섬유화를 관찰하였다.

(라) 혈청 분석

① 혈청 cholesterol, glucose, triglyceride 농도 측정

생화학 측정기(Kornelab 20 XT, Thermo Scientific, USA)를 사용하여 자동적으로 측정하였다.

② 혈청 leptin 농도 측정

혈청 중 leptin 농도는 효소면역법을 이용한 진단용 kit(SPI Bio, AUS)를 사용하여 측정하였다.

③ 혈청 간기능 효소 측정

혈청의 alanine transaminase(ALT)와 aspartate aminotransferase(AST) 활성은 IFCC법을 이용하여 생화학 측정기 (Kornelab 20 XT, Thermo Scientific, USA)로 자동적으로 측정하였다.

(마) 간의 생화학적 변화 분석

① Triglyceride 측정

간 조직을 일정량 (≒100㎎) 취하여 5% NP-40 1㎖을 가하여 균질화한 후 80℃ 수조에서 2분간 가열 후 냉각하여 13,000rpm에서 2분간 원심분리하여 상등액을 얻은 후 실험에 사용하였다.

Triglyceride 농도 측정은 진단용 kit (Biovision, USA)를 사용하여 측정하였다.

② Cholesterol 측정

간 조직(10㎎)에 homogenize buffer (chloroform : isopropanol : NP-40 = 7 : 11 : 0.1) 200㎕를 가하여 균질화 한 후 15,000×g에서 5분간 원심분리 하였다.

원심분리 후 상등액은 건고하여 chloroform 및 유기물을 제거 한 후 assay buffer 200㎕에 완전히 용해시킨 후 진단용 kit(Biovision, USA)를 사용하여 cholesterol 농도를 측정하였다.

③ 항산화 효소 활성 측정

Superoxide dismutase(SOD) 측정을 위해 간 조직을 일정량 (0.2g)을 취하여 EDTA를 첨가한 phosphate buffer (pH 7.0) 1.5㎖을 가하여 균질화한 후 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 상층액을 얻은 후 실험에 사용하였다. SOD 활성 측정은 진단용 kit(Dojindo, Japan)를 사용하여 측정하였다.

즉, 상층액에 WST-1 (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, mono-sodium salt)과 xanthine oxidase working solution을 첨가한 후 37℃에서 20분간 배양 하고 microplate reader(Bio Tech, USA)를 이용하여 405nm에서 측정하였다.

(바) 결과 분석

• 각각의 결과들은 mean±S.E.로 나타내었고, 고지방식이로 유발한 지방간에 대한 번데기 동충하초 추출물 (CMWE)의 억제효과를 검증하기 위하여 one-way analysis로 분석 하였으며 $p<0.05$ 수준에서 유의차를 검증하였다.

(2) 연구결과

(가) CMWE가 체중증가에 미치는 효과

실험 종료일에서 실험동물의 체중을 측정하고 체중 증가분을 환산한 결과를 Table 1에 제시한다. 체중이 고지방식이로 사육한 군(High Fat Diet with CMWE 0㎎/㎏/day; 30.2±1.03) 일반사료로 사육한 군(Normal; 7.2±0.43)에 비해 크게(p<0.01) 증가하였으며 이러한 증가는 CMWE을 50㎎/㎏/day로 투여하면(27.9±0.88) 다소 낮아졌다.

Table 1. 실험동물에서 CMWE가 고지방식이로 유발한 체중 변화에 미치는 효과(Mean±S.E.)

	Normal	High Fat Diet with CMWE(㎎/㎏/day)			
		0	12.5	25	50
Initial weight(g)	22.9 ± 0.19	22.8 ± 0.22	22.8 ± 0.20	22.9 ± 0.24	22.7 ± 0.15
Weight gain(g)	7.2 ± 0.43	30.2 ± 1.03*	29.7 ± 0.81	29.1 ± 0.73	27.9 ± 0.88

*: Significantly(p<0.001) higher than that of the normal group.

(나) CMWE가 간 중량에 미치는 효과

실험 종료일에 간을 적출하고 중량을 측정한 결과를 Fig. 6에 제시한다. 간 중량이 고지방식이로 사육한 군(CMWE 0㎎/㎏/day; 2.95±0.17g)에서 일반사료로 사육한 군(Normal; 1.44±0.03g)에 비해 크게 (p<0.01) 증가하였으며 이러한 증가는 CMWE을 50㎎/㎏/day로 투여하면 다소(2.47±0.10g) 낮아졌다.

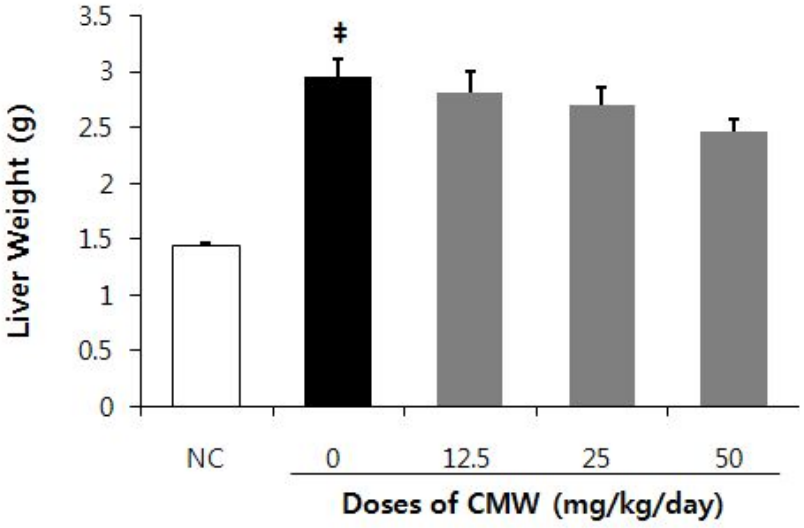


Fig. 6. Effects of CMWE on liver weight in high fat-induced fatty liver animals. ‡ indicates that the data is significantly(p<0.001) higher than that of the normal group(NC). Each bar illustrates Mean±S.E..

(다) CMWE가 부고환 지방중량에 미치는 효과

부고환 지방 중량을 측정한 결과를 Fig. 7에서 보여주고 있다. 부고환 중량이 고지방식이를 투여한 군(CMWE 0㎎/㎏/day; 1.43±0.07g)에서 일반사료를 공급한 군(Normal; 0.85±0.10g)에 비해 크게(p<0.01) 증가하였으며 이러한 증가는 CMWE 투여에 의해 영향을 받지 않았다.

(라) CMWE가 고지방식이로 유발한 혈청 glucose, triglyceride, cholesterol 농도 변화에 미치는 효과

혈청 glucose, triglyceride 및 cholesterol 농도를 측정한 결과를 Table. 2에서 보여주고 있다. 혈청 glucose 농도는 고지방식이로 사육하면 다소 상승하는 경향을 나타내었으나 CMWE에 의해서는 영향을 받지 않았다.

혈청 triglyceride 농도는 고지방식이로 사육하면 감소하는 경향을 보였으나 CMWE에 의해서는 영향을 받지 않았다. 혈청 cholesterol 농도는 고지방식이로 사육하면 유의하게 상승하였으나 이러한 상승이 CMWE에 의해서는 영향을 받지 않았다.

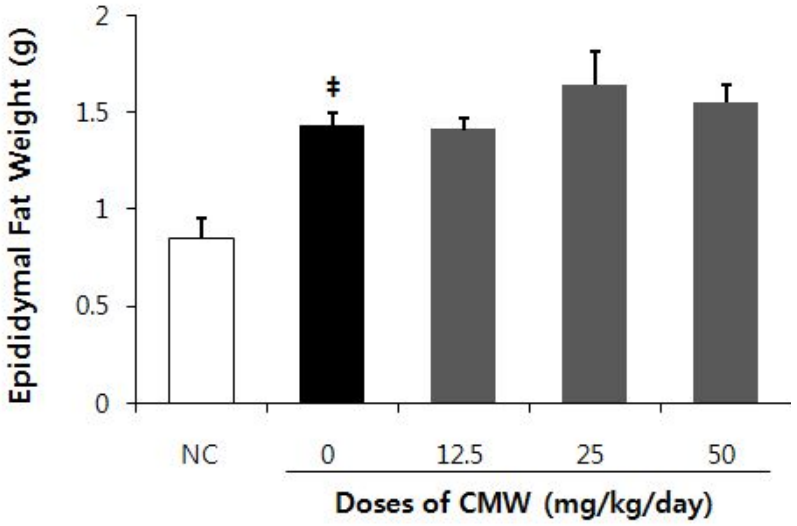


Fig. 7. Effects of CMWE on weight of epididymal fat in high fat-induced fatty liver animals. ‡ indicates that the data is significantly(p<0.001) higher than that of the normal group(NC). Each bar illustrates Mean±S.E..

Table 2. CMWE가 고지방식이로 유발한 혈청 glucose, triglyceride 및 cholesterol 농도의 변화에 미치는 효과

	Normal	High Fat Diet with CMWE(㎎/㎏/day)			
		0	12.5	25	50
Glucose(㎎/dℓ)	270.2 ± 15.40	314.9 ± 23.60	322.8 ± 6.20	332.8 ± 18.9	342.1 ± 8.13
Triglyceride(㎎/dℓ)	65.2 ± 2.67	44.94 ± 4.48	45.5 ± 5.12	51.7 ± 5.49	40.3 ± 2.72
Cholesterol(㎎/dℓ)	87.6 ± 2.84	222.4 ± 8.68*	224.84 ± 8.14	216.5 ± 7.81	214.4 ± 8.13

(마) CMWE가 간기능 효소 ALT와 AST 농도 변화에 미치는 효과

혈청 ALT와 AST 농도를 측정한 결과를 Fig. 8과 Fig. 9에서 보여주고 있다.

ALT가 고지방식이로 사육한 군(CMWE 0㎎/㎏/day; 218.15±27.08 U/l)에서 일반사료를 공급한 군(NC; 44.66±6.02 U/l)에 비해 크게(p<0.001) 증가하였으며 이러한 증가는 CMWE을 25㎎/㎏/day 또는 50㎎/㎏/day 투여하면 농도 의존적으로 유의하게(각각 p<0.05) 낮아졌다.

AST가 고지방식이로 사육한 군(CMWE 0㎎/㎏/day; 251.30±32.98 U/l)에서 일반사료를 공급한 군(NC; 134.71±14.50 U/l)에 비해 크게(p<0.001) 증가하였으며 이러한 증가는 CMWE을 25㎎/㎏/day 또는 50㎎/㎏/day 투여하면 농도 의존적으로 유의하게(각각 p<0.05) 낮아졌다.

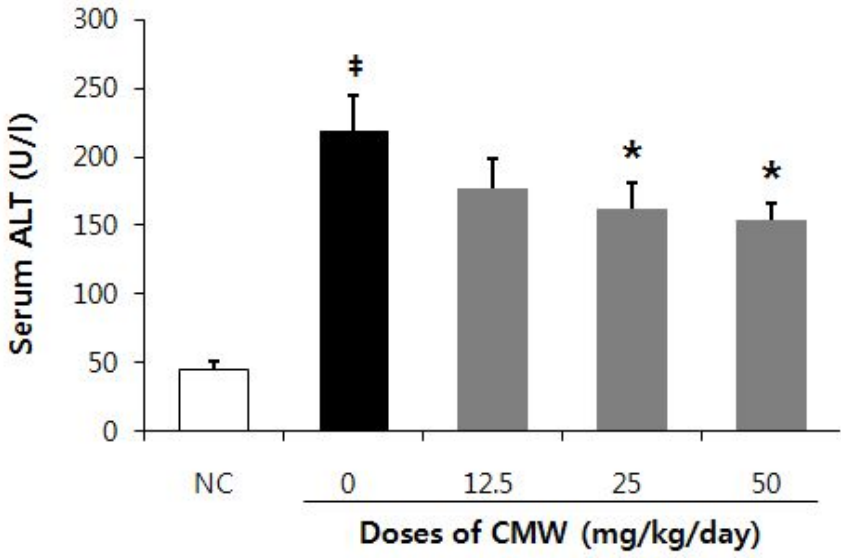


Fig. 8. Effects of CMWE on the serum ALT level in high fat-induced fatty liver animals. ‡ indicates that the data is significantly(p<0.001) higher than that of the normal group(NC). * represents that the data is significantly(p<0.01) lower than that of high fat alone group (0). Each bar illustrates mean±S.E..

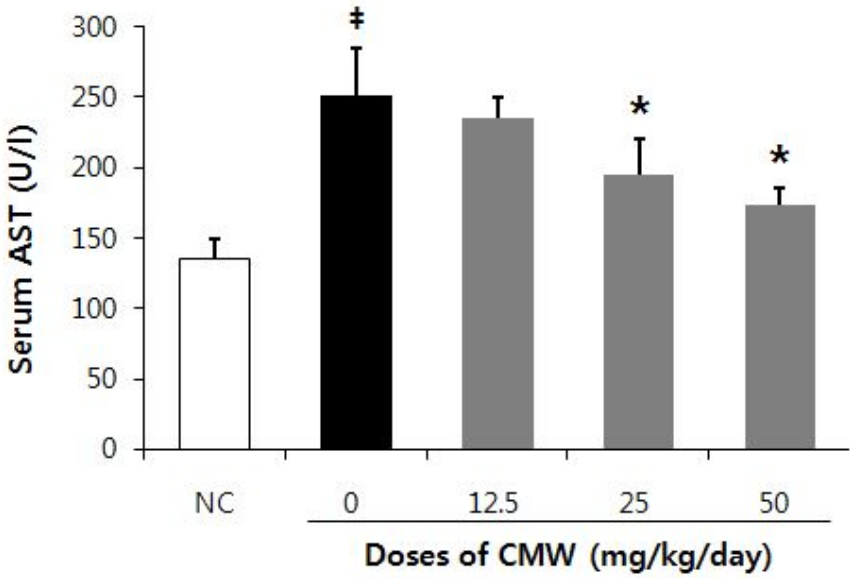


Fig. 9. Effects of CMWE on the serum AST level in high fat-induced fatty liver animals. ‡ indicates that the data is significantly(p<0.001) higher than that of the normal group (NC). * represents that the data is significantly(p< 0.01) lower than that of high fat alone group(0). Each bar illustrates mean±S.E..

(바) CMWE가 혈청 leptin 농도에 미치는 효과

혈청 leptin 농도를 측정한 결과를 Fig. 10에서 보여주고 있다.

혈청 leptin 농도는 고지방식이로 사육한 군(CMWE 0㎎/㎏/day; 104.48±5.13ng/㎖)에서 일반사료를 공급한 군(NC; 6.83±1.21ng/㎖)에 비해 유의하게(p<0.001) 증가하였으며 이러한 증가는 CMWE을 50㎎/㎏/day 투여하면 다소 감소하는 경향을 나타내었다.

(사) CMWE가 간 조직 중 triglyceride 함량에 미치는 효과

간 조직 중의 triglyceride 함량을 측정한 결과를 Fig. 11에서 보여주고 있다.

간 triglyceride 함량은 고지방식이로 사육한 군(CMWE 0㎎/㎏/day; 201.58±13.47㎍/g)에서 일반사료를 공급한 군(NC; 67.99±7.37㎍/g)에 비해 크게(p<0.001) 증가하였으며 이러한 증가는 CMWE을 12.5, 25, 50㎎/㎏/day 씩 투여하면 각각 119.93±13.94, 145.21±13.32, 149.05±6.06㎍/g으로 유의하게(p<0.01) 감소하였다.

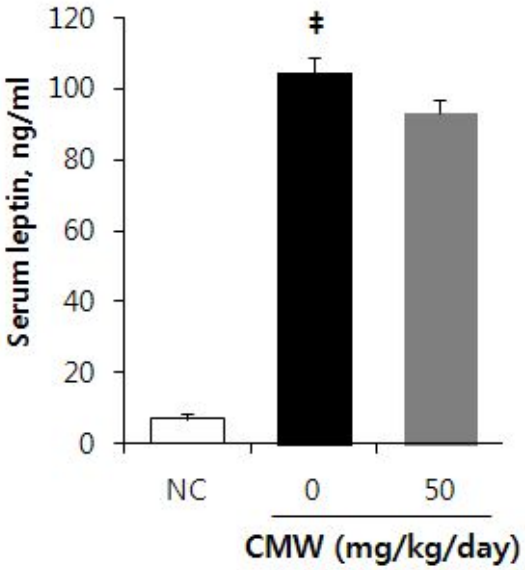


Fig. 10 Effects of CMWE on the serum leptin level in high fat-induced fatty liver animals. ‡ indicates that the data is significantly(p<0.001) higher than that of the normal group(NC). Each bar illustrates mean±S.E..

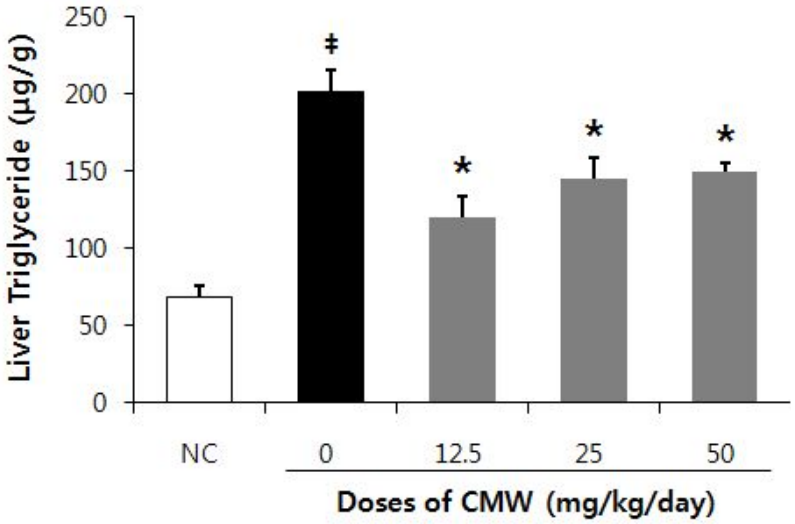


Fig. 11. Effects of CMWE on the liver triglyceride content in high fat-induced fatty liver animals. ‡ indicates that the data is significantly(p<0.001) higher than that of the normal group(NC). * represents that the data is significantly(p<0.01) lower than that of high fat alone group(0). Each bar illustrates mean±S.E..

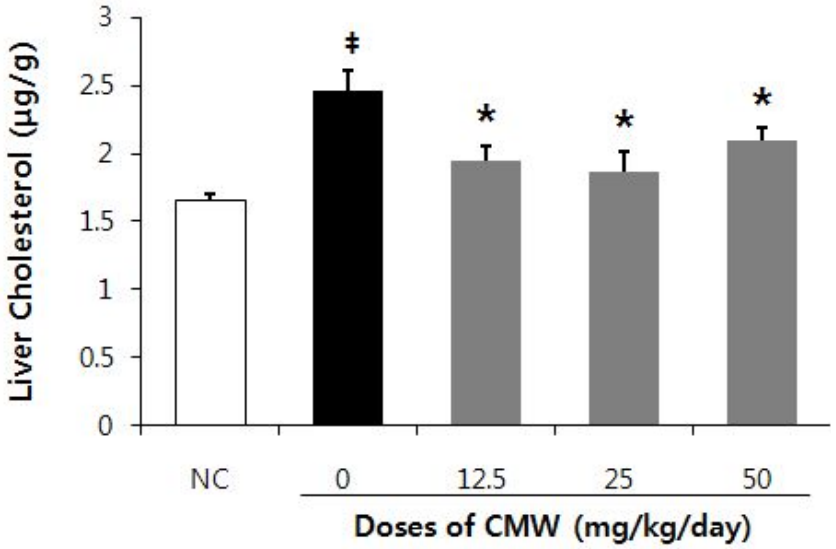


Fig. 12. Effects of CMWE on the liver cholesterol content in high fat-induced fatty liver animals. ‡ indicates that the data is significantly(p<0.001) higher than that of the normal group(NC). * represents that the data is significantly(p<0.05) lower than that of high fat alone group(0). Each bar illustrates mean±S.E..

(아) CMWE가 간 조직 중 cholesterol 함량에 미치는 효과

간 조직 중의 cholesterol 함량을 측정한 결과를 Fig. 12에서 보여주고 있다.

간 cholesterol 함량은 고지방식이로 사육한 군(CMWE 0㎎/㎏/day; 2.46±0.15㎍/g)에서 일반사료를 공급한 군(NC; 1.66±0.04㎍/g)에 비해 크게(p<0.001) 증가하였으며 이러한 증가는 CMWE을 12.5, 25, 50㎎/㎏/day 씩 투여하면 각각 1.94±0.12, 1.86±0.15, 2.10±0.09㎍/g으로 유의하게(p<0.05) 감소하였다.

(자) CMWE가 간의 SOD 활성에 미치는 효과

간 조직에서 측정한 SOD 활성도를 Fig. 13에서 보여주고 있다.

간 조직의 SOD 활성도가 고지방식이로 사육한 군(CMWE 0㎎/㎏/day; 624.05±37.57 U/㎎ protein)에서 일반사료를 공급한 군(NC; 758.44±32.01 U/㎎ protein)에 비해 유의하게(p<0.05) 감소하였으며, 이러한 감소는 CMWE을 50㎎/㎏/day 투여하면 887.76±50.02 U/㎎ protein으로 유의하게(p<0.01) 상승하였다.

(차) CMWE가 간조직의 병리학적 소견에 미치는 효과

간 조직의 지방 침착정도를 알아보기 위해 간 조직을 oil red O 법(Fig. 14) 또는 hematoxylin-eosin 법(Fig. 15)으로 각각 염색하였다. 고지방식이로 사육하면 간세포에 지방이 침착하였으며 그 침착 정도가 CMWE에 의해 농도 의존적으로 감소하는 경향을 나타내었다.

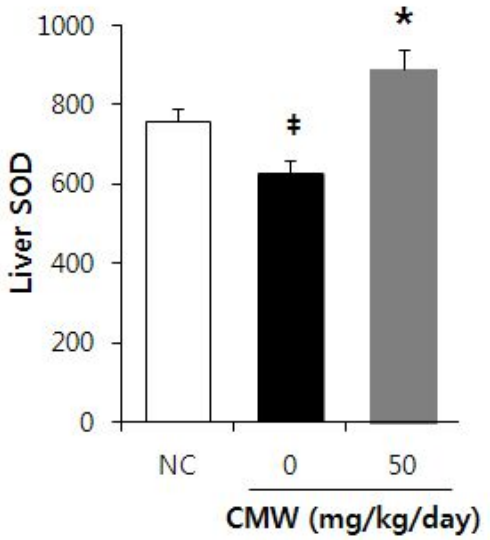


Fig. 13. Effects of CMWE on the liver SOD activity in high fat-induced fatty liver animals. ‡ indicates that the data is significantly($p<0.05$) lower than that of the normal group(NC). * represents that the data is significantly($p<0.01$) higher than that of high fat alone group(0). Each bar illustrates mean±S.E..

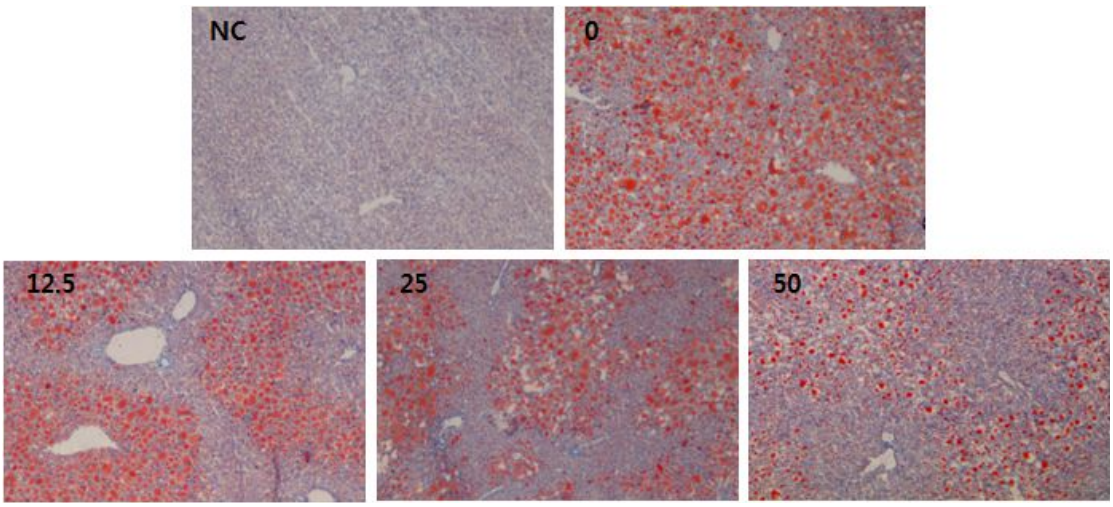


Fig. 14. Lipid drops in liver cells were stained with the oil red O method. Large lipid drops were visualized in hepatocytes of high fat-induced fatty liver animals. The number as well as size of lipid drops was dose-dependently reduced by CMWE.

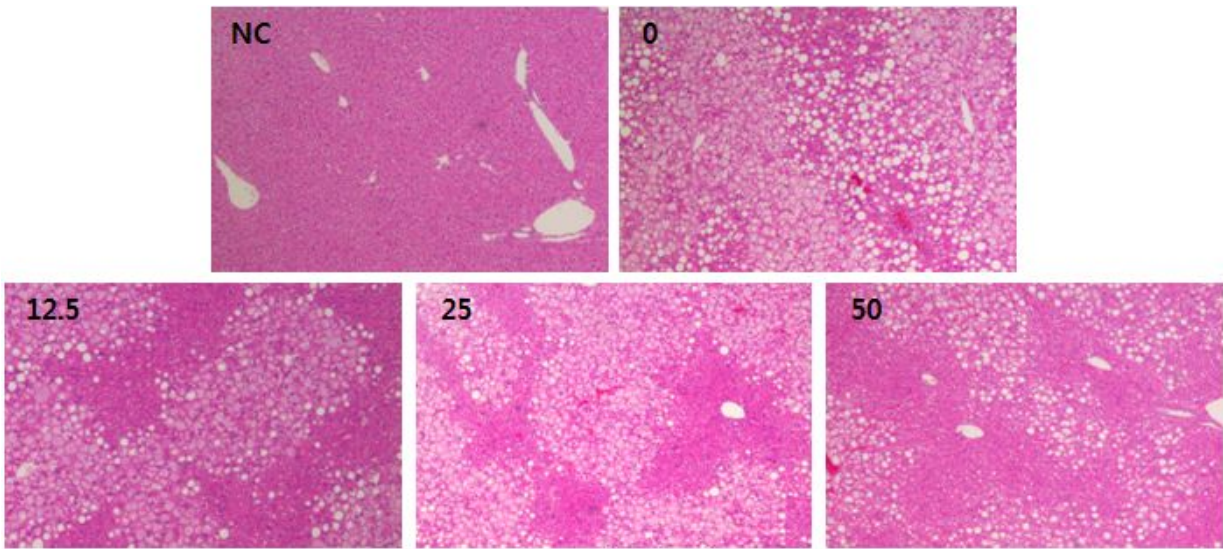


Fig. 15. The liver tissue were stained with the hematoxylin-eosin method. Large vacuoles were visualized in hepatocytes of high fat-induced fatty liver animals. The number as well as size of vacuoles was dose-dependently reduced by CMWE. Lipid in vacuoles was eliminated during H&E staining.

라. 간독성 물질로 유발한 간 섬유화에 대한 번데기 동충하초 추출물의 효과

(1) 연구 방법

(가) 간 섬유화 유발

① Carbon tetrachloride를 이용한 간 섬유화 유발

5 주령의 수컷 C57BL/6N 마우스에 50% carbon tetrachloride(CCl_4)를 마우스 kg당 1㎖씩 6주간 주 2회 복강 내 주사하여 간 섬유화를 유발 한다.

② TAA를 이용한 간 섬유화 유발

5 주령의 수컷 C57BL/6N 마우스에 thioacetamide(TAA)를 100㎎/kg 씩 3일 간격으로 10회 복강내 투여하여 간 섬유화를 유발한다.

(나) 번데기 동충하초 추출물 투여

CCl_4 또는 TAA로 유발한 간 섬유화에 대한 번데기 동충하초 추출물(CMWE)의 억제효과를 관찰하기 위하여 CMWE를 50㎎/kg, 100㎎/kg 또는 200㎎/kg 씩 6주간 매일 경구 투여하였다.

(2) 연구 결과

(가) 간의 병리학적 소견

① Carbon tetrachloride를 이용한 간 섬유화 유발

Mouse에서 CCl_4로 간 섬유화를 유발한 결과를 Fig16에서 보여주고 있다.

CCl_4에 의해 간 섬유화가 유발되지 않았다. 또한 CCl_4가 발암물질로 분류되어 더 이상의 실험이 불가능 하게 되었다.

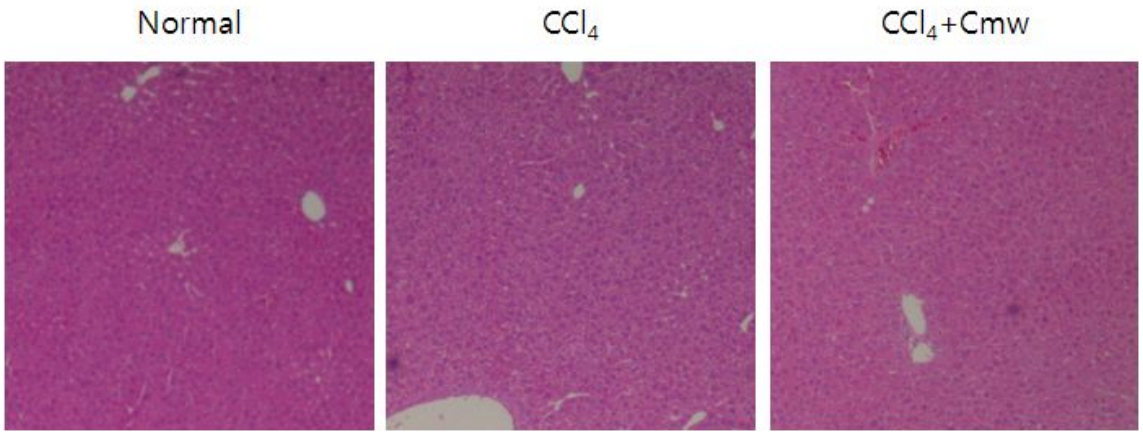


Fig. 16. The liver tissue were stained with the hematoxylin-eosin method. No fibrosis was observed after treatment with CCl_4.

② TAA를 이용한 간 섬유화 유발

Mouse에서 TAA로 간 섬유화를 유발한 결과를 Fig. 17에서 보여주고 있다.

TAA에 의해 간 섬유화가 유발되지 않았다. 또한 TAA가 발암물질로 분류되어 더 이상의 실험이 불가능 하게 되었다.

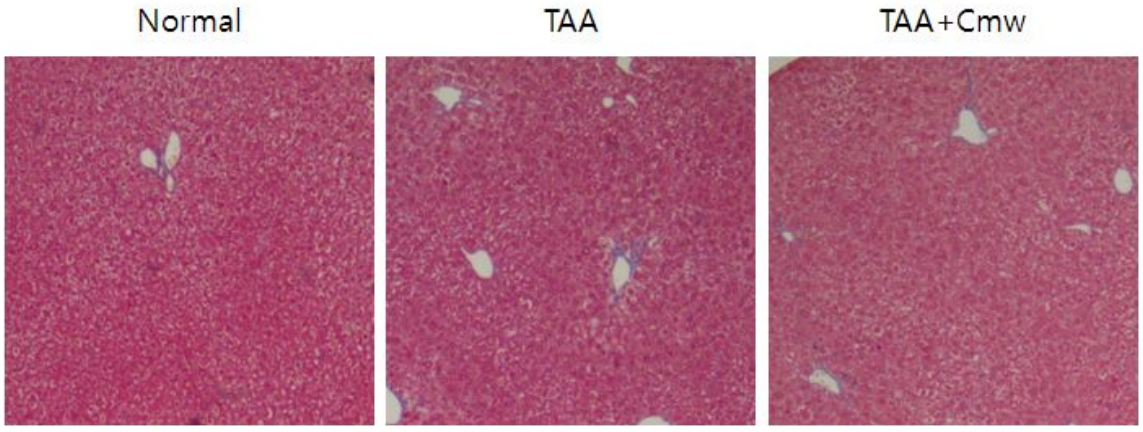


Fig. 17. The liver tissue were stained with the hematoxylin-eosin method. No fibrosis was observed after treatment with TAA.

마. 번데기 동충하초 추출물의 표지성분 개발

CMWE의 표지성분으로 cordycepin을 활용하는 방안을 다음과 같이 확립하였다.

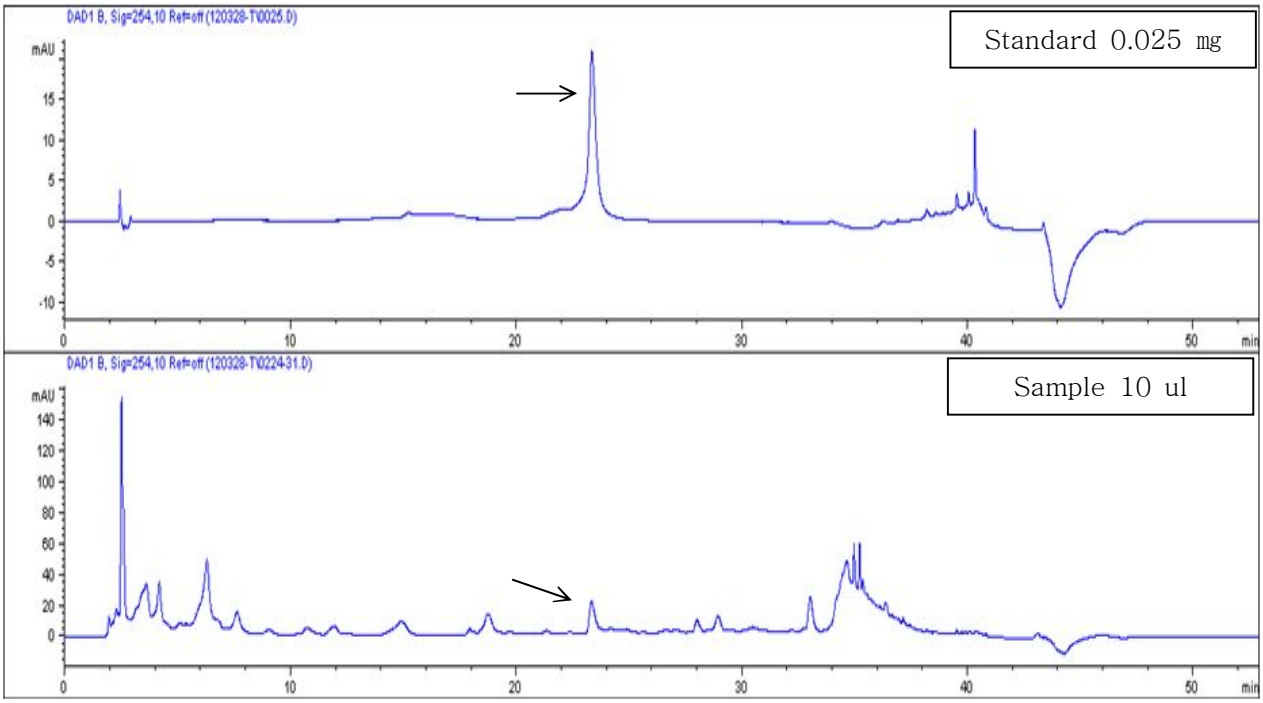
(1) HPLC 조건

Column : Agilent ZOBAX SB-C18, 5㎛, 4.6x150mm
Instrument : Agilent 1100 Series
Solvent : A-0.1% Formate, B-Methanol
Flow rate : 0.7 ㎖/min
Runtime : 53 min
Wavelength : 254nm, 280nm
Sample treatment : 10㎎/㎖ (MeOH)

Timetable

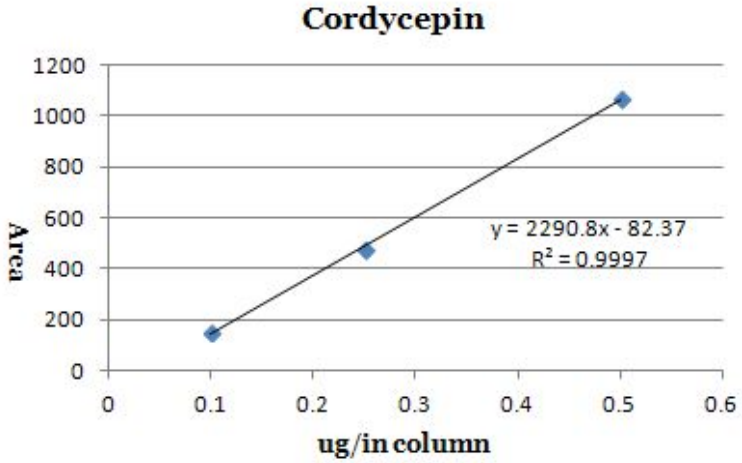
	Time	%B	%C	%D	Flow	Max. Press.
1	0.00	0.0	0.0	0.0	0.700	400
2	10.00	0.0	0.0	0.0	0.700	400
3	20.00	5.0	0.0	0.0	0.700	400
4	30.00	10.0	0.0	0.0	0.700	400
5	37.00	100.0	0.0	0.0	0.700	400
6	40.00	100.0	0.0	0.0	0.700	400
7	43.00	0.0	0.0	0.0	0.700	400
8	53.00	0.0	0.0	0.0	0.700	400

(2) HPLC chromatogram



(3) Sample 중 cordycepin 함량 분석

(가) Standard



(나) Sample 중 cordycepin 함량 환산

3회 추출한 sample의 cordycepin 함량을 HPLC로 측정하고 표준직선을 이용하여 환산 하였다.

Sample	Area	㎎/g	average ㎎/g
1	406.1	2.1323	2.1329 ± 0.0018
2	406.7	2.1349	
3	405.9	2.1314	

(4) 결론

이상의 분석 결과로 보아 CMWE의 표지물질로 cordycepin을 활용함이 적절하며 함량의 측정은 HPLC를 이용하는 방법이 타당한 것으로 판단된다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절 연도별 연구목표 달성도

구분	연도	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위	달성도 (%)
1차년도	2010	• **제1세부과제:** - 번데기동충하초의 배지선택 성분 차별화 검토 - 번데기동충하초 대량생산 방법 확립 - 재배생산된 번데기동충하초의 추출 및 분획 - 번데기동충하초의 알콜에 의한 간세포 손상에 대한 보호 효능 평가	• **제1 세부과제:**	100
			- 번데기동충하초 균주로 대량 생산화 확립	100
			- 번데기 동충하초의 추출, 분리 및 특성연구	100
			- *in vitro*에서 번데기동충하초의 알콜 및 약물에 의한 간세포 손상 보호 효능평가	100
		• **제2세부과제:** - 번데기동충하초 유래 분획의 간 유래 대식세포의 염증반응 조절능 평가	• **제2세부과제:** - 번데기동충하초의 염증조절 효능연구	100
		• **협동연구과제:** - 번데기 동충하초로부터 시료의 확보 - 번데기 동충하초 추출물의 간기능 개선 효과 검증	• **협동연구과제:**	100
			- 번데기 동충하초로부터 간 기능을 향상 시키는 기능성 물질의 추출 및 시료 생산	100
			- 1, 2 세부과제 지원.	100
			- 간경화가 유발된 실험동물에서 번데기 동충하초 추출물이 간 기능의 향상 및 간 섬유화의 억제 효능에 관한 연구.	100
2차년도	2011	• **제1 세부과제:** - 번데기동충하초 대량생산 방법 확립 - 약물에 의한 간세포 손상에 대한 번데기동충하초의 보호 효능 평가	• **제1 세부과제:**	
			- 번데기동충하초 우수균주로 대량생산화 확립	100
			- 번데기동충하초 추출물 및 분획물의 *in vitro*에서 약물에 의한 간세포 손상 보호 효능 평가	100
		• **제2세부과제:** - 간 유래 대식세포(쿠퍼세포) 매개성 간염 모델에서 염증조절	• **제2세부과제:**	
			- 간 유래 대식세포(쿠퍼세포) 매개성 간염 모델의 확립	100

		효능 평가	- 간 유래 대식세포(쿠퍼세포) 매개성 간염 모델에서 염증조절 효능 평가확립	100
		• **협동연구과제:** -번데기 동충하초로부터 시료의 확보 - 번데기 동충하초 추출물의 간 기능 개선 효과 검증 - 번데기 동충하초 추출물의 간기능 개선 효과 검증	• **협동연구과제:**	100
			- 흰쥐에서 TAA로 유발한 간 섬유화에 대한 번데기 동충하초 추출물의 에탄올 침전물(CMWE)의 효과.	100
			- TAA로 유발한 섬유화 간에서 α-smooth muscle actin 발현에 대한 CMWE의 효과.	100
			- TAA로 유발한 섬유화 간에서 tissue inhibitor of metalloproteinase 발현에 대한 CMWE의 효과.	100
3차년도	2012	• **제1세부 과제:** - 번데기동충하초 대량 생산방법 확립 - 번데기동충하초의 간세포 손상에 대한 보호 효능의 생화학적 기전 규명	• **제1세부 과제:**	100
			- 번데기동충하초 우수균주로 대량 생산화 확립	100
			- *in vitro*에서 번데기동충하초를 이용한 간세포 손상에 대한 보호 효능의 생화학적 기작 규명	100
		• **제2세부 과제:** - 간 유래 대식세포(쿠퍼세포) 매개성 간염 치료 기전연구	• **제2세부 과제:**	100
			- 번데기동충하초 유래 분획의 간 유래 대식세포(쿠퍼세포) 매개성 간염치료 기전연구	100
			- 보고서 작성 및 논문 투고	100
		• **협동연구과제:** -번데기 동충하초로부터 시료의 확보 - 번데기 동충하초 추출물의 간 기능 개선 효과 검증 - 번데기동충하초 추출물로부터 기능 성분 또는 지표성분의 개발 - 본 과제의 마무리 작업.	• **협동연구과제:**	100
			- 번데기 동충하초로부터 간 기능 향상 기능성 물질의 추출 및 시료생산.	100
			- 1, 2 세부과제 지원.	100
			- 간경화가 유발된 실험동물에서 번데기 동충하초 추출물이 간 기능 향상 및 간 섬유화의 억제 효능에 관한 연구.	100
			- 건강기능성 식품 제조의 표준화에 필요한 추출물의 기능성분 또는 지표성분 및 그 측정법의 개발	100
			- 보고서 작성 및 논문 투고	100

제2절 평가착안점에 입각한 년차별 연구개발목표의 달성도

1. 1 차년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구내용	연구개발 범위	달성도 (%)
1차 연도 (2010)	제 1세부과제 : (김태웅 교수) 번데기동충하초의 대량생산 및 간기능 개선 생리활성연구	- 번데기동충하초의 배지선택 성분 차별화 검토 - 번데기동충하초 대량생산 방법 확립 - 재배생산된 번데기동충하초의 추출 및 분획 - 번데기동충하초의 알콜에 의한 간 세포 손상에 대한 보호 효능 평가	- 번데기동충하초 균주로 대량 생산화 확립 - 번데기 동충하초의 추출, 분리 및 특성연구 - *in vitro*에서 번데기동충하초의 알콜 및 약물에 의한 간세포 손상 보호 효능평가	100
	제 2세부과제 : (조재열 교수) 번데기동충하초로부터 대식세포 매개성 간염 치료 효능 평가	- 번데기동충하초 유래 분획의 간 유래 대식세포의 염증반응 조절능 평가	- 번데기동충하초의 염증조절 효능연구	100
	협동연구과제 (박형진 교수) 번데기동충하초로부터 간기능을 향상시키는 기능성 물질의 개발	- 번데기 동충하초로부터 시료의 확보 - 번데기 동충하초 추출물의 간기능 개선 효과 검증	- 번데기 동충하초로부터 간 기능을 향상 시키는 기능성 물질의 추출 및 시료 생산. - 1, 2 세부과제 지원. - 간경화가 유발된 실험동물에서 번데기 동충하초 추출물이 간 기능의 향상 및 간 섬유화의 억제 효능에 관한 연구.	100

2. 2 차년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구내용	연구개발 범위	달성도 (%)
2차 년도 (2011)	제 1세부과제 : (김태웅 교수) 번데기동충하초의 대량생산 및 간기능 개선 생리활성연구	- 번데기동충하초 대량생산 방법확립 및 대량생산에 대한 효율, 균주의 활용성 연구 - 번데기동충하초에 관한 형태. 유전적인 특성 및 자원의 연구자원 확보 - 약물에 의한 간세포 손상에 대한 번데기동충하초의 보호 효능평가 및 표준화를 위한 화학적인 연구	- 번데기동충하초 대량생산 방법확립 및 대량생산에 대한 효율 및 균주의 활용성 연구확립. - 번데기동충하초에 관한 형태. 유전적인 특성 및 자원의 연구자원 확보함. - 약물에 의한 간세포 손상에 대한 번데기동충하초의 보호 효능평가 및 표준화를 위한 화학적인 연구를 확립함.	100
	제 2세부과제 : (박영철 교수) 번데기동충하초로부터 대식세포 매개성 간염 치료 효능 평가	- 간 유래 대식세포(쿠퍼세포) 매개성 간염 모델에서 염증조절 효능 평가	- 간 유래 대식세포(쿠퍼세포) 매개성 간염 모델의 확립 - 간 유래 대식세포(쿠퍼세포) 매개성 간염 모델에서 염증조절 효능 평가확립	100
	협동연구과제 (박형진 교수) 번데기동충하초로부터 간기능을 향상시키는 기능성 물질의 개발	- 번데기 동충하초 추출물의 간기능 개선 효과 검증	- 흰쥐에서 TAA로 유발한 간 섬유화에 대한 번데기 동충하초 추출물의 에탄올침전물(CMWE)의 효과. - TAA로 유발한 섬유화 간에서 α-smooth muscle actin 발현에 대한 CMWE의 효과. - TAA로 유발한 섬유화 간에서 tissue inhibitor of metalloproteinase 발현에 대한 CMWE의 효과.	100

3. 3 차년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구내용	연구 개발 범위	달성도 (%)
3차 년도 (2012-2013)	제1세부 과제: (김태웅 교수) - 번데기동충하초 대량 생산방법 확립 - 번데기동충하초의 간세포 손상에 대한 보호 효능의 생화학적 기전 규명	- 번데기동충하초 대량 생산방법 확립	- 번데기동충하초 우수균주로 대량 생산화 확립 - 유전적 특성 비교	100
		- 번데기동충하초의 간세포 손상에 대한 보호 효능의 생화학적 기전 규명	- *in vitro*에서 번데기동충하초를 이용한 간세포 손상에 대한 보호 효능의 생화학적 기작 규명	100
	제2세부 과제: (박영철 교수) - 동충하초 유래 성분(코디세핀 및 밀리타린 등) 및 대조약물의 간 유래 대식세포(쿠퍼세포) 매개성 간염 치료 기전 연구	- 간 유래 대식세포(쿠퍼세포) 매개성 간염 치료 기전 연구	- 동충하초 유래 성분 (코디세핀 및 밀리타린 등) 및 대조약물의 간 유래 대식세포(쿠퍼세포) 매개성 간염 치료 기전연구	100
	협동연구과제: (박형진 교수) - Mouse model에서 번데기 동충하초 추출물의 간 기능 개선 효과 검증 - 번데기 동충하초 추출물의 표지성분 개발	- 번데기 동충하초로부터 시료의 확보	- 번데기 동충하초로부터 간 기능 향상 기능성 물질의 추출 및 시료생산.	100
		- 번데기동충하초 추출물의 간 기능 개선 효과 검증 -지방간에 대한 번데기동충하초 추출물의 효과	- 지방간이 유발된 mouse에서 번데기 동충하초 추출물이 간 기능 향상 및 간섬유화의 억제 효능에 관한 연구. - 체중, 간중량, 혈청 glucose, triglyceride, cholesterol 농도 변화 -효소 ALT 및 AST 농도 변화 - leptin농도, triglyceride 함량, cholesterol 함량 - SOD 활성 - 간조직의 병리학적 소견	100
		- 번데기 동충하초 추출물의 표지 성분 개발	- 각 시료의 cordycepin 함량을 HPLC를 이용하여 측정하여 표지물질로 결정함.	100

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 연구개발 성과:

가. 번데기 동충하초의 배지선택성분 차별화 검토 및 대량생산 방법 확립

- 번데기 동충하초 균주인 EFCC 12448의 형성된 자실체로부터 분리된 단포자 중에서 선발된 6개의 단포자사이에서의 mating type 균주를 선발함.
- 선발된 mating type 균주에서 형성된 자실체를 다시 단포자 분리를 하여 9개균주를 얻었고, 다시 mating type균주 선발결과 5개의 단포자를 얻었다.
- 선발된 5개의 mating type 균주를 13개의 조합으로 petri dish 상에서 배양하여 균주를 선발하였다.
- 선발된 균주는 현미배지에 접종하여 자실체 형성 확인함.
- 쪽 끝부분(B)에서 colony를 떼어 낸 번데기동충하초의 자실체의 길이나 색, 단단함 등을 비교하였을 때 더 뛰어난 결과를 얻을 수 있음을 확인하였다.
- 25℃의 지상층에 있는 동충하초 배양실보다는 20℃인 지하층에 있는 배양실과 농가의 버섯재배사 포장에서 조금 더 뛰어난 결과를 나타내었다.

위의 연구를 통하여 번데기동충하초의 형태. 유전적인 연구자원을 확보하였으며, 번데기동충하초의 대량생산 방법확립 및 대량생산에 대한 효율, 균주의 활용성을 확립하였다.

나. 재배생산 된 번데기동충하초의 추출 및 분획

- 번데기동충하초의 추출, 분리방법으로 얻어진 CMWE의 특성연구
- HPLC를 이용하여 CMWE의 특성을 조사하였다. HPLC는 reverse phase system으로 260nm에서 분석한 결과 8~10분사이에 주요 peak들이 관찰되었으며 CMWE는 polar 성분을 함유하고 있음을 확인 하였음.
- 번데기동충하초에서 제조된 CMWE 중에는, adenosine이 47.4ppm으로 0.09% 함유되어 있으며, cordycepin은 106.1ppm으로 0.21% 함유되어있는 것으로 측정되었음.

다. 약물에 의한 간세포 손상에 대한 번데기동충하초의 보호 효능평가 및 표준화를 위한 화학적인 연구

- SNP를 간암세포인 Chang liver cell에 처리하였을 경우, 619.3μM에서, 50%의 cell viability의 감소, IC_{50}을 보였음.
- Ethanol 을 간세포에 처리하였을 경우, 514.5mM에서, 50%의 cell viability의 감소를 나타내는 IC_{50}을 보였음.
- AAP를 간세포에 처리하였을 경우, 10mM 수준에서, 50%의 cell viability의 감소하는 IC_{50}을 보였다.

결론으로,

- 번데기동충하초 추출물인, CMWE는 정상 간세포에 어떠한 저해작용을 주지 않는다는 결론를 얻었으며,
- 번데기동충하초 추출물인 CMWE가 AAP를 간세포에 처리하였으때, 보호효과가

있음을 확인하였다.

라. 번데기동충하초의 염증조절 효능연구

- 번데기 동충하초 에탄올 추출물(CME)의 NO생성의 억제능은 농도의존적으로 감소됨.
- 번데기동충하초 추출물, CMWE에 대한 phagocytosis assay를 수행한 결과 대식세포의 식세포작용 활성이 감소됨.
- 번데기동충하초 추출물, CMWE에 대한 T cell 분화능을 확인한 결과 강한 T cell 분화를 억제하는 것을 확인함.

마. 번데기 동충하초 유래 cordycepin의 염증조절 효능평가

- Cordycepin의 염증 조절 효소 PKBα kinase 활성저해효과를 확인함.
- 간염 및 간경화에 중요한 기능을 나타내는 것으로 알려진 p70S6 kinase(p70S6K)에 관한, cordycepin의 저해효과에서, 50μM 농도에서 80%의 억제효과를 나타냈다
- Cordycepin이 PDK1의 활성을 저해하는지 조사한 결과, 50㎍/㎖까지 농도의존적으로 억제경향을 보였으며,. 이후 100㎍/㎖까지 유사한 억제효과를 보였다.
- Cordycepin이 PKA의 효소 활성을 저해하는지 조사한 결과, 50㎍/㎖ 농도에서 75% 정도 억제 효과를 보였음을 확인함.

바. 번데기동충하초의 간세포 손상에 대한 보호 효능의 생화학적 기전 규명

- PI 염색에 의한 FACS 분석 결과를 보면, CMWE를 각각의 최종농도 50, 100, 200 ㎍/㎖가 되도록 AAP와 병행투여 했을 때 Sub-G1기가 11.86%, 10.4%, 7.8%로, CMWE의 농도 의존적으로 감소되어 세포사멸을 막아주는 것을 관찰 할 수 있었다.

이러한 결과는, 정상간세포에서 AAP에 의해 유도된 세포 독성, 즉 세포주기의 정지(cell cycle arrest)와 세포사멸에 대해 번데기동충하초 추출물(CMWE)이 간세포 보호활성이 있음을 보여주고 있다.

사. 번데기동충하초 추출물(CMWE)이 AAP에 유도 신호전달 물질에 미치는 영향.

- CMWE의 병행 투여에 의해 활성화된 PARP 양이 CMWE의 농도 의존적으로 감소되는 것을 관찰할 수 있었다.
- Cordycepin 농도에 의존적으로 활성화된 PARP 양이 감소된 것을 관찰할수 있었다.
- CMWE 및 cordycepin의 농도 의존적으로 p-ERK 양이 증가하는 것을 관찰할수 있었다.
- 증가된 JNK 활성은 CMWE의 농도 의존적으로 낮아지는 것을 관찰할 수 있었다.

이러한 결론으로, 정상 간세포(Chang liver cell)에서 간독성 유발물질인 AAP의 투여에 의해, 세포주기(cell cycle)가 정지되고, PARP 활성을 증가시켜 세포사멸(apoptosis)이 진행되는 것을 간접적으로 관찰할수 있었으며,또한 MAPK(mitogen-activated protein kinase) 중 세포의

생존과 증식에 관여하는 ERK(extracellular signal -regulated kinase, p44/42 MAPK)의 활성을 감소시키고, 외부 스트레스(물리·화학적 자극)에 반응하는 JNK(c-Jun N-terminal kinase, SAPK/JNK)의 활성을 증가시키고, p38의 활성을 감소시키는 것으로 관찰되었다. 이러한 세포 독성에 의한 세포사멸 진행에 대하여 번데기동충하초 추출물(CMWE)의 병행투여는, 세포의 생존을에 관여하는 ERK 활성을 증가시켜주고, 외부 스트레스에 관여하는 JNK 활성을 감소시키고, 세포주기 정지(cell cycle arrest)를 해소하여 정상적인 세포주기로 회복시켜주는 역할을 할 것으로 사료되었다. 이러한 결과는 번데기동충하초 추출물(CMWE)이 외부 자극에 의한 간세포 손상에 아주 유효한 생리활성 물질임을 알 수 있었다.

아. 번데기 동충하초 추출물의 간기능 개선 효과 검증

- 번데기동충하초 추출물 CMWE가 TAA에 의한 간손상을 억제하는 것으로 추정됨.
- CMWE는 TAA로 유발한 간손상을 억제하는 것으로 판단됨.

자. 흰쥐에서 TAA로 유발한 간 섬유화에 대한, 번데기 동충하초 추출물의 에탄올 침전물(CMWE)의 효과.

- TAA로 유발한 간 섬유화를 CMWE가 억제함을 확인.
- TAA로 섬유화가 유발된 간에서는 α-SMA가 과발현 되며 CMWE는 이 단백질의 발현을 억제함을 확인.
- TAA로 섬유화가 유발된 간에서는 TIMP-1과 TIMP-2가 과발현 되며 CMWE는 이들 단백질의 발현을 억제함을 화인하였음.

차. 지방간에 대한 번데기 동충하초 추출물의 효과

- 간 triglyceride 함량은 CMWE을 투여하면 각각 유의하게($p<0.01$) 감소하였다.
- 간 cholesterol 함량은 CMWE을 투여하면 유의하게($p<0.05$) 감소하였다.
- ALT가 농도 의존적으로 유의하게(각각 $p<0.05$) 낮아졌다.
- AST는 농도 의존적으로 유의하게(각각 $p<0.05$) 낮아졌다.
- 혈청 leptin 농도는 CMWE을 50㎎/㎏/day 투여하면 다소 감소하는 경향을 나타내었다.

결론적으로, 고지방식이로 사육하면 간세포에 지방이 침착되었으며 그 침착 정도가 CMWE에 의해 농도 의존적으로 감소하는 경향을 나타내었다.

카. 간독성 물질로 유발한 간 섬유화에 대한 번데기 동충하초 추출물의 효과

- 번데기동충하초 처리에 의한 병리학적 소견으로, CCl_4에 의해 간 섬유화가 유발되지 않았다.
- 또한, 번데기 동충하초 추출물의 효과로서, TAA에 의해 간 섬유화가 유발되지 않았다.

타. 번데기 동충하초 추출물의 표지성분 개발

결론으로, CMWE의 표지물질로 cordycepin을 활용함이 적절하며 함량의 측정은 HPLC를 이

용하는 방법이 타당한 것으로 판단되었으며, 연구에 사용된 번데기동충하초에는 2.13㎎/g의 cordycepin이 함유된 것으로 HPLC에 의한 실험으로 확인 되였다.

2. 연구성과 활용계획

가. 국내 번데기동충하초의 채집 및 분리·동정에 의해 우수·유전자원 확보.

- Mating에 의하여 번데기동충하초의 인공자실체를 형성함을 확인함.
- 번데기동충하초의 교배형을 찾아 현미를 이용하여 대량으로 재배 할 수 있는 방법이 개발되었으므로, 현실적인 우수한 개량적된 제품의 산업화가 가능하게 되었슴.
- 이러한 우수한 번데기동충하초 자실체를 형성하여, 국내 자원의 보존 및 차별화 할 수 있다.
- 번데기동충하초의 활용도 증진을 위한 균주자원의 종 다양성 및 우수 유전자원의 확보 및 보존을 가능하게 하였슴.
- 번데기동충하초 자실체의 새로운 대량생산법 확립하여 사용이 가능하게 됨.

나. 번데기동충하초를 이용한 간기능 개선제 제조 기술 개발의 가능성.

- 번데기동충하초 자실체의 간기능 효능을 확인함.
- 간기능 보호효과 및 증진 및 치료의 목적으로 산업적 이용가치가 높으며,
- 신약 개발의 기술(특허)을 참여업체에 이전하여 산업화를 유도가 가능함.

다. 번데기동충하초를 이용한 간기능 개선제 개발:

- 번데기동충하초 자실체의 생리활성연구로서 간기능 개선특성을 규명하였슴.
- **특허출원번호: 10-2013-0088704);**

  특허 명칭: 번데기동충하초 추출물을 유효성분으로 함유하는 간 기능 개선 기능성 식품조성물 및 그 제조방법에 의하여, 번데기동충하초를 이용한 간기능개선제 개발이 가능하게 되었다.

라. 신기술 인증서 획득함)2013년 4월25일) 산업통상부장관 수여-
기술명 - "현미를 이용한 동충하초 대량생산 기술"

마. 이러한 번데기동충하초 간기능 개선 연구의 결과는 더 나아가, 임상·독성·안정성 검사에 의해 과학적인 약효규명에 의하여, 국민건강과 향상에 공헌함으로 사회발전에 기여할 수 있게 될 것이다.

바. 이러한 연구는 산·학·연 협동의 꾸준한 연구를 통한 기초자료 제공 및 대체의학의 자료로 사용가능성을 제시하였으며, 국민보건의 증대로 산·학·연 협동연구의 발전 가능성이 있다.

사. 전 세계적으로 개발이 되지않은, 간기능 개선에 관련된 번데기동충하초를 이용한

다양한 연구에 의해, 기타 여러 제약을 제조할 수 있는 기초자료를 조성하였다.

아. 본 연구를 통한 업적을 보면,
SCI 논문 2편 발표, 매체(방송국) 홍보 5건, 특허 2건, 교육 지도 1건,
국외학술 발표 1건 등을 수행 하였다.

3. 앞으로의 연구성과 활용계획

앞으로의 간기능 개선에 관련된 번데기동충하초의 활용 방안은 다음과 같다.:

가. 번데기동충하초의 간기능 개선 및 기타 여러 이용성을 증대할 수 있도록 참여기업인 (주)머쉬텍과 유기적인 관계를 유지하여 연구하며 연구에서 좋은 결과가 나오개 되면 참여기업과 협의하여 참여기업이 할 수 없는 일은 타 기업체와 협의하여 좋은 제품이 나오도록 최선의 노력을 하려고 한다.

나. 번데기동충하초는 지금까지 많은 연구가 되어 있는 동충하초 이지만, 아직 알려지지 않은 미지의 물질에 관련된 번데기동충하초의 이용성 연구를 통해서 새로운 식품 및 한의약 분야로의 이용성을 증대하여, 산업체 및 농가소득향상을 위한 특화작물의 활용하는데 있어서의 정당성 및 타탕성을 부여하는데 있다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제1절 학술적인 면(논문)

1. 동충하초 및 생리활성에 관련된 문헌:

1. Bai, S.K., Lee, S.J., Na, H.J., Ha, K.S., Han, J.A., Lee, H.S.,Kwon,Y.G., Chung,C.K., Kim, Y.M., 2005. β-Carotene inhibits inflammatory gene expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages by suppressing redox-based NF-B activation. Experimental and Molecular Medicine 37, 23 - 334.
2. Berenbaum, F., 2000. Proinflammatory cytokines, prostaglandins, and the chondrocyte: mechanisms of intracellular activation. Joint Bone Spine 67, 561 - 564.
3. Chen, C.C., Wang, J.K., 1999. p38 but not p44/42 mitogen-activated protein kinase is required for nitric oxide synthase induction mediated by lipopolysaccharide in RAW 264.7 macrophages. Molecular Pharmacology 55, 481 - 488.
4. Chen, T.H., Kao, Y.C., Chen, B.C., Chen, C.H., Chan, P., Lee, H.M., 2006.Dipyridamole activation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 mediates inhibition of lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in RAW 264.7 cells. European Journal of Pharmacology 541, 138 - 146.
5. Coker, R.K., Laurent, G.J., 1998. Pulmonary fibrosis: cytokines in the balance. European Respiratory Journal 11, 1218 - 1221.
6. D'Acquisto, F., May, M.J., Ghosh, S., 2002. Inhibition of nuclear factor kappa B (NF-B): an emerging theme in anti-inflammatory therapies. Molecular Interventions 2, 22 - 35.
7. Di Rosa, M., Lalenti, A., Ianaro, A., Sautenbin, I., 1996. Inte raction between nitric oxide and cyclooxygenase pathway. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids 54, 229 - 238.
8. Forman, H.J., Torres, M., 2001. Redox signaling in macrophages. Molecular Aspects of Medicine 22, 189 - 216.
9. Fujiwara, N., Kobayashi, K., 2005. Macrophages in inflammation. Current Drug Targets, Inflammation and Allergy 4, 281 - 286.

10. Green, I.C., Wagner, D.A., Glowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.B., 1982. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. Analytical Biochemistry 126, 131 - 138.

11. Ginn-Pease, M.E., Whisler, R.L., 1998. Redox signals and NF-B activation in T cells. Free Radical Biology and Medicine 25, 346 - 361.

12. Han, S.B., Lee, C.W., Jeon, Y.J., Hong, N.D., Yoo, I.D., Yang, K.H., Kim, H.M., 1999. The inhibitory effect of polysaccharides from *Phellinus linteus* on tumor growth and metastasis. Immunopharmacology 41, 157 - 164.

13. Han, Y.J., Kwon, Y.G., Chung, H.T., Lee, S.K., Simmons, R.L., Billiar, T.R.,Kim, Y.M., 2001. Antioxidant enzymes suppress nitric oxide production through the inhibition of NF-B activation: role of H2O2 and nitric oxide in inducible nitric oxide synthase expression in macrophages. Nitric Oxide: Biology and Chemsity 5, 504 - -513.

14. Herlaar, E., Brown, Z., 1999. p38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease. Molecular Medicine Today 10, 439 - 447.

15. Hommes, D.W., Peppelenbosch, M.P., van Deventer, S.J.H., 2003. Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets. Gut 52, 144 - 151.

16. Islam, S., Hassan, F., Mu, M.M., Ito, H., Koide, N., Mori, I., Yoshida, T.,Yokochi, T., 2004. Piceatannol prevents lipopolysaccharide (LPS)-induced nitric oxide (NO) production and nuclear factor (NF)-kappaB activation by inhibiting IkappaB kinase (IKK). Microbiology and Immunology 48, 729 - 736.

17. Kamata, H., Manabe,T., Kakuta, J., Oka, S., Hirata, H., 2002. Multiple redox regulation of the cellular signaling system linked to AP-1 and NFB: effects of *N*-acetylcysteine andH2O2 on the receptor tyrosine kinases, theMAPkinase cascade, and IB kinases. Annals of the New York Academy of Sciences 973, 419 - 422.

18. Kim, B.C., Choi, J.W., Hong, H.Y., Lee, S.A., Hong, S., Park, E.H., Kim, S.J.,Lim, C.J., 2006a. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of mushroom *Phellinus linteus* in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. Journal of Ethnopharmacology 106, 364 - 371.

19. Kim, C.S., Kawada, T., Kim, B.S., Han, I.S., Choe, S.Y., Kurata, T., Yu, R.,2003. Capsaicin exhibits anti-inflammatory property by inhibiting IkB-degradation in

LPS-stimulated peritoneal macrophages. Cellular Signalling 15, 299 - 306.

20. Kim, G.Y., Choi, G.S., Lee, S.H., Park, Y.M., 2004a. Acidic polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* enhances through the up-regulation of nitric oxide and tumor necrosis factor-from peritoneal macrophages. Journal of Ethnopharmacology 95, 69 - -76.

21. Kim, G.Y., Han, M.G., Song, Y.S., Shin, B.C., Shin, Y.I., Lee, H.J., Moon, D.O., Lee, C.M.,Kwak, J.Y., Bae,Y.S., Lee, J.D., Park,Y.M., 2004b. Proteoglycan isolated from *Phellinus linteus* induces toll-like receptors 2- and 4-mediated maturation of murine dendritic cells via activation of ERK, p38, and NF-B. Biological & Pharmaceutical Bulletin 27, 1656 - 1662.

22. Kim, H.G., Shrestha, B., Lim, S.Y., Yoon, D.H., Chang, W.C., Shin, D.J., Han,S.K., Park, S.M., Park, J.H., Park, H.I., Sung, J.M., Jang, Y., Chung, N.,Hwang, K.C., Kim, T.W., 2006b. Cordycepin inhibits lipopolysaccharideinduced inflammation by the suppression of NF-kappaB through Akt and p38 inhibition in RAW 264.7 macrophage cells. European Journal of Pharmacology 18, 192 - 199.

23. Kim, J.H., Kim, D.H., Baek, S.H., Lee, H.J., Kim, M.R., Kwon, H.J., Lee, C.H.,2006c. Rengyolone inhibits inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide production by down-regulation of NF-B and p38 MAP kinase activity in LPS-stimulated RAW264.7 cells. Biochemical Pharmacology 71,1198 - 1205.

24. Kim, S.H., Song, Y.S., Kim, S.K., Kim, B.C., Lim, C.J., Park, E.H., 2004c.Anti-inflammatory and related pharmacological activities of the *n*-BuOH subfraction of mushroom *Phellinus linteus*. Journal of Ethnopharmacology 93, 141 - -146.

25. Libby, P., Ridker, P.M., Maseri, A., 2000. Inflammation and atherosclerosis. Circulation 105, 1135 - 1143.

26. Lo, A.H., Liang, C., Lin-Shiau, S.Y., Ho, C.T., Lin, J.K., 2002. Carnosol, an antioxidant in rosemary, uppresses inducible nitric oxide synthase through down-regulating nuclear factor-B in mouse macrophages. Carcinogenesis 23, 983 - -991.

27. Makarov, S.S., 2000. NF-B as a therapeutic target in chronic inflammation:recent advance. Molecular Medicine 6, 441 - -448.Manzi, S., Wasko, M.C., 2000. Inflammation-mediated rheumatic diseases and atherosclerosis. Annals of the

Rheumatic Diseases 59, 321 - 325.

28. Moynagh, P.N., 2005. The NF-B pathway. Journal of Cell Science 118, 4389 - 4392.

29. Pan, M.H., Lin-Shiau, S.Y., Ho, C.T., Lin, J.H., Lin, J.K., 2000a. Suppression of lipopolysaccharide -induced nuclear factor-B activity by theaflavin-3,3-digallate from black tea and other polyphenols through down-regulation of IκB kinase activity in macrophages. Biochemical Pharmacology 59,357 - 367.

30. Pan, M.H., Lin-Shiau, S.Y., Lin, J.K., 2000b. Comparative studies on the suppression of nitric oxide synthase by curcumin and its hydrogenated metabolites through down-regulation of IκB kinase and NF-κB activation in macrophages. Biochemical Pharmacology 60, 1665 - 1676.

31. Paul, A., Cuenda, A., Bryant, C.E., Murray, J., Chilvers, E.R., Cohen, P., Gould,G.W., Plevin, R., 1999. Involvement of mitogen-activated protein kinase homologues in the regulation of ipopolysaccharide -mediated induction of cyclo-oxygenase-2 but not nitric oxide synthase in RAW264.7 macrophages. Cellular Signalling 11, 491 - 497.

32. Shin, K.M., Kim, Y.H., Park, W.S., Kang, I., Ha, J., Choi, J.W., Park, H.J.,Lee, K.T., 2004. Inhibition of methanol extract from the fruits of *Kochia scoparia* on lipopolysaccharide-induced nitric oxide, prostagladin E2, and tumor necrosis factor-production from murine macrophage RAW 264.7 cells. Biological & Pharmaceutical Bulletin 27, 538 - 543.

33. Suh, S.J., Chung, T.W., Son, M.J., Kim, S.H., Moon, T.C., Son, K.H., Kim, H.P., Chang, H.W., Kim, C.H., 2006. The naturally occurring biflavonoid,ochnaflavone, inhibits LPS-induced iNOS expression, which is mediated by ERK1/2 via NF-B regulation, in RAW 264.7 cells. Archives of Biochemistry and Biophysics 447, 136 - -146.

34. Surh, Y.J., Chun, K.S., Cha, H.H., Han, S.S., Keum, Y.S., Park, K.K., Lee,S.S., 2001. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. Mutation Research, 480 - 481.

35. Tak, P.P., Firestein, G.S., 2001. NF-kB: a key role in inflammatory diseases. Journal of Clinical Investigation 107, 7 - 11.

36. Uto, T., Fujii, M., Hou, D.X., 2005. 6-(Methylsulfinyl)hexyl isothiocyanate suppresses inducible nitric oxide synthase expression through the inhibition of Janus kinase

2-mediated JNK pathway in lipopolysaccharide activated murine macrophages. Biochemical Pharmacology 70, 1211 - 1221.

37. Wadsworth, T.L., Koop, D.R., 1999. Effects of the wine polyphenolic quercetin and reveratrol on pro-inflammatory cytokine expression in RAW 264.7 macrophages. Biochemical Pharmacology 57, 941 - 949.

38. Zhang, G., Ghosh, S., 2000. Molecular mechanisms of NF-kappaB activation induced by bacterial lipopolysaccharide through Toll-like receptors. Journal of Endotoxin Research 6, 453 - 457.

2. 기타 동충하초 문헌정보

1. Jujo K., Renz H., Abe J., Gelfand E.W., Leung D.Y.(1992). Decreased interferon gamma and increased interleukin 4 production in atopic dermatitis promotes IgE synthesis, *J Allergy Clin Immunol.*, 90, 323-331.

2. Kondo K., Nagami T., Teramoto S.(1969). Comparative cellular and Species Radiosensitivity, ed by Bondo P V. Sugahara, Igakushoin, Tokyo, 20-29.

3. Leung D.Y.M., Sorter N.A.(2001). Cellular and immunologic mechanisms in atopic dermatitis, *J Am Acad Dermatol*,44, 1-12.

4. Pene J., rousset F., Chretien I., Bonnefoy J.Y., Spits H.,Yokota T., Arai N., Arai K., Banchereau J., De vries J.E.(1998). IgE production by normal human lymphocytes is induced by IL-4 and suppressed by interferon and α and prostaglandin E2. Proceedings of the national Academy Sciences of the United States of America, 85, 6880-6884.

5. Tsuyoshi Ohmura, Ayako Konomi, Yayoi Satoh, et al(2004). Suppression of atopic loke dermatitis by treatment with antibody to lymphosyte funtion associated antigen 1 in NC / Nga mouse, *European*

6. Kim HM, Han SB, Oh GT, Kim YH, Hong DH, Yoo LD. 1996. Stimulation of humoral and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. *Int J Immunopharmacol* 18: 295-303.

7. Sukurai T, Suzu S, Yamada M, Yanai N, Kawashima T, Hataka K, Takaku T, Motovoshi K. 1994. Induction of tumor necrosis factor in mice by recombinant human macrophage colony stimulating factor. *Jpn J Cancer Res* 85: 80-85.

8. Xu RH, Peng XE, Chen GZ, Chen GL. 1992. Effects of *Cordyceps sinensis* on natural killer activity and colony formation of B16 melanoma. *Chin Med J* 105: 971-980.
9. Chen GZ, Chen GL. 1991. Effects of *Cordyceps sinensis* on murine T lymphocyte subsets. *Chin. Med. J.* 104:4, 11.
10. Leung, D. Y., M. Boguniewicz, M. D. Howell, I. Nomura, and Q. A. Hamid. 2004. New insights into atopic dermatitis. *J. Clin. Invest.* 113: 651 - 657.
11. Grewe, M., C. A. Bruijnzeel Koomen, E. Scho¨pf, T. Thepen, A. G. Langeveld Wildschut, T. Ruzicka, and J. Krutmann. 1998. A role for Th1 and Th2 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis. *Immunol. Today* 19: 359 - 361.
12. Spergel, J. M., E. Mizoguchi, H. Oettgen, A. K. Bhan, and R. S. Geha. 1999. Roles of TH1 and TH2 cytokines in a murine model of allergic dermatitis. *J. Clin. Invest.* 103: 1103 - 1111.
13. Vestergaard, C., H. Yoneyama, M. Murai, K. Nakamura, K. Tamaki, Y. Terashima, T. Imai, O. Yoshie, T. Irimura, H. Mizutani, and K. Matsushima. 1999. Overproduction of Th2 specific chemokines in NC/Nga mice exhibiting atopic dermatitis like lesions. *J. Clin. Invest.* 104: 1097 - 1105.
14. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor *foxp3*. *Science* 299: 1057 - 1061.
15. Vestergaard, C., H. Yoneyama, and K. Matsushima. 2000. The NC/Nga mouse: a model for atopic dermatitis. *Mol. Med. Today* 6: 209 - 210.
16. Matsuda, H., N. Watanabe, G. P. Geba, J. Sperl, M. Tsudzuki, J. Hiroi, M. Matsumoto, H. Ushio, S. Saito, P. W. Askenase, and C. Ra. 1997. Development of atopic dermatitis like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. *Int. Immunol.* 9: 461 - 466.
17. Yagi, R., H. Nagai, Y. Iigo, T. Akimoto, T. Arai, and M. Kubo. 2002. Development of atopic dermatitis like skin lesions in STAT6 deficient NC/Nga mice. *J. Immunol.* 168: 2020 - 2027.
18. Horwitz, D. A., S. G. Zheng, and J. D. Gray. 2003. The role of the combination of IL 2 and TGF ɣ or IL 10 in the generation and function of $CD4^+CD25^+$ and $CD8^+$ regulatory T cell subsets. *J. Leukocyte Biol.* 74: 471 - 478.
19. Sumiyoshi, K., A. Nakao, H. Ushio, K. Mitsuishi, K. Okumura, R. Tsuboi, C. Ra, and H. Ogawa. 2002. Transforming growth factor _1 suppresses atopic dermatitis like

skin lesions in NC/Nga mice. *Clin. Exp. Allergy* 32: 309 - 314.

20. Yoshiaki Tomimori, Yoshitaka Tanaka, Megumi Goto, and Yoshiaki Fukuda. 2005. Repeated topical challenge with chemical antigen elicits sustained dermatitis in NC/Nga mice in specific pathogen free condition. *J Invest Dermatol* 124: 119-124.

제 7 장 연구시설·장비 현황

* 도입·개발한 연구시설·장비 현황 및 국가과학 기술종합정보시스템 장비 등록번호를 기술

없 음

제 8 장 참고문헌

* 보고서 작성 시 인용된 모든 참고문헌을 열거

1. 성재모. 이현경. 양근우. 1995. 동충하초속균의 형태적인 특징과 단백질 Pattern에 의한 계통분류. 한국균학회지. 23: 92 - 104
2. 이현경. 1996. 한국산 동충하초의 분포와 분류 및 배양적 특성에 관한 연구. 강원대학교 석사학위 논문
3. 성재모. 1996. 한국의 동충하초. 교학사. pp. 153.
4. 최인영. 2000. 동충하초속균의 유연관계 분석 및 인공배양. 전북대학교 농학박사학위 논문
5. 성재모, 홍성준, Humber, R.A., Spatafora, J.W. 2003. 유충노랑곰보동충하초(Cordyceps staphylindaecola)의 불완전세대와 자실체 형성. 한국균학회지. 31:1-7.
6. 박성수, 2009. 노랑다발 동충하초(*Cordyceps bassiana*)의 교배형 구명 및 인공배양에 관한 연구 강원대학교, 석사학위논문.
7. de Bary A. 1967. Zur kenntniss insectentodtender Pilze, in Bot. Zeit. 25: 2-7, 8. Sommers, L. E., R. F. Harris, F. N. Dalton, and W. R. Gardner. 1970. Water potential relations of three root-infecting Phytophthora species. Phytopathology 60: 932-934.
9. Bruhel, G. W. and B. Cunfer. and M. Toiviainem. 1972. Influence of water potential on growth, antibiotic production, and survival of Cephalosporium gramineum. Can. J. Plant Sci. 52: 417-423.
10. Cook, R. J., and R. I. Papendick. 1972. Influence of water potential of soil and plants on root disease. Annu. Rev. Phytopathol. 10: 349-372.
11. Manandhar, J. B., and G. W. Bruehl. 1973. In vitro interactions of Fusarium and Verticillium wilt fungi with water, pH, and temperature. Phytopathology 63: 413-418.
12. Sung, J. M. 1980. Effect of water potential on reproduction and apore germination by Fusarium roseum "Graminearum", "Culmorum", and "Avenaceum". Master Thesis. Washington State University.
13. Feng, M. G., Poprawski, T. J. and Khachatourians, G. G. 1994. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus Beauveria bassiana for insect control: current status. Biocontrol SCI. Technol. 4: 3-34.
14. Humber, R. A. 2000. Fungal pathogens and parasites of insects. In: Priest, F.G. and Goodfellow, M., (eds.). Applied Microbial Systematics. Kluwer Academic Publishers.

Dordrecht. P. 203-230.

15. Li Zengzhi, Li Chunru, Huang Bo, and Fan Meizhen. 2001. Discovery and demonstration of the teleomorph of Beauveria bassiana(Bals.) Vuill., an important entomogenous fungus. Chinese Science Bulletin Vol.46 No.9

16. Sung, G. H., Spatafora, J. W., Zare, T., Hodge, K. T. and Gams, W. 2001. A revision of Verticillium sect. Prostromata. II. Phylogenetic analysis of SSU and LSU nuclear rDNA sequences from anamorphs and teleomorphs of Clavicipitaceae. Nova Hedwigia 72: 311-328.

17. Shrestha Bhushan, In-Seon Nam, Ho-Kyung Kim, and Jae-Mo. Sung. 2002. Effect of Sector of isolates on fruiting of Cordyceps militaris. The Korean Society of Mycology News letter vol. 14(1): 98.

18. Shrestha Bhushan. 2003. Growth characteristics of somatic mycelium and mating system of Cordyceps militaris (L. ex Fr.) Link. D. Thesis, Kangwon National university. Chuncheon, Korea.

19. Shrestha Bhushan, Ho-Kyung Kim, Gi-ho Sung, Joseph W. Spatafora, and Jae-Mo Sung. 2004. Bipolar Heterothallism, a principal mating system of Cordyceps militaris in vitro Biotechnology and Bioprocess engineering 9: 440-446.

20. Shrestha Bhushan, Sung-Keun Choi, Ho-Kyung Kim, Tae-Woong Kim, and Jae-Mo Sung. 2005, Mycobiology 33(3): 125-130.

21. Yi, J. O. 2007. Characteristics of fruiting body formation of Cordyceps bassiana and its relationship with Beauveria bassiana. Thesis, Kangwon National University. Chuncheon, Korea.

22. Berenbaum, F., 2000. Proinflammatory cytokines, prostaglandins, and the chondrocyte: mechanisms of intracellular activation. Joint Bone Spine 67, 561 - 564.

23. Chen, T.H., Kao, Y.C., Chen, B.C., Chen, C.H., Chan, P., Lee, H.M., 2006.Dipyridamole activation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 mediates inhibition of lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in RAW 264.7 cells. European Journal of Pharmacology 541, 138 - 146.

24. D'Acquisto, F., May, M.J., Ghosh, S., 2002. Inhibition of nuclear factor kappa B (NF-B): an emerging theme in anti-inflammatory therapies. Molecular Interventions 2, 22 - 35.

25. Forman, H.J., Torres, M., 2001. Redox signaling in macrophages. Molecular Aspects of Medicine 22, 189 - 216.

26. Ginn-Pease, M.E., Whisler, R.L., 1998. Redox signals and NF-κB activation in T cells. Free Radical Biology and Medicine 25, 346 - -361.

27. Han, Y.J., Kwon, Y.G., Chung, H.T., Lee, S.K., Simmons, R.L., Billiar, T.R.,Kim, Y.M., 2001. Antioxidant enzymes suppress nitric oxide production through the inhibition of NF-B activation: role of H2O2 and nitric oxide in inducible nitric oxide synthase expression in macrophages. Nitric Oxide: Biology and Chemsity 5, 504 - -513.

28. Herlaar, E., Brown, Z., 1999. p38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease. Molecular Medicine Today 10, 439 - 447.

29. Kamata, H., Manabe,T., Kakuta, J., Oka, S., Hirata, H., 2002. Multiple redox regulation of the cellular signaling system linked to AP-1 and NFB: effects of *N*-acetylcysteine and H2O2 on the receptor tyrosine kinases, theMAPkinase cascade, and IB kinases. Annals of the New York Academy of Sciences 973, 419 - 422.

30. Kim, G.Y., Han, M.G., Song, Y.S., Shin, B.C., Shin, Y.I., Lee, H.J., Moon, D.O., Lee, C.M.,Kwak, J.Y., Bae,Y.S., Lee, J.D., Park,Y.M., 2004b. Proteoglycan isolated from *Phellinus linteus* induces toll-like receptors 2- and 4-mediated maturation of murine dendritic cells via activation of ERK, p38, and NF-B. Biological & Pharmaceutical Bulletin 27, 1656 - 1662.

31. Kim, H.G., Shrestha, B., Lim, S.Y., Yoon, D.H., Chang, W.C., Shin, D.J., Han,S.K., Park, S.M., Park, J.H., Park, H.I., Sung, J.M., Jang, Y., Chung, N.,Hwang, K.C., Kim, T.W., 2006b. Cordycepin inhibits lipopolysaccharide - induced inflammation by the suppression of NF-kappaB through Akt and p38 inhibition in RAW 264.7 macrophage cells. European Journal of Pharmacology 18, 192 - 199.

32. Kim, J.H., Kim, D.H., Baek, S.H., Lee, H.J., Kim, M.R., Kwon, H.J., Lee, C.H.,2006c. Rengyolone inhibits inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide production by down-regulation of NF-κB and p38 MAP kinase activity in LPS-stimulated RAW264.7 cells. Biochemical Pharmacology 71,1198 - -1205.

33. Zhang, G., Ghosh, S., 2000. Molecular mechanisms of NF-kappaB activation induced by bacterial lipopolysaccharide through Toll-like receptors. Journal of Endotoxin Research 6, 453 - 457.

34. Jujo K., Renz H., Abe J., Gelfand E.W., Leung D.Y.(1992). Decreased interferon gamma and increased interleukin 4 production in atopic dermatitis promotes IgE synthesis, *J Allergy Clin Immunol.*, 90, 323 331.

35. Leung D.Y.M., Sorter N.A.(2001). Cellular and immunologic mechanisms in atopic dermatitis, *J Am Acad Dermatol*,44, 1 12.

36. Pene J., rousset F., Chretien I., Bonnefoy J.Y., Spits H.,Yokota T., Arai N., Arai K., Banchereau J., De vries J.E.(1998). IgE production by normal human lymphocytes is induced by IL 4 and suppressed by interferon and α and prostaglandin E2. Proceedings of the national Academy Sciences of the United States of America, 85, 6880-6884.

37. Tsuyoshi Ohmura, Ayako Konomi, Yayoi Satoh, et al(2004). Suppression of atopic loke dermatitis by treatment with antibody to lymphosyte funtion associated antigen 1 in NC / Nga mouse, *European*

38. Kim HM, Han SB, Oh GT, Kim YH, Hong DH, Yoo LD. 1996. Stimulation of humoral and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. *Int J Immunopharmacol* 18: 295 303.

39. Xu RH, Peng XE, Chen GZ, Chen GL. 1992. Effects of *Cordyceps sinensis* on natural killer activity and colony formation of B16F10 melanoma. *Chin Med J* 105: 971 980.

40. Chen GZ, Chen GL. 1991. Effects of *Cordyceps sinensis* on murine T lymphocyte subsets. *Chin Med J* 104:4, 11.

41. Leung, D. Y., M. Boguniewicz, M. D. Howell, I. Nomura, and Q. A. Hamid. 2004. New insights into atopic dermatitis. *J. Clin. Invest.* 113: 651 - 657.

42. Jorissen, R.N., Walker, F., Pouliot, N., Garrett, T.P., Ward, C.W. (2003) Epidermal growth factor receptor: mechanisms ofactivation and signaling. Exp. Cell Res. 284, 31-53.

43. Kang, S.H. ,Song, J.H., Kang, H.K., Kang, J.H., Kim, S.J., Kang, H.W., Lee, Y.K., and Park, D.B. (2003) Arsenic trioxide-induced apoptosis is independent of stress-responsive signaling pathways but sensitive to inhibition of inducible nitric oxide synthase in HepG2 cells. Exp. Mol. Med. 35, 83-90.

44. Kanno, S., Ishikawsa, M., Takayanagi, M., Takayanagi, Y., and Sasaki, K. (2000) Potentiation of acetaminophen hepatotoxicity by doxapram in mouseprimary cultured hepatocytes. Biol. Pharm. Bull. 23, 446-550.

45. Kato, H., Faria, T.N., Stannard, B., Roberts, C.T.Jr, and LeRoith, D.(1994) Essential role of tyrosine residues 1131, 1135, and 1136 of the insulin-like growth factor- I (IGF-I)receptorin IGF- I action. Mol. Endocrinol. 8, 40-50.

46. Kauppinen,T.M.,Chan,W.Y.,Suh,S.W.,Wiggins,A.K.,Huang,E.J., and Swanson, R.A.(2006) Direct phosphoylation and regultion of poly (ADP-ribose)polymerase-1 by extracellular

signal-regulation kinases1/2. Proc. Natl. Acad. Sci, U.S.A. 103, 7193-7141.

47. Kayama M., ImayoshiJ., ArakiS., Ogawa H., Cofusa T., Ueno T., Saito M., 1983. Changes in the lipids of dried laver "Nori "at different water activities. Nippon Suisan Gakkaishi 49, 787-793.

48. Khandwala, H.M. ,McCutcheon, I.E. ,Flyvbjerg,A., and Friend,K.E.(2000) The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. Endocr .Rev. 21, 215-244.

49. Kim, H.K., Jeong, M.J., Kong, M.Y. ,Han, M.Y., Son, K.H., Kim, H.M., Hong, S.H., Kwon, B.M. (2005) Inhibition of Shc/Grb2 protein-protein interaction suppresses growth of tumors xenografted in nude mice. Life Science 78, 321-328.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농림수산식품개발사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농림수산식품개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.