

발간등록번호

11-1541000-001230-01

동충하초를 이용한 항아토피 제품 개발연구
(Development of anti-atopic dermatitis bioproduct
using Cordyceps)

성균관대학교

농림수산식품자료실



0004537

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “동충하초를 이용한 항아토피 제품 개발연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2011 년 12 월 19 일

주관연구기관명 : 성균관대학교

주관연구책임자 : 조 재 열

세부연구책임자 : 조 재 열

연 구 원 : 변 세 은

연 구 원 : 유 타 오

연 구 원 : 정 용 우

연 구 원 : 양 우 석

연 구 원 : 오 주 은

연 구 원 : 정 덕

연 구 원 : 정 혜 윤

연 구 원 : 이 준 호

협동연구기관명 : 강원대학교

협동연구책임자 : 김 태 응

연 구 원 : 윤 덕 효

연 구 원 : 장 현 재

연 구 원 : 원 광 영

협동연구기관명 : 한림대학교

협동연구책임자 : 박 형 진

연 구 원 : 오 광

요 약 문

I. 제 목

동충하초를 이용한 항아토피 제품 개발연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

알러지나 아토피성 질환은 계절적, 환경적 그리고 식이적 요인 등이 복합적으로 다양하게 작용함으로써 발생되며, 심각한 경우에는 사회생활의 지장을 초래할 정도로 큰 영향을 준다. 이러한 증상은 환경이나 삶의 패턴 때문에 악화되거나 치유되는 현상이 반복적으로 진행되므로, 증상을 완화시키는 대중적 요법보다는 근원적인 원인을 제거해 주는 강력한 치료제 개발이 시급한 실정이다.

주 환자층이 어린이들이라는 점 때문에 아토피 질환 치료제는 안전하고 효과가 뛰어나야 하며, 이를 위해서는 새로운 합성적 방법에 의한 치료제 개발보다는, 기존부터 이미 알려져 있는 안전한 생약이나 식용식물로부터 치료자원을 소재화 하는 것이 더 타당한 것으로 받아들여지고 있다.

따라서, 본 연구팀은 식용식물인 동충하초의 생리활성 성분을 이용하여 안전하고 효과가 뛰어난 항아토피 기능성 제품을 개발하는 것을 목표로 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

세부과제	연구 범위	연구 개발 내용
제1세부 과제	동충하초의 in vitro 항아토피 활성 및 세포분자 표적 연구	1. In vitro 항아토피 (Th1/Th2) 시험 2. In vitro 항아토피 (APC/mast cell) 시험 3. (n vitro 항아토피 (표적단백질연구) 시험
제1협동 과제	동충하초 유효분획 및 성분의 화학적, 생화학적 및 제약학적 특성연구	1. 동충하초의 항아토피 생리활성 분획 및 유효성분의 분석연구 2. 단일유효성분에 대한 화학구조 분석 및 대량합성공정 연구 3. 항아토피 효능분획 및 성분의 안전성 시험 (독성 유전독성평가) 4. 항아토피 제제의 제약학적 특징연구 (제형연구) 5. 항아토피 기능성분/유해성분의 규격 및 분석법 확립
제2협동 과제	동충하초의 in vivo 아토피성 피부염 억제 효능 및 예비임상 연구	1. 아토피 유발원에 따른 in vivo 항아토피효능평가 2. 제형변경에 따른 in vivo 항아토피성 효능평가 3. 예비임상효능평가 연구

IV. 연구개발결과

1. 동충하초의 in vitro 항아토피 활성 및 세포분자 표적 연구

가. in vitro 항아토피 (Th1/Th2) 시험

- CBBF와 CBEE에 의한 IFN- γ 와 IL-4 분비 억제 효능을 평가한 결과, IFN- γ 의 경우 서로 다른 stimuli에서도 모두 억제하였으며 IL-4의 경우 CBBF는 ConA 조건에서 그리고 CBEE는 LPS 조건에서 IL-4 분비를 억제하였다. CBBF와 CBEE에 의한 염증매개 물질인 NO 분비 억제 효능을 평가한 결과, CBBF는 세포 생존률에 비해 효과적으로 NO를 억제하였다. CBBF와 CBEE에 의한 세포-세포간의 응집능을 확인한 결과, CBBF는 CD29에 의한 세포간의 응집을 억제하였으며, CBEE는 CD43에 의한 세포간의 응집을 2시간에서 억제하였다. CBBF와 CBEE에 의한 MAPK 신호전달 단백질의 인산화 수준을 확인한 결과, CBBF는 ERK의 인산화 수준을 15분에서 억제하였으며 CBEE는 p38의 인산화 수준을 5분에서 억제하였다. CBBF와 CBEE에 의한 다양한 전사인자의 프로모터 활성을 확인한 결과, CBBF는 AP-1, NF- κ B, CREB의 프로모터 활성을 모두 농도 의존적으로 억제하였으며 CBEE의 경우는 AP-1과 CREB를 효과적으로 억제하였다.

나. in vitro 항아토피 (APC/mast cells) 시험

- 노랑다발 동충하초 추출물인 CBEE와 CBBF 모두 IL-12의 mRNA 레벨을 억제하였다. 히스타민 분비에 관여하는 TNF- α , PGE2, NO의 분비를 확인한 결과, CBBF는 TNF- α 를 모든 농도에서 약하게 억제하였으며, NO는 농도 의존적으로 억제하였다. 반면에 PGE2는 농도 의존적으로 증가시켰다. CBEE와 CBBF는 Fibronectin에 의한 점착능에는 크게 영향을 주지 않았다. CBEE의 경우, p38억제제가 IL-12의 발현을 억제시키는 것으로 보아 p38을 통해 IL-12를 조절하는 것으로 생각되어진다. CBBF의 경우 JAK2의 인산화를 조절함으로써 STAT-1에 의한 IFN- γ 의 생성을 조절하는 것으로 보여진다. CBEE의 경우 p65와 c-jun의 핵내 이동을 억제하였으며, CBBF는 STAT-1과 c-fos의 핵 내 이동을 억제하는 것으로 나타났다.

다. In vitro 항 아토피 기전 (분자표적단백질)연구

- SNP에 의한 NO생성을 조절하지 않는 것을 확인함으로써 TLR4 매개의 NO 생성을 조절한다는 것을 확인하였다. 하지만, TLR4의 발현을 직접적으로 조절하지 않는 것으로 나타났다. Adaptor molecule인 MyD88과 TRIF에 의한 NF- κ B luciferase 프로모터 활성을 확인한 결과, CBBF의 25 mg/ml 농도가 TRIF에 의한 NF- κ B luciferase 프로모터 활성을 약간 억제한 것을 제외하고는 조절 효과가 없었다. 이러한 억제 정도도 그 효과가 미미하여 효과가 없다고 판단하였다. 따라서, 동충하초 추출물은 adaptor molecule인 MyD88과 TRIF를 타겟으로 하지 않는다는 것을 확인하였다. 염증반응 신호전달 기전 중, 상위 신호전달 단백질로 알려진 Src과 Syk은 인산화에 의해 kinase activity를 갖는 것으로 알려져 있다. 따라서, 동충하초 추출물에 의한 인산화 수준의 조절 정도를 조사한 결과, CBEE의 경우 Src을, CBBF의 경우 Src과 Syk의 kinase activity를 억제한다는 것을 확인하였다.

2. 동충하초 유효분획 및 성분의 화학적, 생화학적 및 제약학적 특성연구

가. 원료 특성시험 및 추출공정 개선 연구

- 노랑다발동충하초를 HPLC로 분석하여 포함됨 당(sugar)의 pattern을 비교하였을 때, ethyl acetate 분획물 및 buthanol 분획물의 peak는 retention time이 느린, non-polar한 peak들이 나타나는 것을 알 수 있었다. 노랑다발동충하초은 일반적으로 물(water)로 추출하여 사용

하므로, 4, 100도에서의 추출물 및 water fraction과의 HPLC pattern을 비교하였다. 그 결과, 커다란 차이는 보이지 않았으며, water fraction에서는 0-10분까지의 polar 성분이 보이지 않았다. 노랑다발 동충하초의 total lipid를 Gas Chromatography를 이용하여 지방산 분석을 하였다. 그 결과, 노랑다발 동충하초는 특이적으로 80%의 높은 불포화 지방산(unsaturated fatty acid)을 함유하고 있다. 노랑다발 동충하초의 aqueous layer 를 각각, hexane, Ethyl acetate, butanol, 및 water 로 분획을 하여, hexane, Ethyl acetate, butanol, 및 water fraction을 얻었다. 노랑다발 동충하초의 수율(yield)을 계산하여 보면, 360g의 노랑다발 동충하초를 사용하여 ethanol추출을 하여 66.1g(19%의 수율)을 얻었다. 66.1g의 ethanol추출물에서, water fraction (63.4%), hexane fraction (22%), butanol (7.3%), and ethyl acetate fraction (7.3%)을 얻었다. 노랑다발 동충하초의 BuOH 분획에 대한 안전성 평가의 일환으로 식품의약품안전청 독성시험기준에 근거하여 마우스를 이용한 급성 경구독성시험을 실시하였다. 그 결과, 독성학적 이상변화 및 치사한 개체가 관찰되지 않았으므로 10000 mg/kg의 용량에서도 독성 발현이 없는 안전한 물질임을 확인하였다. 동충하초의 부탄올 분획의 가용성 성분은 불용성 분획보다 낮은 용해도를 보였지만 tween80에서는 가장 높은 용해도를 보임. 불용성 분획은 대체로 다양한 매질에서 보다 우수한 용해성을 보임. 이는 시험에 사용된 매질의 성질이 유용성에 가까워 불용성 성분의 용해에 적합했기 때문으로 생각됨.

나. 기능성 성분분리 및 분석법 정립 (구조분석)

- 노랑다발 동충하초 3,000g을 100% Ethanol로 추출하여 533.7g(17.8% yield)을 얻었고 냉각시켜 얻은 흰 침전물은 39.16g(1.31% yield), 분홍색 결정물은 99.86g(3.33% yield)을 얻었다. Major Extract를 다시 Hexane, Butanol, EA 유기용매를 사용하여 분획을 한 결과 hexane에선 87.34g(2.91%), Butanol은 72.48g(13.9%), EA는 1.18g(0.04%), 그리고 나머지 H₂O에서는 336.9g(11.22%)를 얻었다. 노랑다발 동충하초 시료는 ICR 마우스에 대한 급성독성시험 결과, 독성학적 이상변화 및 치사한 개체가 관찰되지 않았으므로 1000 mg/kg의 용량에서도 독성 발현이 없는 안전한 물질로 사료된다. 아토피치료기전에 적합한 동충하초 외용제의 제제 조성 수립. 동충하초 함유 크림제의 제조공정 수립. 동충하초의 BuOH 분획(CBBF)은 mushroom tyrosinase의 발현을 농도 의존적으로 억제하였고 MTT assay를 통하여 독성이 없음을 확인하였다.

다. 유해물질 분석 및 시험방법 정립

- 노랑다발 동충하초 추출물 및 분획물의 항염 실험을 진행하였으며, Hexane 분획물의 IC₅₀은 0.88mg/ml 였으며, Butanol 분획물의 IC₅₀은 0.34mg/ml를 보였으며, Ethyl acetate 분획물의 IC₅₀은 0.6mg/ml를 보였다. 실험의 결과, Butanol 분획물의 IC₅₀이 0.34mg/ml으로 가장 좋은 결과를 보였다. 이를 바탕으로 Butanol 분획물(CBBF)를 silica chromatography를 이용하여 정제분리하였다. 정제분리된 분획물의 항암 및 항염 실험을 진행하였으며, Chloroform의 함량이 100% 와 90%에서 가장 좋은 항암 및 항염 결과를 얻었다. 1차 분리한 분획물을 2차 Silica chromatography 이용하여 재분리하였고, 이를 이용하여 항암 및 항염 특성을 확인하였다. 그 결과, 100-1, 100-2, 100-3, 100-4, 90-1, 90-2, 20, 0에서 항암 효능을 보였으며, 90-4 및 90-5에서 항염 효능을 보였다. 2차 활성 분획을 합친 후 HPLC 및 LC-MASS로 분석한 결과, 노랑다발 동충하초인 *Cordyceps bassiana*에 Beauvericin 이 함유되어있다는 것을 확인하였다. 노랑다발 동충하초의 Beauvericin의 항염, 세포독성 그리고 항암 효능을 평가한 결과, Beauvericin은 세포독성이 강하여 항염제로 사용할 수 없고 항암 효능이 있음을 알 수 있었다.

3. 동충하초의 in vivo 아토피성 피부염 억제 효능 및 예비임상 연구

가. 동충하초의 in vivo 아토피성 피부염 억제 효능 및 예비임상 연구

DNFB를 이용한 아토피 피부염에서는 대조군에 비해 CBBF-Ep를 처리한 NC/Nga mice의 아토피 피부염이 억제되었다. 그러나, mite antigen으로 유발한 피부염에서는 CBBF-Ep에 의해 억제되지 피부염이 억제되지 않았으며, 대조군인 steroid 물질에서도 억제하지 않는 것으로 보아 아토피 피부염을 연구에 부적합한 모델로 판단되었다. TPA를 acetone에 용해하여 쥐의 귀에 염증을 유도하고 olive oil에 혼합한 CBBF-Ep를 처리한 결과 쥐의 귀 두께가 낮아진 것을 확인하였으며, 광학 현미경에 의한 관찰에서도 진피층의 부종이 감소한 것을 확인하였다.

나. 동충하초 추출분획의 항 아토피 효능에 관한 in vivo 연구: 제품화에 따른 효능 차이 연구

- 아토피군에서는 정상군에 비해 표피층이 두꺼워졌고 표피 돌기가 진피 속으로 깊이 침투하였으며 염증성 세포의 침윤이 증가하였으며 이러한 변화는 CBW-Es 로션을 도포하면 개선되었다. 0.2 % DNFB를 3일에 1회씩 3회 처리하여 아토피 피부염을 유발하면서 노랑다발 동충하초 추출물인 CBW-Ep 로션을 환부에 14일간 도포했다. 그 결과 CBW-Ep 로션은 DNFB로 유발한 아토피 피부염의 임상증상에 아무런 영향을 미치지 않았다.

다. 항아토피 제품의 예비임상평가

- 물 추출, 여과, 감압농축, 에탄올 분획, 원심분리, 감압농축, 동결건조 등 7개의 단계를 거쳐 CBWE를 추출하여 20 mg/ml 농도의 크림을 제조하였다. 아토피 피부염 유발 조건에서, 첫날부터 CBWE를 20 mg/ml의 농도로 크림에 혼합하여 매일 2회씩 14일간 환부에 도포하였다. 그 결과, 피부염 지수가 CBWE를 20 mg/ml의 농도로 도포한 군이 아토피 대조군에 비해 유의하게 감소하였다. 또한 아토피성 피부염 환부에 CBWE를 도포한 후 병리학적 변화 및 비만세포 침윤 상태를 관찰한 결과, 표피층 두께, 비만세포 침윤 상태 그리고 혈청 IgE 농도가 아토피 대조군에 비해 CBWE를 20 mg/ml의 농도로 도포한 군에서 측정치가 유의하게 감소하였다. 이러한 결과를 바탕으로, 아토피성 피부염을 앓고 있는 환자에서 CBWE를 20 mg/ml 함유하는 크림을 환부에 매일 2회씩 도포하였다. 그 결과, 크림 도포 7일 후부터 지원자 10명 중 4명에게서 아토피성 피부염에 대한 만족스러운 억제 효과가 나타났으며 3명에서는 약간의 억제 효과가 관찰되었다. 그리고 나머지 3명의 아토피성 피부염은 개선되지 않았다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 연구성과 활용 실적

연구성과							
논문	특허	인력양성	취업	기술지도	교육지도 (현장실습)	언론홍보	상품화
7	5	8	5	4	2	1	1

2. 연구성과 활용계획

- 제 1세부

- 1) 염증 반응에 관련된 효능 평가 시스템을 확립함으로써 보다 효율적으로 염증 억제 효능 평가를 조금 더 효과적으로 진행할 수 있으며, 현재의 결과들을 대조군으로 사용 가능함.
- 2) 알러지/아토피 반응에 관련된 효능 평가 시스템을 확립함으로써 보다 효율적으로 염증 억제 효능 평가를 진행할 수 있으며, 현재의 결과들을 대조군으로 사용 가능함. 또한 In vitro에서의 평가 뿐만 아니라 In vivo에 대한 평가가 가능하므로 실용 가능성을 높을 수 있음.
- 3) 동충하초 유래 성분의 염증 반응 및 알러지/아토피 억제 효과가 있음을 확인하였으며, 그 신호 전달 기전을 밝힘으로써 차후 동충하초를 이용한 아토피/알러지 질환 치료제로써 쉬운 적용이 가능함.
- 4) 동충하초 유래 성분의 스크리닝 및 항아토피 효능 검증법을 이용하여 제품 개발을 위한 연구가 가능해짐.

- 제 2세부

- 1) 동충하초에서 유효성분을 찾아내고 추출함으로써 아토피/알러지 질환 뿐만 아니라 암 및 염증 등 다른 질병에 쉽게 적용이 가능함.
- 2) 유효성분의 독성 및 효능 평가법을 설립하여 다양한 유효성분에 대한 손쉬운 평가가 용이해 짐.
- 3) 유효성분의 용해도 증가 및 제제를 연구함으로써 제품 개발 시 적용 가능.

- 협동과제

- 1) 마우스를 통한 항아토피 질환 동물모델을 설립함으로써 동충하초 외 다른 천연물 성분의 항아토피 연구 진행시 적용이 가능함.
- 2) 아토피 환자에게 직접 임상실험을 진행함으로써 제품으로써 적용이 용이해 짐.
- 3) 동충하초 추출물을 이용한 항아토피 치료/개선을 위한 시제품 생산 완료.

SUMMARY

I. Title

Development of anti-atopic dermatitis bioproduct using *Cordyceps*

II. The purpose and necessity of research and development.

Allergic or atopic dermatitis is caused by complex factors, such as seasonal, environmental, and dietary causes. And sometimes, it takes severe effect to bring out an encumbrance to social life. As the symptoms of atopic diseases are worsen then cured repeatedly because of the environments or patterns of life, the development of anti-atopic drug is urgently needed, which can remove fundamental causes of the disease.

Children comprise a large proportion of patients suffering from atopic dermatitis. So, most important thing, when we develop the anti-atopic medicine, is safety and efficacy. In this respect it has been accepted the development of drug from a herbal medicine or esculent plants is more appropriate than synthetic medicine.

Therefore, the aim of our project is to develop a safe and effective anti-atopic functional product from *Cordyceps bassiana*-derivated bioactive substances.

III. The contents and scope of research and development

Group	A scope of research	Contents
Group 1	In vitro anti-atopic activity and cellular molecules targeted study of <i>Cordyceps bassiana</i>	<ol style="list-style-type: none"> 1. In vitro anti-atopic effect (Th1/Th2) test 2. In vitro anti-atopic effect (APC/mast cells) test
Group 2	Chemical, biochemical and pharmaceutical properties study of <i>Cordyceps bassiana</i> effective fractions and components	<ol style="list-style-type: none"> 1. Component characterization and extraction process improvement. 2. Separation of functional components and establishment of analysing method (structure analysis) 3. Toxic substance analysis and test method establishment
Group 3	The inhibitory effect of <i>Cordyceps bassiana</i> on atopic dermatitis and preliminary clinical experiment <i>in vivo</i>	<ol style="list-style-type: none"> 1. The inhibitory effect of <i>Cordyceps bassiana</i> on atopic dermatitis and preliminary clinical experiment <i>in vivo</i> 2. In vivo study of anti-atopic effects by extracts of <i>Cordyceps bassiana</i> : a study of difference in effects by making product 3. Preliminary clinical trial of anti-atopic product using <i>Cordyceps bassiana</i>

IV. The results of R&D

1. In vitro anti-atopic activity and cellular molecule targeted study of *Cordyceps bassiana*

A. In vitro anti-atopic effect (Th1/Th2) test

We first evaluated the suppressive effect of CBBF and CBEE on the secretion of IFN- γ and IL-4. CBBF and CBEE blocked the IFN- γ release at all stimulus conditions, while IL-4 secretion was inhibited only at Con A and LPS treatment conditions. And also, we tested the effect of CBBF and CBEE on the production of NO, well-known inflammatory mediator. CBBF blocked effectively NO release considering the effect on cell viability. Then, we studied the cell to cell aggregation by CBBF and CBEE, CBBF diminished cell to cell aggregation mediated by CD29, and CBEE decreased cell aggregation induced by CD43 at 2 h. CBBF suppressed the phosphorylation level of ERK at 15 min, CBEE suppressed the phosphorylation of p38 at 5 min. And, we studied whether CBBF and CBEE blocked promoter activity of transcriptional factors which are involved in inflammatory responses. CBBF dose-dependently reduced the promoter activities of AP-1, NF- κ B, and CREB. But, CBEE blocked only AP-1 and CREB promoter activities.

B. In vitro anti-atopic effect (APC/mast cells) test

Both CBEE and CBBF which were extracted from *Cordyceps bassiana* inhibited transcriptional level of IL-12. So, we explored the release of TNF- α , PGE2, and NO which are associated in histamine secretion. As a result, CBBF weakly decreased TNF- α secretion at all concentration groups and dose-dependently reduced NO production, while the release of PGE2 was up-regulated depending on the concentration of CBBF. CBEE and CBBF did not affect the attachment induced by fibronectin. Based on our results, we suggest that CBBF would regulate IL-12 through p38. We also observed that p38 inhibitor can block the expression of IL-12, which supports our suggestion. And also we expect CBBF might inhibit the STAT-1-induced IFN- γ production by regulating JAK2 phosphorylation. Additionally, CBEE exhibited inhibitory activity against translocation of p65 and c-Jun into nucleus. CBBF also blocked the translocation of STAT-1 and c-Fos.

2. Chemical, biochemical, and pharmaceutical properties study of *Cordyceps bassiana* effective fractions and components

A. Component characterization and the improvement of extraction process.

-We analyzed the patterns of sugar included in each extract using HPLC. The ethyl acetate extract and the butanol extract showed peak that retention time was slow and had non-polar. Generally, *Cordyceps bassiana* has been extracted in water. So we compared HPLC pattern of extract at 4°C and 100°C with water fraction. There was no significant difference between each fraction. Water fraction did not show polar components within 0 to 10 min. We analyzed fatty acid in total lipids of *Cordyceps bassiana* using gas chromatography. As a result, It was revealed that *Cordyceps bassiana* contains 80% of

unsaturated fatty acid. We have sub-fractionated the aqueous layer of *Cordyceps bassiana* to hexane, ethyl acetate, butanol, and water extracts. We got 66.1g of ethanol extract from 360g of *Cordyceps bassiana*, and gained water fraction (63.7%), hexane fraction (22%), butanol (7.3%) and ethyl acetate fraction (7.3%) from ethanol fraction, respectively. We conducted acute oral toxicity test based on Korean Food & Drug administration toxicity testing protocol to verify the safety of *Cordyceps bassiana* butanol fraction. As a result, we confirmed *Cordyceps bassiana* butanol fraction with dose of 100 mg/kg was safe. The soluble components of *Cordyceps bassiana* butanol fraction had a low solubility than insoluble fraction, but it had a high solubility in Tween 80. Generally insoluble fraction can be easily dissolved in diverse medium. It seems that a medium used in our experiment was suitable for dissolution of insoluble fraction.

B. Separation of functional components and establishment of analysing method (structure analysis)

- We extracted 533.7 g (17.8% yield) of extract by 100% EtOH extraction from 3,000 g of *Cordyceps bassiana*, 39.16 g (1.31% yield) of white precipitate by cooling and 99.86 g(3.33% yield) of pink crystal. Major extract was re-extracted by organic solvents such as hexane, butanol and EA. As a result, we got 87.34 g(2.91%) of extract by hexane extraction, 72.48 g(13.9%) of extract by butanol extraction, 1.18 g(0.04%) of extract by EA extraction and 336.9 g(11.22%) of extract from H₂O. *Cordyceps bassiana* sample, therefore, is considered safe material because this sample did not observed toxicological change and lethality and it also had non-toxicity in 1000 mg/kg dosage. We set up a medicine component of suitable external preparation of *Cordyceps bassiana* for atopy dermatitis therapy and the process of manufacture for *Cordyceps bassiana*-containing cream. BuOH fraction of *Cordyceps bassiana* inhibited expression of mushroom tyrosinase in dose dependent manner and had non-toxic activity in MTT assay.

C. Toxic substance analysis and testing method establishment

-We estimated the anti-inflammatory activity of *Cordyceps bassiana* extracts. First, we investigated IC₅₀ value of each fraction. Hexan, butanol, and ethyl acetate extracts exhibited IC₅₀ values of 0.88 mg/ml, 0.34 mg/ml, and 0.6 mg/ml, respectively. Based on this result, the butanol extract (CBBF) was selected to identify its active components using silica chromatography. We also conducted a series of experiments to demonstrate anti-cancer and anti-inflammatory effects of CBBF. The most effective activity was revealed in the extract which was prepared with 100% and 90% of chloroform. We re-segregated the primary extract into secondary fraction using silica chromatography, and we verified that the latter conditions were able to show higher anti-cancer and anti-inflammatory effects. As a result, 100-1, 100-2, 100-3, 100-4, 90-1, 90-2, 20, 0 had anti-cancer effect, while 90-4 and 90-5 exhibited anti-inflammatory function. When we analyzed the combined secondary fractions using HPLC and LC-MASS, we were able to

identify a compound called beauvericin from the *Cordyceps bassiana*. So, we tested the anti-cancer and anti-inflammatory activity of this compound. Unfortunately, beauvericin had strong cytotoxicity, so we could not use it as an anti-inflammatory drug although it displayed anti-inflammatory activity.

3. The inhibitory effect of *Cordyceps bassiana* on atopic dermatitis and preliminary clinical experiment *in vivo*

A. The inhibitory effect of *Cordyceps bassiana* on atopic dermatitis and preliminary clinical experiment *in vivo*

-The atopic dermatitis was relieved by CBBF-Ep treatment comparing with control group in DNFB-induced atopic dermatitis model. In addition, we tested the anti-inflammatory properties of *Cordyceps bassiana* using another dermatitis model: mite antigen-induced dermatitis model. But, steroid which had been used as positive control in dermatitis model didn't show effect against dermatitis in this model. So, we concluded this model is unsuitable for atopic dermatitis model. And also we induced inflammation on the mice ear skin with treatment of TPA dissolved in acetone, then the ears were assessed for abnormalities, edema. We observed the decreased ear thickness and edema on ear dermis.

B. In vivo study of anti-atopic effects by extracts of *Cordyceps bassiana* : a study of difference in effects by making product

- In atopy dermatitis group, there was an increase of the thickness of epidermis and infiltrated deep dendrite in epidermis. Thus, the number of inflammatory cells infiltrating in atopy dermatitis mice was increased. On the other hand, CBW-Es treated group was suppressed in this features. Next, we treated CBW-Es lotion with *Cordyceps bassiana* extract at affected area for 14 days after induced atopy dermatitis by treating 0.2% DNFB three times (one time per 3 days). As a result, CBW-Es lotion has no effect on atopy dermatitis symptoms induced by DNFB.

C. Preliminary clinical trial of anti-atopic product using *Cordyceps bassiana*

- We extracted CBWE on 7 step of extraction such as water extraction, filtration, decompressed concentration, ethanol fractionation, centrifugation, decompressed concentration, and lyophilization, and made 20 mg/ml concentration of CBWE-containing lotion. In atopy dermatitis-induced condition, we mixed cream and 20 mg/ml CBWE and treated the affected area two times a day for 14 days. As a result, atopy dermatitis score was significantly decreased at 20 mg/ml CBWE lotion treated group compared with atopy control group. We also observed pathological changes and mast cell infiltrating after treatment of CBWE on affected area of atopy dermatitis. As a result, 20 mg/ml CBWE treated group significantly decreased epidermal thickness, mast cell infiltration, and serum IgE concentration compared with atopy control. Following these results, we tried a preliminary clinical trial for atopy dermatitis patients by treating 20 mg/ml CBWE-containing cream on affected area two times a day. As a result, after 7 days, 4

patients had satisfactory effects and 3 patient had a little effect for atopy dermatitis treatment. Finally, another 3 patients had no effect for atopy dermatitis.

V. Application plan of results

1. Research achievements

Research achievements							
Paper	Patent	Traing human resource	Finding employment	consultant service	work study program	public relations	commercialization
7	5	8	5	4	2	1	1

2. Application plan of results

- Group 1

- 1) We will try effective evaluation of anti-inflammatory effect by established screening systems related to inflammatory responses. It is possible that our results are used as control data for similar studies.
- 2) We will try effective evaluation of anti-atopic and anti-allergic effects by established screening system related to allergic and atopic disease. It is possible that our results are used as control data for similar studies. Furthermore, this research can applicate to another research because we established the evaluation methods using in vitro and in vivo atopic experiment models.
- 3) We confirmed inhibitory effects of *Cordyceps bassiana*-derived components in atopic, allergic, and inflammatory conditions. In addition, we will readily make use of this components for atopy/allergy treatment because we found that these compounds can be targeted in a signaling pathway in atopy dermatitis.
- 4) It is possible for us to develop *Cordyceps bassiana*-derived products for atopy therapy using *Cordyceps bassiana*-derived component screening and anti-atopic effect verification method.

- Group 2

- 1) We can easily apply active component of *Cordyceps bassiana* on various disease such as atopy, allergy, cancer, and inflammation.
- 2) It is valuable that we evaluate various components by established method of toxicity and efficacy.
- 3) Application of this study for increase of component solubility and a medicine in manufacturing product.

- Group 3

- 1) We can applicate a study of anti-atopic effects by another natural products besides *Cordyceps bassiana* through established atopic disease mouse models.
- 2) It is valuable that we manufacture therapeutic products for atopic dermatitis because atopy patients already tested cream containing *Cordyceps bassiana* derived component.
- 3) We made trial product for treatment atopy disease using extract of *Cordyceps bassiana*.

CONTENTS

Summary	2
Chapter 1. Outline of the research project	17
1. A purpose and field and the necessity of the research	17
2. A strategy, plan and system in development of the research	23
Chapter 2. The state of art in the country and abroad	25
1. A comparison of art in the country and abroad.....	25
2. Analysis of patents.....	25
3. Analysis of research papers.....	27
4. Analysis of market.....	28
Chapter 3. Contents and results of the research	31
1. Contents and results of the research of group 1	31
2. Contents and results of the research of group 2	49
1. A research of active components for anti-atopic effects from <i>Cordyceps bassiana</i>	49
2. Safety test of materials from <i>Cordyceps bassiana</i> (toxicity).....	88
3. Safety test of new active components : Subacute Oral Toxicity by ethanol insoluble extract of cultivated <i>Cordyceps bassiana</i>	94
4. A research of increase solubility for a medicine of materials	101
5. Pharmaceutical Formulation of materials - A design of cosmetic formulation using extracts of <i>Cordyceps bassiana</i>	102
6. A analysis of structure and a research of synthesis for materials (active components) : synthesis of cordycepin derivates contained fluorine.....	104
7. A establishment of analysis method for active components : inhibitory effects of mushroom tyrosinase by butanol fraction of cultured <i>Cordyceps bassiana</i>	108
3. Contents and results of the research of group 3	112
1. in vivo anti-atopic dermatitis effects and pre-clinical study by <i>Cordyceps bassiana</i>	112
2. In vivo study of anti-atopic effects by extracts of <i>Cordyceps bassiana</i> : a study of difference in effects by making product	119
3. Pre-clinical trial of anti-atopic product using <i>Cordyceps bassiana</i>	124
Chapter 4. Objective achievement and contribution to relative field	132

Chapter 5. Application plan of results	138
Chapter 6. Science technology informations collected from abroad during research program	144
Chapter 7. References	146

목 차

요약문-----	2
제 1 장 연구개발 과제의 개요-----	17
제 1절. 연구개발 목적 및 필요성-----	17
1. 연구개발의 필요성-----	17
2. 연구개발의 목적-----	19
3. 과제별(세부·협동) 연구개발의 범위 및 내용-----	20
4. 연차별 연구개발의 범위 및 내용-----	21
제 2절. 연구개발의 추진전략·방법 및 추진체계-----	23
1. 연구개발의 추진전략·방법-----	23
2. 연구개발의 추진체계-----	24
제 2 장 국내외 기술개발 현황-----	25
제 1절. 본 연구관련 국내외 기술수준 비교-----	25
제 2절. 특허분석-----	25
1. 특허분석 범위-----	25
2. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성-----	26
제 3절. 논문분석-----	27
1. 논문분석 범위-----	27
2. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성-----	27
제 4절. 제품 및 시장 분석-----	28
1. 생산 및 시장현황-----	28
2. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과-----	29
3. 분석결과 향후 연구계획-----	30
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과-----	31
제 1절. 세부과제 연구개발수행 내용 및 결과-----	31
제 2절. 제 1협동과제 연구개발수행 내용 및 결과-----	49
1. 동충하초의 향아토피 생리활성 분획 및 유효성분의 분석연구-----	49
2. 원료안전성 시험 (독성)-----	88
3. 신규 효능성분의 안전성 시험 : 배양 노랑다발동충하초 에탄올 불용분획의 아급성 경구독성-----	94
4. 원료성분들의 제제 용해성 증대 연구-----	101
5. 원료제재화 - 동충하초추출물의 향장품 제형설계-----	102
6. 원료(효능성분) 구조분석 및 합성법 연구 : 불소를 함유하는 Cordycepin 유도체의 합성-----	104
7. 효능성분 분석법 확립 : 배양 노랑다발동충하초 부탄올 분획의 Mushroom	

tyrosinase 저해 활성-----	108
제 3절. 제2 협동과제 연구개발수행 내용 및 결과-----	112
1. 동충하초의 <i>in vivo</i> 아토피성 피부염 억제 효능 및 예비임상 연구-----	112
2. 동충하초 추출분획의 항아토피 효능에 관한 <i>in vivo</i> 연구: 제품화에 따른 효능 차이 연구-----	118
3. 항아토피 제품의 예비임상평가-----	124
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도-----	132
제 1절. 1차년도 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용-----	132
제 2절. 2차년도 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용-----	134
제 3절. 3차년도 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용-----	136
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획-----	138
제 1절. 연구성과-----	138
1. 연구개발결과의 성과 및 활용목표 대비 실적-----	138
2. 논문게재 성과-----	138
3. 특허 성과-----	140
4. 인력활용/양성 성과-----	141
5. 경제사회 파급효과-----	141
제 2절. 연구개발결과의 활용방안(사업화 및 현장적용 계획 포함)-----	142
1. 기대성과-----	142
2. 연구성과 활용계획-----	143
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보-----	144
제 7 장 참고문헌-----	146

제 1장 연구개발 과제 의 개요

제 1절. 연구개발 목적 및 필요성

1. 연구개발의 필요성

□ 국내외적으로 아토피 질환 발생 증가

최근, 서울에 사는 6살 미만 아동 10명 가운데 4명 꼴로 아토피성 피부염을 앓았던 것으로 나타나 이들 질환의 심각성이 강력히 제기되고 있음. 즉, 6살 미만 아동 86명 중 41.7%가 아토피성 피부염을 앓은 적이 있는 것으로 파악됐고, 전체 응답자 가운데 22%는 최근 1년 동안 아토피 증상이 나타난 것으로 조사되었음. 또한 23.6%는 아토피성 피부염과 함께 천식을 앓은 적이 있다고 답하였고, 알레르기 비염과 알레르기 결막염을 같이 앓은 아동도 각각 32%와 24%로 조사되었음.

세계일보 2006년 12월 27일 기사

- 아토피 증상 및 알러지 질환은 산업의 발달, 식생활의 서구화 및 인스턴트화, 심각한 환경오염 발생, 새집증후군과 같은 신종 질병 등과 함께 동반되면서, 21세기에 접어들어 더욱 꾸준히 증가하고 있는 추세임.
- 이와같은 아토피성 피부염의 발병 추세는 국내뿐 아니라 서구사회나, 심지어 개발이 진행되고 있는 여러 후진국에서 조차도 심각하게 발생되고 있으므로, 이 질환 치료제는 범세계적인 시장수요를 창출할 것으로 예상되고 있음.

□ 주 환자층인 어린아이들을 대상으로 하는 안전하고 효과적인 치료제 개발요구 증가

특히 주 환자군이 어린 아이들이라는 점 때문에 아토피 질환 치료제는 무엇보다 안전하고 효과가 뛰어나야 하며, 이를 위해서는 새로운 합성적 방법에 의한 치료제 개발보다는, 기존부터 이미 알려져 있는 안전한 생약이나 식용 식물로부터 치료자원을 소재화하는 것이 더 타당한 것으로 받아들여지고 있음.



-아토피 증세-



아토피 증세로 고통받고 있는 사람들...

From kr.img.blog.yahoo.com/ybi/1/3b/23/goljae21

- 소득수준별 아토피 유병율을 보면 소득증가에 따른 유의적인 아토피 질병발생을 확인할 수 있다. 이는 향후 선진국 진입에 따른 소득증가는 아토피 발병에 의한 국민적 고통을 유도할 것으로 판단되어 더욱 공격적인 항아토피 치료용 소재 개발 투자가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

- 잦은 재발이 동반되는 질환이므로 근원인 치료제 개발이 요구
 - 알려지나 아토피성 질환은 계절적 요인, 환경적 요인 및 식이적 요인 등이 복합적으로 다양하게 작용함으로써 발생되며, 대부분 회피할 수 없는 환경이나 삶의 패턴 때문에 악화되거나 치유되는 현상이 반복적으로 진행되기도 함.
 - 심각한 아토피성 피부염 환자들은 사회생활의 지장을 초래할 정도로 이들 질환은 큰 사회적 파장을 불러일으키고 있음.
 - 실제 치유된 아토피 환자들의 경우는 삶의 질을 향상시켰다는 차원에서 환자 개인뿐 아니라 사회전반에 걸쳐 큰 영향을 끼치고 있음.
 - 따라서, 증상을 완화시키는 대중적 요법 치료제 보다는 근원적인 원인을 제거해주는 강력한 치료제 개발이 시급한 실정임.

- 지역경제 회복과 지방 자립도 향상에 기여할 지역특산물을 이용한 기능성 향장품 제제화연구 필요성 부각
 - 지역주민의 경제적인 향상과 지방자치단체의 수입증대는 인구감소 추세와 지방 자립화 시대에 접어들면서 생존을 위한 전략적 필요성으로 부각되고 있음.
 - 기능성 향장품 제제화 연구는 성공적으로 수행 시 동충하초 생산 농가의 소득향상에 기여하게 되며, 이는 지역의 경제 부흥과 지방 자립도 향상에 크게 이바지할 것으로 판단됨.
 - 본 연구의 성공적 수행은 지방 특산물의 고부가 가치화 및 기능성화 추진 성공 모델이 될 것으로 예상됨.

- 접근성과 수익성이 높은 소재
 - 동충하초는 느타리, 표고, 양송이, 영지, 팽이 및 송이와 함께 한국에서 주로 생산되는 대표적인 식·약용버섯의 하나이다. 이들 중 송이를 제외하고는 모두 농업 또는 임업부산물을 이용하여 인공재배하고 있으며 해를 거듭할수록 생산량은 크게 증가하고 있음
 - 이들 버섯류는 어떤 작물보다도 고수익성 소득작물임
 - 최근 다양한 과학적 접근을 통해, 동충하초가 가지는 다양한 활성 및 구체적인 활성성분 등이 보고되고 있지만, 여전히 많은 부분이 명확히 밝혀져 있지 않음. 특별히 동충하초 류가 나타내는 다양한 약리작용에 관한 기전연구가 충분히 진행되고 있지 않고 있으며, 유효 효능성분의 분리 동정연구 (phytochemical study) 역시 여전히 미흡한 실정임
 - 동충하초의 항아토피 작용과 유효성분을 구체적이고 체계적인 연구를 통해 과학적으로 규명한다면, 이들 버섯류의 소비증대를 유도하게 되어 궁극적으로는 동충하초 버섯 재배 농가의 소득증대에 크게 기여할 수 있을 것으로 예상됨.

2. 연구개발의 목적

- 동충하초를 이용하여 항아토피 기능성 제품 개발
- 동충하초로부터 항아토피 기능성 소재화 연구를 위한 활성성분 분획화 및 분리와 최적 활성 물질 분리정제공정 개발,
- 동충하초내 생리활성 후보분획 혹은 물질의 항아토피 효능평가
- 항아토피 활성 생리물질을 이용한 기능성 향장제품 개발

동충하초로부터 항아토피 효능을 가지는 분획 및 활성물질을 분취하여 향장품 기술을 접목함으로써 이들 활성물질이 함유된 무독성 및 고기능성 항아토피 향장 제품을 개발하고자 함.



◆ 최종목표: 항아토피 기능성 향장제품 개발

◆ 구체적 목표:

- ▶ 동충하초로부터 분획화/활성성분 분리 및 최적 항아토피 활성 물질 분리정제공정 개발
- ▶ 동충하초유래 생리활성 분획 혹은 물질의 in vitro/in vivo 항아토피 효능평가
- ▶ 항아토피 활성 생리물질을 이용한 기능성 향장제품 개발

3. 과제별(세부·협동) 연구개발의 범위 및 내용

세부과제	연구 범위	연구 개발 내용
제1세부과제	동충하초의 in vitro 항아토피 활성화 및 세포분자 표적 연구	<ol style="list-style-type: none"> 1. 대식세포 매개성 질병조절 효과 및 표적단백질 검증 2. 수지상세포 매개성 질병조절 효과 및 표적단백질 검증 3. Th1/Th2 세포 매개성 질병조절 효과 및 표적단백질 검증 4. B 세포 (항체) 매개성 질병조절 효과 및 표적단백질 검증 5. 동충하초 유효성분의 물성 파악 연구
제1협동과제	동충하초 유효분획 및 성분의 화학적, 생화학적 및 제약학적 특성연구	<ol style="list-style-type: none"> 1. 동충하초의 항아토피 생리활성 분획 및 유효성분의 분석연구 2. 단일유효성분에 대한 화학구조 분석 및 대량합성공정 연구 3. 항아토피 효능분획 및 성분의 안전성 시험 (독성 유전독성평가) 4. 항아토피 제제의 제약학적 특징연구 (제형연구) 5. 항아토피 기능성분/유해성분의 규격 및 분석법 확립
제2협동과제	동충하초의 in vivo 아토피성 피부염 억제 효능 및 예비임상 연구	<ol style="list-style-type: none"> 1. 아토피 유발원에 따른 in vivo 항아토피효능평가 2. 제형변경에 따른 in vivo 항아토피성 효능평가 3. 예비임상효능평가 연구

4. 연차별 연구개발의 범위 및 내용

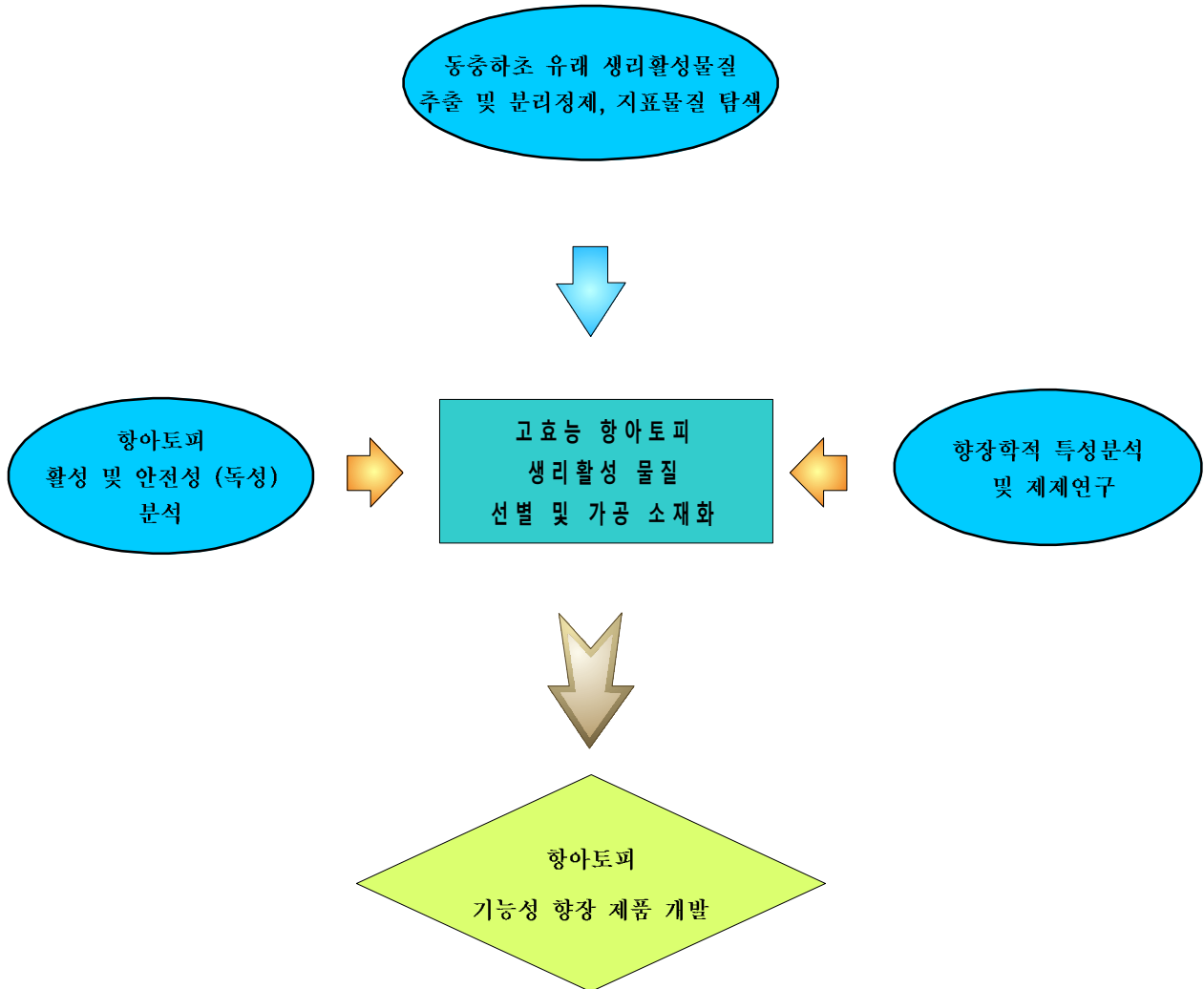
구분	연도	연구개발의 범위		연구개발의 내용
1차 년도	2008	세부	<i>In vitro</i> 항아토피 (Th1/Th2) 시험	-사이토카인 (IL-4/IFN-gamma) 분비능 정량평가 -염증매개물질 분비능 정량평가 -adhesion molecule (integrins) 활성능 정량평가 -신호전달단백질 (Syk/JAK) 활성조절능 정량평가 -Transcription factor (STAT-1/GATA-3/ T-bet) 활성능 평가
		제1협동	원료 특성시험 및 추출공정 개선 연구	-CBBF의 soluble fraction 및 insoluble fraction의 혈관질환관련 연구 -원료안전성 시험 (독성) -원료 성분들의 제제용해성 증가연구 -원료 특성(성상/물성/화학적 특성)시험 -원료제조공정 및 방법 관련 연구자료작성
		제2협동	동충하초 추출분획의 항 아토피 효능에 관한 <i>in vivo</i> 연구: 아토피 유발원에 따른 효능 차이 연구	-유발원에 따른 <i>in vivo</i> 효능차이 연구 -추출용매조건에 따른 <i>in vivo</i> 효능차이 연구
2차 년도	2009	세부	<i>In vitro</i> 항아토피 (APC/mast cells) 시험	-사이토카인 분비능 (IL-12/IL-3) 정량평가 -염증매개물질 (히스타민) 분비능 정량평가 -adhesion molecule 활성능 정량평가 -신호전달단백질 (Syk/MAPK) 활성조절능 정량평가 -Transcription factor (STAT-1/NF-kB/AP-1) 활성능 평가
		제1협동	기능성 성분분리 및 분석법 정립 (구조분석)	- 항아토피 성분의 추출분리 및 구조분석 -신규 효능성분의 안전성 시험 -동충하초 제제의 혈관질환관련 연구 -원료제제화 -원료(효능성분) 구조분석 및 합성법 연구 -효능성분 분석법 확립
		제2협동	동충하초 추출분획의 항 아토피 효능에 관한 <i>in vivo</i> 연구: 제품화에 따른 효능 차이 연구	-가용 제제용매조건에 따른 <i>in vivo</i> 효능차이 연구 -제품화에 따른 <i>in vivo</i> 효능차이 연구

3차 년도	2010	세부	<i>In vitro</i> 항 아토피 기전 (분자표적 단백질)연구	<ul style="list-style-type: none"> -사이토카인 분비능 정량평가 -염증매개물질 분비능 정량평가 -adhesion molecule 활성능 정량평가 -신호전달단백질 활성조절능 정량평가 -Transcription factor 활성능 평가 -kinase assay 평가
		제1협동	유해물질 분석 및 시험방법 정립	<ul style="list-style-type: none"> -아토피 제제의 혈관질환관련 연구 -아토피 효능성분의 대량합성공정연구 -아토피 항장제제의 안전성 시험 -아토피 항장제제의 원료 안정성 시험 -가공제품의 pilot 생산과 제조공정의 최적화 및 최종 제품규격 확립 -유해물질 시험법 확립
		제2협동	항 아토피 제품의 예비임상평가	<ul style="list-style-type: none"> -예비 임상 평가 조건시험 -예비 임상 시험

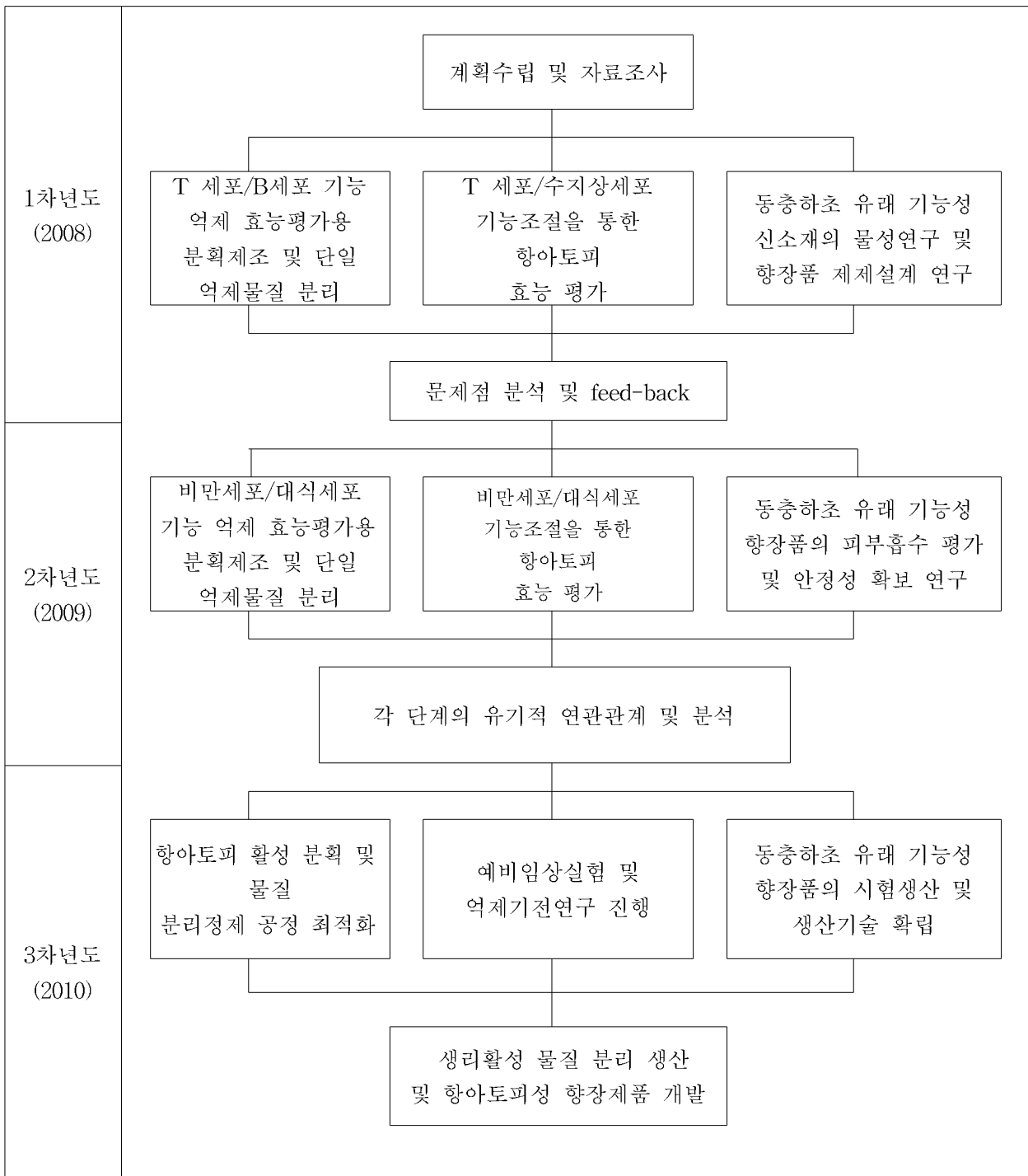
제 2절. 연구개발의 추진전략·방법 및 추진체계

1. 연구개발의 추진전략·방법

□ 추진전략



2. 연구개발의 추진체계



↓

항아토피 활성물질 함유
기능성 향장품 개발

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1절. 본 연구관련 국내외 기술수준 비교

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라	연구신청팀		
동충하초 액체배양기술	대한민국	100%	100%	150%	특허보유
동충하초 자실체 형성	대한민국	100%	100%	150%	특허보유
동충하초 대량생산기술	대한민국	100%	100%	200%	특허보유
동충하초의 생리활성	대한민국	80%	100%	150%	특허보유
동충하초 기능성제품개발	대한민국	50%	80%	120%	특허보유
동충하초의 신물질 탐색	대한민국	50%	80%	150%	특허보유
동충하초의 유효성분 구조규명	대한민국, 미국	30%	50%	100%	특허보유

제 2절. 특허분석

1. 특허분석 범위

대상국가	국내, 국외(미국, 일본, 유럽)
특허 DB	특허정보원 DB(www.kipris.or.kr)
검색기간	최근 5년간
검색범위	Cordyceps spp. militaris, Cordyceps purinosa, products, codycepin.

2. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명	동충하초 액체배양 기술	동충하초 자실체 형성	동충하초 대량생산 기술	동충하초 의 생리활성	동충하초 기능성 제품개발	동충하초의 신물질 탐색	
Keyword	liquid culture, Cordyceps	fruit body Cordyceps	mass production, Cordyceps	Physiological activity, Cordyceps	health foods, Cordyceps	new compound, Cordyceps	
검색건수	7	14	8	44	13	1	
유효특허건수	1	1	3	0	0	1	
핵심특허 및 관련성	특허명	동충하초 자실체의 대량생산을 위한 액체종균 배양방법 및 그 장치	신규한 번데기 동충하초 균주와 그 종균 및 자실체 재배방법	1.출원번호 : 102000003 5753 2. 출원번호: 102000003 5752 3. 출원번호: 102000003 5751	--	--	밀리타리스 동충하초로부터 분리된 항암활성이 있는 신물질과 그 제조방법 및 용도
	보유국	한국	한국	한국	--	--	한국
	등록년도	2006	2001	2004	--	--	2005
	관련성(%)	100%	30%	100%	--	--	100%
	유사점	본 연구팀의 특허	유사하지 만, 현재 소멸된 특허임.	3건 모두 본 연구팀의 특허	--	--	본 연구팀의 특허
	차이점	--	배지의 차이점	--	--	--	--

제 3절. 논문분석

1. 논문분석 범위

대상국가	미국, 일본, 유럽
논문 DB	pubmed DB(www.ncbi.nlm.nih.gov)
검색기간	최근 5년간
검색범위	제목, 초록 및 키워드

2. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명	(기술 1)	(기술 2)	(기술 3)	(기술 4)
Keyword	cordyceps inflammation	cordyceps cancer/toxicity	cordyceps cordycepin	cordyceps atherosclerosis
검색건수	13	7	23	0
유효논문건수	9	5	8	0
핵심논문 및 관련성	논문명	Evaluation of the anti-inflammatory and anti-proliferation tumoral cells activities of <i>Antrodia camphorata</i> , <i>Cordyceps sinensis</i> , and <i>Cinnamomum osmophloeum</i> bark extracts	Morphological and genetic characterization of a cultivated <i>Cordyceps sinensis</i> fungus and its polysaccharide component antioxidant property in H22 tumor-bearing mice	Cordycepin (3'-deoxyadenosine) inhibits the growth of B16-BL6 mouse melanoma cells through the stimulation of adenosine A3 receptor followed by glycogen synthase kinase-3 β activation and cyclin D1 suppression
	학술지명	Journal of Ethnopharmacology	Life Sciences	Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology
	저자	Yerra Koteswara Rao, Shih-Hua Fang and Yew-Min Tzeng	Jiaping Chen, Weiyun Zhanga, Tingting Lu, Jing Li, Yi Zheng and Lingdong Kong	Noriko Y, Shizuo Y, Chihiro T, Satomi K, Kazumasa S, Masaru K and Kazuki N
	게재년도	2007	2006	2007
	관련성(%)	30%	10%	20%
	유사점			
	차이점			

제 4절. 제품 및 시장 분석

1. 생산 및 시장현황

가. 국내 제품생산 및 시장 현황

국내의 동충하초 제품은 약 100여종 정도이며, 피로회복 및 체력 증진을 위한 건강 보조식품과 음료가 90% 이상으로 주를 이루고 있는 추세이다. 대체로 중소기업에서 생산하는 제품들이며, 그 제품들은 동충하초 추출물 및 고형분을 포함한 가공식품류이다. 또한 대형 식품 업체인 풀무원이나 몇몇 제약회사에서 출시하는 제품들은 대부분 동충하초 추출물 외에도 각종 천연 추출물을 혼합한 것들이며, 대체로 자양강장을 목적으로 하고 있다. 이러한 기업체 외에도 대다수의 동충하초 재배 농가가 직접 고형분을 만들어 판매하기도 한다.



- 국내 동충하초 제품들. 풀무원 ‘동충하초 프라임’(왼쪽), 동화제약 ‘동충하초’(가운데), 동성제약 ‘이력신’(오른쪽).

동충하초는 가공식품 및 음료 외에도 최근 화장품에 적용되고 있다. 그 예로 (주)하늘바람꽃에서 출시된 미백 기능성 화장품 ‘디리닌’과, 벤처기업인 마이코플러스에서 출시한 지루성 피부염 화장품 ‘JIRU-n’, 아토피 케어 화장품 ‘ASTOPY’, 무좀 관리 크림 ‘MUJOMEN’이 있다. 이러한 제품들은 동충하초를 이용한 미백 및 치료의 기능을 확실히 보여주고 있다.

그러나 300여종의 동충하초 중 국내에서 식용으로 허가를 받은 종은 ‘눈꽃 동충하초’와 ‘밀리터리스 동충하초’ 2가지이며, 이들을 이용한 각종 질병 치료 기능성식품 및 의약품의 개발이 거의 이루어 지지 않은 상태이다. 따라서 식용 동충하초의 연구를 통하여 더 많은 건강식품 및 제품이 생산될 것으로 생각되어지며, 단지 자양강장을 목적으로 하는 것 외에도 각종 질환을 치료하고 개선하는 기능성 식품 및 의약품 생산에 주력해야 할 것이다.

나. 국외 제품생산 및 시장 현황



- 국외 동충하초 제품들. Aloha Medicinals Inc. 'CordycepsTM'(왼쪽), Organica 'Cordyceps Mushroom Extract' (오른쪽).

현재 세계 각국에서는 천연물을 이용한 자양강장 제품 시장이 활성화되고 있으며, 특히 그 중에서도 동충하초의 효능 및 효과를 인지하고 그 추출물 및 성분을 이용한 제품들이 많이 생산되고 있다. 국내 시장과 마찬가지로 자양강장 및 면역증강을 위한 각종 건강보조식품이 주를 이루며 그 외에도 몇몇 의약품이 출시되어 있다. 이러한 보조식품은 대체로 알약, 분말, 음료 등의 다양한 형태를 띠고 있다. 미국, 중국, 한국, 일본, 홍콩 등이 거대한 시장을 형성하고 있으며, *Cordyceps sinensis* 를 이용한 제품들이 가장 많이 출시되고 있다. 그 외에도 다른 동충하초들을 이용한 제품 출시도 계속 진행 중이다. 또한 동충하초의 추출물에서 생산된 주성분인 Cordycepin, Adenosine 등을 이용한 의약품들이 생산되고 있다.

2. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

가. 산업화 방향(제품의 특징, 대상 등)

- 동충하초는 그 종류만 300여종 이상이고 다양한 효능을 갖고 있는 것으로 추측됨. 현재 국내 및 국외에서 주로 이용되고 있는 식용 동충하초는 2-3종 정도이고, 그 외의 동충하초는 식용 여부가 확인되지 않은 것이 대부분임. 따라서 다른 종류의 동충하초를 식용으로 이용할 수 있도록 그 기능 및 효능을 스크리닝 하는 것이 중요함.
- 현재 국내 및 국외 시장에서 동충하초를 이용한 제품은 대부분 건강보조식품이며, 그 외에도 적은 종류의 기능성 화장품, 동충하초 유래 성분을 이용한 의약품이 전부임. 동충하초를 이용한 치료목적 및 질환 개선 기능성 식품과 의약품의 개발이 미흡한 실정이므로 각종 질환 치료 기능성 제품을 생산하는 것이 부가가치 창출에 효과적임.
- 최근 성인병 중 대표적 질환인 동맥경화의 주원인은 혈관의 손상과 그로 인한 과도한 염증반응, LDL의 산화를 인한 고지혈증, 고혈압, 혈소판 응집이 있다. 대부분의 경우 동맥경화는 만성적이므로, 지속적인 약물의 섭취가 필요함. 따라서 화학적인 의약품이 아닌 부작용이 적은 천연물 유래의 성분으로 질환 개선 및 치료 제품 개발이 중요함.
- 최종적으로 우리 연구팀은 각종 동충하초의 스크리닝 하여 식용 가능성 및 그 효능을 확인하고, 그 중 항염증 및 혈관신생에 대한 기능을 집중적으로 밝혀냄으로써 동맥경화 및 각종 심혈관, 뇌혈관 질환을 치료하기 위한 기능성 식품을 개발하는 것을 목적으로 함.

나. 산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만원)

항 목 \ 산업화 기준	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과	1,000	2,000	3,000	4,000	5,000	15,000
경제적 파급효과	500	1,000	2,000	3,000	4,000	10,500
부가가치 창출액	1,000	1,500	2,000	2,500	3,000	10,000
합계	2,500	4,500	7,000	9,500	12,000	35,500

- ※ 직접 경제효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 제품의 매출액 추정치
- ※ 경제적 파급효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통한 농가소득효과, 비용절감효과 등 추정치
- ※ 부가가치 창출액 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 수출효과, 브랜드가치 등 추정치

3. 분석결과 향후 연구계획

가. 제품 및 시장분석 측면

- 국내 및 국외 시장에서 그 효능을 인정받고 사용되고 있는 동충하초의 수는 2-5 개에 불과하다. 시장 개척을 위해서 효능을 갖는 다른 종의 동충하초를 스크리닝 하고, 기존 동충하초 종의 효능을 세분화 하여 발전시키는 것이 필요하다.
- 현재 동충하초를 이용한 대부분의 제품은 자양강장을 목적으로 한 건강보조식품 이다. 동충하초를 이용한 치료목적 및 질환 개선 기능성 식품과 의약품의 개발이 미흡한 실정이므로 각종 질환의 치료 및 개선을 목적으로 하는 기능성 제품을 생산하는 것이 부가가치 창출에 효과적일 것이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절. 세부과제 연구개발수행 내용 및 결과

가. 연구목표

In vitro 항아토피 시험을 통해 항아토피 후보 물질로 생각되는 노랑다발 동충하초의 BuOH와 EtOH 분획의 염증 조절 메커니즘을 연구한다.

나. 연구 방법

(1) 대식세포주에서 세포 생존률(cell viability) 실험 결과

세포성 면역활성 효과를 검증하기 위한 선행실험으로서, CBEF와 CBBF이 나타내는 세포생존에 미치는 효과를 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay법을 이용하여 분석하였다. (Cho et al., Eur. J. Pharmacol. 398: 399-407, 2000) 96-well plate에 1×10^6 의 세포를 plating하고 37°C에서 각 면역실험 조건에 상응하는 배양 시간 동안 CO₂ incubator에서 배양한다. 이후 10 μ l MTT 용액 (stock concentration : 5 mg/ml)을 첨가하고 3시간 동안 추가반응을 유도하였다. 반응 종료 및 formazan crystal 용해를 위해 각 well에 100 μ l MTT stopping solution (10% Sodium dodecyl sulfate in 0.01M HCL)을 추가적으로 첨가하였다. 세포 생존율은 MTT가 formazan으로 환원된 양을 570 nm에서 흡광도를 측정하여 얻어진 OD 값을 통해 산출하였다.

(2) 염증매개 물질인 Nitric Oxide (NO) 분비능 정량 평가

마우스 대식세포주인 RAW264.7를 penicillin (100 IU/ml) 및 streptomycin (100 μ g/ml)과 10%의 FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지를 이용해서 1×10^6 cell/ml의 농도로 조절한 후, 96 well plate에 접종하고, 5% CO₂ 및 37°C에서 18시간 동안 전배양하였다 (Cho et al., Eur. J. Pharmacol. 398: 399-407, 2000). 이후 배지를 제거하고 4배 농도로 조제된 CBEF와 CBBF 50 μ l와 50 μ l의 LPS (최종농도 1 μ g/ml) 함유 배지를 동시에 처리하여 배양하였다. 24시간 후 상층액을 100 μ l씩 또 다른 96 well plate에 옮기고 NO 정량은 Griess 용액 (0.5% naphthylethylenediamine dihydrochloride, 5% sulfanilamide, 25% H₃PO₄)을 이용하여 실시하였다. 표준물질로 sodium nitrite (0 에서 100 μ M) 를 사용하여 검량선을 작성하였다.

(3) 세포-fibronectin 점착능 확인 실험

Human monocyte 세포주인 U937을 이용하여 세포와 세포외 기질의 주요구성 물질인 fibronectin과의 점착능을 확인하였다. 이러한 세포와 세포외 기질의 상호작용은

세포의 분화와 증식, 그리고 기능의 활성화에 중요한 역할을 한다. 따라서 대식세포의 전구세포인 monocyte를 이용하여 실험을 진행하였다. Human monocyte 세포주인 U937 세포는 5% CO₂, 37°C incubator에서 배양하며, 배지는 10% FBS가 포함된 RPMI 1640을 사용하였다. cell-fibronectin 점착능은 96 well plate에 37°C에서 2시간동안 fibronectin을 코팅한 후 1×10⁶ cells/ml 농도로 세포를 접종하고 시험물질을 처리한다. 4시간 후 PBS로 세척한 후 crystal violet으로 세포를 염색한 후 흡광도를 측정하여 정량하였다.

(4) 세포-세포 응집능 확인 실험

Human monocyte 세포주인 U937을 이용하여 세포와 세포 사이의 응집능을 확인하였다. 이러한 세포와 세포의 상호작용은 세포의 분화와 증식, 그리고 기능의 활성화에 중요한 역할을 한다. 따라서 대식세포의 전구세포인 monocyte를 이용하여 실험을 진행하였다. Human monocyte 세포주인 U937 세포는 5% CO₂, 37°C incubator에서 배양하며, 배지는 10% FBS가 포함된 RPMI 1640을 사용하였다. 세포-세포 응집능은 96 well plate에 1×10⁶ cells/ml 농도로 세포를 접종한 후 시험물질을 처리한다. 그 후 CD43과 CD29 antibody를 처리하고 현미경으로 세포를 관찰하였다.

(5) 신호전달 과정 검토 - Western blotting

Murine 대식 세포주인 RAW264.7 세포를 penicillin (100 IU/ml) 및 streptomycin (100 µg/ml)과 10%의 FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지를 이용해서 배양한 세포를 7×10⁶ cells/ml 농도로 60mm의 dish에서 전 배양시킨다. 이후 각 분획들을 처리하고 일정시간 후 stimuli (Lipopolysaccharide)로 자극하고 약물에 따른 일정시간 후 cell 들을 모아서 lysis buffer와 sonicator를 사용해 세포를 깨어 western 표본을 얻어냈다. 그리고 각 표본의 단백질 농도를 BSA를 표준으로 잡고 측정했다. 이렇게 얻어진 값을 기준으로 단백질 농도가 되는 각 표본량을 가지고 SDS-PAGE를 실행하고, wet blotting 방법을 사용해 PVDF membrane으로 단백질을 blotting시킨 후 membrane을 5 % non-fat dried milk (Bio-rad)를 사용해 blocking시키고, 원하는 항체 용액을 사용해 1차 처리하고, 다시 washing 단계 후 2차 항체 용액을 처리하고 washing했다. 그리고 암실에서 membrane에 ECL 용액 (Amersham, England)을 골고루 분주하여 X-ray film으로 감광했다.

(6) Luciferase 활성을 이용한 프로모터 활성 평가

HEK 293 세포주를 이용하여 Calcium Phosphate 법을 이용하여 DNA를 transfection 하였다. transfection 6시간 후 배지를 교체해주고, 24시간 쯤에 24 well plate에 같은 양으로 나누어 옮겨준다. 다시 24시간 배양 후 시험물질을 농도 별로 처리한 후 30분 배양하고, 각각의 DNA를 활성화 시키는 stimuli를 처리한 후 6-18 시간동안 배양한다. 배양 후 lysis buffer를 이용하여 세포를 용해시키고 substrate와 1:1로 반응 시킨다. 반응 후 바로 Luminometer로 흡광도를 측정한다.

(7) splenocyte로부터 분리된 사이토카인 정량

Balb/c mouse로부터 무균조작으로 spleen을 적출하고 주사기를 이용하여 차가운 RPMI 1640 배지로 splenocyte를 분리하였다. 분리된 splenocyte를 원심분리로 모은 후 0.83% ammonium chloride-20 mM 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 1×10^7 cells/ml 농도로 96 well plates에 접종한다. CBEF와 CBBF를 50 μ g/ml, 100 μ g/ml의 농도로 전처리하고, LPS, Concanavaline A (ConA), phytohemagglutinin (PHA)를 10 μ g/ml의 농도로 동시에 처리한 후 48시간 동안 배양하였다. 그 후 상층액을 채취하여 IL-4와 IFN- γ 의 분비량을 ELISA법으로 확인하였다.

(8) RT-PCR을 이용한 전사수준에서 mRNA 발현량 측정

사이토카인 및 화학물질의 발현 정도를 전사수준에서 조사하기 위해 각 시료를 일정시간동안 처리하여 배양한 세포로부터 Trizol reagent를 처리하여 total RNA를 추출하고 First strand cDNA synthesis kit (Fermentas)에 의해 cDNA를 제조한 다음, 동량의 cDNA를 PCR로 증폭시켰다 (Hong et al., 2003). 이때 사용한 표적단백질의 sense 및 antisense primer 염기서열은 기존문헌을 참조하여 제조하였다. PCR amplification은 i-Master PCR kit (iNtRON)을 사용하여 각 실험군 cDNA와 표적단백질들의 sense 및 antisense primers, 대조군 GAPDH primers 및 dNTP 250 μ M, Tris-HCL(pH8.3) 10mM, KCl 50mM, NgCl₂ 1.5mM를 포함한 HiPi solution 20 μ l에서 시행하며, PCR은 94 $^{\circ}$ C에서 45초 간 denaturing, 30초 간 annealing 그리고 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 extension 하는 조건으로 시행하였고, 각각의 primer에 대한 annealing temperature와 cycle 수는 GAPDH는 55 $^{\circ}$ 에서 25 cycles, IL-12p40은 58 $^{\circ}$ 에서 35 cycles을 실시하였다.

(9) 대식세포로부터 분리된 사이토카인 정량

대식세포 주인 RAW264.7 세포를 10% FBS 함유 RPMI 1640 배지를 이용하여 1×10^7 cells/ml 농도로 96 well plates에 접종한다. CBEF와 CBBF를 50 μ g/ml, 100 μ g/ml의 농도로 전처리하고, LPS 1 μ g/ml의 농도로 동시에 처리한 후 TNF- α 의 경우 6시간, PGE2의 경우 24시간 동안 배양하였다. 그 후 상층액을 채취하여 TNF- α 와 PGE2의 분비량을 ELISA법으로 확인하였다.

다. 연구 결과

(1) 사이토카인 분비능 정량평가

(A) CBBF

(B) CBEE

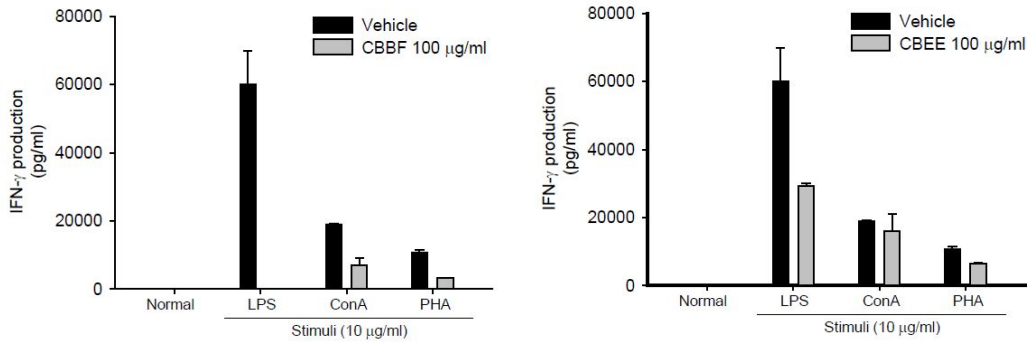


Fig.1-1 mouse의 splenocyte에서 CBBF 및 CBEE에 의한 IFN- γ 억제 효과

염증 반응에 관여하는 T 세포 유래의 사이토카인 중 전염증성 사이토카인인 IFN- γ 와 항염증성 사이토카인인 IL-4의 생성량을 측정하였다. 그 결과 노랑다발 동충하초의 BuOH 분획 (CBBF)에 의해 전염증성 사이토카인인 IFN- γ 의 생성량이 모든 Stimuli 조건에서 억제하는 것을 확인할 수 있었으며, 또한 LPS 조건에서 가장 강력하게 억제한다는 것을 Fig.1-1A를 통하여 확인하였다. 노랑다발 동충하초의 EtOH 분획 (CBEE)에 의한 IFN- γ 의 생성은 모든 stimuli 조건에서 억제 되었으나, 그 수준이 CBBF와 비교했을 때 미약한 것을 Fig.2에서 확인 할 수 있다. CBEE 역시 LPS 조건에서 가장 강력히 억제하였다 (Fig.1-1B). 따라서, 노랑다발 동충하초 분획들은 Splenocytes에서 분비된 전염증성 사이토카인인 IFN- γ 를 억제하며, 그 중 LPS 자극 조건에서 그 억제 효과가 가장 강력하다는 것을 확인하였다.

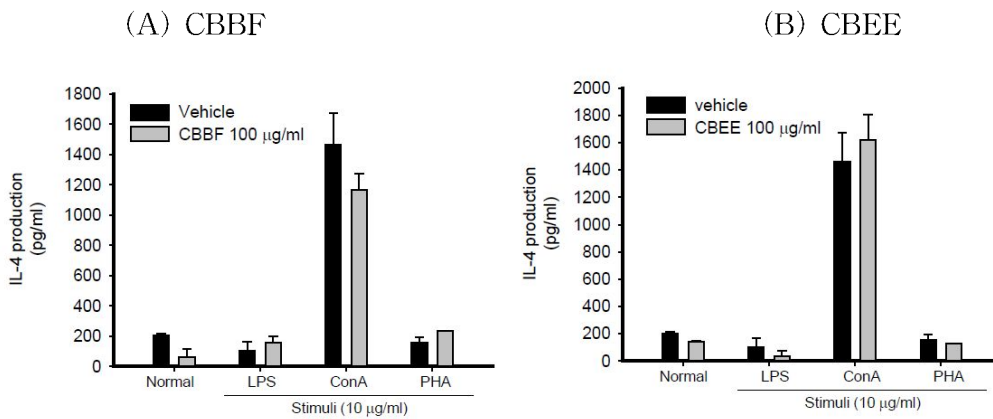


Fig.1-2 mouse의 splenocyte에서 CBBF 및 CBEE에 의한 IL-4 억제 효과

염증 반응에 관여하는 T 세포 유래의 사이토카인 중 항염증성 사이토카인인 IL-4의 생성량을 측정한 결과, CBBF 및 CBEE는 특정 stimuli 조건에서만 IL-4를 억제하는 것을 Fig.1-2를 통해 알 수 있었다. 특히 CBBF는 ConA 조건에서, CBEE는 LPS 조건에서 IL-4를 억제하였다. 이러한 결과에 의해 CBBF와 CBEE에 의한 IL-4의 생성 억제 효과는 그 조절 기전이 다를 것이라고 생각할 수 있다.

(2) 염증매개물질 분비능 정량평가

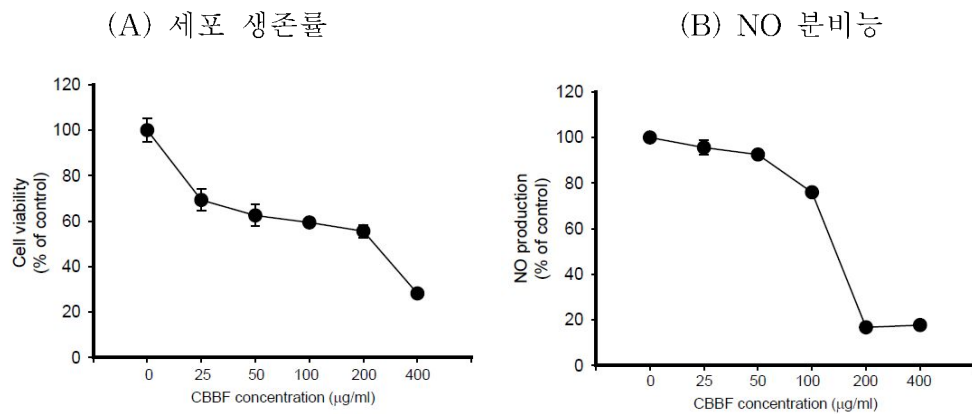


Fig.1-3 대식세포주에서 CBBF에 의한 세포 생존률 및 염증매개물질 NO 분비능 억제 효과

혈액내의 대표적인 면역세포이자 APC 중 하나인 대식세포의 세포주인 RAW264.7을 이용하여 세포독성 및 염증 매개 물질은 NO의 생성 효과를 확인하였다. 24 시간 동안 CBBF를 농도별로 처리한 결과, CBBF의 고농도에서 세포독성이 있는 것을 Fig.1-3A를 통해 확인할 수 있다. 또한, CBBF의 NO 생성능을 확인 한 결과 고농도에서 세포독성이 있는 것에 비하여 90% 이상의 강력한 NO 생성 억제 효과를 갖는 것을 Fig.1-3B를 통해 확인할 수 있었다.

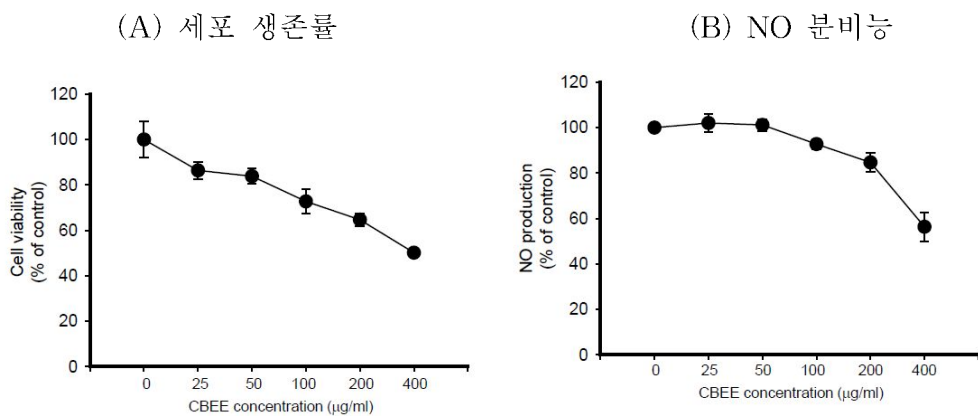


Fig.1-4 대식세포주에서 CBEE에 의한 세포 생존률 및 염증매개물질 NO 분비능 억제 효과

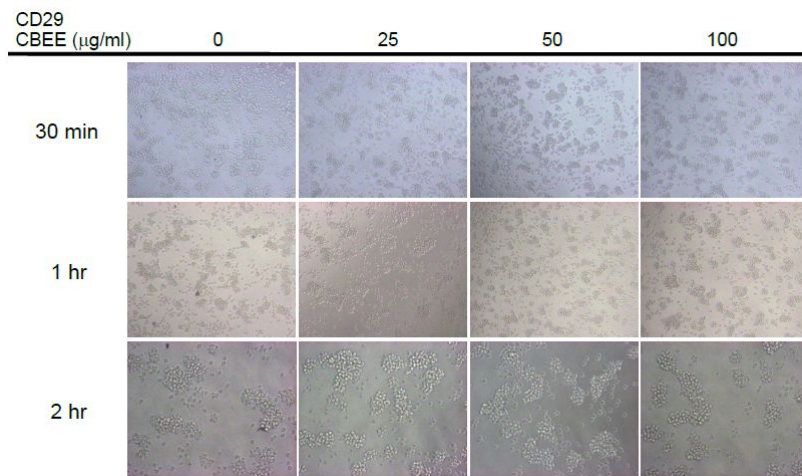
24 시간 동안 CBEE를 농도별로 처리한 경우에는, CBBF와 비교하였을 때 CBEE의 세포 생존률이 20% 정도 높은 것을 알 수 있었다 (Fig.1-4A) 하지만, 그에 비하여 NO 분비능의 억제 효과는 높지 않은 것으로 확인되었다 (Fig.1-4B). 이러한 결과로 볼 때, CBBF는 CBEE에 비해 염증매개물질인 NO 억제 효과가 높으며 그에 따

른 염증반응 억제 효과도 더 높을 것으로 사려된다.

(3) adhesion molecule 활성화 정량평가

Human monocyte 세포주인 U937을 이용하여 세포와 세포 사이의 응집능을 확인하였다. 이러한 세포와 세포의 상호작용은 세포의 분화와 증식, 그리고 기능의 활성화에 중요한 역할을 한다. 따라서 대식세포의 전구세포인 monocyte를 이용하여 실험을 진행하였다.

(A) CD29



(B) CD43

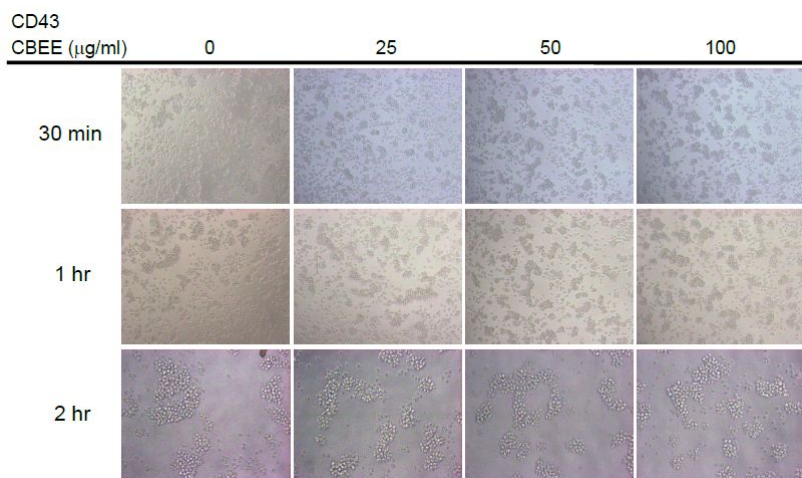
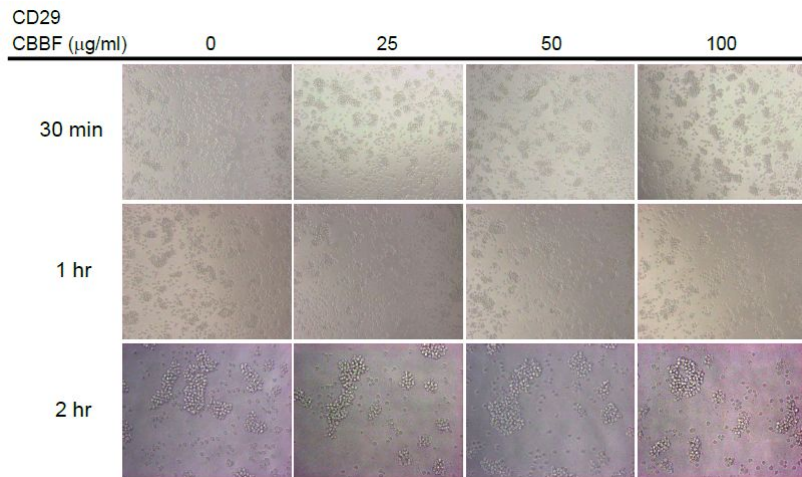


Fig. 1-5 U937 세포-세포간 점착에서 CBEE의 효과

그 결과 CD43에 의해서 응집되었던 세포가 CBEE에 의해 세포간 응집이 억제되는 것을 Fig. 1-5B.를 통해 제시하였다. 그러나 CD29에 의한 세포의 응집은 억제하지 못하였다. 따라서 CBEE는 대식세포의 전구세포인 monocyte의 세포간 상호작용을 CD43에 의한 세포간의 응집능을 억제함으로써 세포 활성화 및 그 기능을 억제한다.

(A) CD29



(B) CD43

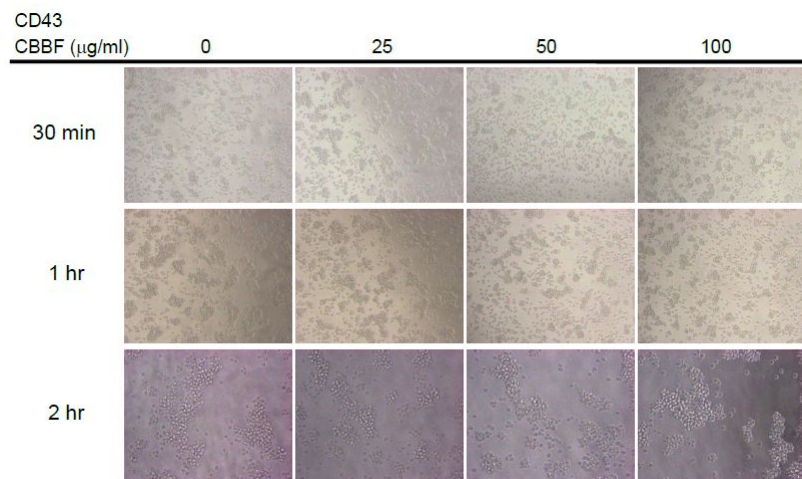


Fig. 1-6 U937 세포-세포간 점착에서 CBBF의 효과

그 결과 CD29에 의해서 응집되었던 세포가 CBBF에 의해 세포간 응집이 억제되는 것을 Fig. 1-6A를 통해 제시하였다. 따라서 CBBF는 대식세포의 전구세포인 monocyte의 세포간 상호작용을 CD29에 의한 세포간 응집능을 억제함으로써 세포 활성화 및 그 기능을 억제한다.

(3) 신호전달단백질 활성화조절능 정량평가

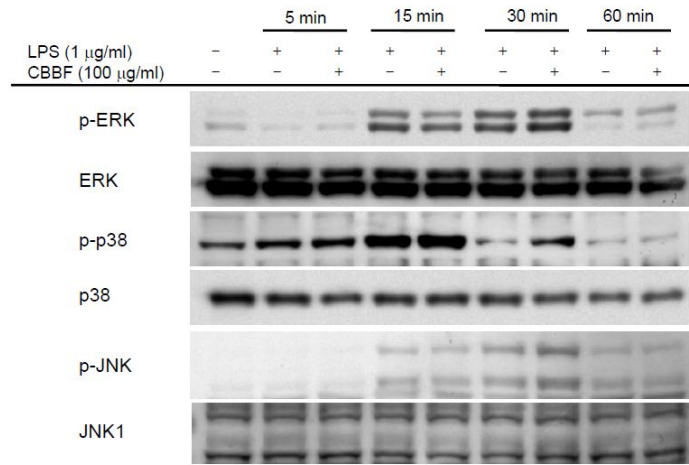


Fig.1-7 대식세포주에서 CBBF에 의한 신호전달 단백질 조절 효과

염증 반응에 관련된 신호전달 과정을 연구하기 위해 RAW264.7 세포에서 LPS에 의해 유도된 신호전달 단백질들의 활성화 정도가 노랑다발 동충하초 분획에 의해 조절되는 수준을 확인하였다. 그 결과, CBBF에 의해 MAP Kinases family 중 하나인 ERK의 인산화 수준이 15분에서 억제된 것을 확인하였다 (Fig.1-7). 그러나 다른 MAP Kinases family인 p38과 JNK의 인산화 수준은 억제하지 못하였다.

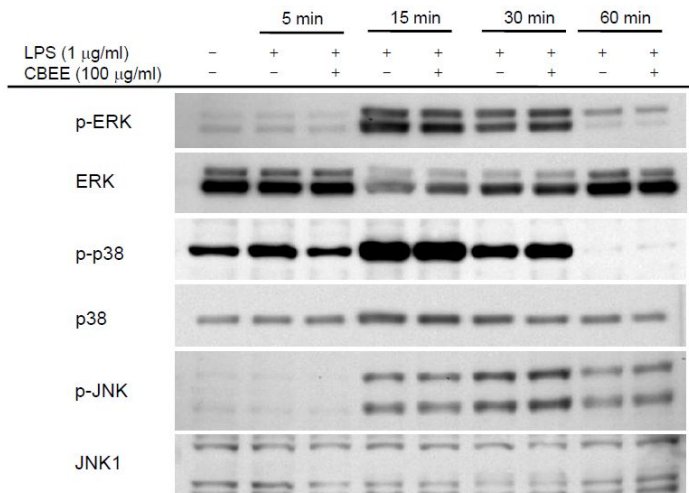


Fig.1-8 대식세포주에서 CBEE에 의한 신호전달 단백질 조절 효과

CBEE의 경우, CBBF와는 다른 MAP Kinases family인 p38의 인산화 수준을 5분에서 억제하였다 (Fig.1-8). 그러나 ERK와 JNK의 인산화 수준은 억제하지 못하였다. 이러한 결과를 비추어 볼때, CBBF는 ERK의 조절을 통해 그리고 CBEE는 p38의 조절을 통해 염증반응을 조절한다고 생각되어 진다.

(4) Transcription factor 활성능 평가

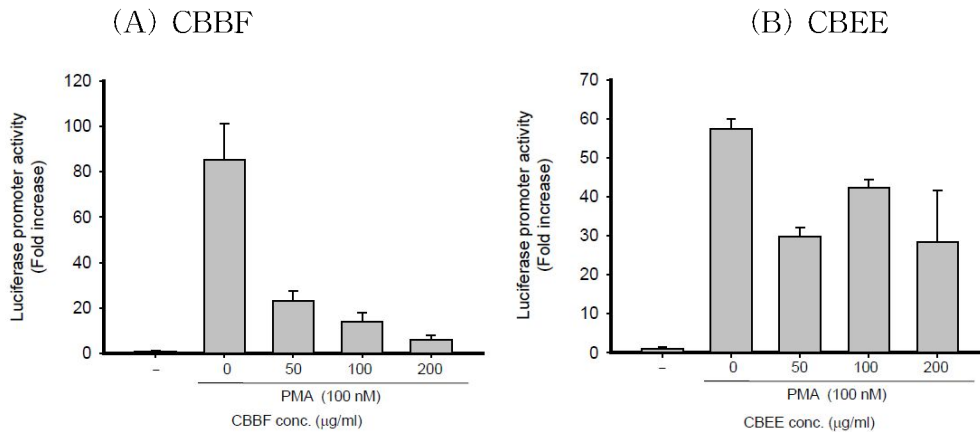


Fig.1-9 AP-1-Luciferase 유전자가 transfection된 HEK293 세포주에서 CBBF 및 CBEE에 의한 AP-1 luciferase 프로모터 활성 조절 효과

노랑다발 동충하초 추출물의 전사인자에 대한 프로모터 활성을 확인하기 위해 Luciferase assay를 통해 그 효과를 평가하였다. 그 결과, CBBF의 경우 AP-1의 프로모터 활성을 농도의존적으로 억제한 것을 Fig.1-9A를 통해 확인하였다. 그리고 CBEE의 경우에는 AP-1의 프로모터 활성을 효과적으로 억제하였으나 농도 의존적으로 억제하지는 하였으며, 그 억제 수준이 CBBF에 미치지 못하였다 (Fig.1-9B)

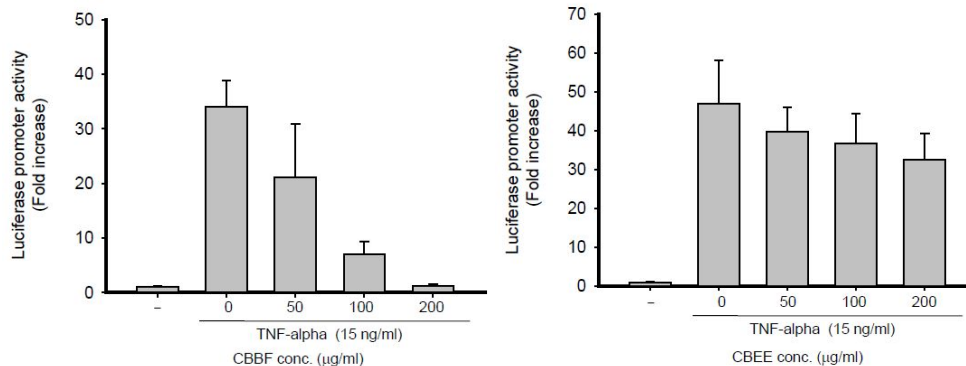


Fig.1-10 NF-κB-Luciferase 유전자가 transfection된 HEK293 세포주에서 CBBF 및 CBEE에 의한 NF-κB luciferase 프로모터 활성 조절 효과

또한 NF-κB 프로모터 활성 평가에서, CBBF와 CBEE는 농도 의존적으로 그 활성을 억제하였으며 이러한 결과는 Fig.1-3과 4의 NO 생성 억제 효과와 일치한다 (Fig.1-10).

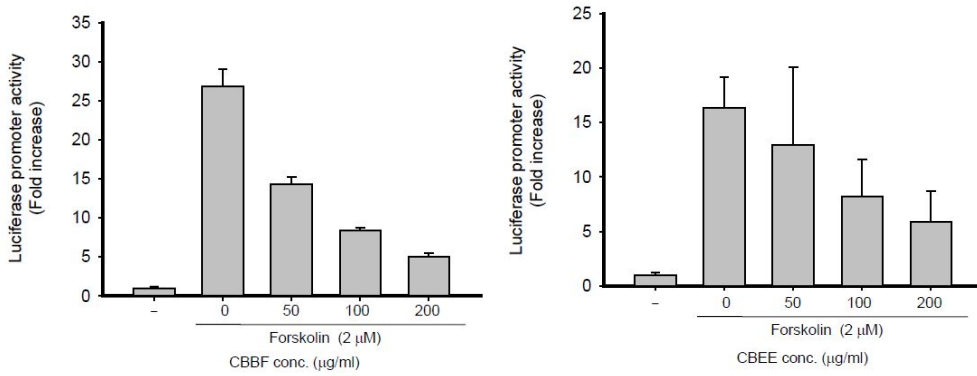


Fig.1-11 CREB-Luciferase 유전자가 transfection된 HEK293 세포주에서 CBBF 및 CBEE에 의한 CREB luciferase 프로모터 활성 조절 효과

CBBF와 CBEE는 CREB의 프로모터 활성을 농도 의존적으로 억제하였고, 그 수준은 CBBF가 더 높은 것으로 확인되었다 (Fig.1-11). 따라서, CBBF와 CBEE는 전사인자의 프로모터 활성을 억제함으로써 염증 반응을 조절하며, 그 수준은 CBBF가 더 높은 것으로 보여진다. CBBF와 CBEE의 전사인자 억제 효과의 차이는 서로 다른 상위단계 신호전달 단백질을 조절함으로써 나타나는 것으로 생각할 수 있다.

(5) 사이토카인 분비능 (IL-12) 정량평가

아토피 및 알러지 반응에서 중요한 역할을 하는 세포인 APC (Antigen presenting cell) 또는 mast cell의 염증 반응에 작용하는 전염증성 사이토카인인 IL-12의 분비능을 평가하였다. 그 결과 노랑다발 동충하초의 에탄올 분획인 CBEE의 50과 100 µg/ml의 농도는 대표적인 APC인 대식세포주에서 IL-12의 mRNA 레벨을 억제하는 것으로 나타났다 (Fig.1-12A). 에탄올 분획 뿐만 아니라 노랑다발 동충하초의 부탄올 분획인 CBBF의 50과 100 µg/ml에서 IL-12의 mRNA 레벨을 감소시켰다 (Fig.1-2B). 따라서, 노랑다발 동충하초 추출물은 아토피 반응에 관여하는 전염증성 사이토카인 IL-12을 전사수준에서 억제한다는 것을 확인하였다.

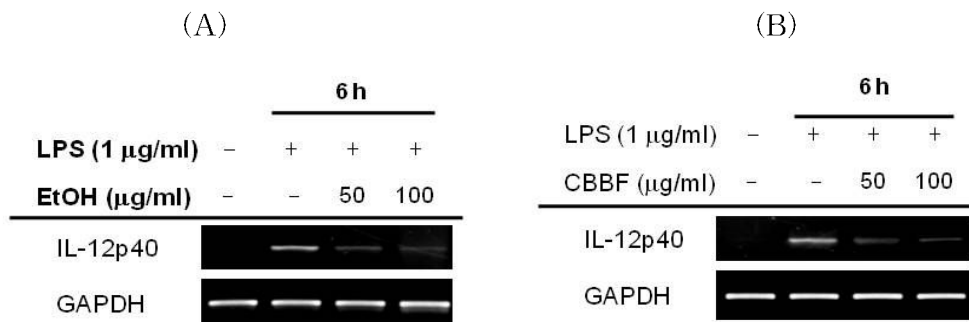


Fig.1-12 The mRNA expression level of LPS induced IL-12p40 by Cordyceps bassiana on RAW264.7 cells

(6) 염증매개물질 (히스타민) 분비능 정량평가

CBBF를 이용하여, 히스타민 분비에 관여하는 염증 매개물질인 NO, TNF- α 그리고 PGE2의 분비능을 LPS 조건 하에서 측정하였다. 그 결과, CBBF는 농도 의존적으로 강력히 NO 분비를 억제하는 것을 확인하였다. 반면에 PGE2의 경우, CBBF에 의해서 농도 의존적으로 분비량이 증가하는 것을 확인 할 수 있다. TNF- α 의 경우, CBBF가 TNF- α 의 분비를 약하게 억제하는 것으로 보여진다 (Fig. 1-13).

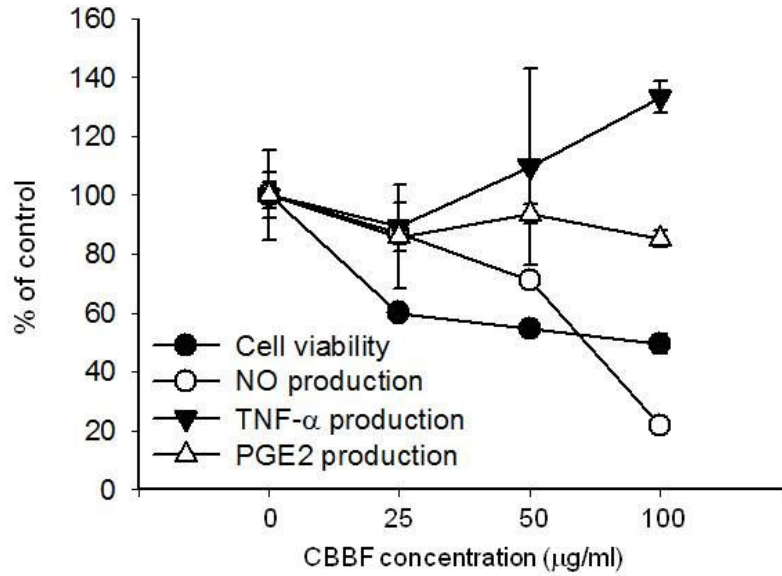
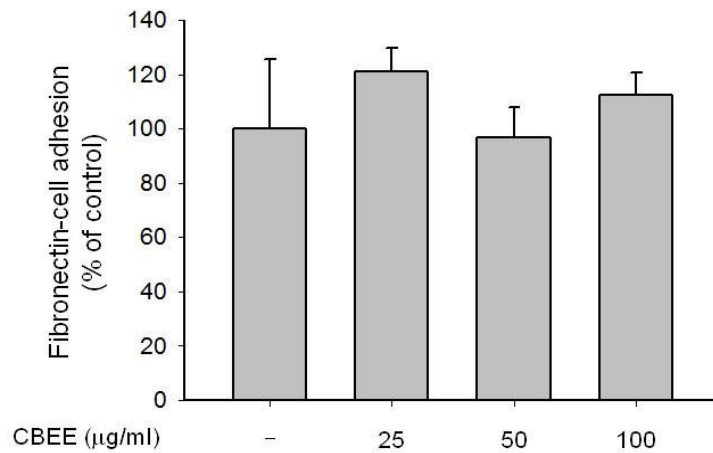


Fig. 1-13 The production levels of LPS-induced inflammatory mediator and cell viability by *Cordyceps bassiana* on RAW264.7 cells

(7) adhesion molecule 활성화 정량평가

Human monocyte 세포주인 U937을 이용하여 세포와 세포외 기질의 주요구성 물질인 fibronectin과의 점착능을 확인하였으며, 또한 세포와 세포 사이의 응집능을 확인하였다. 이러한 세포와 세포 혹은 세포와 세포외 기질의 상호작용은 세포의 분화와 증식, 그리고 기능의 활성화에 중요한 역할을 한다. 따라서 대식세포의 전구세포인 monocyte를 이용하여 실험을 진행하였다.

(A)



(B)

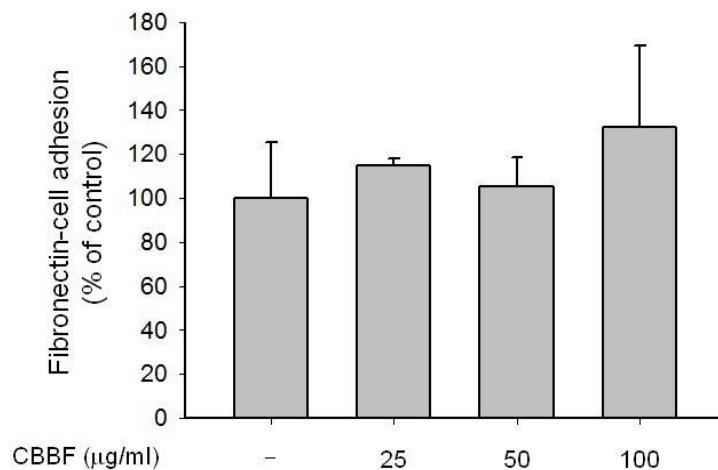


Fig. 1-14 A fibronectin-cell adhesion by *Cordyceps bassiana* on U937 cells

그 결과, Fig.1-14에서와 같이, 노랑다발 동충하초 추출물인 CBEE와 CBBF는

fibronectin에 의한 세포 점착능에 큰 영향을 주지 않는 것으로 확인되었다.

(8) 신호전달단백질 활성조절능 정량평가

이전 연구결과에서, 노랑다발 동충하초 분획인 CBEE는 MAPK 신호전달 단백질 중 p38의 인산화를 억제하는 것으로 확인되었다. 이런 결과를 바탕으로 MAPK 신호전달 단백질의 기능을 억제하는 억제제가 IL-12의 전사 수준을 조절하는지를 확인하였다. MAPK 중 p38의 억제제인 SB203580 외에도, ERK의 억제제인 U0126과 JNK1/2의 억제제인 SP600125를 이용하여 LPS에 의한 자극 조건 하에서 IL-12의 mRNA 레벨을 측정하였다.

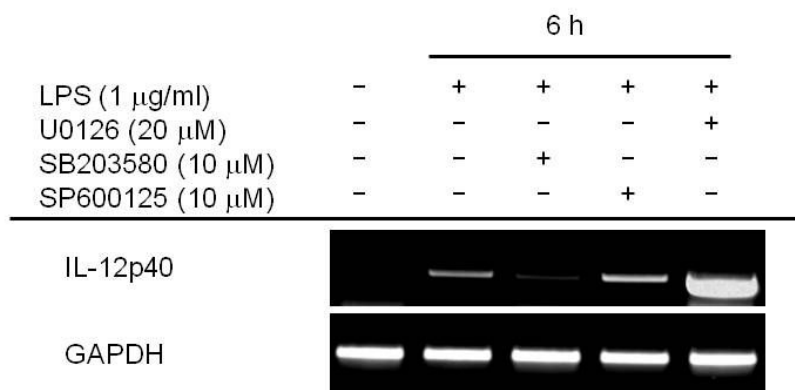


Fig. 1-15 The mRNA expression level of LPS induced IL-12p40 by MAPKs inhibitors on RAW264.7 cells

그 결과, p38의 억제제인 SB203580이 IL-12의 mRNA 레벨을 억제하는 것을 확인하였다. 이와는 대조적으로, ERK의 억제제인 U0126은 IL-12의 mRNA 레벨을 증가시키는 것을 확인하였다. 따라서, CBEE는 p38의 인산화 조절을 통해 IL-12의 전사 수준의 발현을 조절한다고 생각할 수 있다 (Fig.1-15).

다음으로, CBBF는 이전 연구 결과에서 LPS에 의한 자극 조건에서 IFN- γ 를 강력히 억제하는 것을 확인하였다. 따라서, 우리는 CBBF를 이용하여 IFN- γ 관련 실험을 진행하였다.

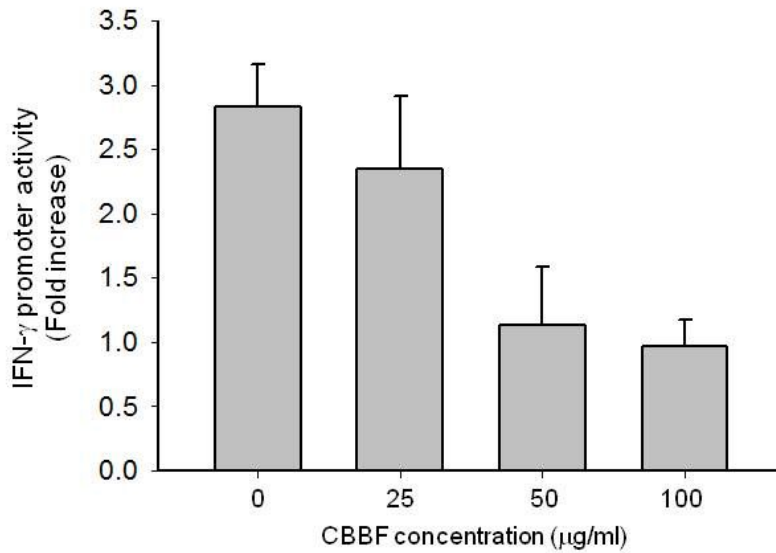


Fig. 1-16 The IFN- γ promoter activity of CBBF induced by STAT-1

STAT-1을 co-transfection하여 IFN- γ 의 프로모터 활성을 측정한 결과, IFN- γ Luciferase activity가 CBBF 농도 의존적으로 억제된 것을 확인하였다 (Fig.1-16). 따라서, CBBF의 IFN- γ 억제 기전은 전사인자 중 STAT-1이 관여할 것으로 사려 된다.

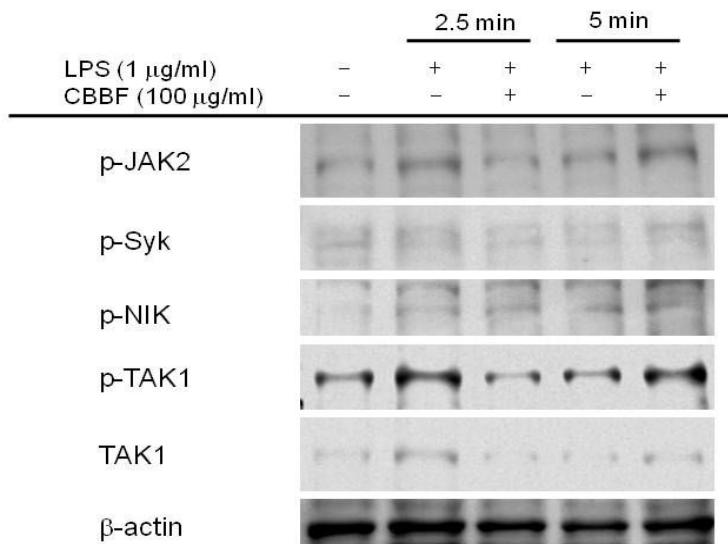


Fig. 1-17 Effect of Cordyceps bassiana extracts on signaling proteins.

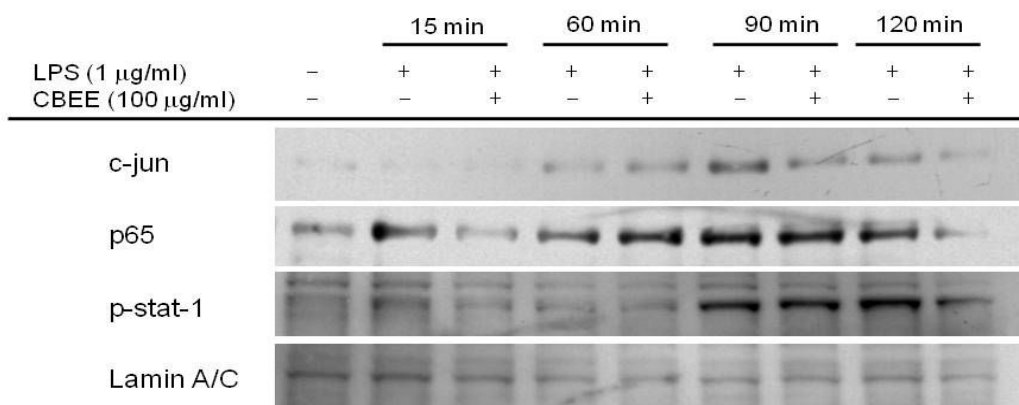
위의 결과를 바탕으로, STAT-1 상위 단계 신호전달 단백질이라 생각되는 JAK2의 인산화를 측정하였다. 그 결과, LPS에 의한 자극 2.5분 조건에서 CBBF가 JAK2의 인산화 레벨을 억제하는 것을 확인하였다. 하지만 그 외의 다른 단백질들의 인산화

레벨은 억제 정도가 명확하지 않았다. 따라서, CBBF는 STAT-1의 상위 단계 신호 전달 단백질인 JAK2의 인산화 수준을 조절함으로써 STAT-1에 의한 IFN- γ 생성을 조절하는 것으로 생각된다 (Fig.1-17).

(9) Transcription factor 활성화 평가

우리는 위와 같은 결과들을 바탕으로, 전사 인자들의 핵 내 이동을 Western blotting을 통해 확인하였다 (Fig.1-18).

(A)



(B)

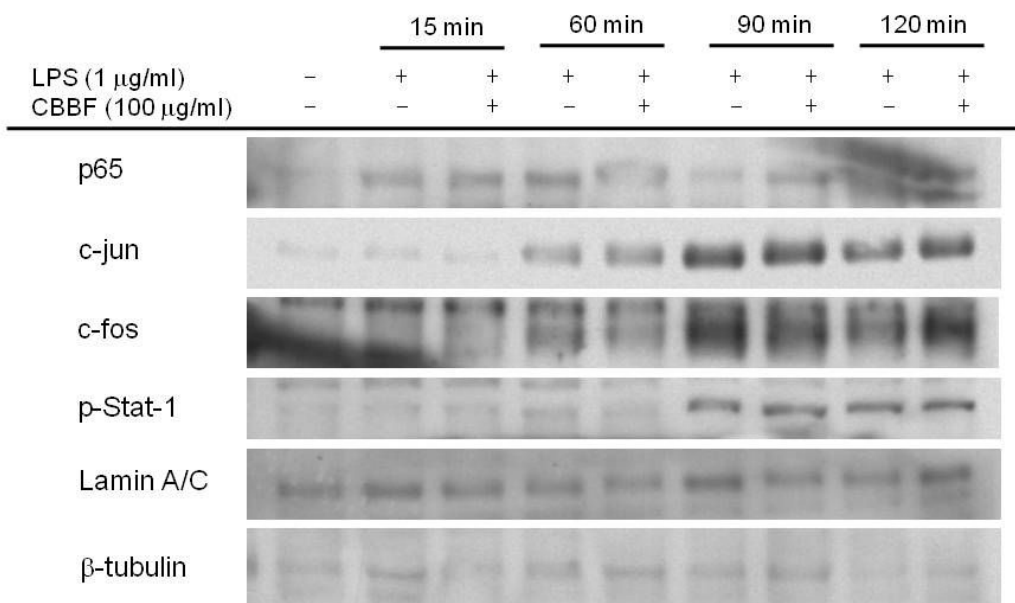


Fig. 1-18 Effect of Cordyceps bassiana extracts on the nuclear translocation of various transcription factors.

그 결과, CBEE는 LPS 자극 60 분 조건에서 NF- κ B의 서브유닛인 p65를 강력히 억제하는 것을 확인하였다. 또한, p38에 의해 조절되는 것으로 알려져 있는 AP-1 서브유닛 중 c-jun의 핵 내 이동이 LPS 자극 90분에서 강하게 억제되는 것을 Fig.1-18A를 통해 확인할 수 있다. CBBF의 경우는 ERK에 의해 조절되는 것으로 알려진 AP-1 서브유닛 중 c-fos의 핵 내 이동을 LPS 자극 60분에서 억제하는 것을 확인하였고, STAT-1의 경우에도 LPS 자극 60분에서 억제되는 것을 확인할 수 있다 (Fig.1-18B).

(10) TLR와 타겟 단백질간의 상호작용 조절 평가

우리는 동충하초 분획이 생성된 NO의 조절을 억제하는지를 확인하기 위해 nitric oxide donor인 SNP를 이용한 NO 조절능을 평가하였다.

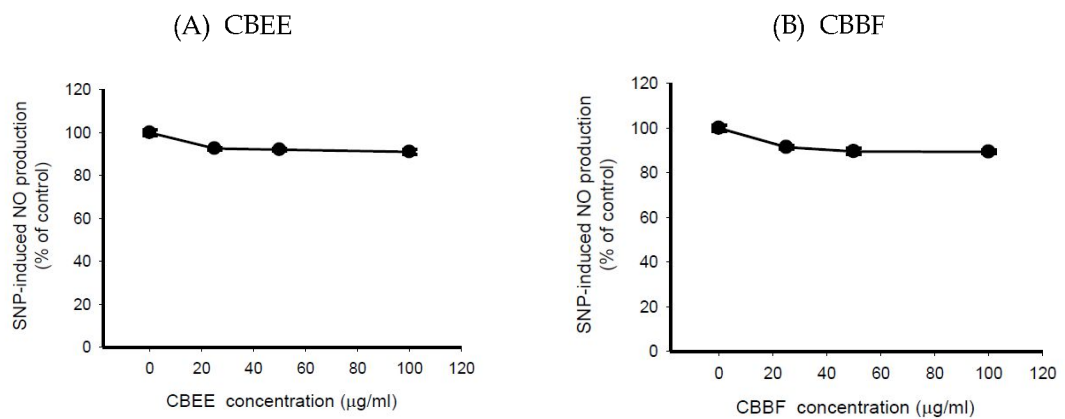


Fig. 1-19 Effect of Cordyceps bassiana extracts on the SNP-induced NO production.

그 결과, CBEE와 CBBF 모두 SNP에 의한 NO 생성 약 10% 정도 억제하였으나, LPS에 의해 생성된 NO 억제 효과에 영향을 줄 만큼 억제하지는 못하였다 (Fig. 1-19). 이러한 결과를 통해 동충하초 추출물의 NO 조절 효능이 TLR4 신호전달 기전을 매개로 한다는 것을 확인할 수 있었다. 위의 결과를 바탕으로, 동충하초 추출물이 TLR4의 발현을 직접적으로 조절하는지를 확인하기 위해 western blot 방법을 이용하였다.

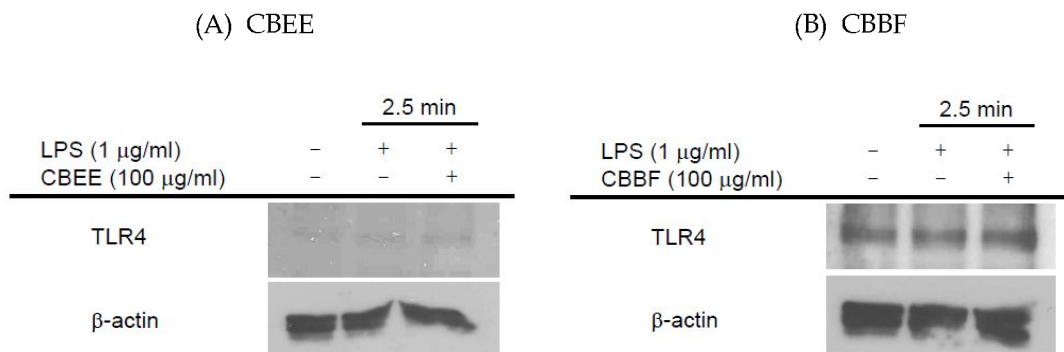


Fig. 1-20 Effect of Cordyceps bassiana extracts on the LPS-induced TLR4 expression level.

그 결과, 동충하초 추출물인 CBEE와 CBBF 모두 TLR4의 발현 정도를 조절하지 않는 것으로 나타났다 (Fig. 1-20). 이러한 결과들로 요약해 볼 때, 동충하초 추출물인 CBEE와 CBBF는 TLR4 매개의 신호전달 과정을 통해 NO 생성을 조절하지만 직접적으로 TLR4를 조절하지는 않는 것으로 생각된다.

(11) 타겟 단백질에 의해 조절되는 Transcription factor의 활성 조절능 평가
 위의 실험 결과를 바탕으로, TLR4의 하위 단계에 존재하는 adaptor molecule들에 의한 NF-kappaB 활성을 평가하였다. 동충하초 추출물이 TLR4를 직접적으로 조절하지 않음을 확인하였고, 그 타겟 분자가 하위 adaptor molecule일 가능성을 고려하여 TLR4와 binding하고 있는 것으로 알려진 MyD88과 TRIF를 이용한 NF-kappaB 프로모터 활성을 평가하였다.

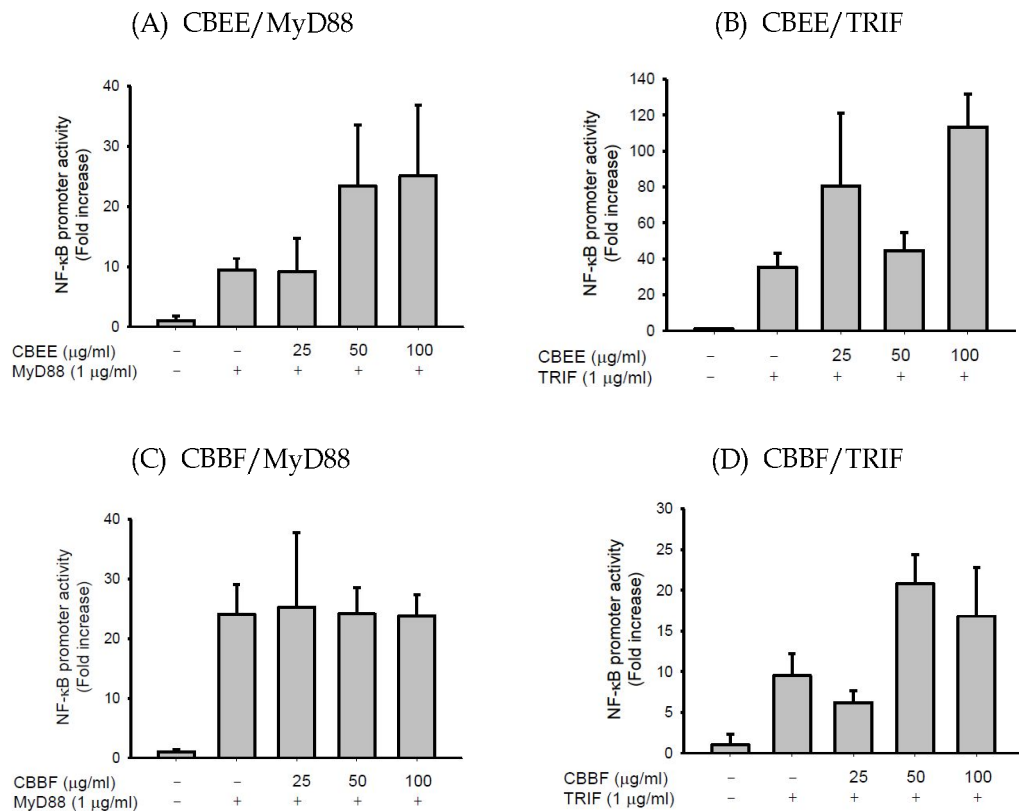


Fig. 1-21 Effect of Cordyceps bassiana extracts on the MyD88 or TRIF-induced NF-kappaB promoter activities

그 결과, CBEE는 adaptor molecule에 의한 NF-kappaB Luciferase promoter 활성을 조절하지 못하는 것으로 나타났다. CBBF의 경우는 25 μg/ml 의 농도에서 TRIF에 의한 NF-kappaB promoter 활성을 억제한 것처럼 나타났으나 그 수준이 미미하여 억제하지 않는 것으로 판단하였다 (Fig.1-21). 따라서, 동충하초 추출물들은 adaptor molecule 중 MyD88과 TRIF를 타겟으로 하지 않는다는 것을 확인하였다.

(12) 신호 전달 단백질의 kinase activity 평가

우리는 위의 실험결과들을 바탕으로 adaptor molecule들의 하위 단계 그리고 염증 반응 관련 kinase들의 상위 단계 단백질로 잘 알려진 Src과 Syk의 활성을 평가하기로 하였다. Src과 Syk은 Protein tyrosine kinase로 알려져 있으며, 인산화가 되면 kinase activity를 갖는 것으로 알려져 있다. 따라서 우리는 Src과 Syk의 인산화 수준을 조사함으로써 동충하초 추출물이 상위단계 신호전달 단백질의 kinase activity를 조절하는지를 알 수 있다.

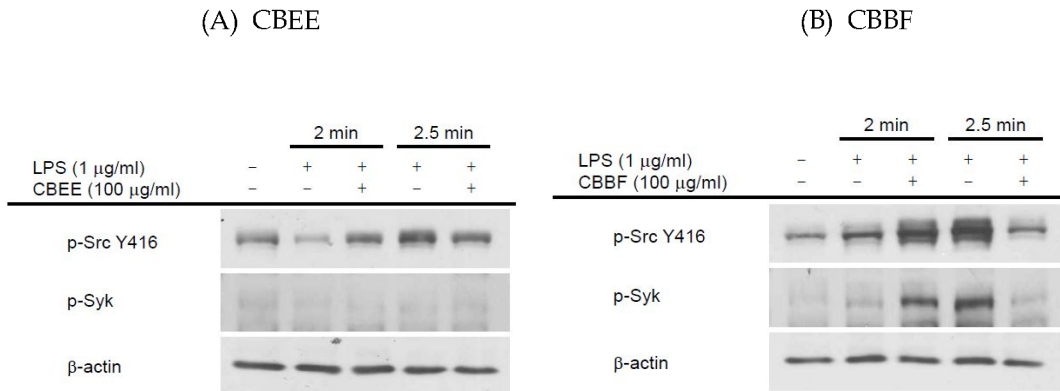


Fig. 1-22 Regulatory effects of *Cordyceps bassiana* extracts on the phosphorylation of Src and Syk proteins.

그 결과, CBEE는 p-Src Y416의 인산화 수준을 LPS 처리 2.5분에서 억제하는 것을 확인할 수 있으며, CBBF는 p-Src Y416과 p-Syk 모두를 LPS 처리 2.5분에서 강력하게 억제하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 1-22). 따라서, 동충하초 추출물인 CBEE의 경우 TLR4 신호전달 기전 중 Src을 매개로 하여 NO 생성 및 다른 하위 신호전달 단백질들을 조절하는 것으로 생각되며, CBBF는 Src과 Syk을 모두 매개하여 NO 생성, 다른 하위 신호전달 단백질의 조절 그리고 염증반응을 조절한다고 생각되어 진다.

라. 요약

노랑다발 동충하초 추출물인 CBEE와 CBBF는 서로 다른 기전을 통해 IFN- γ 생성 및 IL-12의 발현을 조절하는 것으로 생각된다. CBEE의 경우 p38의 인산화 수준을 조절하는 것을 통해 전사인자인 p65와 c-jun의 핵 내 이동을 조절하여 IL-12의 발현을 조절하는 것으로 생각된다. CBBF는 JAK-2의 인산화를 조절하여 STAT-1의 핵 내 이동을 억제하고 이를 통해 IFN- γ 를 강력히 억제하는 것으로 생각되며, ERK의 인산화 조절을 통하여 c-fos의 핵 내 이동도 조절하고 있는 것으로 사려된다. 이러한 기전들은 TLR4 매개의 신호전달 기전 내에 있으며 그 중 CBEE의 경우는 Src이 그리고 CBBF의 경우에는 Src과 Syk이 이러한 기전을 중요하게 매개하고 있다.

제 2절. 제 1협동과제 연구개발수행 내용 및 결과

1. 동충하초의 항아토피 생리활성 분획 및 유효성분의 분석연구 가. 실험 방법

(1) 노랑다발동충하초의 추출 및 분획

생초 노랑다발동충하초를 (주)머쉬텍에서 제공받은 후, 자실체만 따로 분리하여 냉동건조 시키고 잘게 분쇄 시켰다. 노랑다발 동충하초의 분쇄된 가루를 ethanol을 사용하여 85℃에서 8시간 3회 추출하였다. 추출된 ethanol extract를 6시간 4℃ Colling 시켜 침전물을 따로 분리시키고 major한 ethanol extract를 55℃에서 감압하에서 농축 시킨 후, distilled water를 사용하여 resuspend시켰으며, 이러한 aqueous layer 를 각각, hexane, Ethyl acetate, butanol, 및 water 로 분획을 하여, hexane, Ethyl acetate, butanol, 및 water fraction을 얻었다(Fig.2-1).

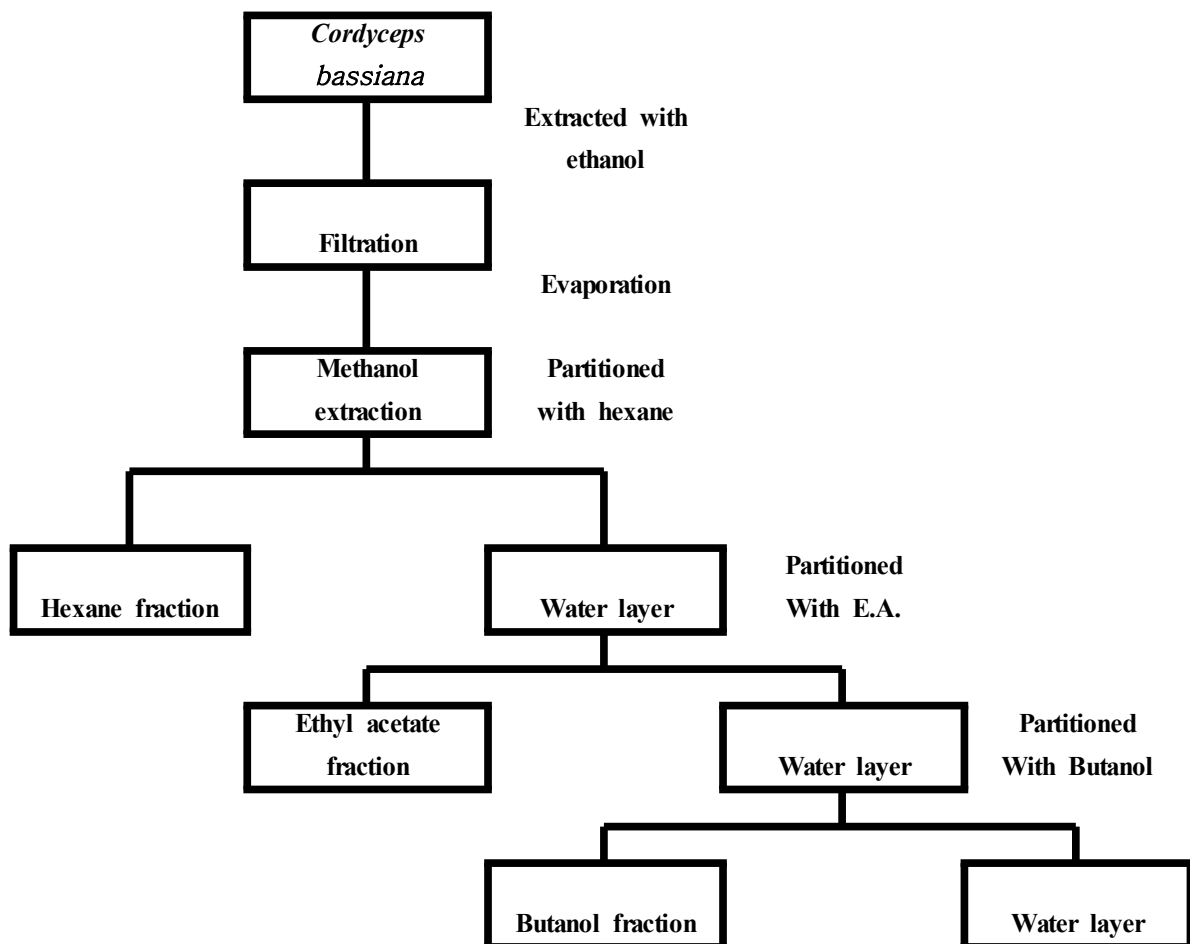


Fig.2-1 Extraction and fractionation of *Cordyceps bassiana*.

(2) 노랑다발동충하초의 gas chromatography에 의한 Fatty acid analysis

노랑다발 동충하초의 total lipid는 ethanol/ether(1:3)용액을 사용하여 추출하였으며, 추출된 노랑다발 동충하초의 total lipid 에, 1ml의 HCl(5%)inmethanol(95%)를 가하여, 100℃ for 2 시간, methylation시킨후, gas chromatography (Hewlett packard model 6890 equipped with a HP-INNOWAX) 로 지방산 분석을 하였다. The injector temperature는 250℃, the detector temperature 는 280℃ 였으며, gas chromatography oven 은 14℃/min의 비율로, 210℃까지 증가 시켰으며, 마지막 temperature 250℃까지 7℃/min비율로 증가시킨후, 마지막으로 250℃에서 10 min 동안 유지 시켜 분석을 하였다.

(3) SDS-PAGE에 의한 노랑다발동충하초의 단백질 분포

노랑다발 동충하초의 단백질의 정량 및 형태를 비교 분석하였다. 각각의 노랑다발 동충하초 가루 1g을 20ml의 PBS buffer(pH7.4)에 녹인 후에 Centrifuge 4000rpm 45분 2번하여 Supernant만을 얻었다. 이 시료를 얼린 후에 동결 건조하여, 2ml의 PBS buffer(pH7.4)에 녹인 후에 Centrifuge 4000rpm 45분을 하여 상층액을 취하여 Lowry Method을 이용하여 단백질 정량을 하였다.

또한, 이 시료를 SDS-PAGE의 분석 방법으로 단백질의 분포형태를 비교하였다.

(4) Open Column을 이용한 노랑다발동충하초의 정제 분리.

Solvent	Concentration (%)							
CHCl ₃	100	90	80	60	40	20	0	0
Me-OH	0	10	20	40	60	80	100	0
H ₂ O	0	0	0	0	0	0	0	100

실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(Silica gel60(0.2~0.5))[MERCK]를 4.2Cm× 100Cm 컬럼에 Packing 한후 위 표와 같이 클로로포름 100%에서 메탄올 100%로 순차적으로 흘려주었다. eluate fraction을 다시 농축시키고 냉동건조 후 생리활성을 확인하였다.

(5) 노랑다발동충하초의 Thin Layer Chromatography:

TLC 판은 MERCK(Kieselgel 60 F254)에서 구입하였다. 전개용매는 클로로포름, 메탄올, 물을 80:20:2.5의 비율로 섞은 후 전개하였다. 확인 법은 UV(366nm/254nm)으로 확인하였다.

(6) 노랑다발동충하초의 High performance liquid chromatography (HPLC) analysis

HPLC는 KNAUER (Wellchrom HPLC-Pump K-1001, Wellchrom fast scanning spectrophotometer K-2600, and 4 channel degasser K-500)를 사용하여 분석하였다.

노랑다발 동충하초 부탄올 분획물을 100mg/ml의 농도로 DMSO에 녹인 후 10,000rpm으로 centrifuge하여 상층액을 얻었다. 이 상층액의 50 μ l 주입하여 노랑다발 부탄올 분획물을 HPLC로 분석하였다. column은 phenomenex gemini C18을 이용하였고, Detectors는 300nm, 470nm, 540nm의 3파장에서 측정하였고, column은 38 $^{\circ}$ C로 유지하였다. 사용한 Buffer로는 무기용매성인 Buffer A와 유기용매성인 buffer B를 1ml/min의 속도로 A에서 B로 100분간 변화시켰다.

Buffer A - 1% TFA in ddH₂O

Buffer B :-ACN : ddH₂O : TFA = 950 : 50 : 0.8

(7) 생리활성 실험 : 항암 실험

실험에 사용된 폐암세포(A549)는 한국세포주은행에서 분양받아 사용하였고 각 추출물(1번, 2번, 2-1번, 3번)과 분획물(Hexane, Butanol, EA, H₂O)을 25, 50, 100, 200, 400, 600 μ g/ml 농도로 하여 처리하였다. 세포에 각 추출물 및 분획물 처리 전 시료는 1ml PBS에 0.6% DMSO로 하여 50 $^{\circ}$ C Heating 10min 후 Sonication 1min 후 vortexing하였다. 이것을 3000rpm으로 10min centrifuge하여 상층액만을 이용하여 24시간 incubation 후 MTT((3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay를 하였다.

(8) 생리활성 실험 : 항염 실험

실험에 사용된 세포는 RAW 264.7 로써 ATCC에서 분양받아 사용하였다. 추출물 및 분획물의 농도와 시료처리는 “(7) 생리활성 실험 : 항암실험” 과 동일하게 처리하였고 시료를 30min Pre-incubation한 후 24hr 동안 1 μ g/ml의 농도로 LPS를 처리하였다.

(9) Structure and molecular weight determination

NMR : Bruker Avance 600, USA (1H-NMR). Solvent were CD₃OD and DMSO. Internal standard was TMS.

GC-MSD : Agilent 7890A, 5975C, USA.

LC-MS/MS : TSQ Quantum Ultra, Thermo.

나. 실험 결과

(1) 노랑다발동충하초의 추출 및 분획

노랑다발동충하초의 추출 및 분획은 Fig.2-1과 같은 방법으로 시행하였으며, 노랑다발동충하초의 수율(yield)을 계산하여 보면, 360g의 노랑다발동충하초를 사용하여 ethanol추출을 하여 66.1g(19%의 수율)을 얻었다. 66.1g의 ethanol추출물에서, water fraction (63.4%), hexane fraction (22%), butanol (7.3%), and ethyl acetate fraction (7.3%)을 얻어 실험을 계속하였다(Fig.2-2).

Cordyceps bassiana; 360g

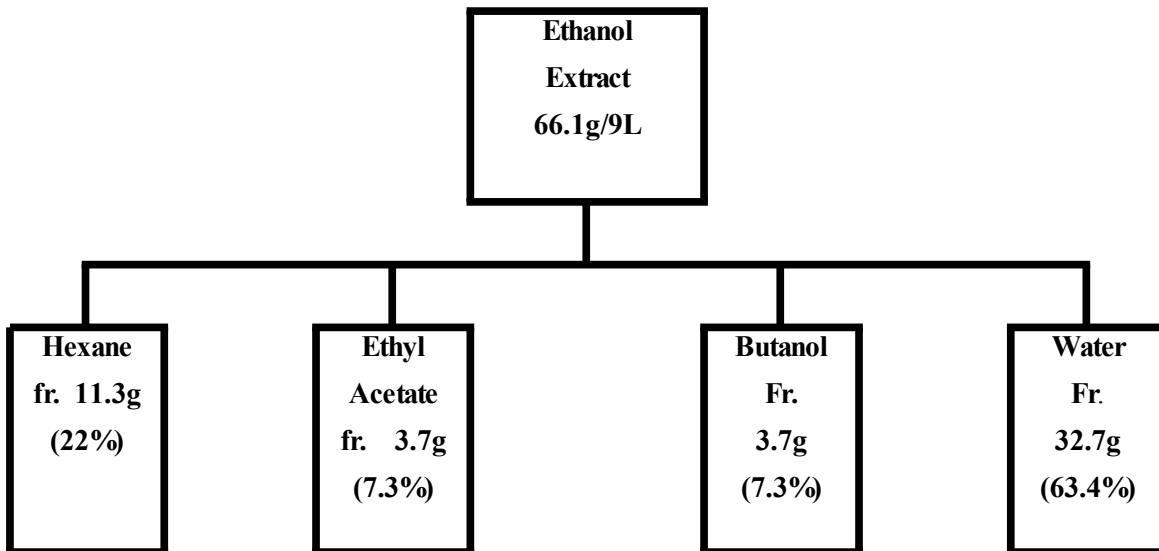


Fig.2-2 Yield of *Cordyceps bassiana* from ethanol extract.

(Yield from each fraction was obtained from 66.1g of ethanol extract)

(2) 노랑다발동충하초의 High performance liquid chromatography (HPLC) analysis

노랑다발동충하초의 ethanol 추출물 및 ethyl acetate 분획물 및 butanol 분획물

(fraction)을 HPLC로 분석하여 포함됨 당(sugar)의 pattern을 비교하였다. column은 Waters ubondapak C18을 이용하여 분석하였으며, 결과는 Fig.2-3과 같았다. HPLC의 결과는, 왼쪽이 polar성분이며, 오른쪽으로 갈수록 non-polar성분을 보여주며, ethyl acetate 분획물 및 buthanol 분획물의 peak는 retention time이 느린, non-polar한 peak들이 나타나는 것을 알수 있었다(Fig.2-3).

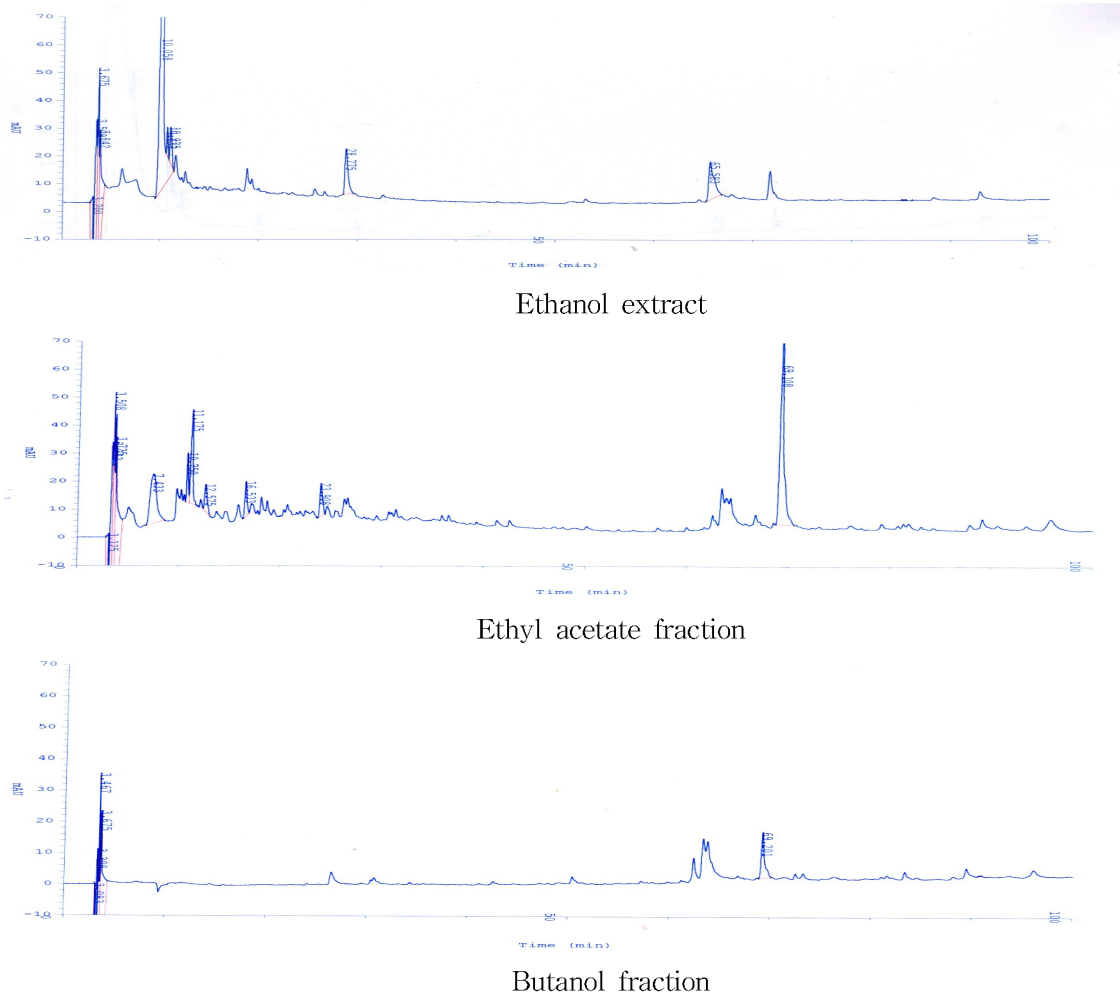
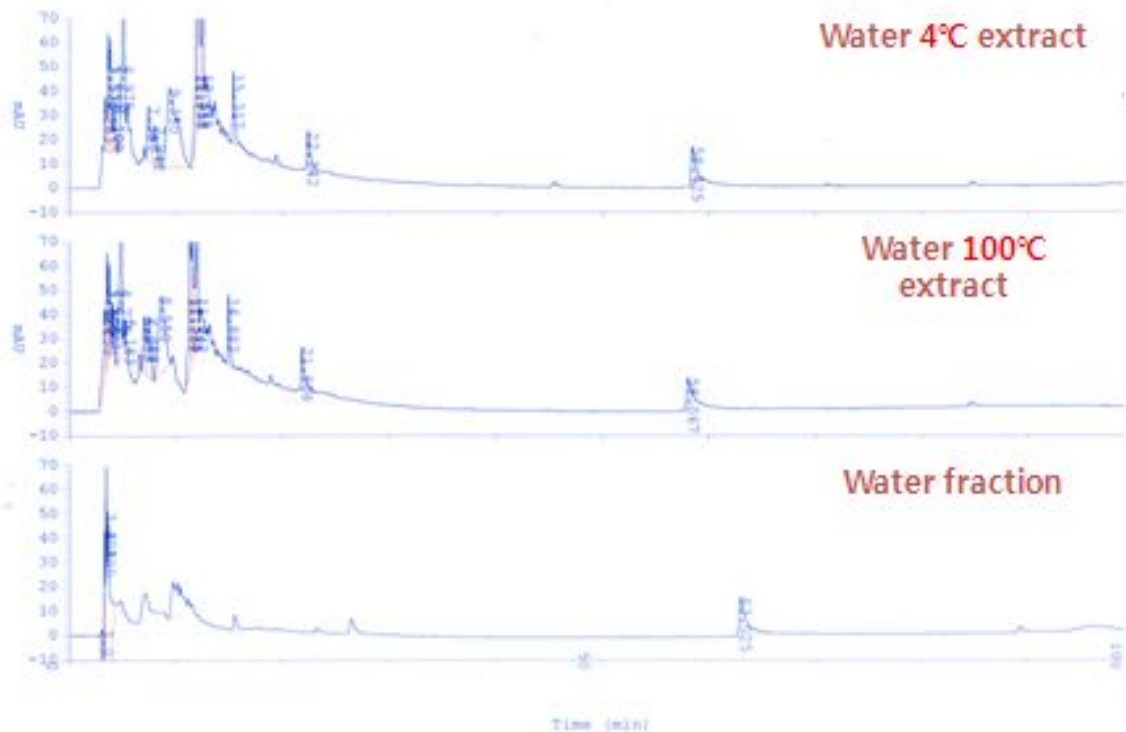


Fig.2-3 HPLC pattern of *Cordyceps bassiana* extract and fractions.

(3) 물(water)에 의한 추출온도에 따른, 노랑다발동충하초의 High performance liquid chromatography (HPLC)분석

노랑다발동충하초은 일반적으로 물(water)로 추출하여 사용하므로, 4, 100도에서의 추출물 및 water fraction과의 HPLC pattern을 비교하였다. 그 결과(Fig.2-4), 커다란 차이는 보이지 않았으며, water fraction에서는 0-10분까지의 polar 성분이 보이지를 않았다.



Comparison of HPLC pattern for 4°C, 100°C, and water fraction.

Fig.2-4 Comparison of HPLC pattern for 4°C, 100°C, and water fraction.

(4) 노랑다발 동충하초의 지방산 분석

노랑다발 동충하초의 total lipid는 ethanol/ether(1:3)용액을 사용하여 추출하였으며, 추출된 노랑다발 동충하초를 Gas Chromatography를 이용하여 지방산 분석을 하였다. 그 결과는 Fig.2-5(standard) 및 2-6(노랑다발 동충하초의 지방산 분포)과 같았다. 지방산 분석 결과, 노랑다발 동충하초는 특이적으로 80%의 높은 불포화 지방산(unsaturated fatty acid)을 함유하고 있으며, 그 성분을 비교하여 보았을 때, parmitic acid (16:0), linoleic acid (18:1), linolenic acid (18:2) 등이 major peak를 보였다. 특히, arachidonic acid (20:4) 와 eicosapentenoic acid (20:5)가 특이적으로 보임을 알 수 있었다(Fig.2-7).

실험의 결과, 노랑다발 동충하초는 불포화지방산을 다량함유하고 있어, 최근 인체의 건강에 필요한 불포화지방산의 섭취에 아주 좋은 건강식품(health food)이 될 수가 있다.

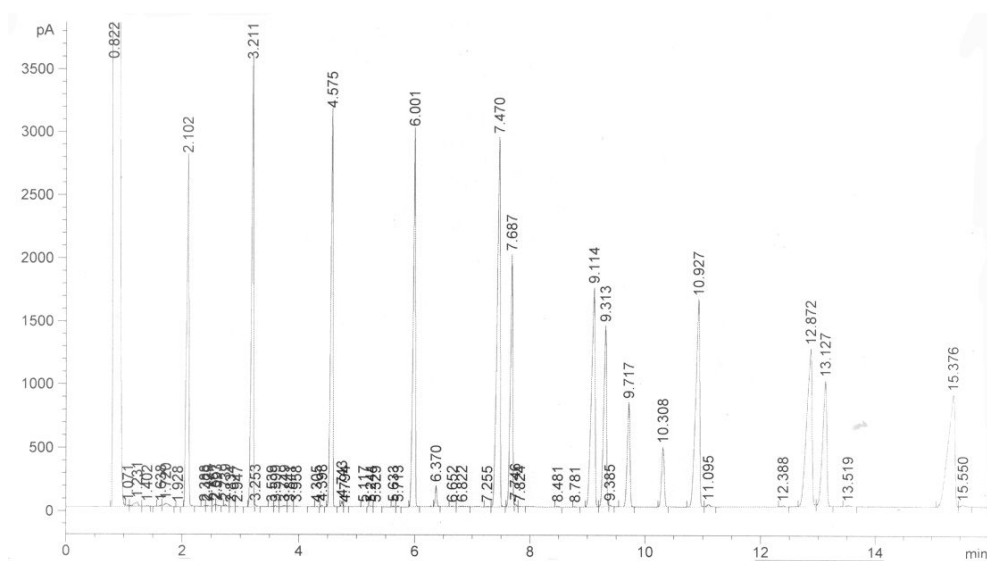


Fig.2-5 Gas chromatogram for the analysis of the fatty acid composition of standard(upper)

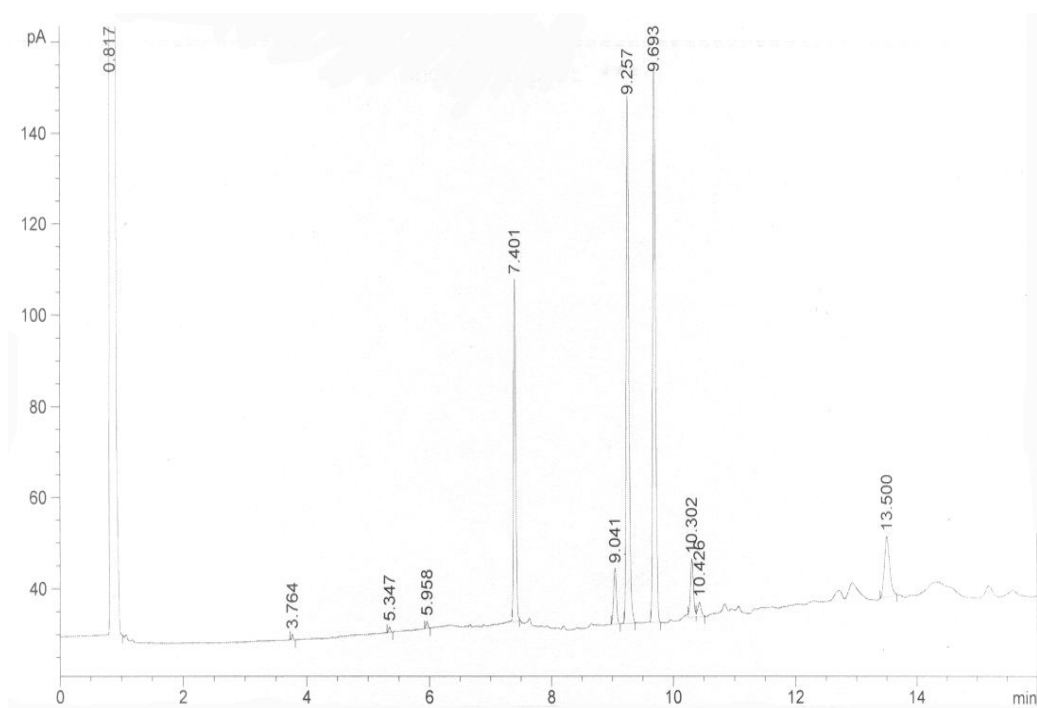


Fig.2-6 Gas chromatogram for the analysis of the fatty acid composition of *Cordyceps bassiana*(lower).

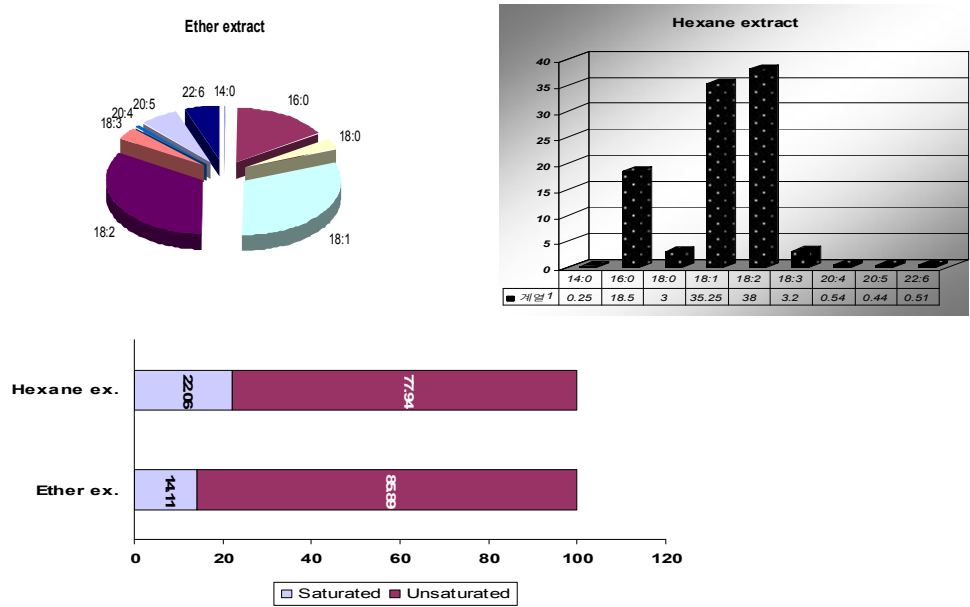


Fig.2-7 Comparison of fatty acid composition for ether and hexane extract of *Cordyceps bassiana*

(5) 노랑다발동충하초의 단백질 함량 및 분포(Lowry 방법 및 SDS-PAGE에 사용) 노랑다발 동충하초의 단백질의 정량 및 형태를 비교 분석하기 위하여, Lowry Method을 이용하여 단백질 정량을 하였다. 실험결과, 배지보다 자실체에 많은 양의 단백질이 함유되어 있음을 알수 있었으며, 또한, 이 시료를 SDS-PAGE의 분석 방법으로 단백질의 분포형태를 비교하였다. 자실체와 배지에서의 단백질 분포는 비슷한 pattern을 보였으나, 배지 보다 자실체에서 약간 더많은 단백질의 분포를 볼수 있었다(Fig.2-8).

Proteins of *Cordyceps bassiana*

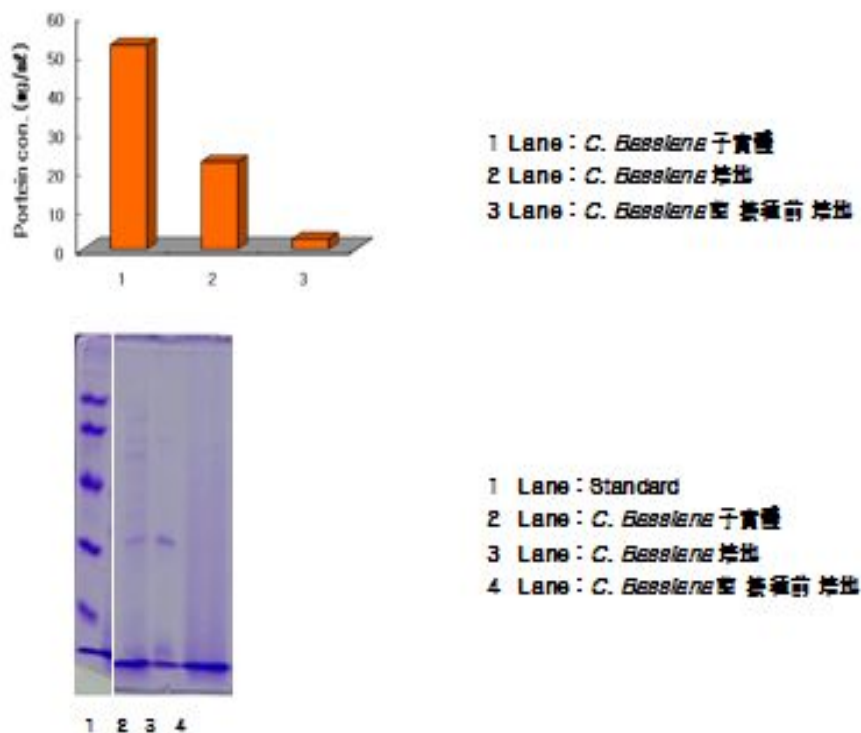


Fig.2-8 Protein contents and distributions of *Cordyceps bassiana*

(6) 노랑다발동충하초의 추출 및 분획

노랑다발 동충하초 3,000g을 100% Ethanol로 추출하여 533.7g(17.8% yield)을 얻었고 냉각시켜 얻은 흰 침전물은 39.16g(1.31% yield), 분홍색 결정물은 99.86g(3.33% yield)을 얻었다. Major Extract를 다시 Hexane, Butanol, EA 유기용매를 사용하여 분획을 한 결과 hexane에선 87.34g(2.91%), Butanol은 72.48g(13.9%), EA는 1.18g(0.04%), 그리고 나머지 H₂O에서는 336.9g(11.22%)를 얻었다.

실험의 모든 step과정과 추출물 및 분획물의 yield는 Fig.2-9 와 같이 나타내었다.

□ Sample preparation(1/7)

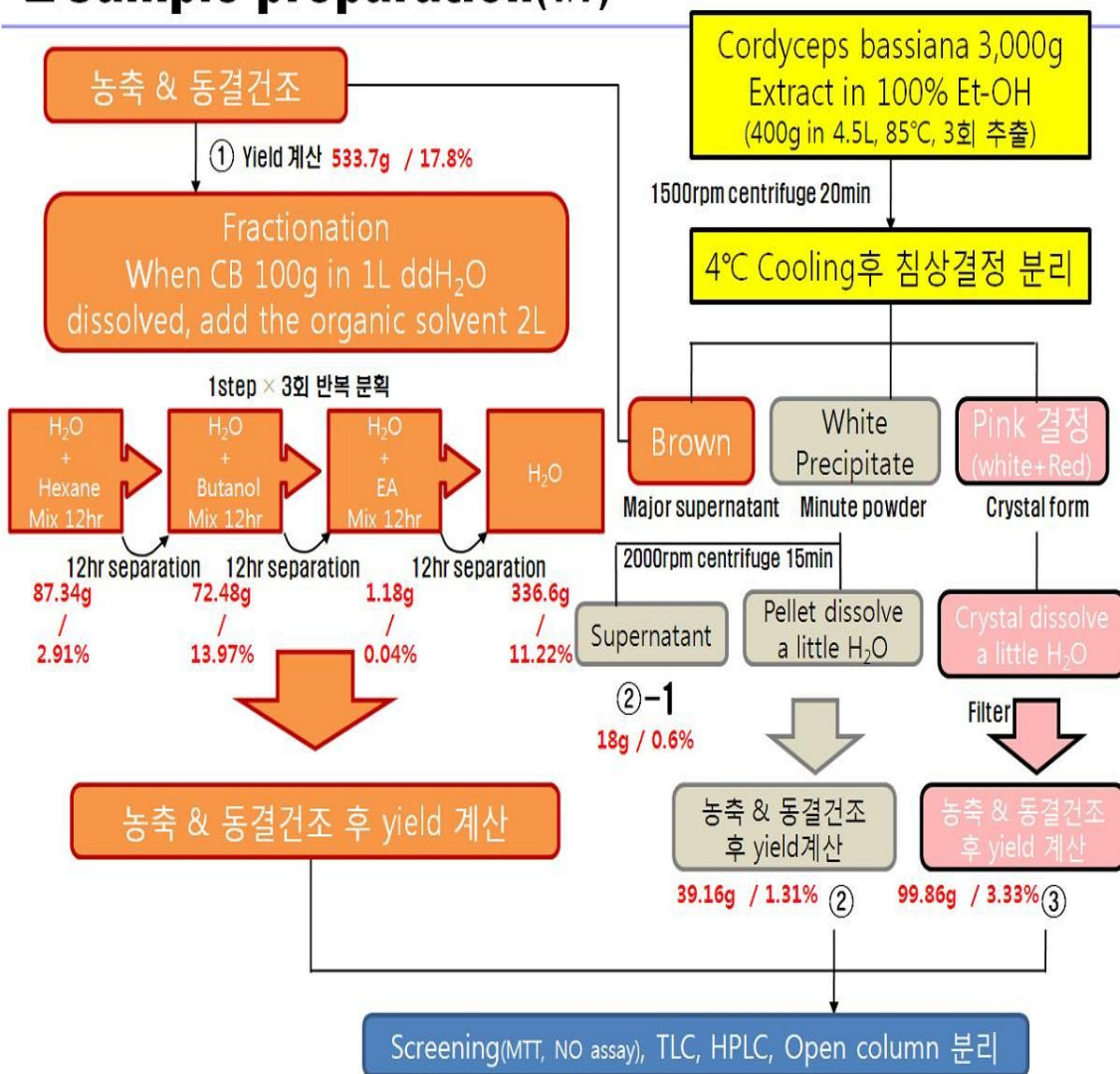


Fig.2-9 Yield of *Cordyceps bassiana* from the continous extractions and fractionations.

(7) 노랑다발동충하초 추출물의 냉각후 분리 결과:

노랑다발 동충하초를 추출하고 4°C Cooling 후에 분리결과는 Fig 2-10, Fig 2-11, Fig 2-12에 나타내었다.

Fig 2-10은 노랑다발동충하초를 100% ethanol로 8시간씩 3회 반복 추출후, 4°C cooling(6시간)시킨 후의 결과이며, 이러한 CB추출물을 재분리하였을때, Fig.2-10의 오른쪽 그림과 같은 결과를 얻었다.

□ Sample preparation

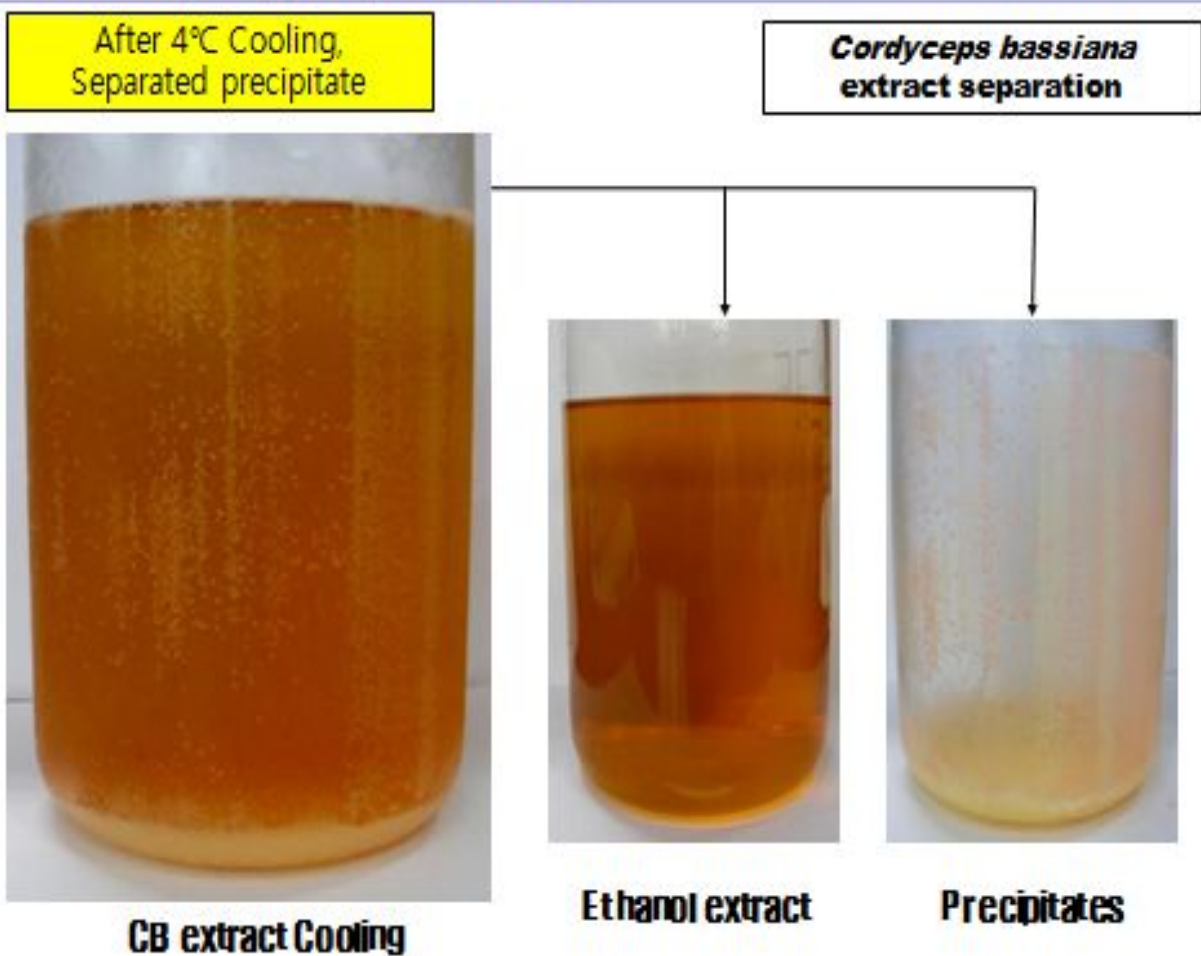


Fig.2-10 Separation of CB precipitate and crystal

Fig2-11은 Fig2-10에서 분리한 노랑다발 동충하초 침전물들을 각 밀도의 차이에 의해서 2번의 노란색 침전물과 3번의 결정형의 분홍색의 침전물로 분리하였다.

□ Sample preparation

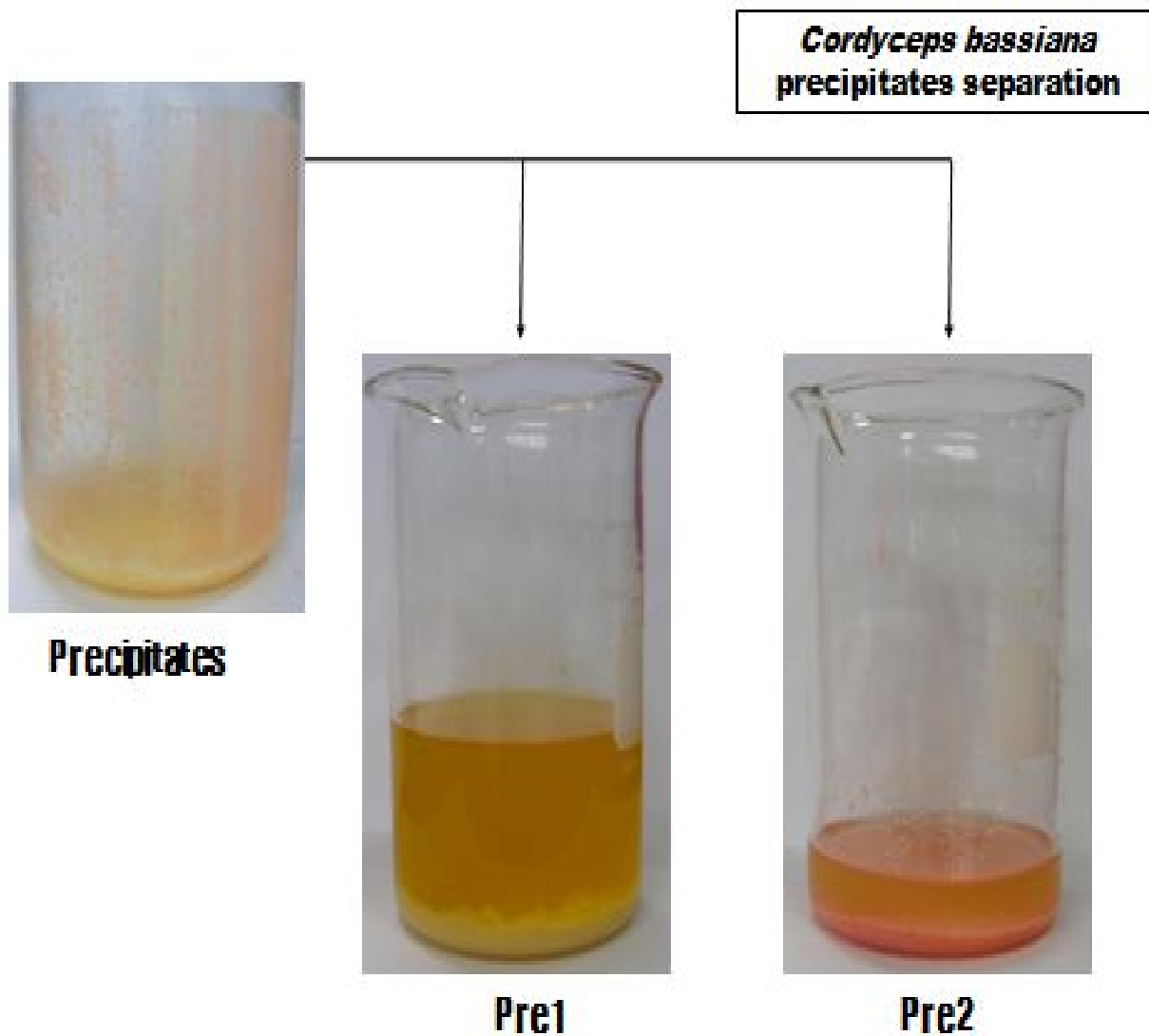


Fig. 2-11 Separation of CB precipitate and crystal

Fig. 2-12에서 얻은 2번 침전물을 15min동안 2,000rpm으로 Centrifuge하여 다시 침전시키고 노란색 상층액 2-1과 2번 침전물을 얻었다.

□ Sample preparation

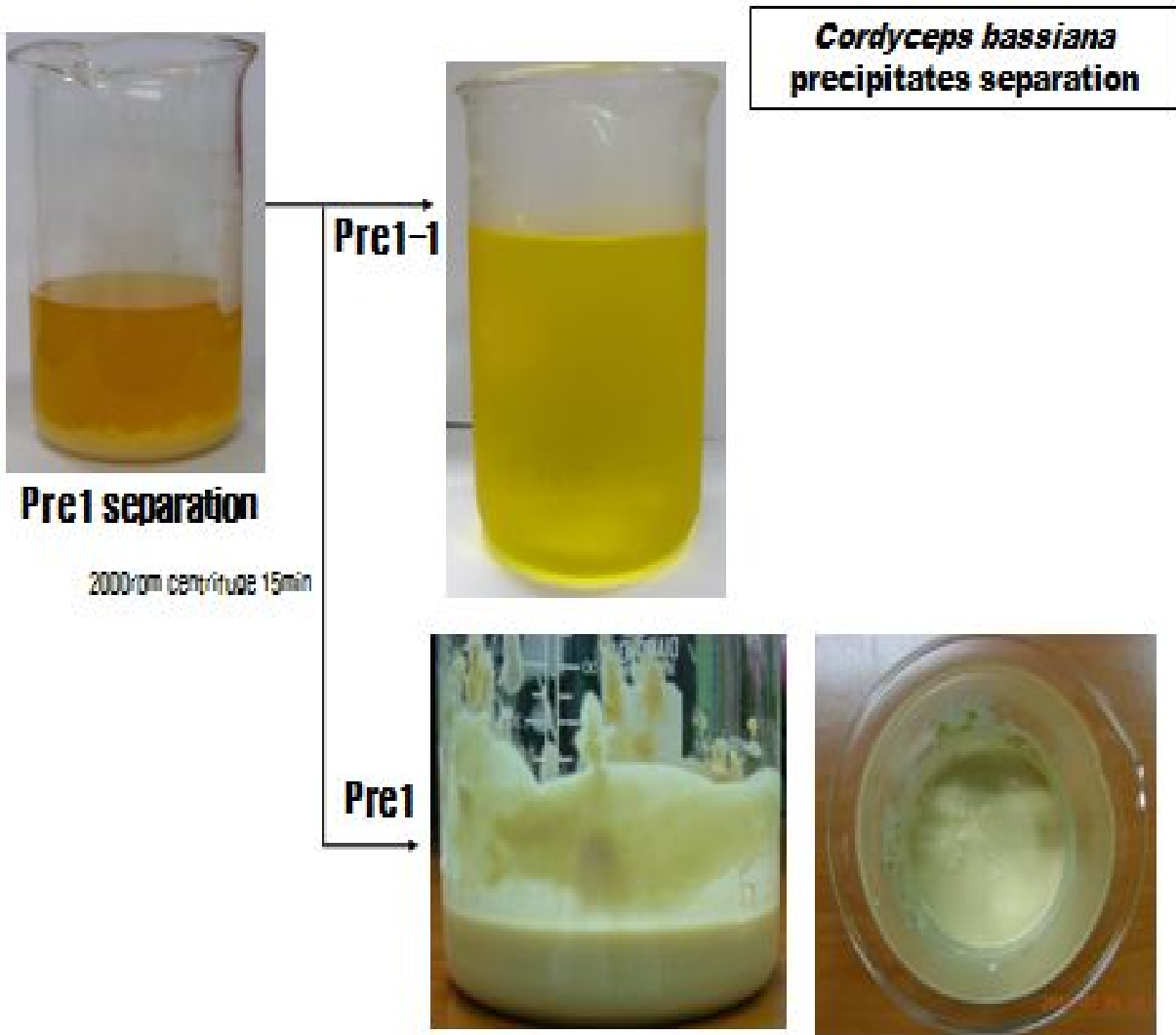


Fig.2-12 Separation of CB precipitate

(8) 노랑다발동충하초 침전물 prep 1과 prep 2의 비교:


Fig 2-13에서는, 침전물 prep 1과 prep 2의 침전물을 약간의 물에 녹여 색소를 비교한 결과, prep 2의 침전물은 탁한 노란색을 띠었고 3번 침전물은 붉은색 계통의 색소를 나타내었다.

이러한 prep 2의 구성성분을 조사하고자, ^{13}C -NMR ^1H -NMR을 이용하여 구성성분을 연구한 결과, prep 2의 구성성분은 D-mannitol이 대다수의 주요성분이었으며, glucopyranose의 당 성분이 함유되어 있음을 NMR을 이용하여 분석하였다. 그러나, prep 2에서는 별다른 생리활성이 보이지를 않아 더 이상 연구를 하지는 않았다.


□ Sample preparation

***Cordyceps bassiana* precipitates separation**


Pre1




Pre2



Dissolved a little ddH₂O





2010.07.05 00:18

^{13}C -NMR and ^1H -NMR analysis, show that it contained D-Mannitol and α -(D)-glucopyranose

OCC(O)C(O)C(O)CO

D-Mannitol(major)

O[C@H]1O[C@@H](O)[C@H](O)[C@@H](O)[C@H]1O

α -(D)-glucopyranose(minor)

Fig.2-13 Comparison of pigment between the CB separated precipitate 1 and the crystal type precipitate 2.

(9) 노랑다발동충하초 분획물의 색소 비교:

노랑다발 동충하초의 추출물과 분획물의 각각의 yield(100% = 0.5g)에 따라 각 추출 용매에 녹여 Fig.2-14번과 같이 색소를 확인한 결과 Ethanol과 hexane, Butanol에서 노란색소를 나타내었다. hexane은 진한 황색을 보였으며, buthanol fraction은 진한 노란색을 보인다는 것을 알 수 있었다.

□ Sample preparation(6/7)

	부피(ml)	수율(%)	녹인양(g)
추출물	1	17.8	0.089
Hexane	1	2.91	0.01455
Butanol	1	2.42	0.0121
EA	1	0.04	0.0002
H2O	1	11.22	0.056
2번	1	1.31	0.00655
2-1번	1	0.6	0.003
3번	1	3.33	0.01665

Cordyceps bassiana fractionation pigment

Yield 별 Pigment 확인

용해 전



Et-OH
추출물
(Et-OH)

②
(H₂O)

②-1
(Et-OH)

③
(H₂O)

Hexane
(Hexane)

Butanol
(Butanol)

EA
(EA)

H₂O
(H₂O)

용해 후

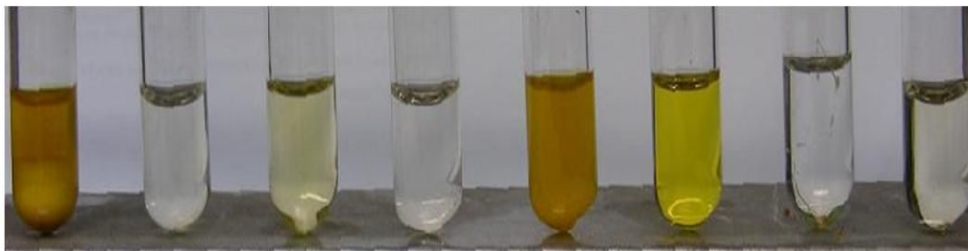


Fig.2-14 Pigment comparison of separated CB extracts and fractions with equal concentration.

(10) 노랑다발동충하초 추출물 및 분획물의 동일농도에서의 색소 비교:

노랑다발 동충하초의 추출물과 분획물을 DMSO에 농도를 125mg/ml로 녹여서 색소를 관찰한 결과 2번과 3번 추출물과 H₂O분획물을 제외하고 노랑색소를 나타내었고 Hexane과 Butanol 분획물은 진한노랑색을 나타내었다. 특이하게 3번 추출물 같은 경우 분홍색 색소가 관찰되었다(Fig.2-15).

□ Sample preparation(7/7)

Cordyceps bassiana fractionation pigment

동일 농도에 따른 Pigment 확인

● 시료의 처리

Solvent	Sample weight	Volume	Concentration
DMSO	25mg	200ul	125mg/ml

- ✓ 50℃ 항온수조에서 5분간 Heating
- ✓ Sonication 1min후 vortexing



Et-OH
추출물

②

②-1

③

Hexane

Butanol

EA

H₂O

Fig.2-15 Comparison of Pigment between separated CB extracts and fractions with equal concentration.

(11) 노랑다발동충하초 추출물 및 분획물의 수득율(yield) 비교:

본 실험에서 시행한 노랑다발동충하초 추출물 및 분획물의 분리 정제과정에서의 수득율(yield)을 비교하였으며, 그 결과, 3,000g의 노랑다발동충하초에서 17.8%dp 해당하는 533.7g의 ethanol 추출물을 얻었으며, 이때, prep1(침전물)은 39.2g, prep 1(상등액)은 18g, prep 2는 99.0g을 얻었다. 분획물로는 Hexane 분획물 87.3g, Butanol 분획물 72.5g, Ethyl acetate 분획물은 1.18g, 마지막 water분획물은 33.6g을 얻었다(Fig. 2-16).

□ Yield of extract and fraction(6/6)

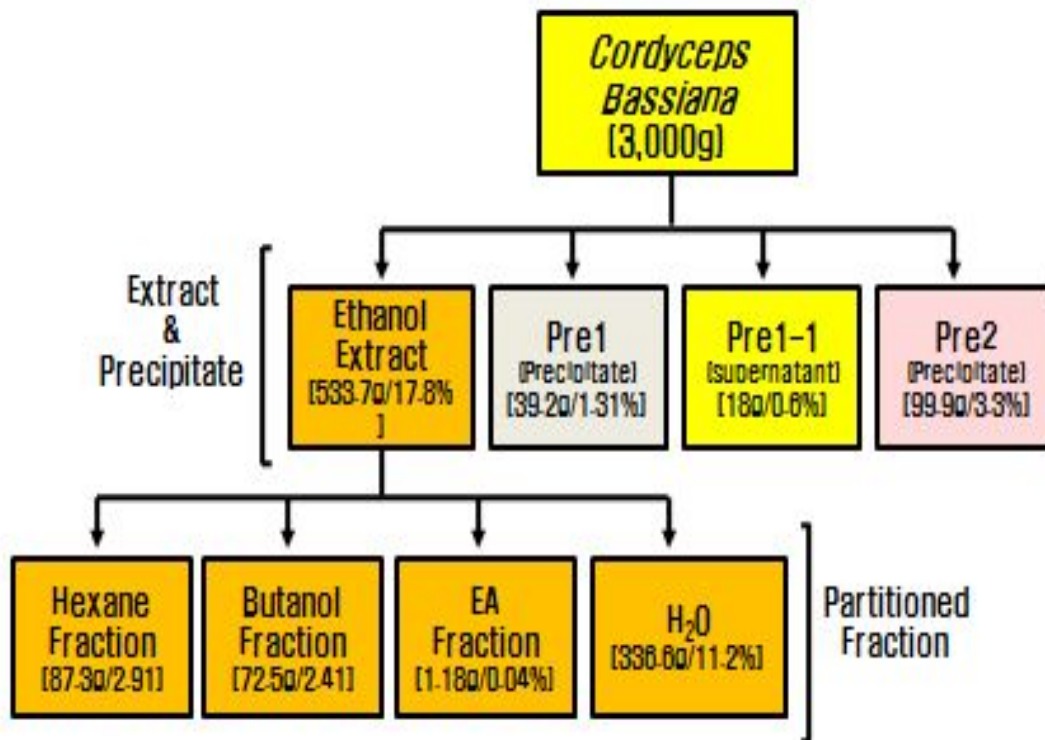


Fig. 2-16 노랑다발동충하초 추출물 및 분획물의 수득율(yield) 비교

(12) 노랑다발동충하초 추출물 및 분획물의 TLC 실험결과 비교:

노랑다발 추출물 및 분획물을 Fig 2-17와 같이 254nm와 366nm의 파장으로 detection한 결과를 나타내었다.

hexane분획물에서는 mibility가 높게 보였으며, H₂O분획물로 갈수록 mibility가 낮아지는것을 알수 있었다. 각각의 분획물은 polarity에 따라 각각의 독특한 성분을 함유하고 있다는 것을 알수 있었다.

□ Thin layer chromatography(3/3)

● Result(2/2)

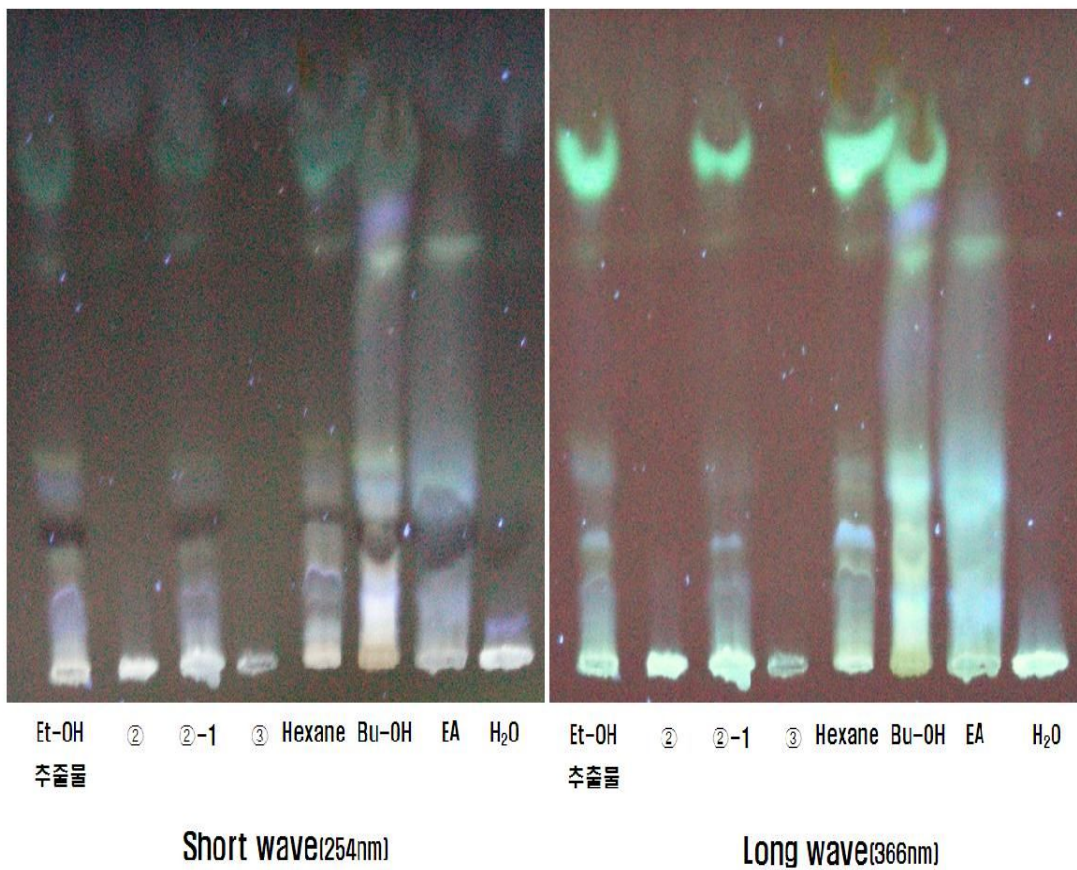


Fig.2-17 Thin layer chromatography of separated CB extract and fraction

(13) 노랑다발동충하초 buthanol 분획물의 HPLC 분석결과 :

50ul의 노랑다발 동충하초의 Buthanol Fraction을 inject하여 HPLC 분석을 하였다.
Fig 2-18, Fig 2-19, Fig2-20, Fig 2-21에서 같이 각각 merge(모든파장), 300nm,
430nm, 540nm에서 HPLC Pattern을 확인하였다.

Operator:

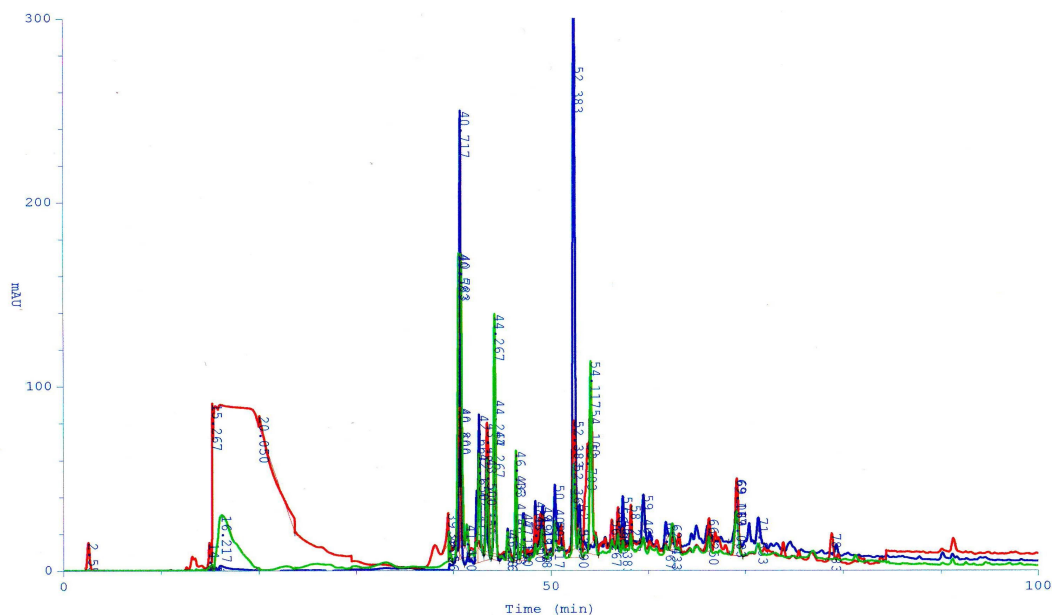


Fig 2-18. Separation pattern of CBBF by HPLC

Operator:

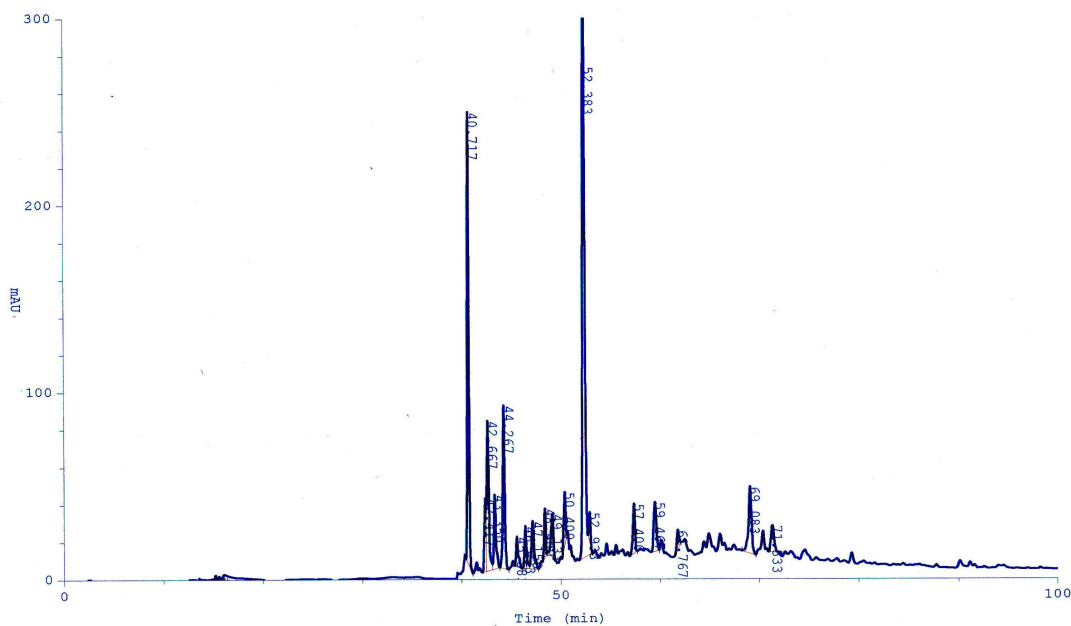


Fig 2-19. HPLC separation pattern of CBBF at 300nm wavelength

Operator:

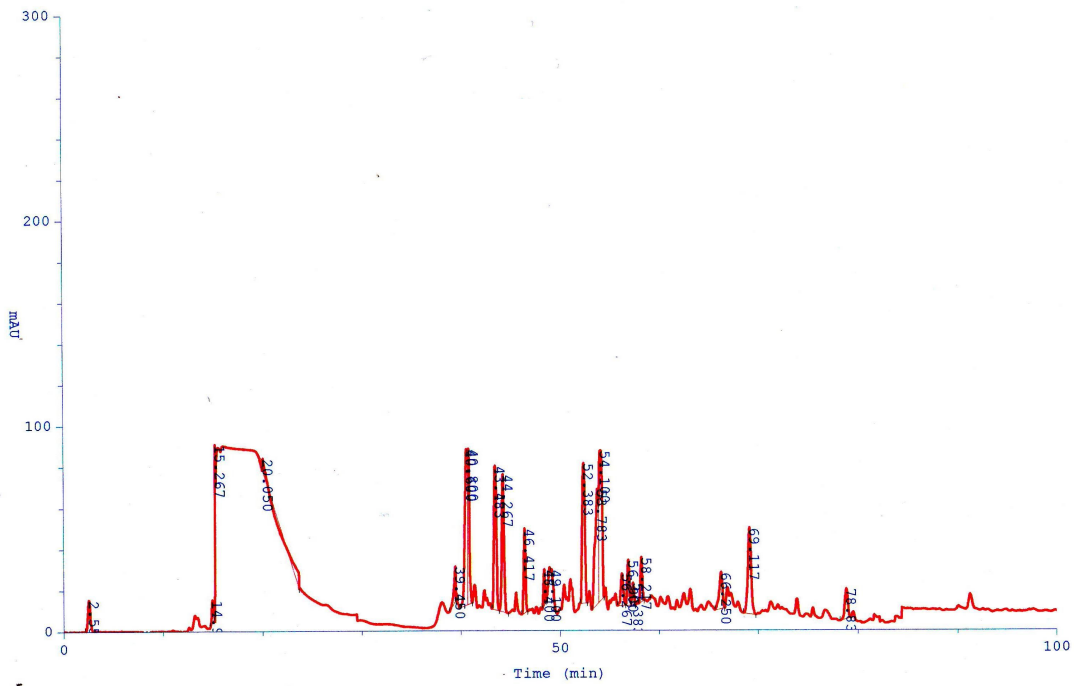


Fig 2-20. HPLC separation pattern of CBBF at 470nm wavelength

Operator:

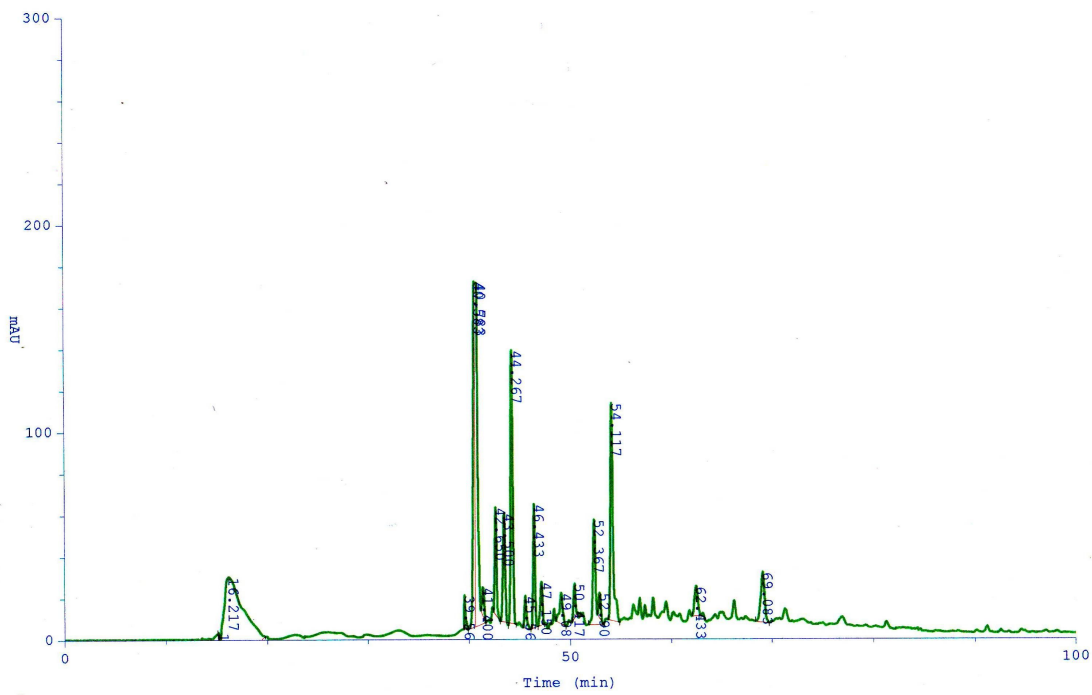


Fig 2-21. HPLC separation pattern of CBBF at 540nm wavelength

(14) 노랑다발동충하초 추출물 및 분획물의 항암 실험결과 비교:

노랑다발 동충하초 추출물 및 분획물을 폐암 세포주(A549)에 농도별로 처리하여 24hr incubation한후 MTT assay를 이용하여 폐암 세포의 사멸정도를 570nm에서 흡광도를 측정함으로써 확인하였다. Fig2-22과 Fig2-23에서 보는 것과 같이 노랑다발 동충하초 추출물 및 분획물에 의한 항암 효과는 extract와 Hexane, Butanol에서 큰 효과를 나타내었으며, 2번과 3번 침전물과 EA, H₂O 분획물에서 항암 효과는 그리 크게 나타내지 못하였다.

□ Physiology-activity Screening test(2/6)

● Result(1/2)

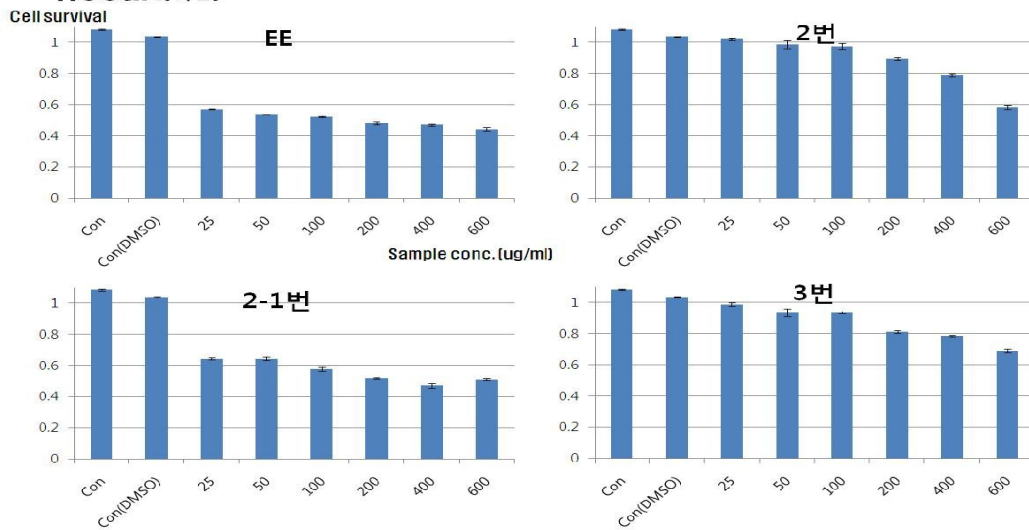


Fig 2-22. Inhibition of Viability of Cancer Cell(A549) by *Cordyceps bassiana* extracts.

□ Physiology-activity Screening test(3/6)

● Result(2/2)

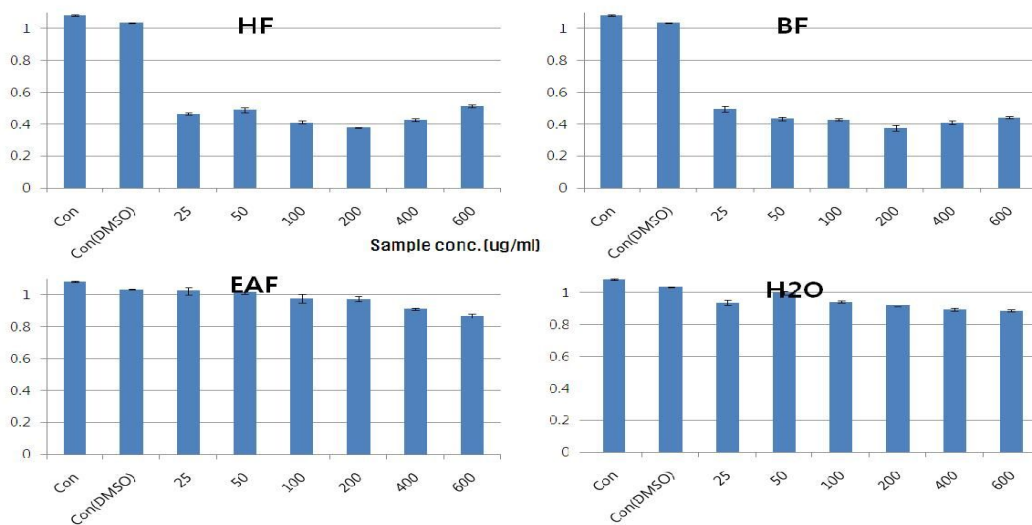


Fig 2-23. Inhibition of Viability of Cancer Cell(A549) by *Cordyceps bassiana* fractions.

(15) 노랑다발동충하초 추출물 및 분획물의 A549 암세포의 항암 실험결과 비교:

노랑다발동충하초 추출물을 이용하여 A549 암세포의 항암 실험결과 비교하였을 때, Ethanol 추출물과, prep1-1 이 가장 좋은 효과를 보였으며, 노랑다발동충하초 분획물의 A549 암세포의 항암 실험결과 비교하였을 때에는, Hexane 분획물과 Buthanol 분획물이 Fig 2-24 와 같이, 좋은 효과를 보였다.

□ Bioactive fraction screening test

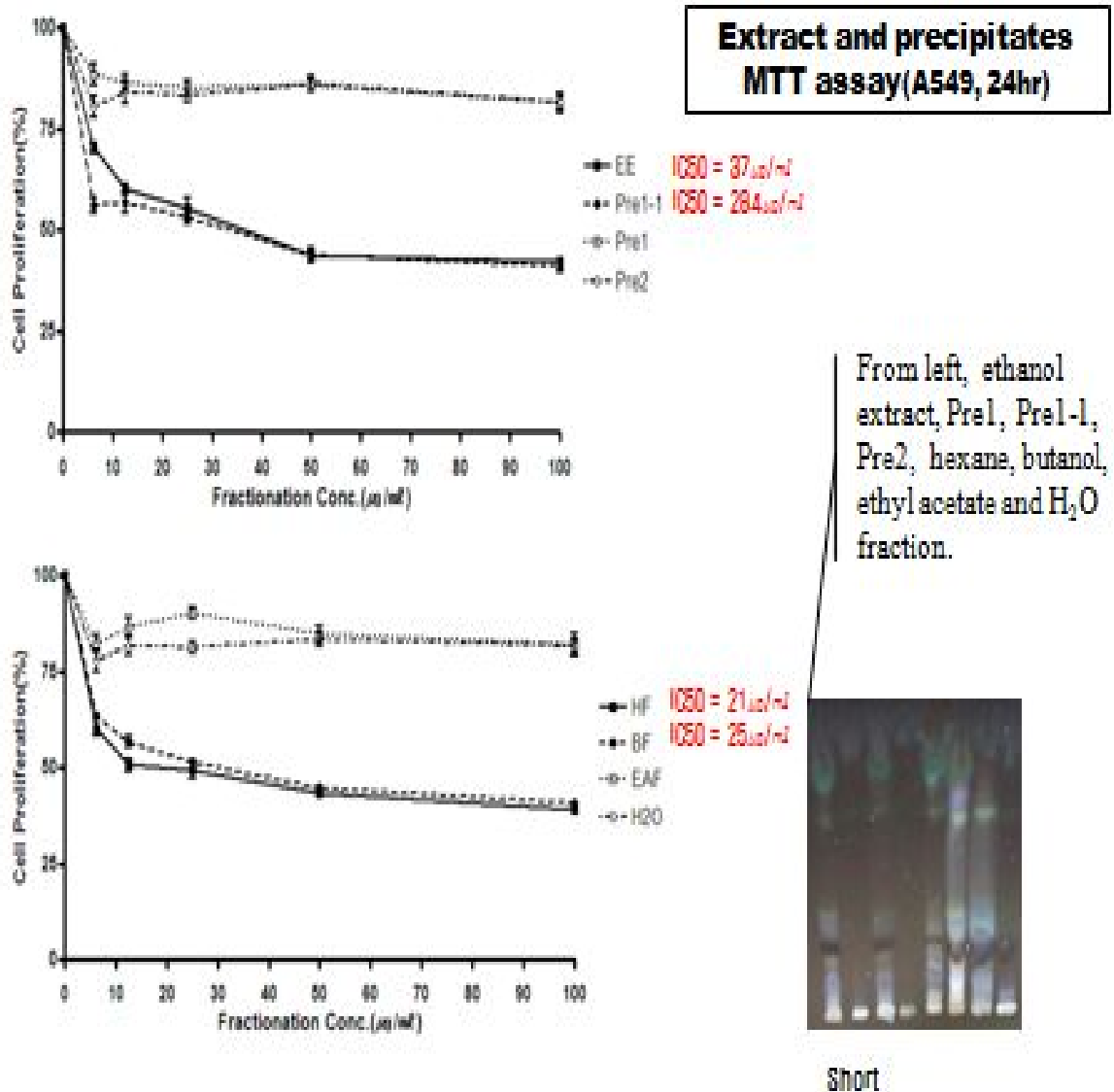


Fig 2-24. Inhibition of Viability of Cancer Cell(A549) by *Cordyceps bassiana* fractions.

(16) 노랑다발동충하초 추출물 및 분획물의 항염 실험결과 비교:

RAW 264.7 macrophage 세포에 1ug/ml 농도로 LPS를 처리하여 염증을 유발한 후 노랑다발 동충하초 추출물과 분획물을 각 농도별로 처리하여 염증 유발시 생성되는 NO를 억제하는 정도를 확인하여 염증이 억제되는 효과를 간접적인 방법으로 측정하였다. Fig 2-25과 Fig 2-26에서 보는 바와 같이 Butanol 분획물이 다른 추출물과 분획물에 비하여 NO생성을 효과적으로 억제하는 것을 확인하였다.

□ Physiology-activity Screening test(5/6)

● Result(1/2)

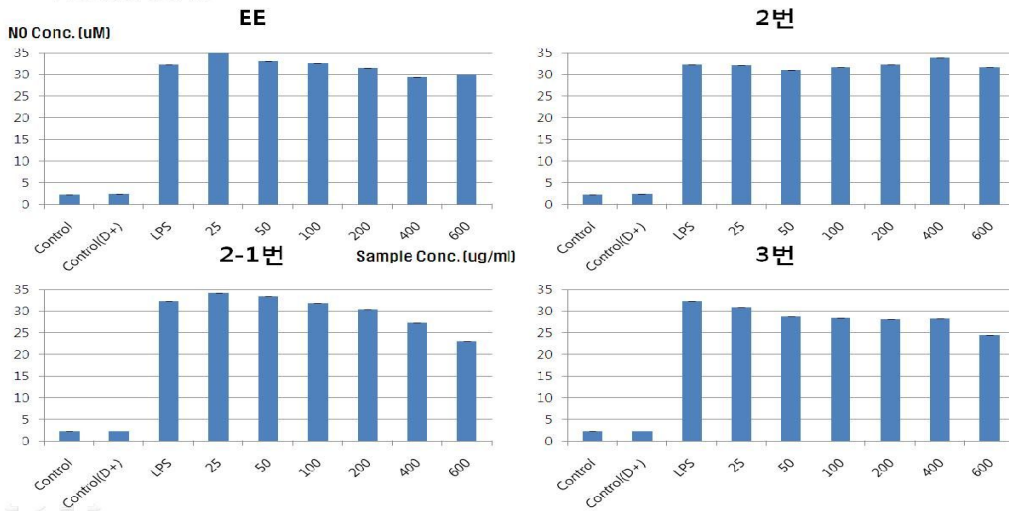


Fig 2-25. Effect of anti-inflammation with the addition of CB extracts on NO inhibition

□ Physiology-activity Screening test(6/6)

● Result(2/2)

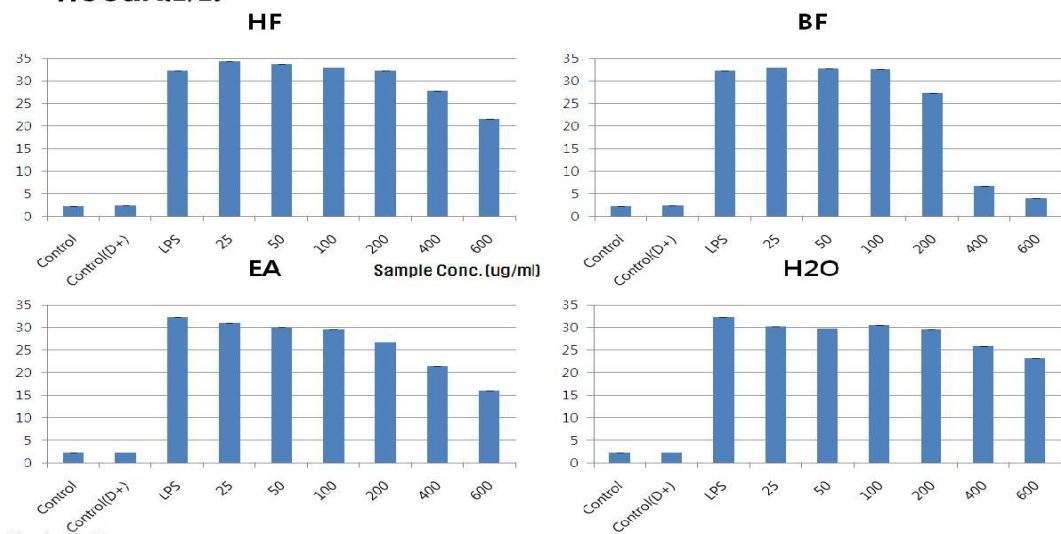


Fig 2-26. Effect of anti-inflammation with the addition of CB fractions on NO inhibition.

(17) 노랑다발동충하초 추출물 및 분획물의 항염 실험결과 IC50의 비교:

Fig 2-27은 노랑다발동충하초 추출물 및 분획물의 항염 실험결과 비교를 보여주고 있으며, 그 결과는 Fig 2-26의 결과와 유사하였으며, Hexane 분획물의 IC50은 0.88mg/ml 였으며, Buthanol 분획물의 IC50은 0.34mg/ml를 보였으며, Ethyl acetate 분획물의 IC50은 0.6mg/ml를 보였다. 실험의 결과, Buthanol 분획물의 IC50이 0.34mg/ml으로 가장 좋은 결과를 보였다.

□ Bioactive fraction screening test

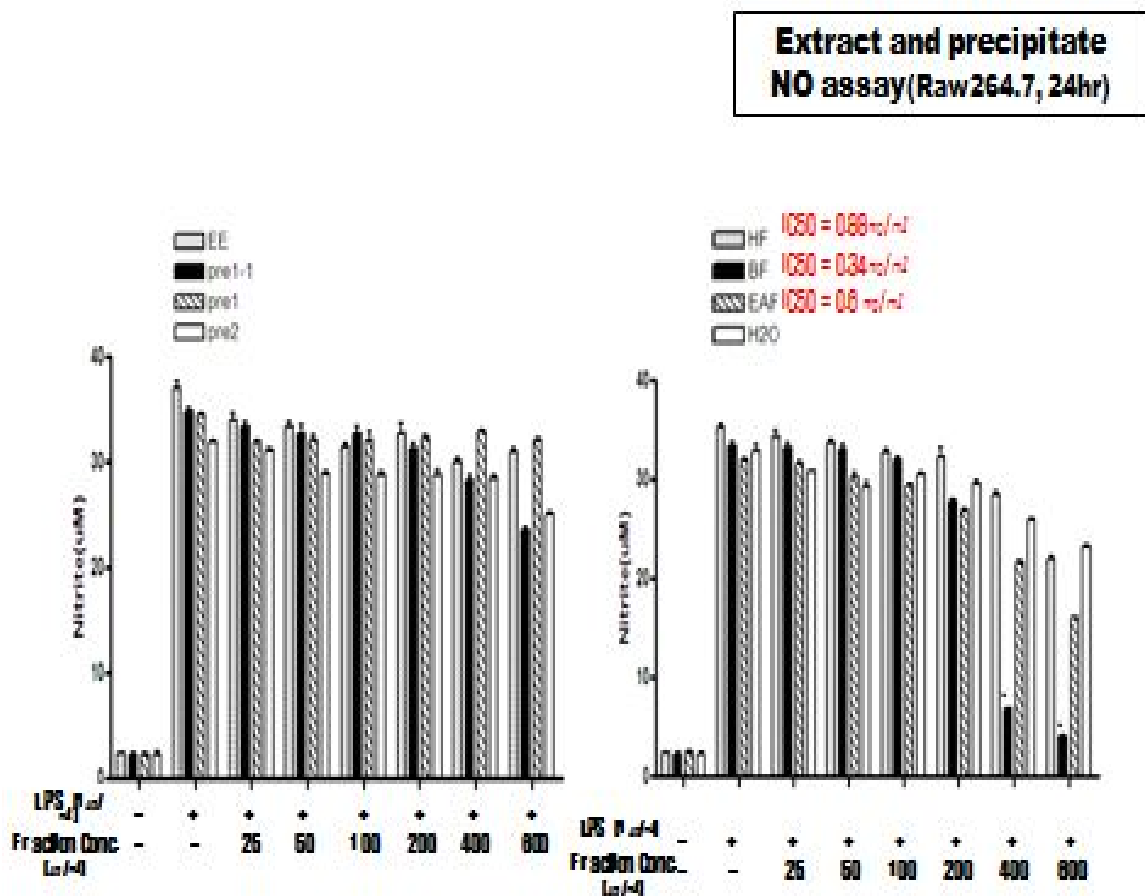


Fig 2-27. 노랑다발동충하초 추출물 및 분획물의 항염 실험결과 IC50의 비교:

(18) Open column chromatography를 이용한 노랑다발동충하초 추출물 및 분획물의 분리 정제 결과:

지금까지의 노랑다발동충하초 추출물 및 분획물의 생리활성 실험 결과, Buthanol 분획물이 가장 효과적이라는 결론을 얻어, Buthanol 분획물(CBBF)를 silica chromatography를 이용하여 정제분리하였다.

Sil-100에서 Sil-0까지 얻었으며, 각각의 fraction을 TLC 분석을 하여 비교하였다.

254 및 366nm의 TLC 분석 결과 non-polar 성분에서 polar한 성분의 순서로 분리 되었음을 재확인하였다(Fig 2-28).

□ Purification of 1st-column chromatography

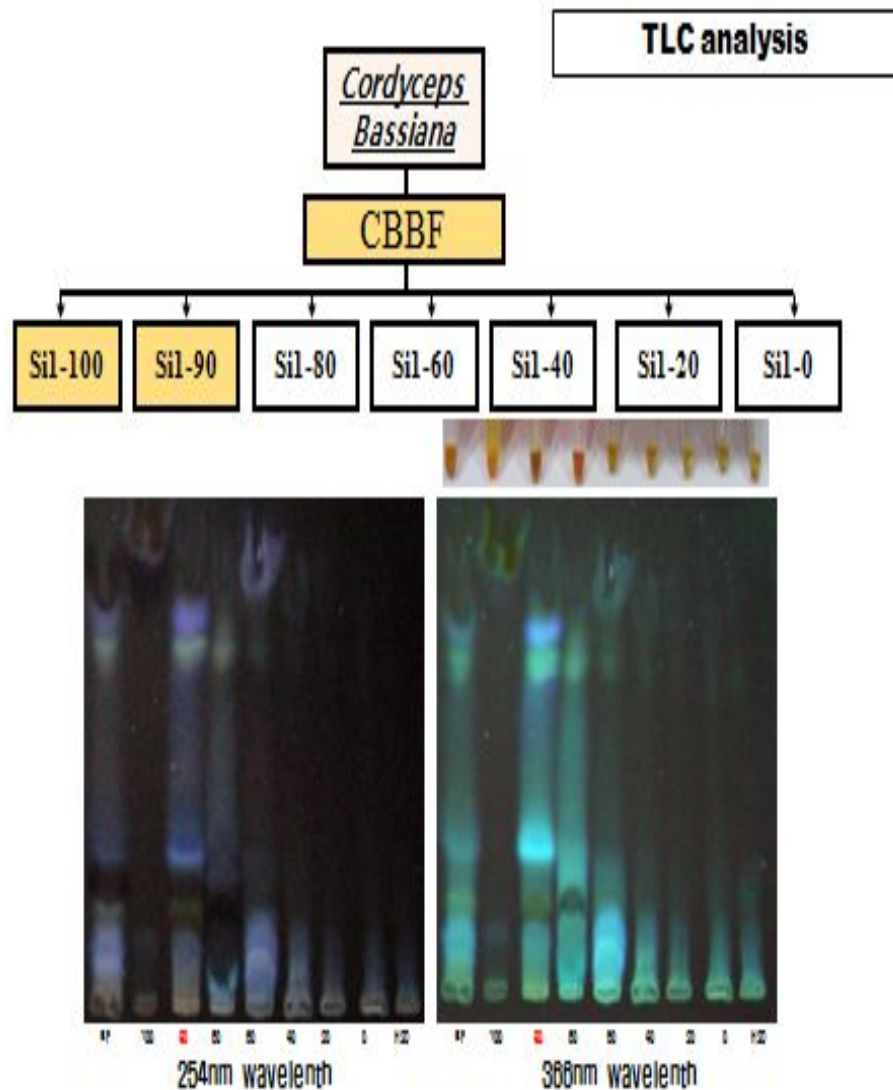


Fig 2-28. Open column chromatography를 이용한 노랑다발동충하초 추출물 및 분획물의 분리 정제

(19) 1st Silica를 이용한, open column chromatography를 이용하여 분리된 노랑다발 동충하초 분획물의 항암특성:

open column chromatography인, Silica chromatography(1차)를 이용하여 분리된, 노랑다발동충하초 분획물의 항암특성을 비교하였다. Cloroform : Methanol ratio를 100:0에서 0:100 까지의 혼합비율로 추출분리된 각각의 분획물을 이용하여 A549 암세포의 억제 효과를 비교하였다. 실험의 결과(Fig 2-29), Cloroform의 함량이 100% 와 90%에서 가장 좋은 항암 결과를 얻었다. 이와같이 효과가 좋은 (Cloroform : Methanol ratio) 100:0 및 90:10에서 얻은 분획물을 합쳐서 다음 실험에 이용하였다.

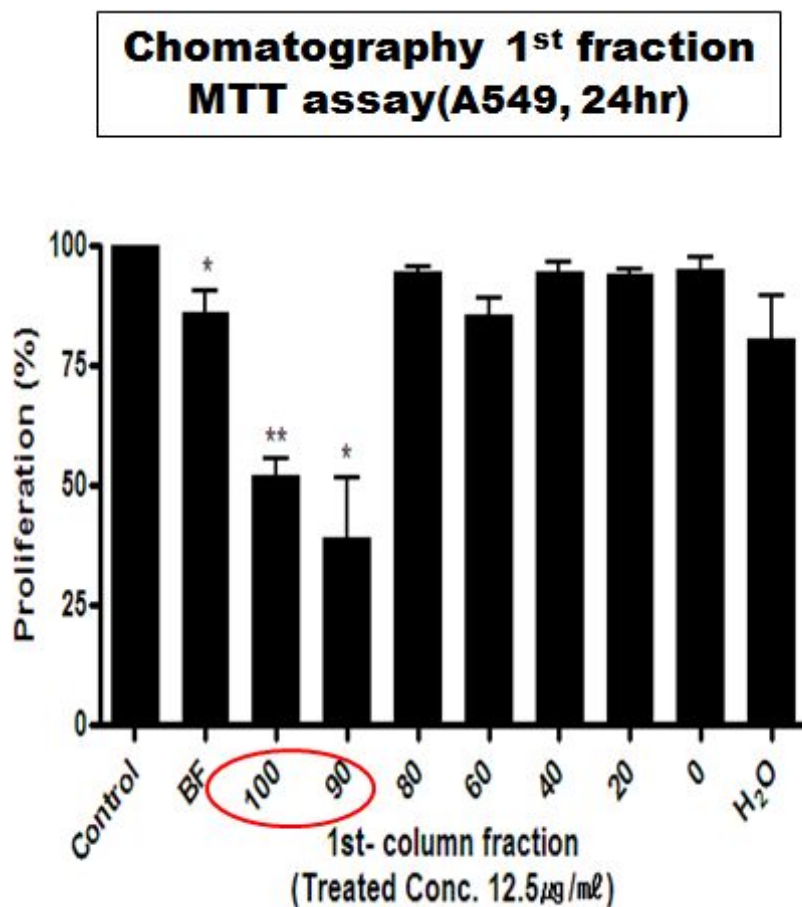


Fig 2-29. Open column chromatography를 이용한 노랑다발동충하초 분획물의 항암 특성비교

(20) 1st Silica를 이용한, open column chromatography를 이용하여 분리된 노랑다발 동충하초 분획물의 항염특성:

open column chromatography인, Silica chromatography(1차)를 이용하여 분리된, 노랑다발동충하초 분획물의 NO 억제 항염특성을 비교하였다. Cloroform : Methanol ratio를 100:0에서 0:100 까지의 혼합비율로 추출분리된 각각의 분획물을 이용하여 macrophage cell을 이용하여 NO억제 효과를 비교하였다. 실험의 결과(Fig 2-30), 상기의 항염효과에서와 같이, Cloroform의 함량이 100% 와 90%에서 가장 좋은 항염 결과를 얻었다.

이와 같이 효과가 좋은 (Cloroform : Methanol ratio) 100:0 및 90:10에서 얻은 분획물을 합쳐서 다음 항염 실험에 이용하였다.

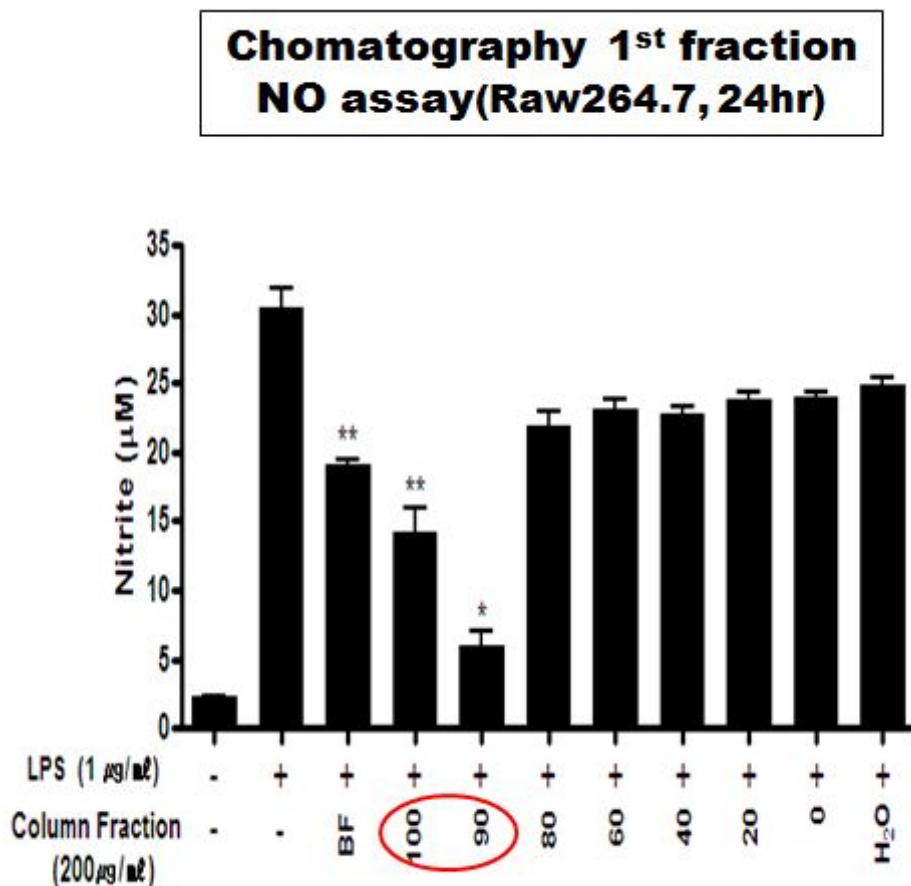


Fig 2-30. Open column chromatography를 이용한 노랑다발동충하초 분획물의 항염 특성비교

(21) 2차(2nd) Silica chromatography를 이용한, 노랑다발동충하초 분획물의 2차 open column chromatography를 이용한 재분리:

1차분리를 끝낸, 노랑다발동충하초 분획물을, 재분리하고자 2차(2nd) Silica chromatography를 이용한, 2차 open column chromatography를 사용하여 Fig 2-31과 같이 노랑다발 동충하초 분획물을 재분리 하였다.

□ Purification of 2nd-column chromatography

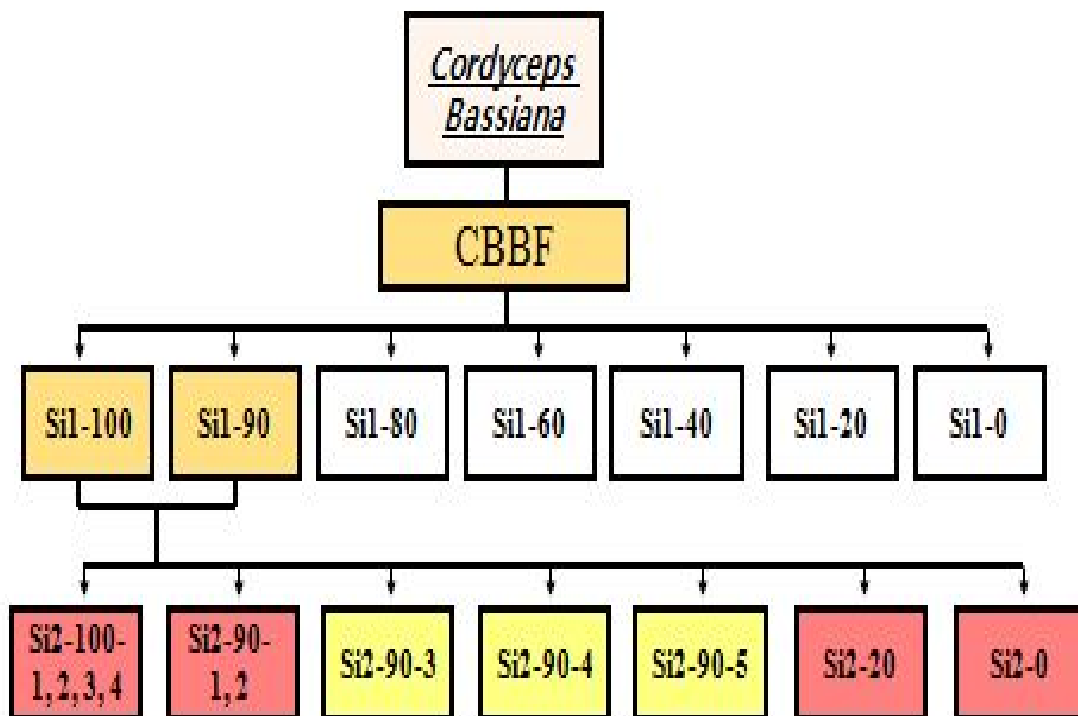


Fig 2-31. Open column chromatography를 이용한 노랑다발동충하초 분획물의 2차분리 결과

(22) 2차(2nd) Silica chromatography를 이용한, 2차 open column chromatography를 사용하여 재분리된 노랑다발동충하초 분획물의 A549 암세포 억제에 대한 항암특성 비교:

효과가 좋은 (Cloroform : Methanol ratio) 100:0 및 90:10에서 얻은 분획물을 합친후, 2차 open column chromatography방법으로 2차 Silica chromatography를 이용하여, 재분리된 노랑다발동충하초 분획물의 항암특성 비교 결과는 Fig 2-32와 같다.

100-1,100-2,100-3,100-4,90-1 및 90-2에서 좋은 항암 효과를 보였으므로 각 fraction을 합쳐서 다음 실험방법인 HPLC를 사용하여 분리를 시작하였으며, 20, 0에서도 좋은 효과를 보였으나 이 부분은 사용하지 않았다.

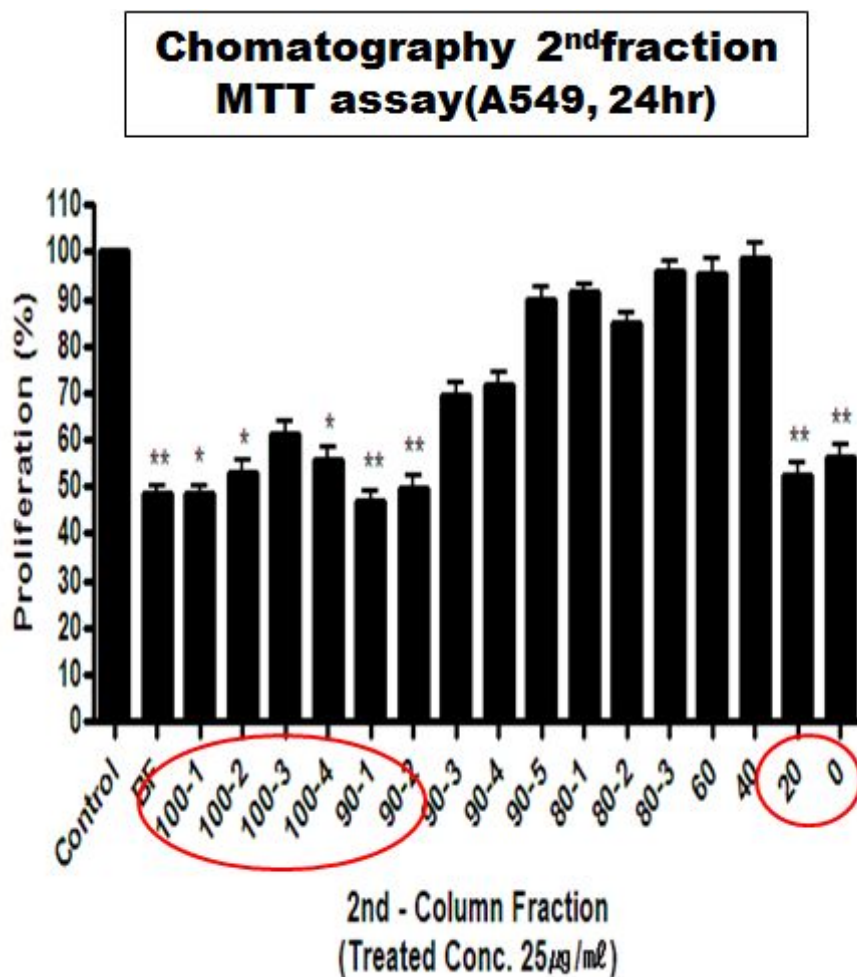


Fig 2-32. 2차(2nd) Silica chromatography를 이용한, 2차 open column chromatography를 사용하여 재분리된 노랑다발 동충하초 분획물의 항암특성 비교 결과

(23) 2차(2nd) Silica chromatography(2차 open column chromatography)를 이용하여 재분리된 노랑다발동충하초 분획물의 NO억제 항염 특성 비교:

효과가 좋은 (Cloroform : Methanol ratio) 100:0 및 90:10에서 얻은 분획물을 합친 후, 2차 open column chromatography방법으로 2차 Silica chromatography를 이용하여, 재분리된 노랑다발동충하초 분획물의 NO억제 항염특성 비교 결과는 Fig 2-33 과 같다.

90-4 및 90-5에서 좋은 항염효과를 보였으므로 각 fraction을 합쳐서 다음 실험방법인 HPLC를 사용하여 분리를 시작하였으며, 나머지 fraction에서는 좋은 효과를 보이지 않았으므로 사용하지 않았다.

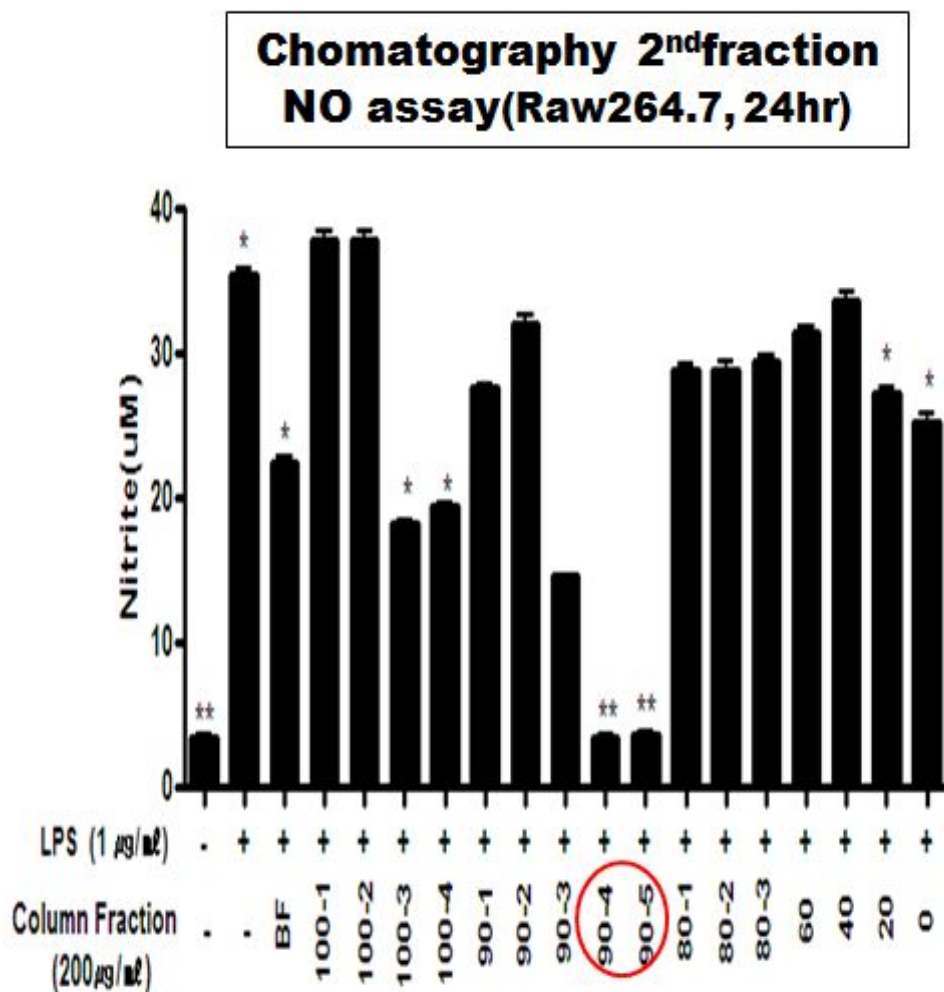


Fig 2-33. 2차(2nd) Silica chromatography를 이용한, 2차 open column chromatography를 사용하여 재분리된 노랑다발동충하초 분획물의 NO억제 항염특성 비교 결과

(24) 2차(2nd) Silica chromatography(2차 open column chromatography) 실험에서 높은 생리활성을 보인 노랑다발동충하초 fraction의 HPLC 분리정제:

chromatography(2차 open column chromatography) 실험에서 좋은 생리활성을 보인 노랑다발 동충하초 fraction을 합친후, 유효성분의 구조를 확인하기 위하여, 다음 단계로 HPLC를 사용하여 분리정제 하였다. HPLC로 실험한 결과는 Fig 2-34와 같았다.

2차(2nd) Silica chromatography를 사용후 좋은 결과를 보인, 노랑다발동충하초 분획물인 Si2-100-4 fraction, Si2-90-1 fraction 및 Si2-90-2 fraction 의 HPLC 분리결과는 Fig 2-35와 같았다.

□ Semi-Prep. HPLC

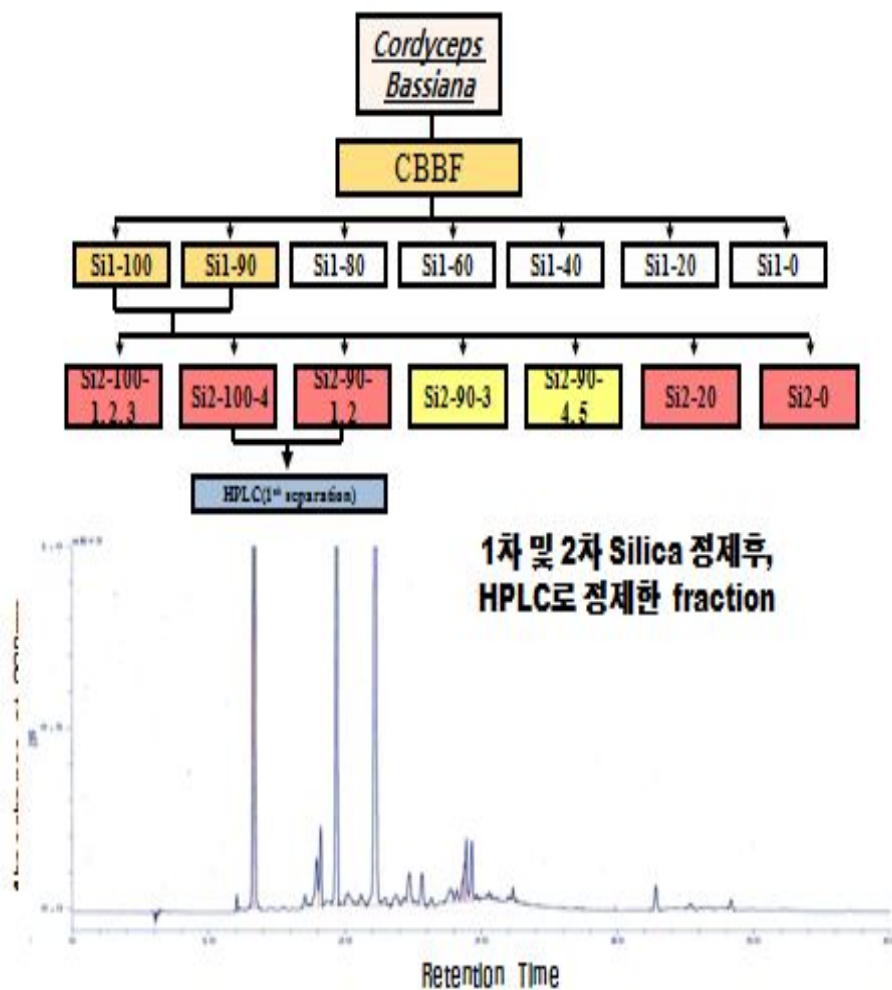


Fig 2-34. 2차(2nd) Silica chromatography를 사용 후 좋은 결과를 보인, 노랑다발 동충하초 분획물의 실험방법 및 HPLC 재분리 결과:

□ Semi-Prep. HPLC

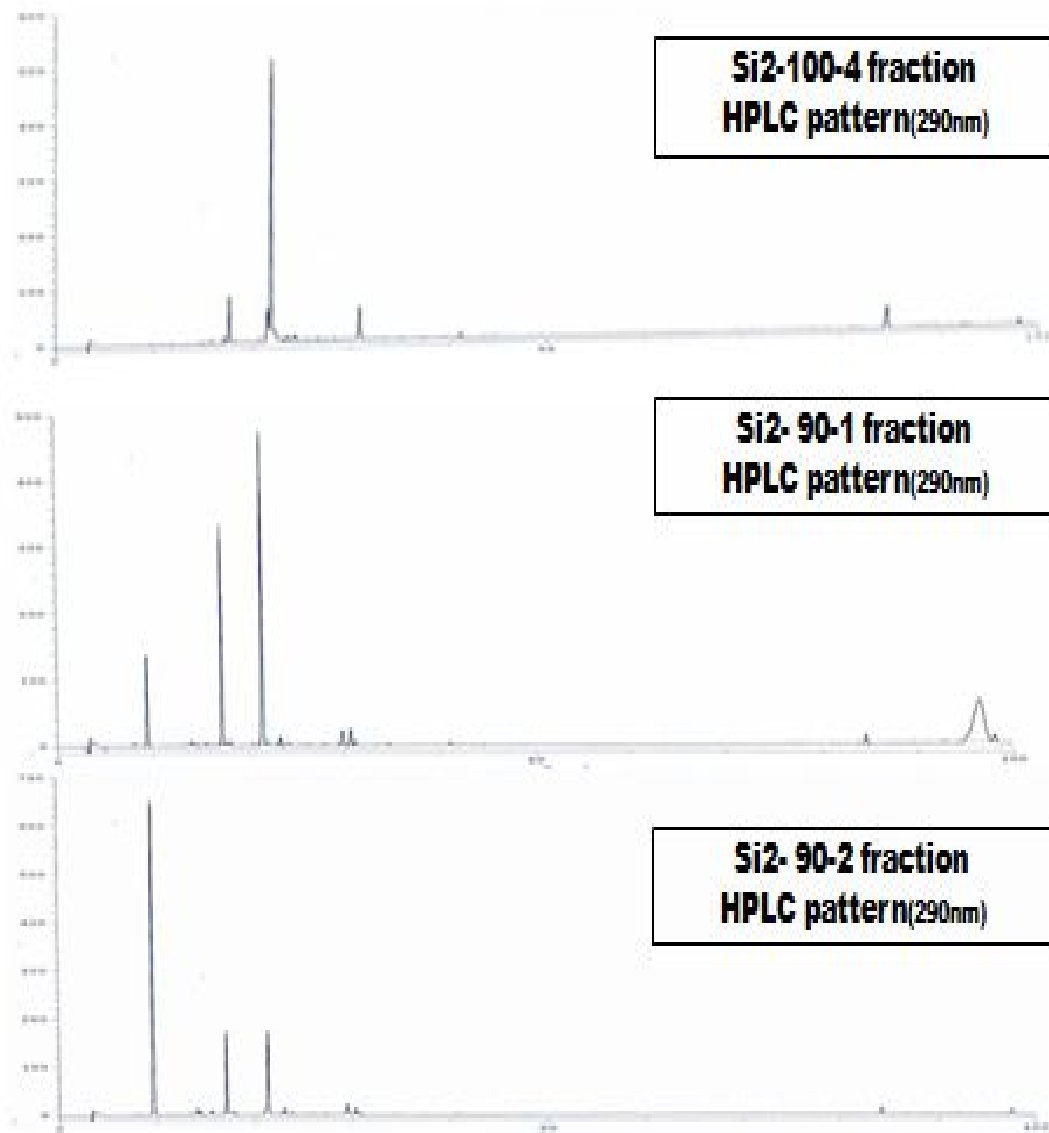


Fig 2-35. 2차(2nd) Silica chromatography를 사용후 좋은 결과를 보인 ,노랑다발 동충하초 분획물인 Si2-100-4 fraction, Si2-90-1 fraction 및 Si2-90-2 fraction 의 HPLC 분리 결과

(25) 노랑다발동충하초 fraction의 HPLC를 이용하여 Beauvericin의 확인 실험:

Beauveria bassiana 에 Beauvericin 이 함유되어 있다고 알려있어, 본 실험에 사용된 노랑다발 동충하초인 *Cordyceps bassiana* 에도 Beauvericin 이 함유되어 있는지를 HPLC를 사용하여 확인하였다.

실험의 결과, Beauvericin standard는 43.2분에 131.0의 면적을 보였고, HPLC 재분리로 얻은 fraction에서도 43분에 Beauvericin의 peak(area 131.0)을 얻었다. 이 결과를 재확인 하고자, fraction에 Beauvericin standard를 가해, HPLC로 분석한 결과, 43.2분에서 345.8의 area를 얻었다.

이러한 HPLC 분석 결과, 노랑다발 동충하초인 *Cordyceps bassiana*에도 Beauvericin 이 함유되어있다는 것을 확인 할 수 있었다(Fig 2-36).

□ Identification of Beauvericin by HPLC

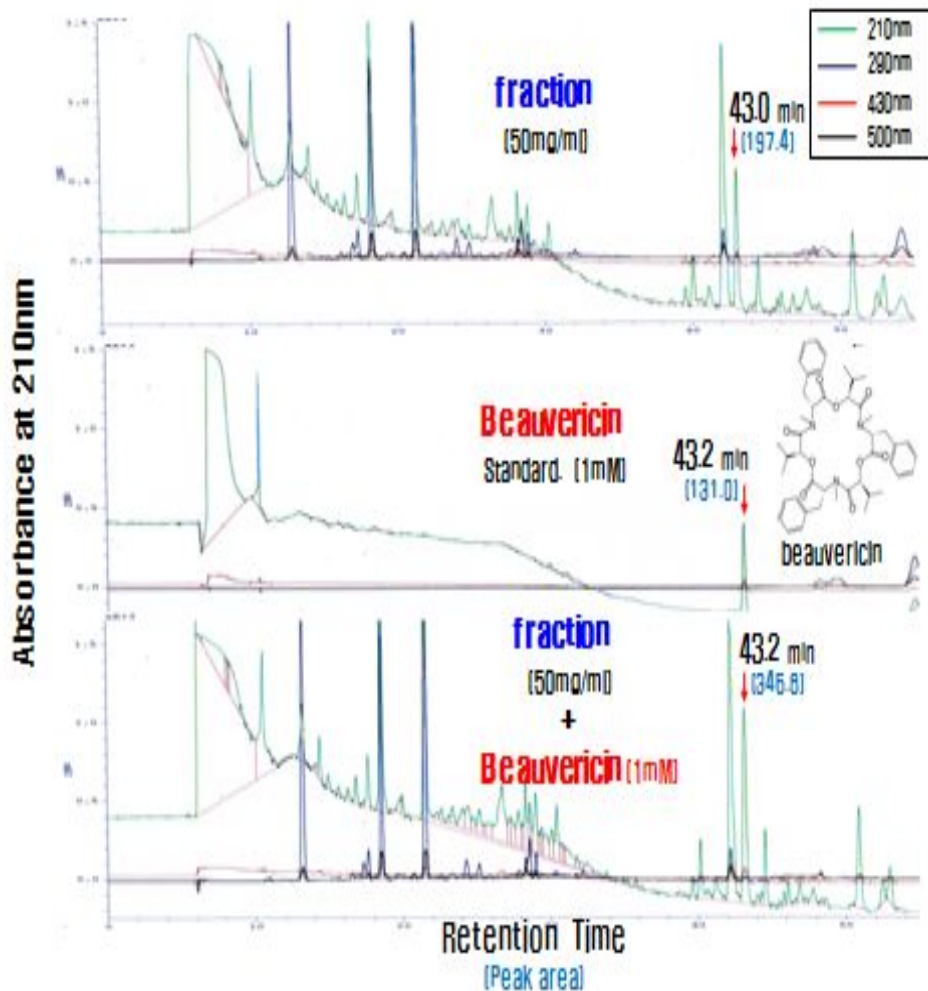


Fig 2-36. HPLC를 이용하여 노랑다발 동충하초 fraction에 Beauvericin이 함유되어 있음을 확인한 실험

(26) 노랑다발동충하초 fraction중에 Beauvericin 의 존재를 LC-MASS 를 이용한 재확인 실험:

LC-MASS를 이용하여, 노랑다발동충하초 fraction중에 Beauvericin 이 함유되어 있는지를 재확인하였다. LC-MASS 를 이용하여 노랑다발동충하초 fraction에 Beauvericin이 함유되어 있음을 확인한 실험으로, Fig 2-37은 Beauvericin 의 LC-MASS 실험 결과로, Beauvericin standard는 785m/z의 질량치를 보였다. Fig 2-38은 노랑다발동충하초 fraction의 LC-MASS 결과이며, LC-MASS 실험 결과로, 역시 Beauvericin와 같은 785m/z의 질량치를 보였다.

이러한 LC-MASS 분석의 결과, 노랑다발동충하초에는 Beauvericin이 함유되어 있음을 재확인 할 수 있었다.

□ Identification of Beauvericin by LC-MS

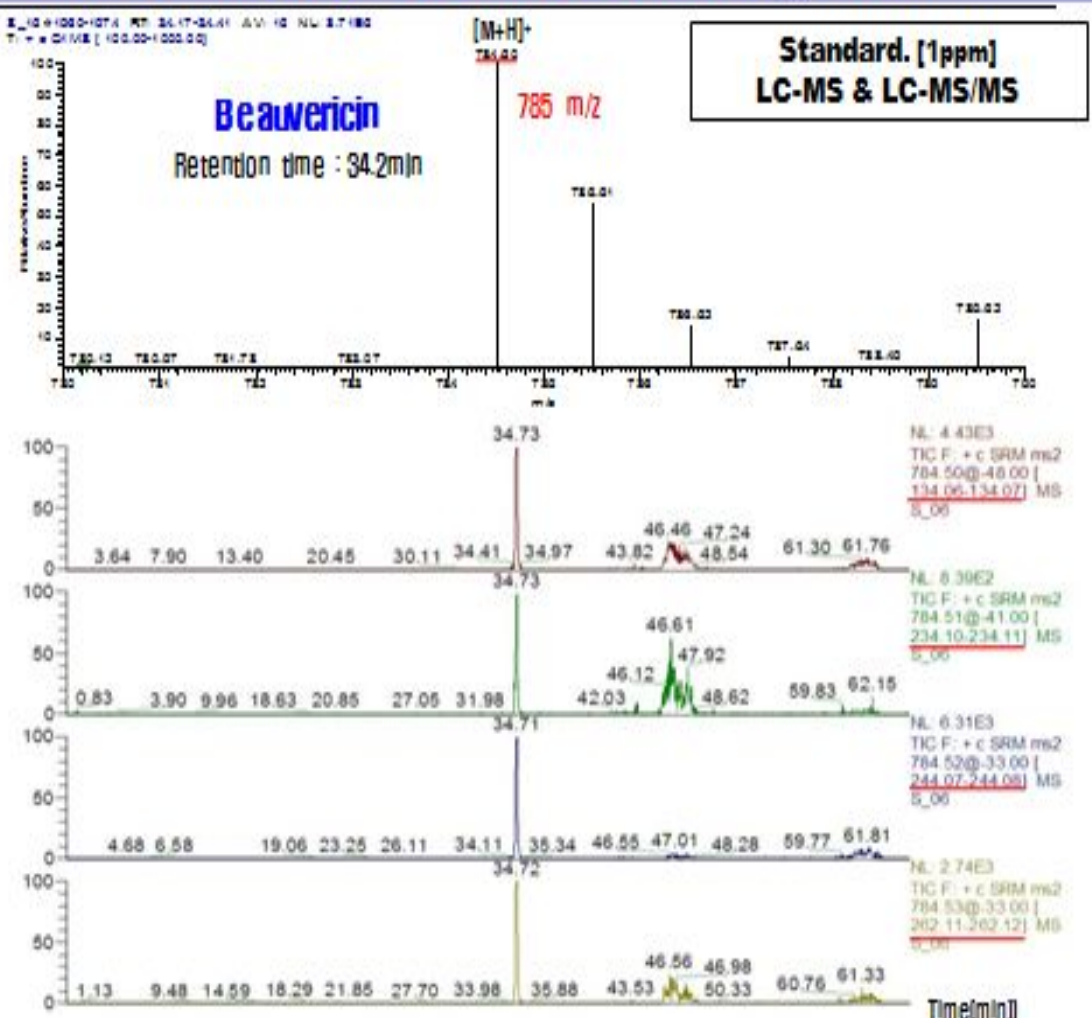


Fig 2-37. LC-MASS 를 이용하여 노랑다발 동충하초 fraction에 Beauvericin이 함유되어 있음을 확인한 실험으로, Beauvericin 의 LC-MASS 실험 결과.

□ Identification of **Beauvericin** by LC-MS

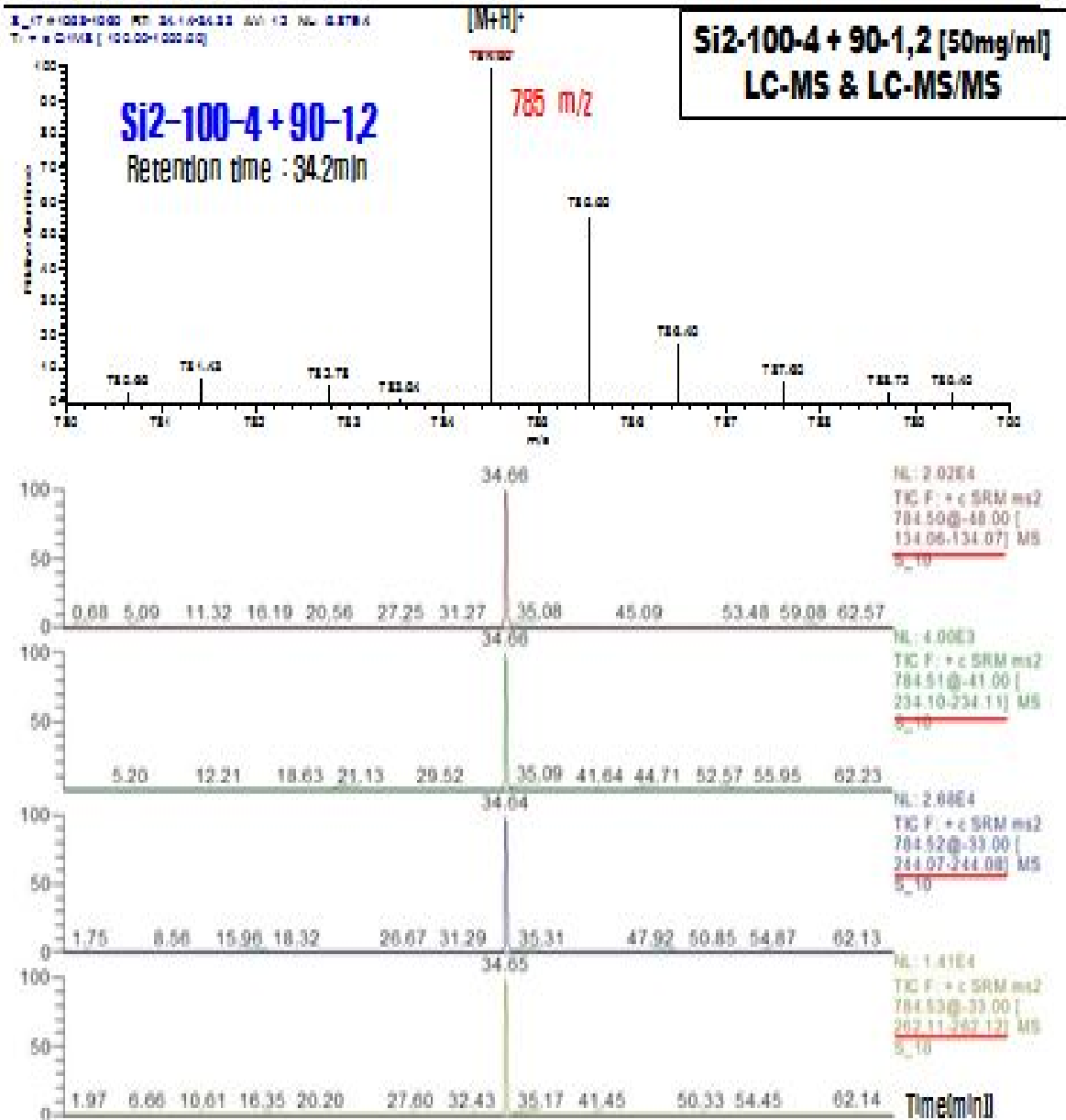


Fig 2-38. LC-MASS 를 이용하여 노랑다발 동충하초 fraction에 Beauvericin이 함유되어 있음을 확인한 실험으로, 노랑다발 동충하초 fraction에는 Beauvericin 이 함유되어 있다는 LC-MASS 실험 결과.

(27) Beauvericin 의 항염 및 세포독성효과 실험:

상기의 실험에서, 노랑다발동충하초에는 Beauvericin이 함유되어 있음을 확인 하였으며, 다음에는, Beauvericin의 생리활성 효과를 조사하였다.

Fig 2-39은 Beauvericin 의 NO억제 항염 실험 결과로서, 5uM에서 IC50을 보여 주어, 항염제로서의 NO억제 효과에 탁월함을 보여 주었다.

그러므로, 다음에는 정상세포인 macrophage에서의 세포 독성효과가 있는지를 test 하였다. 실험 결과, Fig 2-40과 같이 Beauvericin은 4uM에서 35.3%의 생존율을 보여주어 세포독성이 강함을 알수 있었다.

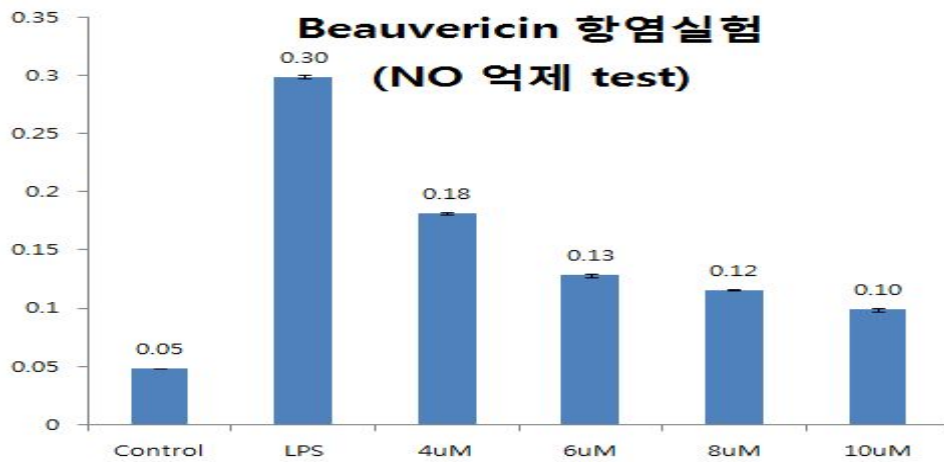


Fig 2-39. Beauvericin 의 NO억제 항염 실험

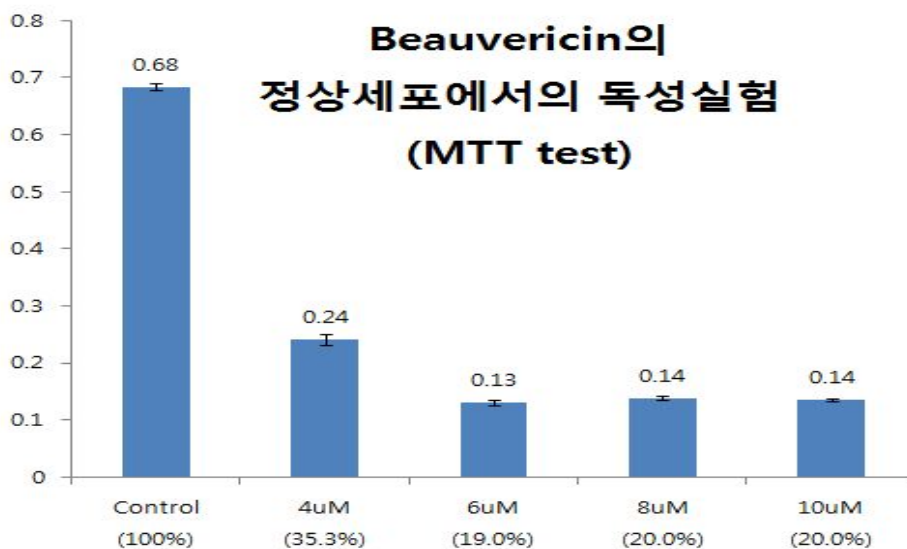


Fig 2-40. Beauvericin 의 macrophage에서의 세포독성 효과

(28) Beauvericin 의 항암 작용효과:

상기의 실험결과, Beauvericin은 4 μ M에서 35.3%의 생존율을 보여주어 세포 독성이 강하다는 결론으로, 항암제로의 사용은 불가하다는 것을 알 수 있었다. 그러므로, 다음으로는 Beauvericin 의 항암 작용효과를 실험하였다.

실험 결과, Fig 2-41과 같이 암세포(A549)를 억제 하는데 효과가 있음을 알 수 있었다.

그러므로, Beauvericin 의 항암효과 보다는 항암제로서의 사용이 효과가 있음을 알 수 있었다.

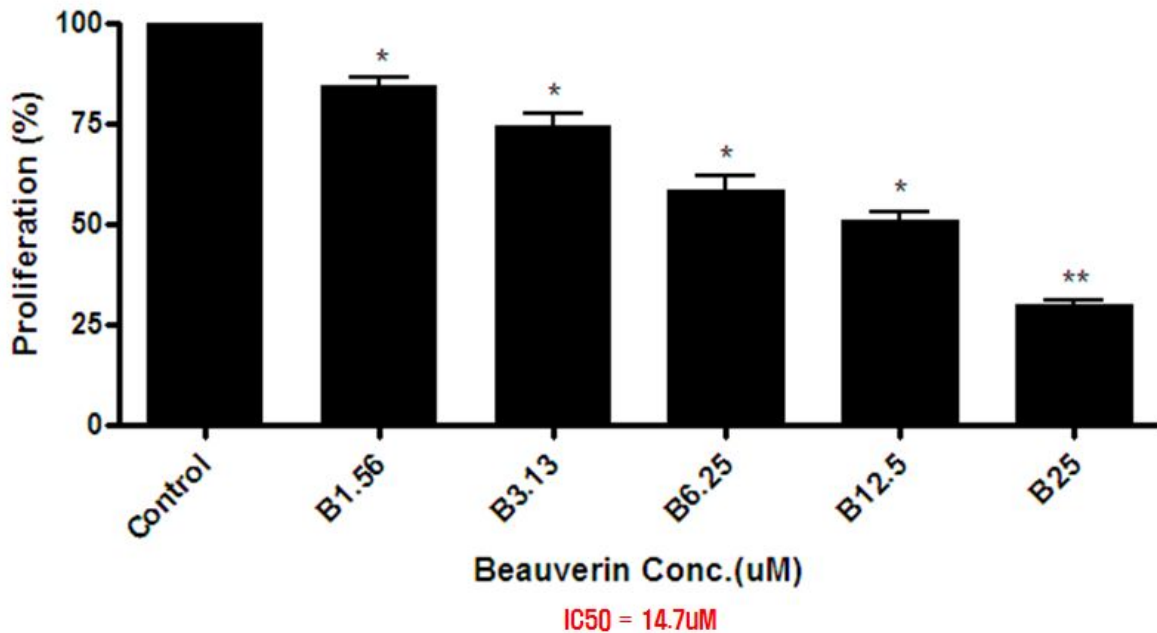


Fig 2-41. Beauvericin 의 항암 작용효과

(29) 본 실험의 결과 :

본 실험의 결과, Fig 2-42와 같이. 노랑다발동충하초에는 Beauvericin이 함유되어 있음을 확인하였으며, Beauvericin 은 항염효과 보다는 항암제로서의 사용이 효과가 있음을 알 수 있었다.

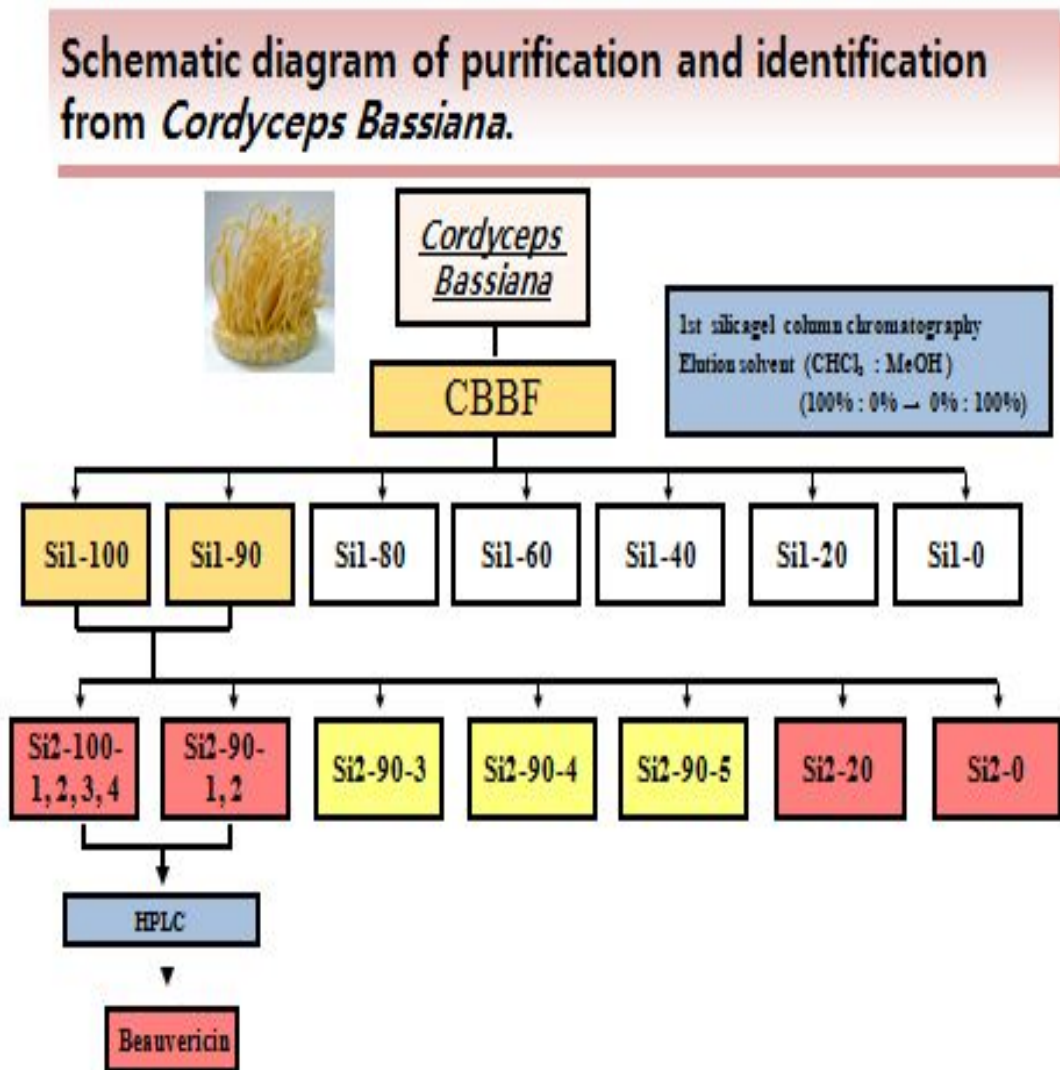


Fig 2-42. 노랑다발동충하초를 이용한 생리활성 물질 탐색의 결과, Beauvericin이 함유되어 있음을 확인.

(30) 본 실험의 앞으로의 진행사항:

이와 같이, 본 실험의 결과, 우선, 노랑다발동충하초에는 Beauvericin이 함유되어 있음을 확인하였지만, 앞으로 새로운 물질을 추적하고자, 1차 및 2차 Silica chromatography로 정제 후, HPLC로 재정제 하여 얻은 결과인, Fig. 2-43의 chromatogram을 계속 추적하여 새로운 생리활성 효과가 있는 물질을 계속 추적하고 있다.

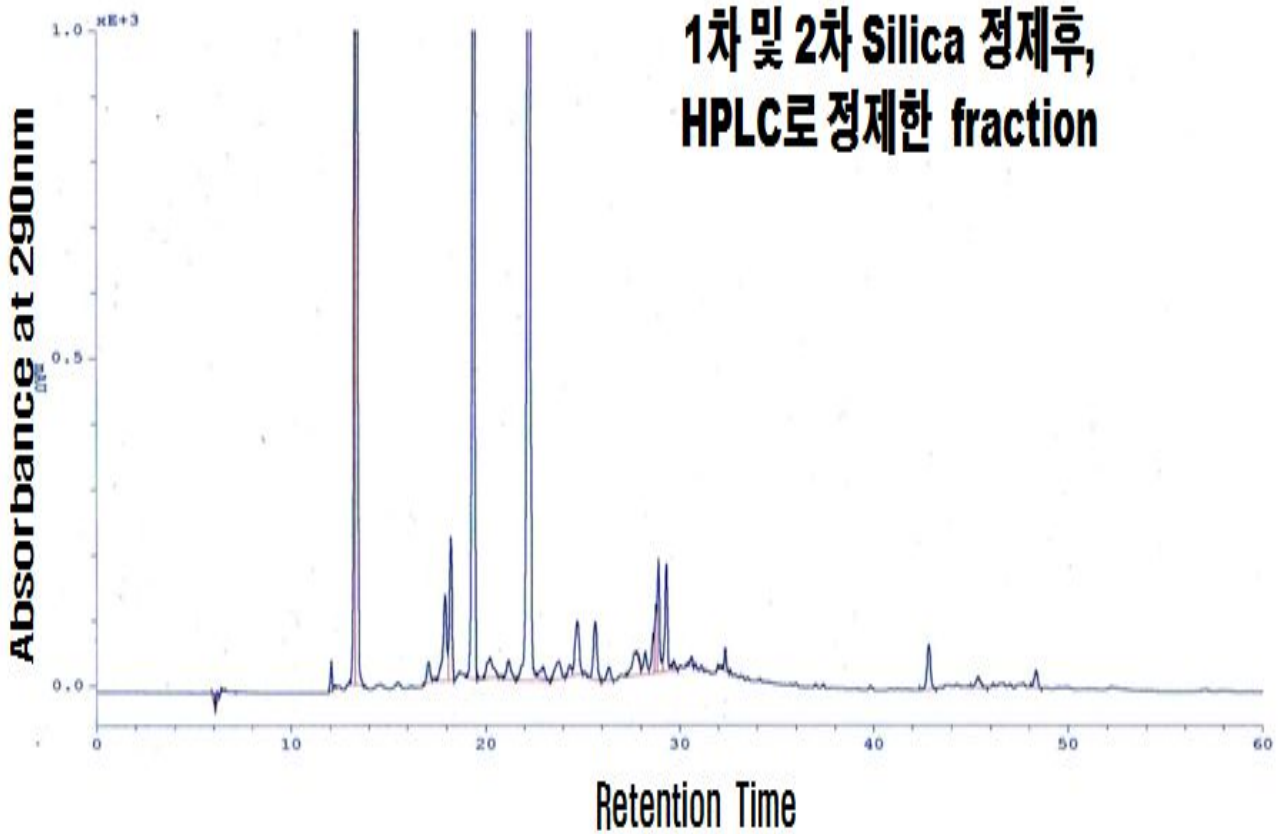


Fig 2-43. 1차 및 2차 Silica chromatography로 정제후 HPLC로 분리한 parrern

2. 원료안전성 시험 (독성)

가. 재료 및 방법

① 실험재료 - 노랑다발동충하초는 머쉬텍(주)으로부터 제공받았으며 강원대학교 성재모교수에 의하여 기원을 확인하였다. 표본품(EFCC#15736)은 강원대학교 동충하초은행에 보관되어 있다.

② 시료의 조제 - 노랑다발동충하초 5 kg을 EtOH로 70℃에서 3시간씩 3회 추출하고 감압농축하여 EtOH엑스 750 g(수득율 15.0%)을 얻었다. 이 EtOH엑스를 물에 현탁시킨 후 hexane, EtoAc, BuOH로 순차적으로 추출 후 감압농축하여 BuOH분획 37.5 g(수득율 5%)을 얻었다. BuOH분획을 absolute alcohol에 녹여서 원심분리(3,000rpm, 20min. 4℃)하여 세척하고 얻은 BuOH 분획(BuEp) 12.4 g(수득율 33.0%)을 시료로 사용하였다.

③ 실험동물 - 4주령의 특정병원체부재 ICR 마우스(웅성 16-18 g, 자성 16-18 g)는 (주)샘타코 BIO KOREA에서 구입하였으며, 1주일간의 순화사육기간 동안 일반증상을 관찰하여 건강한 개체를 시험에 사용하였다. 순화 및 시험 기간 중에 사육환경은 온도 21-24℃, 상대습도 40-60%, 형광등 명암 12h cycle, 조도 300-500 Lux의 조건으로 유지하였으며, 사육상자에 5마리씩 넣고 대팻밥 깔집을 깔아 사육하였다. 실험 동물용 고형사료(주)샘타코)와 음용수(멸균 수도물)는 자유 급여시켰다. 동물실험은 숙명여자대학교 동물실험 윤리위원회에서 심의를 받은 후 수행하였다.

④ 군분리 및 투여용량의 설정 - 동물의 군분리는 체중을 기준으로 무작위법을 이용하여 실시하였으며, 용량군당 암수 각각 5마리씩 배치하였다. 동물의 개체식별은 꼬리에 유성매직으로 표시한 일련번호에 의하여었다. 최고 투여 용량은 10000 mg/kg으로 설정하였으며, 3개의 용량군(10000 mg/kg, 5000 mg/kg, 2500 mg/kg), 대조군과 용매군으로 설정하였다.

⑤ 시료의 투여 - 시료인 노랑다발동충하초 BuOH 분획(BuEp) 동결건조물을 2% tween 80에 균일하게 현탁되도록 조제하였다. 투여 액량은 체중 kg 당 50 ml로 설정하였으며, 시료의 투여는 마우스용 금속제 존데를 이용해서 체중측정치 기준으로 1회 강제 경구투여하였다.

⑥ 임상관찰 및 사망동물 수 - 모든 실험동물에 대한 임상증상관찰 및 사망동물 수는 투여 당일에는 투여 후 10분, 30분, 1시간, 2시간 간격으로, 익일부터는 14일까지는 매일 1회 이상 관찰하였다.

⑦ 체중, 사료 및 음수 섭취량 - 공시된 모든 동물에 대하여 투여 당일 및 투여 후 생존 동물에 대하여 1, 3, 7일 및 14일째 개체별 체중을 측정하였으며, 사료 및 음

용수 섭취량은 3, 7, 14일에 사육상자 당 사료 및 음수섭취량을 측정하였다.

⑧ 혈청생화학적 검사 - 생존 동물은 관찰기간 종료 후 Zoletyl과 Rompun을 이용하여 마취시키고 심장을 통해 혈액을 채취한 후, 채취한 혈액에 대한 혈청생화학적 검사로서 total protein (T-protein), total bilirubin (T-bilirubin), aspartic acid transaminase (AST), alkaline phosphatase (ALKP), blood urea nitrogen (BUN), creatinine 함량을 동아의료제단에 의뢰하여 자동분석장치 (HITACHI 7600-110)로 측정하였다.

⑨ 부검 및 장기중량 측정 - 채혈 후 장기이상 유무를 육안으로 관찰하고 간, 신장, 비장의 중량을 측정하였다.

⑩ 통계학적 처리 - 시험결과는 평균값과 표준편차로 표기하였으며, 통계적 유의적 차이의 정도는 Student's t-test를 사용하여 $p < 0.01$ 인 값에 대해 유의적인 것으로 처리하였다.

나. 연구 결과

① 일반증상 및 사망률 - 시료를 경구투여 후 식품의약품안전청의 독성시험기준을 참고하여 실험기간 동안 일반증상관찰과 사망의 유무를 관찰한 결과 모든 실험군에서 사망동물은 관찰되지 않았다. 따라서 본 시료의 최소치사량(minimum lethal dose, MLD)은 10,000 mg/kg 이상으로 나타났다. 또한 이외의 관찰된 모든 일반증상에서 대조군과 차이를 나타내지 않았다 (Table I, II). 박 등은 계면활성제의 2,500 mg/kg 투여, 장 등은 DR-29 투여 마 등은 쌍화탕 투여에서 5,000 mg/kg이하의 값에서 무독함을 나타내었으나 신 등의 레몬그라스정유 투여에 의하여는 10,000 mg/kg 투여에 의하여도 독성이 없다고 보고하였다. 또한 기원균주인 *Beauveria bassiana*는 독성이 있어 천연제초제로 사용되고 있으나 본 실험을 통하여 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.

Table I. Accumulative mortality in male and female mice after a single oral administration of BuCp

Dose group(mg/kg)	Number of died animals at the indicated time post dosing (died animals/total observed animals)					Total
	Day 0	Day1	Day 3	Day 7	Day 14	
Male						
Control	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
tween 80	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
2500	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
5000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
10000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Female						
Control	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
tween 80	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
2500	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
5000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
10000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

Total mortalities during 14 days of observation period, died animal/total observed animals (n=5).

Table II. Clinical finding in male and female mice after a single oral administration of Cordyceps bisfusispora.

Dose group (mg/kg)	Findings	Days after treatment														
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Male																
Control	Appear normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
tween 80	Appear normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
2500	Appear normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
5000	Appear normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
10000	Appear normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Female																
Control	Appear normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
tween 80	Appear normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
2500	Appear normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
5000	Appear normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
10000	Appear normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Clinical findings were observed during 14days (n=6).

② 체중변화와 사료섭취량 및 섭취량의 변화 - 시험물질에 의한 체중변화 관찰결과 자성, 웅성 마우스 모두에서 체중에 유의적인 영향을 주지 않았다(Fig.2-9). 또한 사육상자 당 사료섭취량도 대조군 및 시험물질 투여군에서 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 시험기간 중 자성 대조군, 용매군, 시료 저용량투여군, 중용량투여군, 고용량투여군의 일일 사료섭취량은 22.4, 25.9, 32.4, 25.9, 27.2 (g)이었다. 웅성의 마우스에 있어서도 시험기간 중 대조군과 시험물질의 투여군 모두에서 섭취량의 변화는 인정되지 않았으며 대조군, 용매군, 저용량투여군, 중용량투여군, 고용량투여군의 동물 당 평균 일일 섭취량은 30.7, 28.5, 28.9, 29.2, 29.1 (g)이었다(Fig.2-10). 섭취량에 있어서도 관찰기간 동안 시험물질 투여와 관련된 유의한 변화는 관찰되지 않았다. 자성 마우스의 사육상자당 평균 일일 섭취량은 40.8, 36.1, 36.1, 38.0, 41.2 (ml)이었으며, 웅성 마우스의 일일 평균 섭취량은 46.4, 47.1, 46.1, 43.2, 46.1 (ml)이었다(Fig.2-11).

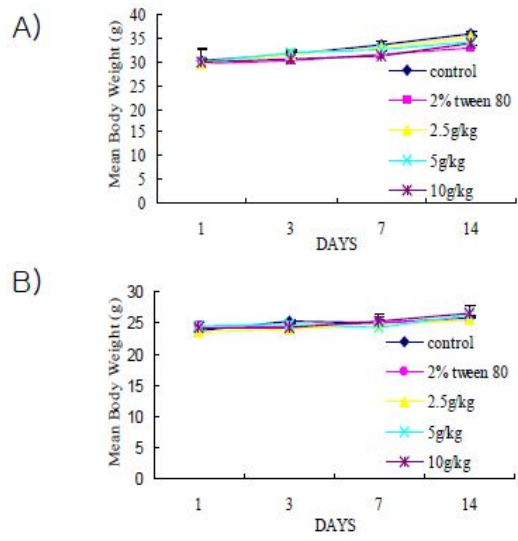


Fig.2-9 Body weight increases in A) male and B) female mice treated orally with BuCp. Values are presented as mean \pm S.D. (n=5)

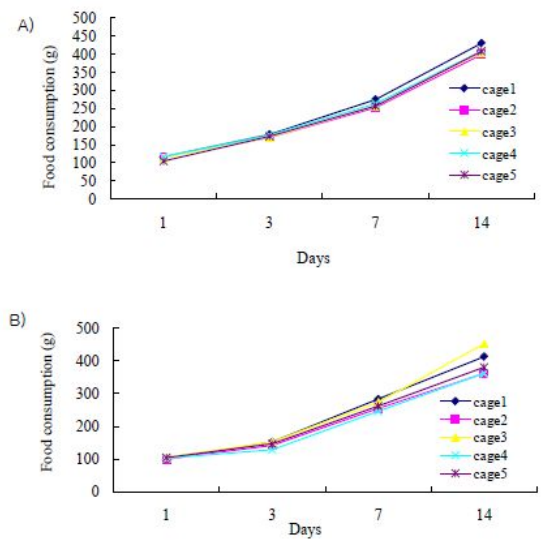


Fig.2-10 Food consumption in A) male and B) female mice treated orally with BuCp. Values are presented as mean \pm S.D. (n=5)

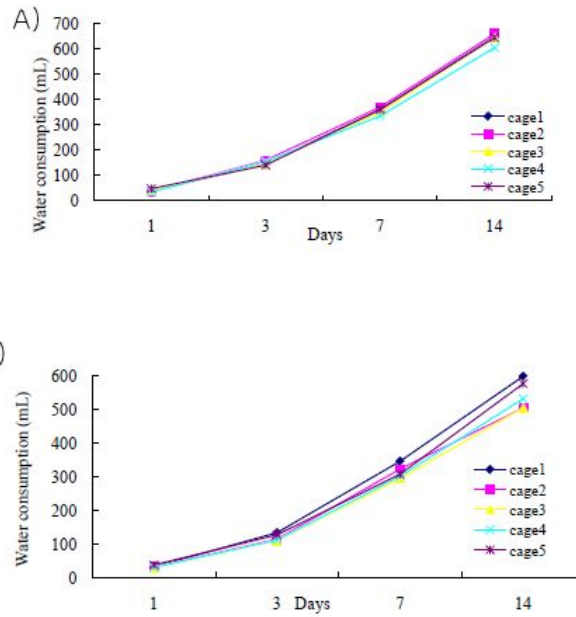


Fig.2-11 Water consumptions in A) male and B) female mice treated orally with BuCp. Values are presented as mean \pm S.D. (n=5)

③ 혈청 생화학적검사 - 혈청 생화학적 소견에서 총 단백질량 및 총 bilirubin의 양은 대조군과 비교할 때 유의성 있는 차이를 나타내지는 않았다. 자성군 및 음성군 각각에서 측정된 혈청생화학적인 간기능 지표인 AST, ALKP 및 신기능지표인 BUN, creatinine에서 시료투여군 및 대조군 개체간에서 약간의 차이가 있었으나 모두 정상 수치 내의 값으로 유의적인 변화는 관찰되지 않았다(Table III)

Table 3. The values of serum biochemical parameters in mice after single oral administration of BuCp

Parameters ^a	Sex		Male			
	Dose (mg/kg)	Control	2% tween 80	2500	5000	10000
T-protein(g/dL)		4.28 \pm 1.14	5.20 \pm 0.72	6.35 \pm 0.44	5.78 \pm 0.15	5.80 \pm 0.24
T-bilirubin(mg/dL)		0.50 \pm 0.07	0.40 \pm 0.07	0.35 \pm 0.05	0.45 \pm 0.21	0.40 \pm 0.07
AST(IU/L)		129.50 \pm 14.52	211.50 \pm 55.00	157.00 \pm 58.53	153.75 \pm 28.60	124.50 \pm 15.24
ALKP(IU/L)		448.33 \pm 36.80	378.75 \pm 67.86	488.67 \pm 45.22	426.25 \pm 31.50	417.50 \pm 51.27
BUN(mg/dL)		31.07 \pm 3.67	26.88 \pm 6.66	33.93 \pm 7.22	30.95 \pm 4.71	27.00 \pm 2.46
CREA(mg/dL)		0.60 \pm 0.07	0.60 \pm 0.07	0.55 \pm 0.09	0.53 \pm 0.08	0.63 \pm 0.11
Parameters ^a	Sex		Female			
	Dose (mg/kg)	Control	2% tween 80	2500	5000	10000
T-protein(g/dL)		7.03 \pm 0.67	6.17 \pm 0.82	5.70 \pm 0.23	5.83 \pm 0.41	5.75 \pm 0.23
T-bilirubin(mg/dL)		0.77 \pm 0.11	0.60 \pm 0.07	0.55 \pm 0.11	0.63 \pm 0.11	0.45 \pm 0.27
AST(IU/L)		236.67 \pm 16.98	244.00 \pm 4.30	176.50 \pm 17.32	155.50 \pm 57.99	173.50 \pm 30.20
ALKP(IU/L)		426.67 \pm 20.72	306.67 \pm 56.61	310.50 \pm 15.34	423.67 \pm 16.13	480.00 \pm 3.54
BUN(mg/dL)		23.73 \pm 0.29	21.20 \pm 1.11	28.28 \pm 1.83	28.30 \pm 2.57	28.60 \pm 3.29
CREA(mg/dL)		0.57 \pm 0.04	0.70 \pm 0.07	0.50 \pm 0.07	0.53 \pm 0.04	0.58 \pm 0.15

Values were expressed as mean \pm S.D (n=5). T-protein, total protein; T-bilirubin, total bilirubin; AST, aspartate aminotransferase(SGOT); ALKP, alkaline phosphatase; BUN, blood urea nitrogen; CREA, creatinine. Statistically significant from 2% tween 80(negative control), * p<0.01

④ 부검소견 및 장기 중량 - 실험 종료 후 시료투여군과 대조군의 모든 동물의 부

검결과 모든 장기에서 독성작용에 의한 이상 소견은 관찰되지 않았다. 투여 물질에 의한 절대장기 중량의 변화에서도 자성 및 음성 마우스 모두에서 유의적인 중량변화가 나타나지 않았다(Table IV, Fig.2-12).

Table 4. Absolute organ weights (g) of male and female mice after single oral administration of BuCp

Organ(g)	sex					
	Dose (mg/kg)	male				
		Control	2% tween 80	2500	5000	10000
Liver		2.18±0.23	1.95±0.11	2.08±0.02	1.98±0.12	1.94±0.08
Kidney		0.72±0.03	0.71±0.06	0.67±0.13	0.67±0.05	0.67±0.05
Spleen		0.20±0.01	0.21±0.02	0.22±0.01	0.20±0.03	0.19±0.01

Organ(g)	sex					
	Dose (mg/kg)	female				
		Control	2% tween 80	2500	5000	10000
Liver		1.25±0.05	1.36±0.09	1.45±0.10	1.44±0.06	1.44±0.11
Kidney		0.41±0.01	0.39±0.03	0.40±0.03	0.42±0.03	0.43±0.02
Spleen		0.17±0.02	0.17±0.01	0.15±0.01	0.18±0.01	0.18±0.01

Values were presented as mean ± S.D.(n=5)
 Statistically significant from 2% tween 80(negative control), * p<0.01

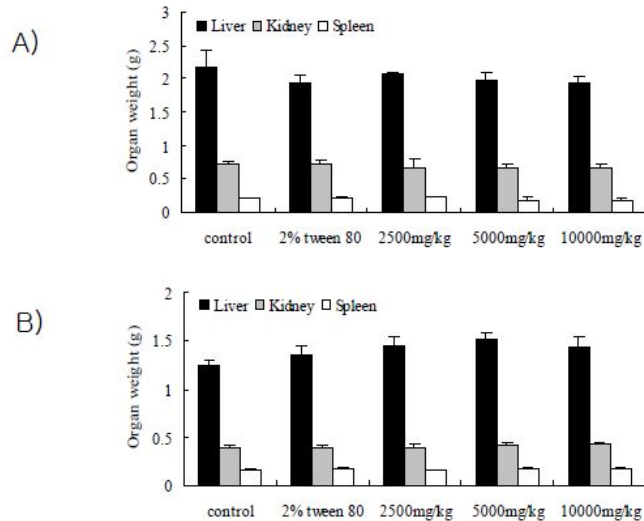


Fig.2-12. Absolute organ weights (g) of A) male and B) female mice after single oral administration with BuCp. Values are presented as mean ± S.D. (n=5)

다. 결론

본 연구에서는 노랑다발동충하초의 BuOH분획에 대한 안전성 평가의 일환으로 식품의약품안전청 독성시험기준에 근거하여 마우스를 이용한 급성 경구독성시험을 실시하였다. 시료의 단회 경구투여에 의한 독성을 평가하기 위해 대조군, 용매군 및 시료 2500 mg/kg, 5000 mg/kg 및 10000 mg/kg 투여군으로 설정하여 ICR 마우스에 투여한 후 2주간 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견, 혈청생화학적인 지표들을 관찰하였다. 실험기간동안 시료의 투여에 기인한 어떠한 중독증상이나 사망 동물은 관찰되지 않았으며 체중은 지속적으로 증가하였고 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 혈청생화학적인 지표검사와 장기중량 측정에서도 시료증가에 기인한 유의적 차이는 인정되지 않았다.

이상으로 노랑다발 동충하초 BuOH 분획은 ICR 마우스에 대한 급성독성시험 결과, 독성학적 이상변화 및 치사한 개체가 관찰되지 않았으므로 10000 mg/kg의 용량에서도 독성 발현이 없는 안전한 물질로 사료된다.

3. 신규 효능성분의 안전성 시험 : 배양 노랑다발동충하초 에탄올 불용분획의 아급성 경구독성

가. 재료 및 방법

① 실험재료 - 노랑다발동충하초는 머쉬텍(주)으로부터 제공받았으며 강원대학교 성재모교수에 의하여 기원을 확인하였다. 표본품(EFCC#15736)은 강원대학교 동충하초은행에 보관되어 있다.

② 시료의 조제 - 노랑다발동충하초 5 kg을 EtOH로 70℃에서 3시간씩 3회 추출하고 감압농축하여 EtOH엑스 750 g(수득율 15.0%)을 얻었다. 이 EtOH엑스를 물에 현탁시킨 후 hexane, butanol, ethylacetate로 순차적으로 추출 후 감압농축하여 butanol분획 37.5 g(수득율 5%)을 얻었다. BuOH분획을 absolute alcohol에 녹여서 원심분리(3,000rpm, 20min, 4℃)하여 얻은 침전물을 동결건조시켜 동충하초 EtOH 불용물(CBEp) 12.4 g(수득율 33.0%)을 얻어서 시료로 사용하였다

③ 실험동물 - 4주령의 특정병원체부재 ICR 마우스(웅성 16-18 g, 자성 16-18 g)는 (주)샘타코 BIO KOREA에서 구입하였으며, 1주일간의 순화사육기간 동안 일반증상을 관찰하여 건강한 개체를 시험에 사용하였다. 순화 및 시험 기간 중에 사육환경은 온도 21~24℃, 상대습도 40~60%, 형광등 명암 12h cycle, 조도 300~500 Lux의 조건으로 유지하였으며, 사육상자에 5마리씩 넣고 대팻밥 깔집을 깔아 사육하였다. 실험 동물용 고형사료((주)샘타코)와 음용수(별균 수도물)는 자유 급여시켰다. 동물실험은 숙명여자대학교 동물실험 윤리위원회에서 심의를 받은 후 수행하였다.

④ **군분리 및 투여용량의 설정** - 동물의 군분리는 체중을 기준으로 무작위법을 이용하여 실시하였으며, 용량군당 암수 각각 5마리씩 배치하였다. 동물의 개체식별은 꼬리에 유성매직으로 표시한 일련번호에 의하였다. 최고 투여 용량은 1000 mg/kg으로 설정하였으며, 3개의 용량군(1000 mg/kg, 500 mg/kg, 250 mg/kg), 대조군과 용매군으로 설정하였다.

⑤ **시료의 투여** - 시료인 빈데기노랑다발동충하초 EtOH insoluble 동결건조물을 2% tween 80에 균일하게 현탁되도록 조제하였다. 투여 액량은 체중 kg 당 50 ml로 설정하였으며, 시료의 투여는 마우스용 금속제 존데를 이용해서 체중측정치 기준으로 1일 1회씩 14일간 강제 투여하였다.

⑥ **임상관찰 및 사망동물 수** - 모든 시험동물에 대한 임상증상관찰 및 사망동물 수는 투여 당일에는 투여 후 10분, 30분, 1시간, 2시간 간격으로, 익일부터는 14일까지는 매일 1회 이상 관찰하였다.

⑦ **체중, 사료 및 음수 섭취량** - 공시된 모든 동물에 대하여 투여 당일 및 투여 후 생존 동물에 대하여 1, 3, 7일 및 14일째 개체별 체중을 측정하였으며, 사료 및 음용수 섭취량은 3, 7, 14일에 사육상자 당 사료 및 음수섭취량을 측정하였다.

⑧ **혈청생화학적 검사** - 생존 동물은 관찰기간 종료 후 Zoletyl과 Rompun을 이용하여 마취시키고 심장을 통해 혈액을 채취한 후, 채취한 혈액에 대한 혈청생화학적 검사로서 total protein (T-protein), total bilirubin (T-bilirubin), aspartic acid transaminase (AST), alkaline phosphatase (ALKP), blood urea nitrogen (BUN), creatinine 함량을 동아시아의료재단에 의뢰하여 자동분석장치 (HITACHI 7600-110)로 측정하였다.

⑨ **부검 및 장기중량 측정** - 채혈 후 장기이상 유무를 육안으로 관찰하고 간, 신장, 비장의 중량을 측정하였다.

⑩ 통계학적 처리 - 시험결과는 평균값과 표준편차로 표기하였으며, 통계적 유의적 차이의 정도는 Student's t-test를 사용하여 $p < 0.01$ 인 값에 대해 유의적인 것으로 처리하였다.

나. 결과 및 고찰

① 일반증상 및 사망률 - 시료를 경구투여 후 식품의약품안전청의 독성시험기준²⁰⁾을 참고하여 실험기간 동안 일반증상관찰과 사망의 유무를 관찰한 결과 모든 실험군에서 사망동물은 관찰되지 않았다. 따라서 본 시료의 최소치사량(minimum lethal dose, MLD)은 1,000 mg/kg 이상으로 나타났다. 또한 이외의 관찰된 모든 일반증상에서 대조군과 차이를 나타내지 않았다 (Table I, II).

Table I. Accumulative mortality in male and female mice after a single oral administration of *Cordyceps bassiana*

Dose group(mg/kg)	Number of died animals at the indicated time post dosing (died animals/total observed animals)					Total
	Day 0	Day1	Day 3	Day 7	Day 14	
Male						
Control	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
tween 80	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
250	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
500	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
1000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Female						
Control	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
tween 80	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
250	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
500	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
1000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

Total mortalities during 14 days of observation period, died animal/total observed animals (n=5).

Table II. Clinical finding in male and female mice after a single oral administration of *Cordyceps bassiana*.

Dose group (mg/kg)	Findings	Days after treatment													
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Male															
Control	Appear normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
tween 80	Appear normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
250	Appear normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
500	Appear normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
1000	Appear normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Female															
Control	Appear normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
tween 80	Appear normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
250	Appear normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
500	Appear normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
1000	Appear normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Clinical findings were observed during 14days (n=5).

박²¹⁾ 등은 계면활성제의 2,500 mg/kg 투여, 장²²⁾ 등은 DR-29 투여 마²³⁾ 등은 쌍화탕 투여에서 5,000 mg/kg이하의 값에서 무독함을 나타내었으나 신²⁴⁾ 등의 레몬그라스정유 투여에 의하여는 10,000 mg/kg 투여에 의하여도 독성이 없다고 보고하였다. 또한 기원균주인 *Beauveria bassiana*는 독성이 있어 천연제초제로 사용되고 있으나 본 실험을 통하여 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.²⁵⁻²⁷⁾

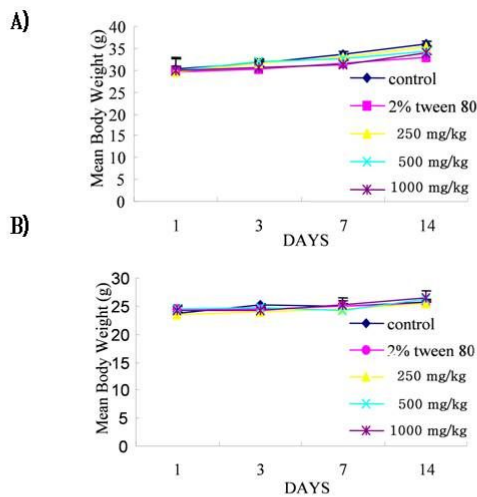


Fig. 2-18. Body weight increases in A) male and B) female mouse treated orally with *Cordyceps bassiana*. Values are presented as mean \pm S.D. (n=5)

② **체중변화와 사료섭취량 및 섭취량의 변화** - 시료에 의한 체중변화 관찰결과 자성, 웅성 마우스 모두에서 체중에 유의적인 영향을 주지 않았다(Fig. 2-18). 또한 사육상자 당 사료섭취량도 대조군 및 시료 투여군에서 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 실험기간 중 자성 마우스의 대조군, 용매군, 시료 저용량투여군, 중용량투여군, 고용량투여군의 일일 사료섭취량은 22.4, 18.7, 19.7, 18.54, 19.8 (g)이었다. 웅성의 마우스에 있어서도 실험기간 중 대조군과 시험물질의 투여군 모두에서 사료섭취량의 유의적인 변화는 인정되지 않았으며 대조군, 용매군, 저용량투여군, 중용량투여군, 고용량투여군의 동물 당 평균 일일 섭취량은 22.4, 20.3, 20.8, 20.9, 21.6 (g)이었다.

섭취량에 있어서도 관찰기간 동안 시료의 투여와 관련된 유의적인 변화는 관찰되지 않았다. 자성 마우스의 사육상자당 평균 일일 섭취량은 40.5, 33.8, 33.9, 25.9, 30.8 (ml)이었으며, 웅성 마우스의 일일 평균 섭취량은 43.7, 44.6, 43.2, 40.8, 34.2 (ml)이었다.

③ **혈청 생화학적검사** - 혈청 생화학적 소견에서 총 단백질량 및 총 bilirubin의 양은 대조군과 비교할 때 유의성 있는 차이를 나타내지는 않았다. 자성군 및 웅성군 각각에서 측정된 혈청생화학적인 간기능 지표인 AST, ALKP 및 신기능지표인 BUN, creatinine에서 시료투여군 및 대조군 개체간에서 약간의 차이가 있었으나 모두 정상 수치 내의 값으로 유의적인 변화는 관찰되지 않았다(Table III).

Table III. Absolute organ weights (g) of male and female mice after single oral Administration of *Cordyceps bassiana*.

Organ(%)	sex		male			
	Dose (mg/kg)	Control	2% tween 80	250	500	1000
Liver		2.07±0.16	1.71±0.20	1.58±0.11	1.11±0.57	1.64±0.11
Kidney		0.59±0.03*	0.59±0.03*	0.51±0.04*	1.14±0.57	0.55±0.05*
Spleen		0.10±0.02*	0.14±0.01*	0.11±0.01*	0.14±0.01*	0.18±0.09*

Organ(%)	sex		female			
	Dose (mg/kg)	Control	2% tween 80	250	500	1000
Liver		1.18±0.07*	1.19±0.12	0.95±0.26	1.23±0.11	1.02±0.08*
Kidney		0.37±0.06*	0.32±0.02*	0.31±0.04*	0.35±0.14	0.32±0.02*
Spleen		0.13±0.02*	0.20±0.09*	0.13±0.08*	0.08±0.04*	0.10±0.02*

Values were presented as mean ± S.D.(n=5)
 Statistically significant from 2% tween 80(negative control), * p<0.1

④ 부검소견 및 장기 중량 - 실험 종료 후 시료투여군과 대조군의 모든 동물의 부검결과 모든 장기에서 독성작용에 의한 이상 소견은 관찰되지 않았다. 투여 물질에 의한 절대장기 중량의 변화에서도 자성 및 음성 마우스 모두에서 유의적인 중량 변화가 나타나지 않았다(Table IV).

Table IV. The values of serum biochemical parameters in mice after single oral administration of *Cordyceps bassiana*.

Parameters	Sex		Male			
	Dose (mg/kg)	Control	2% tween 80	250	500	1000
T-protein(g/dl)		5.75±0.89	6.0±1.15	6.35±2.87	5.0±0**	5.4±0.52
T-bilirubin(mg/dl)		0.35±0.05*	0.35±0.06*	0.38±0.09*	0.33±0.05*	0.28±0.08*
AST(IU/l)		380.0±57.73	340.0±127.02	395.00±98.15	372.5±37.53	355.0±76.06
ALKP(IU/l)		556.67±98.52	445.0±121.24	502.5±118.89	460.0±38.99	455.0±49.28
BUN(mg/dl)		23.33±3.14	21.0±1.15	23.03±0.9	18.5±0.58	20.42±2.17
CREA(mg/dl)		0.50±0.08*	0.60±0.12	0.63±0.05*	0.63±0.05*	0.66±0.08*

Parameters	Sex		Female			
	Dose (mg/kg)	Control	2% tween 80	250	500	1000
T-protein(g/dl)		5.25±0.46	5.25±0.52	4.33±0.52	5.0±0.01*	5.33±0.52
T-bilirubin(mg/dl)		0.30±0.08*	0.38±0.09*	0.30±0.09*	0.25±0.25	0.33±0.05*
AST(IU/l)		142.5±40.27	105.0±28.75	156.67±28.75	155.0±40.41	205.0±40.41
ALKP(IU/l)		463.33±83.11	365.0±59.55	386.67±59.55	435.0±51.96	420.0±64.50
BUN(mg/dl)		26.33±1.37	54.05±1.55	24.0±1.55	23.0±2.31	28.67±1.86
CREA(mg/dl)		0.65±0.05*	2.25±0.10	0.73±0.10	0.7±0.12	0.77±0.05*

Values were expressed as mean ± S.D (n=5). T-protein, total protein; T-bilirubin, total bilirubin; AST, aspartate aminotransferase(SGOT); ALKP, alkaline phosphatase; BUN, blood urea nitrogen; CREA, creatinine. Statistically significant from 2% tween 80(negative control), * p<0.1, ** p<0.01

다. 결론

본 연구에서는 노랑다발동충하초의 ethanol 불용분획에 대한 안전성 평가의 일환으로 식품의약품안전청 독성시험기준에 근거하여 마우스를 이용한 아급성 경구독성시험을 실시하였다. 시료의 경구투여에 의한 독성을 평가하기 위해 대조군, 용매군 및 시료 250 mg/kg, 500 mg/kg 및 1000 mg/kg 투여군으로 설정하여 ICR 마우스에 2주간 투여한 후 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견, 혈청생화화학적 지표들을 관찰하였다. 실험기간동안 시료의 투여에 기인한 어떠한 중독증상이나 사망동물은 관찰되지 않았으며 체중은 지속적으로 증가하였고 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 혈청생화화학적 지표검사와 장기중량 측정에서도 시료증가에 기인한 유의적 차이는 인정되지 않았다.

이상으로 노랑다발 동충하초 시료는 ICR 마우스에 대한 급성독성시험 결과, 독성학적 이상변화 및 치사한 개체가 관찰되지 않았으므로 1000 mg/kg의 용량에서도 독성 발현이 없는 안전한 물질로 사료된다.

4. 원료성분들의 제제 용해성 증대 연구

가. 연구방법

동충하초 분획의 향아토피 향장제제화를 위해서향장품의 구성 성분이 되는 다양한 유성, 수성 원료에 분획이 가용화 되어야 한다. 특히 제제 구성성분에서의 높은 용해성은 피부침투를 위한 필수 선행조건이 된다.

따라서, 본 연구에서는 향장 제제에 사용 가능한 다양한 오일 및 계면활성제에 CBBF의 soluble fraction과 insoluble fraction이 얼마나 가용화되는지 평가하였다. 물에서의 용해성을 평가하지 않은 이유는 동충하초 분획이 물에 대해 용해도가 낮았고 이 경우 향장품의 또 다른 구성 요소인 오일이나 계면활성제에 가용화 시키면 되기 때문이다.

용해성 평가는 다음의 방법으로 진행하였다. CBBF의 soluble fraction과 insoluble fraction 약 10 mg을 취하여 시험에 사용된 각각의 오일 및 계면활성제 일정량(1 ml)에 가한 후 실온에서 wrist action shaker (100 rpm)로 용해시켰다. 동충하초의 추출물이 다 용해되면 추가적으로 5 mg의 추출물을 가하여 최대로 녹을 수 있는 동충하초 추출물의 양을 구하였다.

표. 각공 오일 및 계면활성제 매질에서 동충하초 CBBF의 가용성분획 및 불용성 분획의 용해성

매질	용해성 (각 매질 ml 당)	
	CBBF 가용성분획	CBBF 불용성분획
Labrafac Lipo	< 10 mg	< 15 mg
Labrafac PG	< 15 mg	< 10 mg
Peceol	< 10 mg	< 20 mg
Capryol 90	< 10 mg	< 40 mg
Lauroglycol 90	< 10 mg	< 15 mg
Lauroglycol FCC	< 10 mg	< 15 mg
Labrafil M1944 CS	< 15 mg	< 20 mg
Labrafil M2125 CS	< 15 mg	< 25 mg
Gelucire44/14	< 10 mg	< 10 mg
Labrasol	< 25 mg	< 40 mg
Transcutol	< 20 mg	< 35 mg
Olive oil	< 10 mg	< 10 mg
PEG 400	< 15 mg	< 30 mg
Liquid paraffin	< 10 mg	< 10 mg
Tween 80	< 45 mg	< 50 mg
Span 20	< 40 mg	< 40 mg

나. 결과 및 고찰

위의 표에서 볼 수 있듯이 동충하초의 부탄올 분획의 가용성 성분은 HLB 값이 낮은 Labrafac Lipo, Peceol, Capryol 90, Lauroglycol 90, Lauroglycol FCC, Labrafil M1944 CS, Labrafil M2125 CS, Labrasol, Transcutol에서 보다 낮은 용해도를 보였다. 그러나 비록 CBBF 불용성 분획보다는 낮은 용해도를 보였지만 Tween 80에서는 가장 높은 용해도를 보였다. 이는 Tween 80이 물에 대한 친화성이 높아 가용성 분획의 용해에 적합하였기 때문으로 생각된다. 한편, CBBF의 불용성 분획은 대체로 다양한 매질에서 보다 우수한 용해성을 보여 주었는데 이는 시험에 사용된 매

질의 성질이 유용성에 가까워 불용성 성분의 용해에 보다 적합했기 때문으로 생각된다.

다. 향후계획

동충하초 분획을 이용해 항아토피 향장품으로 제제화 할 경우 이상에서 평가한 오일 및 계면활성제를 구성성분으로 사용해야 동충하초의 분획을 가용화 시키기 용이해 지고 이는 동충하초의 피부전달에 큰 도움을 줄것으로 기대된다.

5. 원료제제화 - 동충하초추출물의 향장품 제형설계

가. 연구배경

- 동충하초의 활성을 아토피 치료에 사용하기 위해서는 치료의 타겟이 되는 피부 부위에 동충하초의 추출물을 효과적으로 전달하기 위한 제형의 확보가 필수적임
- 외용제로 사용 가능한 제형으로는 유성연고제, 수성연고제, 겔제 및 크림제가 있으나 크림제는 피부가 갖고 있는 가장 효과적인 침투장벽인 각질층의 투과도를 높일 수 있는 제형으로 알려져 있어 아토피 치료에 적합한 제형으로 사료됨
- 크림제는 그 구성 상 유상과 수상으로 이루어져 있어 동충하초의 용해성이 다양하여도 사용이 가용화된 제형을 제조할 수 있는 잇점이 있음
- 1차년도의 연구를 통해 동충하초의 가용화에 적합한 제형소재를 다수 확보하여 이를 이용해 제형을 설계할 필요가 있음

나. 연구목적

- 동충하초의 물성에 적합한 크림제의 조성을 설계
- 경우에 따라서는 동충하초 추출물의 각질층 투과성이 매우 낮을 수 있으므로 투과도를 보다 증대시킬 수 있는 back-up 제형의 확보

다. 연구방법

- 동충하초 추출물로는 동충하초의 부탄을 분획을 사용하였으며 이를 유상에 용해시킨 후 가장 안정적으로 크림상을 형성할 수 있는 조성을 검색하였음.
- 본 연구에서 검토된 유상은 Labrafac Lipo, Labrafac CC, Peceol, Capryol 90, Lauroglycol 90, Lauroglycol FCC, Labrafil M1944 CS, Labrafil M2125 CS, Labrasol, Transcutol, Tween 80, Glyceryl monostearate, Stearic acid, Cetyl alcohol, Propylene glycol 및 Glyceryl monooleate 임
- 이 중 Glyceryl monooleate는 세포막투과도를 높이는 기능이 다수 보고되어 있어 각질투과도를 증대시키기 위한 처방에 Glyceryl monooleate를 함유 시켰음
- 위의 각성분을 이용해 다수의 크림제를 아래의 방법으로 제조한 후 경시적으로 크림이 분리되지 않고 양호한 성상을 보이는지를 평가하여 크림제의 최종 조성을 결정하였음.

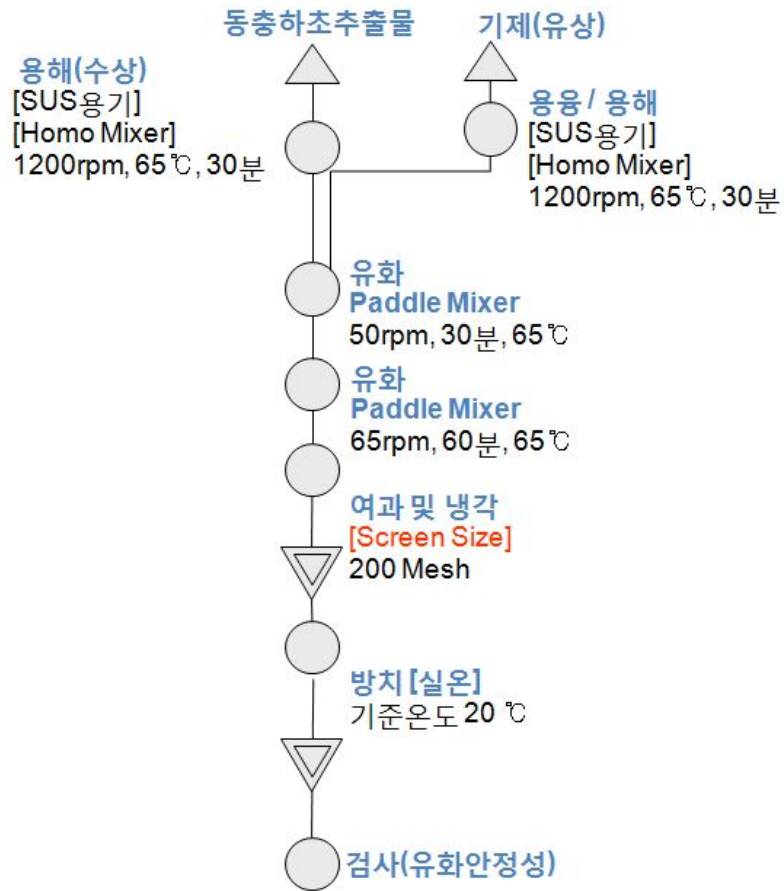


Fig 2-19. 동충하초추출물 함유 크림제의 제조공정

라. 결과 및 고찰

- 동충하초 부탄올 분획 2% 함유 크림제의 조성설계

Table 5. 동충하초 부탄올분획 2% 함유 크림제의 조성

	처방 1	처방 2
동충하초(mg)	300 (2%)	300 (2%)
Labrafac CC(ml)	3.45 (23%)	3.45 (23%)
Tween 80(ml)	1.05 (7%)	1.575 (10.5%)
Glycerol Monostearate(mg)	600 (4%)	600 (4%)
Stearic acid(mg)	1500 (10%)	1050 (7%)
Cetyl alcohol(mg)	900 (6%)	300 (2%)
Propylene glycol(ml)	1.35 (9%)	1.35 (9%)
Glycerol Monooleate(mg)	-	525(3.5%)
Water(ml)	5.85 (39%)	5.85 (39%)
총 중량(g)	15 (100%)	15 (100%)

- 처방 1은 동충하초 부탄을 분획을 2% 함유하는 가장 안정한 크림제의 기본조성임. 처방 2와 처방 1의 차이는 Glyceryl monooleate의 함유 여부로, Glyceryl monooleate는 양친성 화합물로 피부를 포함 한 흡수장벽의 투과도를 높이는 것으로 알려져 있어 처방 1보다 고침투력을 기대할 수 있는 크림조성으로 볼 수 있음
- 분획 형태로 항아토피 효능을 평가한 후 보다 실제적인 치료효과를 예측하기 위해 본 연구에서 개발된 크림 제형을 적용한 유효성과 안전성 평가가 필요할 것으로 사료됨

6. 원료(효능성분) 구조분석 및 합성법 연구 : 불소를 함유하는 Cordycepin 유도체의 합성

번데기 동충하초를 메탄올을 이용해 추출 한 후, 극성에 따라 유기용매를 이용하여 분획을 실시 하고 각 분획의 항암 실험을 통하여 부탄올 분획이 가장 강한 항암 활성을 나타냄을 확인 하였으며, 정제과정 (silicagel, sephadex-LH20 column chromatography, HPLC) 및 구조결정을 통하여 코디세핀 (cordycepin)이 강한 항암작용을 나타내는 물질로 판명되었다. 코디세핀은 기지물질로서 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 보고되어 있지만 구조-활성 상관성에 대한 체계적인 연구결과는 아직 보고되어 있지 않다.

3년차 연구에서는 코디세핀 구조의 당 (sugar) 부분에 불소 (fluorine/F)을 함유하는 유도체를 합성하고 생리활성을 검토할 목적으로 Fig 2-20에 나타난 유도체를 설계하였다. 불소원자는 입체적으로는 수소 (H)와 비슷한 크기이나 전기음성도가 가장 큰 원소로서 전자를 잡아 당기는 힘이 수소에 비해 월등히 크기 때문에 야기되는 전자적 효과 때문에 아주 다른 생리활성을 나타내는 경우가 빈번하기 때문에 신약 설계 시 수소원자 대신 치환되는 경우가 많다. 또한 수산기와 비슷한 입체적 및 전자적 효과를 유발하기 때문에 불소로 치환하는 경우도 빈번하다. 현재 시판되는 다수의 의약품의 구조에 불소를 함유하고 있다.

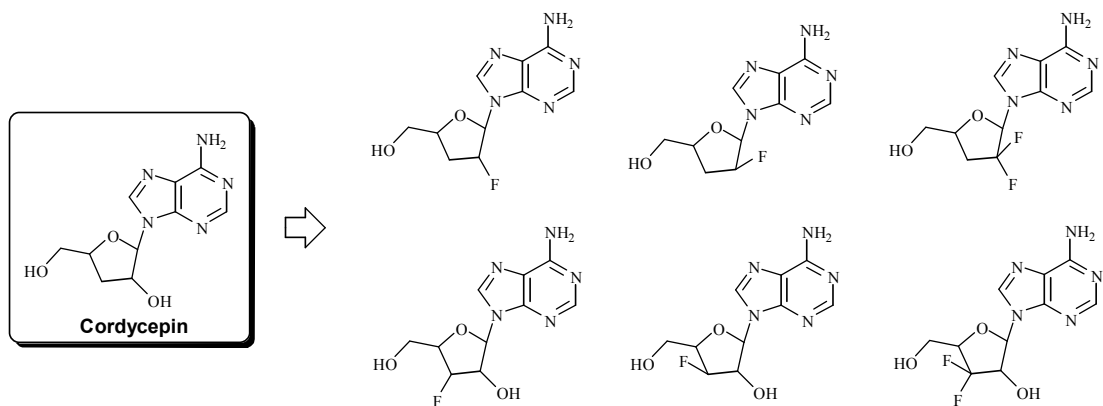
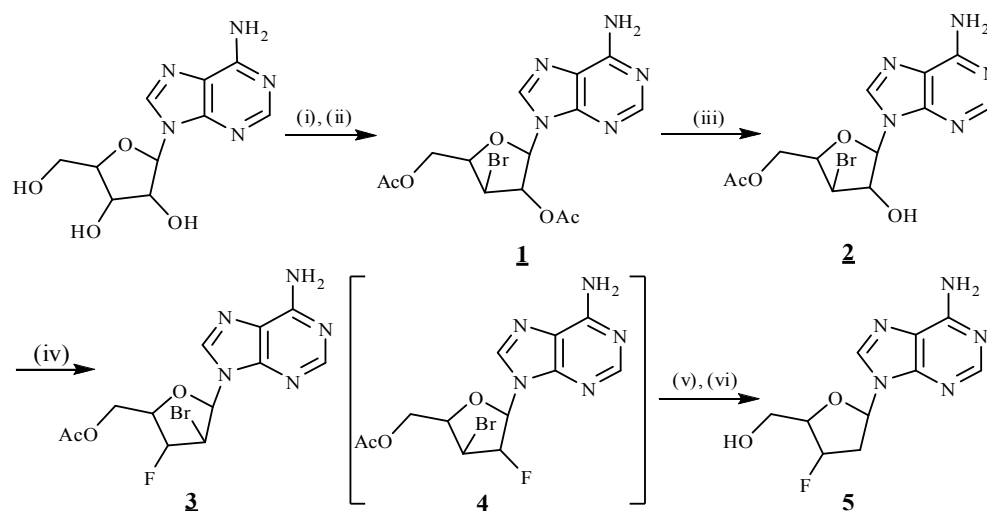


Fig 2-20. 불소 함유 cordycepin유도체의 구조식

* 3'-α-Fluoro-2',3'-dideoxyadenosine 합성



(i) $\text{MeC}(\text{OMe})_3, \text{AcOH}, 50^\circ\text{C}, 5\text{h}$ (ii) $\text{AcBr}, \text{CH}_3\text{CN}, 0\text{--}10^\circ\text{C}, 4\text{h}, 65\%$ 2steps (iii) $\text{H}_2\text{NNH}_2, \text{H}_2\text{O}, \text{EtOH}, 0^\circ\text{C}, 30\text{min}, 44\%$ (iv) $\text{DAST}, \text{CH}_2\text{Cl}_2, \text{reflux}, 1\text{h}, 68\%$ (v) $(n\text{-Bu})_3\text{SnH}, \text{AIBN}, \text{benzene}, \text{reflux}, 5\text{h}$ (vi) $\text{NH}_3, \text{MeOH}, \text{RT}, 2\text{h}, 36\%$ 2steps.

Scheme 1. 3'-α-Fluoro-2',3'-dideoxyadenosine 합성 방법

* 9-(2,5-Di-O-acetyl-3-bromo-3-deoxy-β-Dxylofuranosyl)adenine (1) 합성

adenosine (2.0 g, 7.48 mmol)을 AcOH (10 ml)에 용해한 현탁액에 $\text{MeO}(\text{OMe})_3$ (1.17g, 9.73mmol)을 가하고 50°C 에서 5시간 교반 후 반응 혼합액을 감압농축하였다. 농축하여 얻은 혼합물을 CH_3CN (10ml)에 용해한 후 $0\sim 5^\circ\text{C}$ 로 냉각하고 AcBr (3.04 g, 24.73 mmol)를 1시간 동안 천천히 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 $5\sim 10^\circ\text{C}$ 에서 2시간 교반하였다. 반응 종결 후 반응 혼합물에 NaCO_3 포화수용액을 가하고 EtOAc로 추출하였다. 얻은 유기층을 무수 MgSO_4 로 수분을 제거 후 감압농축하고 silica gel column chromatography ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}=20/1$)로 분리하여 노란색 오일 상태의 화합물 (1) (2.05g, 65%)을 얻었다. $^1\text{H NMR}$ (300MHz, CDCl_3): δ 8.33 (s, 1H, H2), 8.30 (s, 1H, H8), 6.36 (brs, 2H, NH_2), 6.26-6.27 (d, 1H, $J=2.2\text{Hz}, \text{H1}'$), 5.74-5.75 (dd, 1H, $J=1.4\text{Hz}, 2.0\text{Hz}, \text{H2}'$), 4.41-4.58 (m, 4H, $\text{H3}', \text{H4}', \text{H5}'$), 2.19 (s, 3H, OAc), 2.13 (s, 3H, OAc).

* 9-(5-O-Acetyl-3-bromo-3-deoxy-β-Dxylofuranosyl)adenine (2) 합성

화합물 (1) (2.05g, 4.9mmol)을 EtOH (20 ml)에 용해한 용액에 $\text{H}_2\text{NNH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2.45g, 49mmol)을 가하고 0°C 에서 30분 교반하였다. 반응 혼합물에 H_2O (40ml)과 EtOAc (100 ml)를 가하고 분리하여 얻은 유기층을 무수 MgSO_4 로 수분 제거 후 감압농축하였다. silica gel column chromatography ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}=20/1$)로 분리하여 하얀색 고체의 화합물 (2) (0.8g, 44%)를 얻었다. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO): δ 8.30 (s, 1H, H8), 8.17 (s, 1H, H2), 7.33 (brs, 2H, NH_2), 6.50-6.52 (d, 1H, $J=5.3\text{Hz}, 2'-\text{OH}$), 5.88-5.90 (d, 1H, $J=4.0\text{Hz}, \text{H1}'$), 4.99-5.04 (m, 1H, $\text{H2}'$)

,4.55-4.65(m,2H,H3',H4'),4.38-4.39(d,2H, $J=5.1\text{Hz}$,H5'),2.06(s,3H,5'-OAc).

***9-(5-O-Acetyl-2-bromo-2,3-dideoxy-3-fluoro- β -Darabinofuranosyl)adenine**

(3) 합성

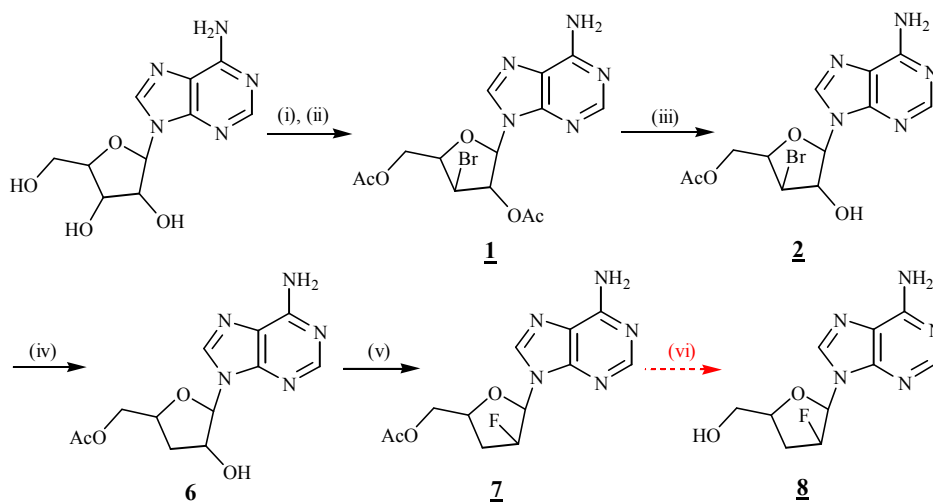
화합물 (2)(0.96g,2.6mmol)를 CH_2Cl_2 (40ml)에 용해한 용액에 diethylaminosulfur trifluoride (DAST, 2.5 g, 15.5 mmol)를 가하고 reflux 조건에서 1시간 교반하였다. 반응 혼합물을 0°C로 냉각하고 5% NaHCO_3 수용액(50 ml)을 가하였다. CH_2Cl_2 로 추출하여 얻은 유기층을 무수 MgSO_4 로 수분 제거 후 감압농축하고 silica gel column chromatography ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}=20/1$)로 분리하여 화합물 (3)과 (4)의 혼합물 (0.66 g, 68%, ratio :10/3)을 얻었다. 주요 화합물 3: $^1\text{HNMR}(300\text{MHz},\text{DMSO})$: δ

8.30(s,1H,H8),8.19(s,1H,H2),7.47(brs,2H, NH_2),6.51-6.53(d,1H, $J=6.7$,H1'),5.83-6.05(m,1H,H3'),5.30-5.41(ddd,1H,H2'),4.35-4.46(m,3H,H4',H5'),2.06(s,3H,OAc). 화합물 4: $^1\text{HNMR}(300\text{MHz},\text{DMSO})$:8.32(s,1H,H8),8.21(s,1H,H2),7.47(brs,2H, NH_2),6.29-6.35(dd,1H, $J=20\text{Hz},2.4\text{Hz}$,H1'),6.12-5.95(m,1H,H2'),5.04-5.16(m,1H,H3'),4.35-4.46(m,3H,H4',H5'),2.08(s,3H,OAc).

*** 3'- \uparrow -Fluoro-2',3'-dideoxyadenosine (5) 합성**

화합물 (3)(0.66g,1.76mmol)을 benzene (20 ml)에 용해한 용액에 azobisisobutyronitrile (0.43 g, 2.62 mmol)과 (*n*-Bu) $_3$ SnH(2.05g,7.05mmol)을 가하고 reflux 조건에서 5시간 교반하였다. 반응 혼합액을 실온으로 냉각 하고 silica gel column chromatography ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}=20/1$)로 분리하여 중간체 화합물을 얻었다. 상기 반응에서 얻은 중간체 화합물에 MeOH에 용해된 5.0 M NH_3 용액(50 ml)을 가하고 실온에서 2시간 교반하였다. 반응 종결후 반응 혼합물을 감압농축하고 silica gel column chromatography ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}=20/1$)로 분리하여 노란색 고체 상태의 화합물 (5)(0.16g,36%)를 얻었다. $^1\text{HNMR}(300\text{MHz},\text{DMSO})$: δ 8.35 (s, 1H, H8), 8.14 (s, 1H, H2), 7.38 (brs, 2H, NH_2),6.37-6.42(dd,1H, $J=5.6\text{Hz},9.3\text{Hz}$,H1'),5.56(brs,1H,OH),5.35-5.54(dd,1H, $J=4.4\text{Hz},5.3.7\text{Hz}$,H3'),4.20-4.31(ddd,1H, $J=4.3\text{Hz},27.0\text{Hz}$,H4'),2.90-3.63(m,2H,H5'),2.54-2.72(m,2H, H2').

* 2'-Fluoro-2',3'-dideoxyadenosine 합성



(i) MeC(OMe)₃, AcOH, 50°C, 5h (ii) AcBr, CH₃CN, 0-10°C, 4h, 65% 2steps (iii) H₂NNH₂·H₂O, EtOH, 0°C, 30min, 44% (iv) (*n*-Bu)₃SnH, AIBN, benzene, reflux, 5, 67% (v) DAST, CH₂Cl₂, reflux, 2h, (vi) NH₃, MeOH, rt, 2h.

Scheme 2. 2'-Fluoro-2',3'-dideoxyadenosine 합성

* 5'-O-Acetyl-3'-deoxyadenosine(6) 합성

화합물 (2)(1.2g, 3.2mmol)을 benzene (40 ml)에 용해한 용액에 azobisisobutyronitrile (AIBN, 0.79 g, 4.8 mmol)과 (*n*-Bu)₃SnH(2.8g, 9.6mmol)을 가하고 reflux 조건에서 2시간 교반하였다. 반응 혼합액을 실온으로 냉각 하고 silica gel column chromatography (CHCl₃/MeOH=20/1)로 분리하여 하얀색 고체상의 화합물 (6)(0.6 g, 67%)을 얻었다. ¹H NMR (300 MHz, DMSO): δ 8.25 (s, 1H, H2), 8.16 (s, 1H, H8), 7.28 (brs, 2H, NH₂), 5.91-5.92(d, 1H, *J*=1.8Hz, H1'), 5.74-5.76(d, 1H, *J*=4.1Hz, H2'), 4.69(brs, 1H, OH), 4.49-4.57(m, 1H, H4'), 4.15-4.29(m, 2H, H5'), 2.27-2.37(m, 1H, H3'b), 1.97-2.04(m, 1H, H3'a), 1.99(s, 3 H, OAc).

* 5'-O-Acetyl-2'-fluoro-2',3'-dideoxyadenosine(7) 합성

화합물 (6)(0.13g, 0.45mmol)을 CHCl₂(27ml)에 용해한 용액에 diethylaminosulfur trifluoride (DAST, 0.43 g, 2.67 mmol)을 가하고 reflux 조건에서 3시간 교반하였다. 반응 종결 후 혼합물을 0°C로 냉각하고 5% NaHCO₃수용액 (50 ml)를 가하였다. CHCl₂로 추출하여 얻은 유기층을 무수 MgSO₄로 수분 제거 후 감압농축하고 silica gel column chromatography (CHCl₃/MeOH=20/1)로 분리하였지만 혼합물을 얻었다. 혼합물 NMR 확인 결과 목표 화합물의 signals이 발견되었다.

7. 효능성분 분석법 확립 : 배양 노랑다발동충하초 부탄을 분획의 Mushroom tyrosinase 저해 활성

가. 연구배경

동충하초는 모든 곤충군의 유충, 번데기, 성충 등에 걸쳐 침입하며 곤충을 죽게 한 후, 이를 기주로 하여 증체 전반에 자실체를 형성하는 버섯이다. 중국에서는 예로부터 불로장생의 비약으로 알려져 결핵, 황달 등의 치료와 강장제로서 주로 병후의 신체조절, 보양 등에 사용되고 있다.

노랑다발동충하초 *Cordyceps bassiana*는 Li 등¹⁾에 의해 최초로 분리보고되었으며, 이종은 토양 아래 또는 부패한 나무 안의 죽은 인시목 애벌레 안에서 자라고 곤충의 진균 병원체로서 자실체의 생성물은 자연에서 희귀하며 인위적인 경작을 통해 얻기 힘들다.²⁻³⁾ 관련 균주는 *Beauveria bassiana*로서⁴⁻⁷⁾ 이 균은 항생제 오스포린을 생산하며 과상풍, 피부가려움증, 단독(丹毒)의 치료에 이용되어 왔다.⁸⁾ 동충하초류의 활성에 관하여는 당뇨, 알코올성 질병,⁹⁾ 항염,¹⁰⁾ 항암¹¹⁻¹³⁾ 및 면역기능 증가¹⁴⁾ 작용 등이 알려져 있다. 인공배양을 통하여 얻은 노랑다발동충하초의 약효를 규명하기 위하여 생리활성^{15,16)} 및 약효 검색 등이 이루어졌으며, 이 과정에서 얻은 동충하초의 에탄올 불용분획이 멜라닌 생성에 미치는 영향을 알아봄으로써 피부 미백에 대한 효과를 평가하고자 하였다.

나. 재료 및 방법

① 실험재료 - 노랑다발동충하초는 머쉬텍(주)으로부터 제공받았으며 강원대학교 성재모교수에 의하여 기원을 확인하였다. 표본품(EFCC#15736)은 강원대학교 동충하초은행에 보관되어 있다.

② 기기 및 시약 - 미백 활성을 위한 tyrosinase 효소 활성 측정 및 멜라닌 정량을 위한 시료로 Melanocyte stimulating hormone(Sigma Chemical Co., U.S.A.), Protein Assay(Bio-Rad., U.S.A.), L-Dopa(Sigma Chemical Co., U.S.A.), Mushroom tyrosinase(Sigma Chemical Co., U.S.A.), Trypan blue(Gibco BRL Life Technologies Inc.), DMSO(Sigma Chemical Co., U.S.A.), Triton X-100(Sigma Chemical Co., U.S.A.), 세포독성 실험을 위한 시료로 MTT(3-[4,5-dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma Chemical Co., U.S.A.)를 구입하여 사용하였다. B16 melanoma cell은 숙명여자대학교 약학대학에서 세포배양하여 사용하였다.

이 실험에서 사용한 주요 기기는 Autoclave(DAC811, Daeil, Korea), Clean bench(SAM KI CO., Korea), CO₂ incubator(NAPCO, Precision Scientific Inc., Korea), Microscope(Olympus CKX41, Japan), Refrigerated multi purpose

centrifuge(UNION55R, Hanil Science Industrial, Korea), Universal microplate reader(EL800, Bio-tek instruments Inc., Korea) 등이다.

③ 시료 추출 및 분획 - 노랑다발동충하초 5 kg을 EtOH로 70℃에서 3시간씩 3회 추출하고 감압농축하여 EtOH엑스 750 g(수득율 15.0%)을 얻었다. 이 EtOH엑스를 물에 현탁시킨 후 hexane, butanol, ethylacetate로 순차적으로 추출 후 감압농축하여 butanol분획(CBBF) 37.5 g(수득율 5%)을 얻었다.

Mushroom tyrosinase 저해 활성 측정 - 50 mM KH₂PO₄(pH 6.5), 1 mM tyrosine solution, 증류수를 10:10:9의 비율로 섞어 tyrosine buffer를 만들었다. Tyrosine buffer 170 μl에 시료 10 μl를 가하고, 여기에 1000 units/ml mushroom tyrosinase 20 μl를 가하여 전량을 200 μl로 하였다. 반응액을 25℃ incubator에서 20분간 반응시킨 후, 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료 대신 시료와 동량의 tyrosine buffer를 가하여 control로 하였고, mushroom tyrosinase를 제외하여 blank로 하였다. 저해율은 아래와 같이 계산하고, 대조약물로는 kojic acid(IC₅₀=61.15 μg/ml)를 이용하였다.

$$\text{저해율(\%)} = (A-C)/(B-C) \times 100$$

여기서 A는 시료용액이 첨가된 균의 A₄₉₀, B는 control의 A₄₉₀, C는 blank의 A₄₉₀를 나타낸다.

④ MTT 시험법을 이용한 세포의 독성 측정 - 48 well plate에 well 당 1×10⁴ cells/mL 로 접종한 후 37℃, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 배지를 제거 하고 시료를 농도별로 처리하여 배지를 교체한 후 48시간 배양하였다. 각 well을 PBS로 두 번 세척한 후 MTT의 농도가 0.5 mg/mL가 되도록 10 % FBS DMEM에 녹인 후 100 μl씩 가하였다. 이 때 대사 활동을 하고 있는 세포의 경우 NADH와 NADPH의 작용으로 인한 환원반응으로 MTT(yellow tetrazolium salt)가 formazan crystal (purple)로 변하였다. 37℃, 5% CO₂ incubator에서 4시간 배양한 후 solubilization 용액을 400 μl씩 넣어 밤새 실온에 놓아 용해시켰다. Formazan crystal이 완전히 용해되면 다음날 대조 파장을 650 nm로 하고 측정 파장을 570 nm로 하여 ELISA reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

⑤ 통계학적 처리 - 시험결과는 평균값과 표준편차로 표기하였으며, 통계적 유의적 차이의 정도는 Student's t-test를 사용하여 p<0.01인 값에 대해 유의적인 것으로 처리하였다.

나. 결과 및 고찰

Mushroom tyrosinase 저해 활성 측정 - Tyrosinase는 피부의 색소성분인 melanin을 생성하는 주효소이므로 tyrosinase의 활성을 효과적으로 억제할 수 있는 물질은 피부 미백을 목표로 하는 기능성 화장품의 첨가제로 이용할 수 있다.

실제 세포 tyrosinase의 활성도에 대한 영향을 관찰하기 전에, mushroom tyrosinase의 활성도에 미치는 효과를 확인하였다. 먼저 기준 물질인 kojic acid를 12.5, 25, 50 ug/ml의 농도로 처리하였을 때 저해율은 각각 27.8, 52.9, 64.2 %로 나타났다. 그리고 시료인 CBBF를 1250, 2500, 5000 ug/ml의 농도로 처리하였을 때 저해율은 각각 2.0, 24.7, 39.4 %로 나타났다. 이를 통해 실험물질인 CBBF는 mushroom tyrosinase의 발현을 농도 의존적으로 억제하였음을 확인하였다.

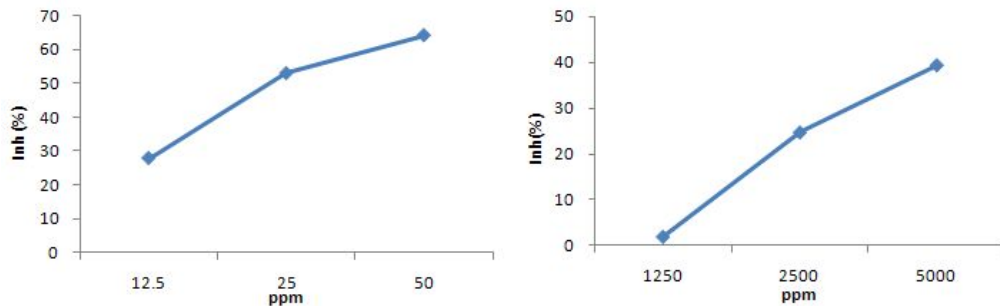


Fig. 2-21. Effect of Butanol Fraction of the Cultured Fruitbody *Cordyceps bassiana* on mushroom tyrosinase activity. Left; standard (kojic acid), right; CBBF.

MTT 시험법을 이용한 세포의 독성 측정 - B16F10에 실험물질인 CBBF를 2.5, 5, 10 ug/ml의 농도로 처리한 결과 세포 생존율은 각각 90, 84, 83 %를 나타냈다. 그리고 기준 물질인 kojic acid를 CBBF와 동일한 농도로 처리한 경우, 세포 생존율은 각각 98, 97, 93 %를 나타냈다. 두 물질 모두 농도 의존적으로 세포 독성을 보이고는 있으나, 가장 높은 농도인 10 ug/ml에서도 80% 이상의 세포 생존율을 나타냈으므로, 사멸효과는 나타나지 않은 것으로 볼 수 있다.

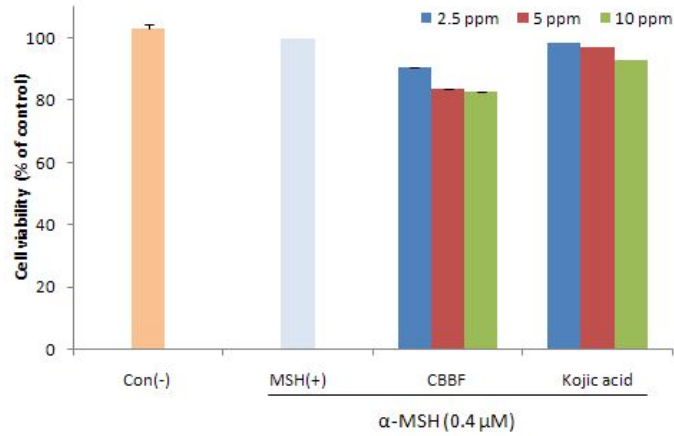


Fig. 2-22. Effect of butanol fraction of the cultured fruitbody *Cordyceps bassiana* on the viability of B16F10 melanoma cells with α -MSH(0.4 μ M).

다. 결론

동충하초의 BuOH 분획(CBBF)은 mushroom tyrosinase의 발현을 농도 의존적으로 억제하였고 MTT assay를 통하여 독성이 없음을 확인하였다. 따라서 앞으로 melanoma cell을 야용한 연구를 더 진행할 예정이며 본 시료는 미백작용의 활성을 가지고 있는 천연자원으로 개발할 수 있는 물질이라 사료된다.

제 3절. 제2 협동과제 연구개발수행 내용 및 결과

1. 동충하초의 *in vivo* 아토피성 피부염 억제 효능 및 예비임상 연구

가. 연구개발 목표

본 협동과제의 제1차년도 연구개발 목표는 아토피 피부염의 유발 원인에 따른 동충하초 추출분획의 항 아토피 효능을 *in vivo* 연구를 통하여 규명하는 것이다. 연구개발의 내용은 첫째 노랑다발 동충하초의 CBBF 분획이 피부염 유발원에 따른 효능의 차이를 *in vivo* 실험을 통하여 관찰하는 것이며 둘째 CBBF로부터 유효물질을 더욱 정제하여 그 효능을 *in vivo* 실험을 통하여 관찰하는 것이다.

본 연구에서는 아토피 유발원에 따른 CBBF의 효능을 비교하기 위하여 화학적 유발물질인 DNFB와 생물학적 유발물질인 mite antigen을 각각 사용하여 아토피 피부염을 유발하였다. 유효 물질을 더욱 정제하기 위하여 CBBF로부터 에탄올 비용해 성분을 얻어 연구에 사용하였다.

나. 연구개발 내용

(1) 유발물질에 따른 CBBF-Ep의 항아토피 효과

- 재료 및 방법

① CBBF-Ep 제조: 본 실험에서는 (주)머쉬텍에서 재배된 노랑다발 동충하초를 건조한 후 초미분(<70 μm)하여 시료로 사용하였다. 시료 1 kg을 10 l의 에탄올과 혼합하고 4시간 동안 가열 추출한 다음 추출액을 감압농축하였다. 에탄올 추출물을 2 l의 증류수에 녹인 후 동량의 hexane과 혼합한 다음 hexane 층을 분리 제거하였다. 나머지 용액을 동량의 n-butanol과 혼합한 다음 butanol 층을 분리하고 감압농축한 후 동결건조하여 butanol 분획(CBBF)을 얻었다.

CBBF가 아토피 피부염을 억제하는 효과를 지니고 있음이 본 연구진에 의해 이미 밝혀졌으므로 본 연구에서는 아토피 피부염에 대한 유효성분을 더욱 정제하여 사용하고자 하였다. CBBF를 중량의 5배에 해당하는 에탄올에 용해하고 30분간 방치한 다음 원심침전 (10,000 rpm, 30 min)하여 비용해성분(CBBF-Ep)을 얻어 실험에 사용하였다.

② DNFB로 유발한 아토피 피부염에 대한 CBBF-Ep의 효과 관찰: NC/Nga 마우스의 등 부위를 깨끗하게 제모하고 피부의 미세 상처가 치유되도록 24시간 방치하였다. 0.2% 1 fluoro 2,4 dinitrobenzene (DNFB) 용액 (acetone : olive oil = 3 : 1) 150 μl 을 제모한 부위에 주당 2회씩 3주간 도포하여 피부염을 유발하였다. CBBF-Ep는 2.0%의 농도로 olive 로션에 혼합하여 DNFB를 도포하기 시작한 날로부터 매일 2회씩 3주간 환부에 도포하고 DNFB 도포가 끝난 후 1주간 더

도포하였다. olive 로션은 총량의 10%에 해당하는 olive 기름을 olive wax로 유화하여 사용하였다.

③ mite antigen을 이용한 아토피 피부염 유발 및 이에 대한 CBBF-Ep의 효과 관찰: mite antigen으로는 Yamaguchi 등의 방법에 따라 *Dermatophagoides farinae*에서 추출한 것을 사용하였다. NC/Nga 마우스의 제모된 부위에 4%의 sodium dodecyl sulfate (SDS) 수용액을 150 μ l 분무하고 3시간이 지난 후 mite antigen 100 mg을 주당 2회씩 3주간 도포하여 피부염을 유발하였다. CBBF-Ep는 2.0%의 농도로 olive 로션에 혼합하여 피부염 유발 후 매일 2회씩 1주간 환부에 도포하였다.

- 실험 결과

① DNFB를 이용한 아토피 피부염에 대한 CBBF-Ep의 효과: NC/Nga mice에서 DNFB로 유발한 피부염에 대한 CBBF-Ep의 효과를 Fig.3-1과 Plate 1에 제시한다. 피부염 지표가 CBBF-Ep를 도포하지 않은 대조군에서는 DNFB 처리가 끝난 1주일 후에도 동일한 상태를 유지하였으나 CBBF-Ep를 도포하면 DNFB 처리가 끝난 때뿐만 아니라 대조군에 비하여 서도 낮아졌다. 한편 혈청 IgE 농도가 (Figure 3-2) CBBF-Ep를 도포하지 않은 대조군에서는 DNFB 처리가 끝난 때에 비하여 1주일 후에 더욱 상승하였으나 CBBF-Ep를 도포하면 DNFB 처리가 끝난 때뿐만 아니라 대조군에 비하여 서도 낮아졌다. 따라서 CBBF-Ep는 NC/Nga mice에서 DNFB로 유발한 아토피 피부염을 억제하는 것으로 판단된다.

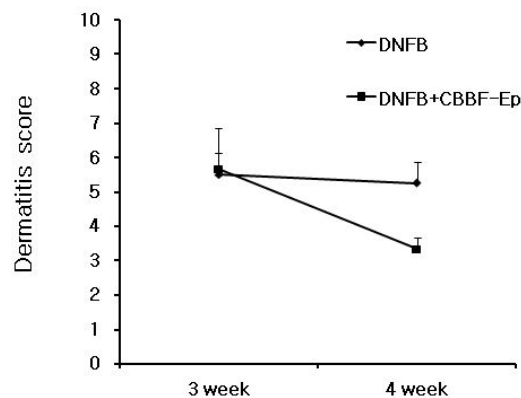


Fig.3-1 Changes of the DNFB-induced dermatitis score in response to CBBF-Ep in NC/Nga mice. The dermatitis score was reduced when CBBF-Ep was continually applied for 1 week (b) after cessation of DNFB.

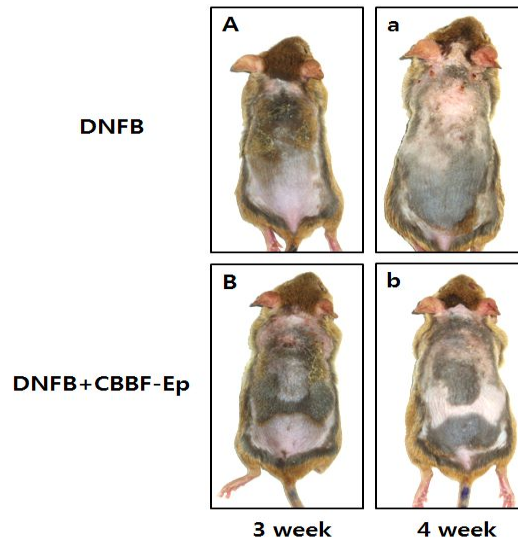


Plate.1 Change of the DNFB-induced skin lesion in NC/Nga mice. The skin lesion of a mouse (A) lasted 1 week after cessation of DNFB (a). The skin lesion of a mouse (B) got better when CBBF-Ep was continually applied for 1 week (b) after cessation of DNFB.

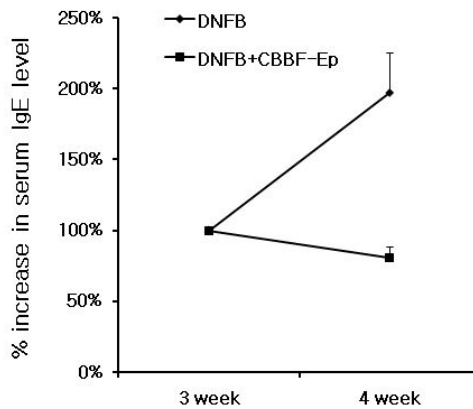


Fig.3-2 Changes of the serum IgE level in response to CBBF-Ep in NC/Nga mice in which atopic dermatitis was induced by DNFB. The serum IgE level was reduced when CBBF-Ep was continually applied for 1 week (b) after cessation of DNFB while the serum IgE level increased in the group without CBBF-Ep.

② mite antigen을 이용한 아토피 피부염에 대한 CBBF-Ep의 효과: mite antigen을 주당 2회씩 3주간 도포하여 피부염을 유발하고 CBBF-Ep를 도포하여 얻은 결과를 Figure 3-3, Plate 2에 제시한다. DNFB로 유발 한 경우와는 달리, 피부염지표가 mite antigen 도포를 중단한 후에도 시간이 지날수록 더욱 나빠졌으며 피부염지표가 CBBF-Ep에 의해 영향을 전혀 받지 않았다. 또한 mite antigen으로 유발한 피부염이 corticosteroid 계열의 약물에 의해서도 영향을 받지 않았다. mite antigen으로 유발한 피부염이 steroid 물질에 의해서도 억제되지 않은 것으로 보아 mite antigen으로 유발한 피부염은 아토피 피부염을 연구하기 위한 model로 적합하지 않은 것으로 판단된다.

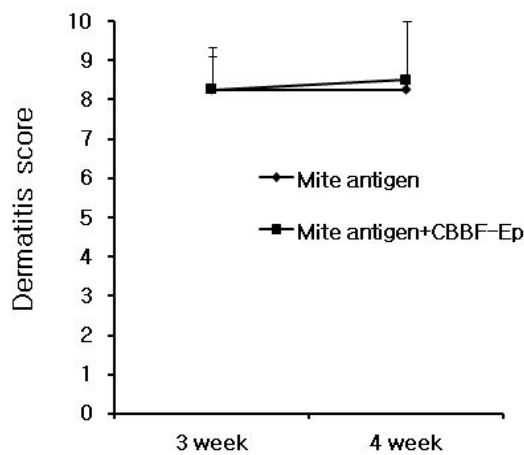


Fig.3-3 Changes of the mite antigen-induced dermatitis score in response to CBBF-Ep in NC/Nga mice. The dermatitis score was reduced by CBBF-Ep.

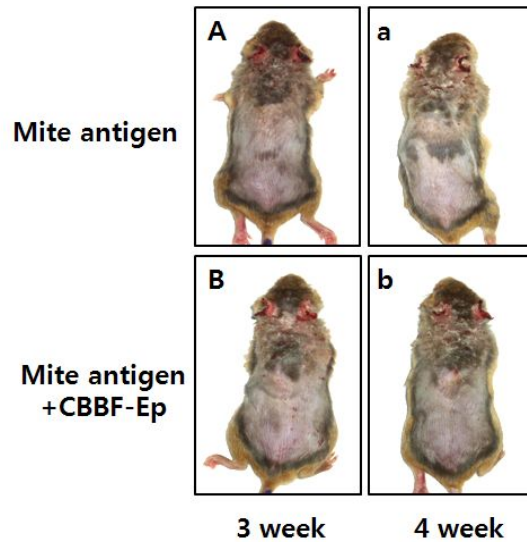


Plate.2 Change of the mite antigen-induced skin lesion in response to CBBF-Ep in NC/Nga mice. The skin lesion of a mouse (A) was without change at 1 week after cessation of mite antigen (a). The skin lesion of a mouse (B) did not get better even though CBBF-Ep was continually applied for 1 week (b) after cessation of mite antigen.

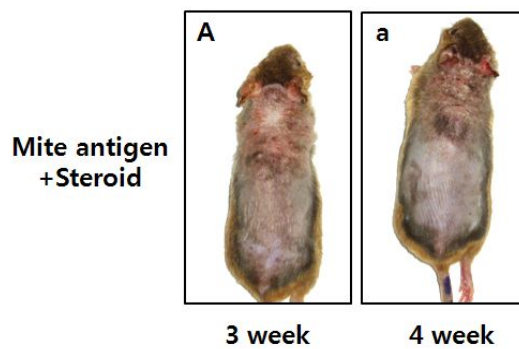


Plate.3 Effects of corticosteroid on the mite antigen-induced skin lesion in NC/Nga mice. The skin lesion of a mouse (A) did not get better even though corticosteroid was continually applied for 1 week (b) after cessation of mite antigen.

(2) CBBF-Ep의 항염 효과

- 재료 및 방법

① 염증 유발: 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate(TPA)를 acetone에 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 용해하여 염증유발물질로 사용하였다. 생후 7주된 Balb/c mice의 우측 귀에 TPA를 매일 1회씩 3일간 도포하여 염증을 유발하였다. 염증의 정도를 판정하기 위해 귀의 두께를 측정하였으며 귀 조직을 hematoxylin-eosin으로 염색하고 관찰하였다.

② CBBF-Ep의 효과 관찰: CBBF-Ep를 olive 로션에 2.5%의 농도로 혼합하여 사용하였다. 로션을 3일간 매일 2회씩 TPA를 바른 후 1시간과 10시간에 TPA로 염증을 유발한 부위에 도포하였다.

- 실험 결과

① 귀 두께의 변화: 염증이 유발된 mouse의 귀 두께를 Fig.3-4에 제시한다. 귀 두께가 vehicle인 acetone을 처리한 군에서 0.25 ± 0.01 mm이었으며 TPA를 처리한 군에서 0.57 ± 0.02 mm로 vehicle 처리군에 비하여 두터워졌다. 그러나 TPA와 함께 CBBF-Ep를 처리하면 귀 두께는 0.43 ± 0.03 mm이어서 TPA만을 처리한 군의 값에 비하여 유의하게($P < 0.05$) 낮았다. 따라서 CBBF-Ep는 TPA로 유발한 염증을 억제하는 결과를 얻었다.

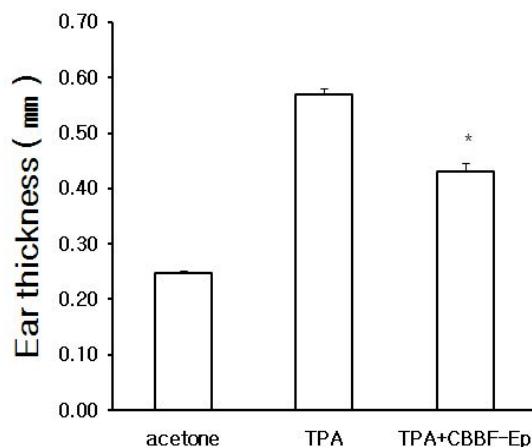


Fig.3-4 Effects of CBBF-Ep on TPA-induced ear edema in Balb/c mice in which inflammation was induced by TPA. Acetone: treated with acetone only, TPA: treated with TPA in acetone, CBBF-Ep: treated with TPA + 2.5% CBBF-Ep in acetone. CBBF-Ep significantly ($P < 0.05$) reduced the TPA-induced ear edema.

② 염증부위의 광학현미경 소견: 염증이 유발된 귀의 현미경 사진을 Plate. 4에 제시한다. TPA를 처리하면 귀의 표피층이 두꺼워지고 진피층에 부종이 발생하며 귀의 두께가 두꺼워졌다. CBBF-Ep를 처리하면 진피층의 부종이 감소하며 귀의 두께가 얇아졌다.

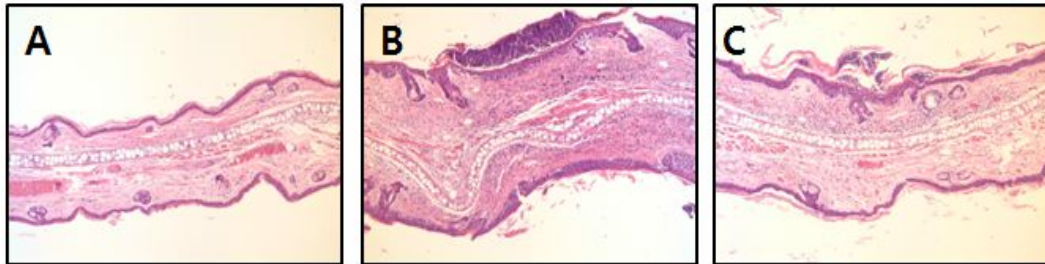


Plate. 4 Histological changes of the ear in response to CBBF-Ep in Balb/c mice in which inflammation was induced by TPA. The ear tissue was stained with hematoxylin-eosin. A: treated with acetone only, B: treated with TPA in acetone, C: treated with TPA + CBBF-Ep in acetone. TPA induces edema in the dermis the ear and increases epidermal thickness as well. The TPA-induced edema in the dermis is reduced by CBBF-Ep.

2. 동충하초 추출분획의 항아토피 효능에 관한 *in vivo* 연구: 제품화에 따른 효능 차이 연구

가. 연구개발 목표

본 협동과제의 제2차년도 연구개발 목표는 가용 제제용매조건에 따른 동충하초 추출분획의 항 아토피 효능을 *in vivo* 연구를 통하여 규명하는 것이다. 연구개발의 내용은 첫째 추출 조건에 따른 효능의 차이를 *in vivo* 실험을 통하여 관찰하는 것이며 둘째 유발기간에 따른 효능의 차이를 *in vivo* 실험을 통하여 관찰하는 것이다.

나. 실험방법

(1) 유효물질 추출조건 변경

노랑다발 동충하초 butanol 분획(CBBF)이 아토피성 피부염을 억제하는 효과를 지니고 있음이 본 연구진에 의해 이미 밝혀졌다. 그러므로 본 연구에서는 유효성분의 수익률을 높이기 위해 추출 조건을 다음과 같이 개선하였다. 본 실험에서 사용한 노랑다발 동충하초는 (주) 머쉬텍에서 재배된 자실체를 사용하였다.

시료 중량의 10배에 해당하는 증류수를 시료와 혼합하고 105 °C에서 3시간 동안 가열 추출한 다음 추출액을 50 °C에서 감압 농축하여 물 추출물(CBW)을 얻었다. 농

축된 CBW에 2 배 용량의 냉(-20 ℃) 에탄올을 혼합하고 냉장사애에서 12시간 방치하였다. 에탄올 혼합물을 원심분리(10,000 rpm, 4 ℃, 20 min)하여 상청액과 침전물을 따로 얻었다. 상청액을 감압농축한 후 동결건조하여 CBW-Es를 얻었으며, 침전물을 증류수에 용해한 후 동결건조하여 CBW-Ep를 얻었다.

(2) 피부염 유발기간의 변경

DNFB로 4주간 중증도 피부염 유발 후 동충하초의 추출 분획물이 포함된 로션을 도포하여 아토피 치료효과를 본 연구진에 의해 이미 밝혀졌으나 연구기간이 길며 피부염이 과다하게 유발되는 등의 어려움이 있었다. 그러므로 본 연구에서는 아토피 피부염의 유발기간을 단축시키면서 아토피 피부염에 대한 동충하초 추출물의 효능을 비교하였다.

아토피 피부염의 model 동물인 NC/Nga mouse (수컷, 6주령)를 SLC(Shizuoka, Japan)로부터 공급받았다. 실험동물을 새로운 환경에 1주간 적응 시킨 후 실험에 사용하였다. 사육실은 온도와 습도가 각각 20 ± 2 ℃와 55 ± 5 %로 유지되도록 하였으며 12시간 간격으로 명암을 바꾸었다. 적응기간이 지나면 마우스의 등 부위를 깨끗하게 제모하고 피부의 미세 상처가 치유되도록 24시간 방치하였다.

아토피 피부염은 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB)를 0.2 %의 농도로 acetone-olive 용액 (acetone : olive oil = 3 : 1)에 용해하고 그 용액 150 μ l를 제모한 부위에 도포하였다. 유발기간은 3일에 1회씩 3회로 단축하여 주당 2회씩 3주간 유발한 결과와 비교하였다.

(3) 아토피 피부염에 대한 CBW-Es, CBW-Ep의 처치

정상군에서는 제모만 실시하였다. DNFB군에서는 제모한 부위에 DNFB를 도포하면서 로션기제를 발랐으며, DNFB+CBW-Es군과 DNFB+CBW-Ep군에서는 DNFB를 도포하면서 노랑다발 동충하초 추출물인 CBW-Es, CBW-Ep를 20 mg/g씩 함유하는 로션을 각각 발랐다. 로션은 매일 2회씩 2주간 환부에 도포하였다.

(4) 피부염지수(dermatitis score) 측정

노랑다발 동충하초 각 추출 분획물의 도포가 종료되면 환부를 관찰하고 홍반, 출혈, 가피 등 육안적 변화를 1 - 10의 단계로 평가하여 피부염지수로 삼았다.

(5) 표피두께 및 비만세포 수 산출

실험이 끝나면 채혈 후 실험동물로부터 환부 중앙부의 피부조직을 0.5 cm x 1 cm의 크기로 채취하여 IHC zinc fixative formalin-free(BD Pharmingen, USA)용액에 고정하였다. 조직을 paraffin 포매한 뒤 4 μ m의 연속절편을 얻어 poly-L-lysine으로 코팅된 슬라이드에 부착시켰다. 탈파라핀(deparaffination)과 수화과정(hydration)을 거친 뒤 hematoxylin-eosin, 또는 toluidine blue법으로 염색하였다. 광학현미경을 이용하여 100, 200배로 확대하고 5 시야를 선택하여 표피층 두께 및 비만세포 수를 산출하였다.

(6) 혈청 IgE 농도 측정

실험동물을 마취시킨 다음 심장에서 채혈하고 원심분리하여 혈청을 얻어 냉동보관하였다. 혈청에서 IgE 농도는 mouse IgE ELISA kit(Shibayagi, Japan)를 이용해 흡광도 450 nm에서 microplate reader(Biotek, VT, USA)로 측정하였다.

다. 실험결과

(1) 추출 조건에 따른 각 분획의 수익률

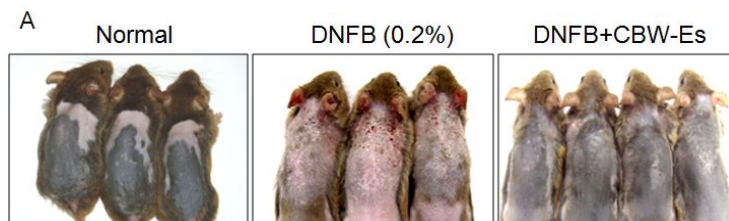
노랑다발 동충하초 자실체에서 추출 조건을 개선하여 얻은 수익률을 표 1에 표시한다. CBW-Es의 수익률은 25.12%로 가장 높았으며 CBBF의 수익률이 9.55%로 가장 낮았다. 따라서 추출조건을 달리하여 유효물질의 수익률을 2.5배 이상 증가시켰다.

표 1. 추출조건에 따른 각 분획의 수익률

	중량(g)	수익률(%)
노랑다발 동충하초 자실체	500	
CBW-Es	125.6	25.12
CBW-Ep	53.13	10.63
CBBF	47.75	9.55

(2) 유발기간에 따른 CBW-Es이 아토피 피부염에 미치는 효과

0.2 % DNFB를 3일에 1회씩 3회 처리하여 아토피 피부염을 유발하면서 노랑다발 동충하초 추출물인 CBW-Es 로션을 환부에 14일간 도포하고 얻은 결과는 다음과 같다. 일반적으로 유발기간을 단축함에 따라 아토피 지표는 감소하였으며 CBW-Es에 의해 유발된 아토피성 피부염이 크게 개성되었다.



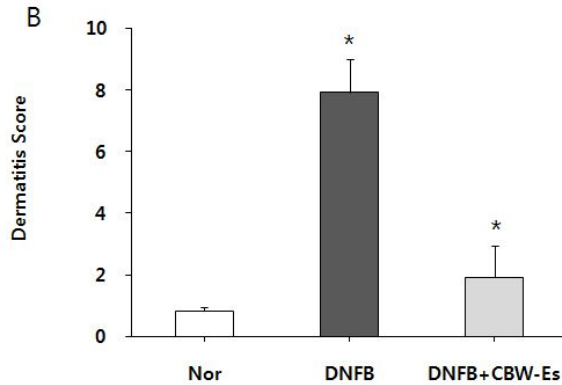


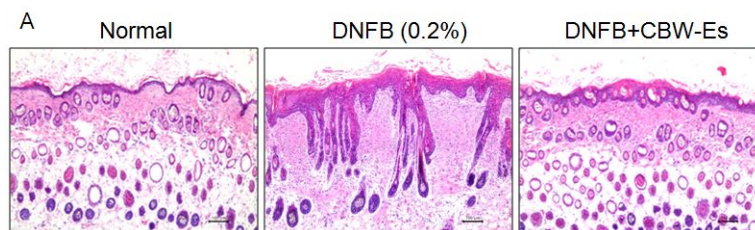
Fig 3-5 Effects of CBW-Es on the clinical sign of the skin lesion in DNFB-treated NC/Nga mice. (A) Photos of the skin lesion. (B) Mean dermatitis scores of the skin lesion. Data represent mean \pm S.E. of 6 mice. *: indicates statistical significance ($P < 0.05$) compared to the DNFB group. Nor: normal control.

(3) CBW-Es 처리 후 환부의 육안적 변화

아토피 피부염이 유발된 환부의 임상적 소견을 Fig. 3-5에 제시한다. Mouse 등 부위의 홍반, 귀 조직 손상 등 아토피 피부염의 임상적 소견이 아토피군에서 정상군에 비해 더욱 심해졌다. 이러한 증상은 CBW-Es 로션을 도포하면 호전되었다(Fig. 3-1A). 피부의 홍반, 출혈, 가피 등 육안적 변화를 평가한 피부염지수(Fig. 3-1B)가 아토피군(7.92 ± 1.11)에서 정상군(0.83 ± 0.11)에 비해 유의하게 증가하였다($P < 0.05$). 이러한 피부염지표는 CBW-Es 로션을 도포하면 1.92 ± 1.04 로 아토피군에 비해 유의하게 감소하였다($P < 0.05$).

(4) CBW-Es 처리 후 환부의 조직학적 변화

아토피 피부염이 유발된 환부의 조직학적 변화를 Fig. 3-6에 제시한다. 아토피군에서는 정상군에 비해 표피층이 두꺼워졌고 표피 돌기가 진피 속으로 깊이 침투하였으며 염증성 세포의 침윤이 증가하였으며 이러한 변화는 CBW-Es 로션을 도포하면 개선되었다(Fig. 3-2A). 표피층 두께 (epidermal thickness)가 아토피군($116.99 \pm 6.93 \mu\text{m}$)에서 정상군($34.55 \pm 2.66 \mu\text{m}$)에 비해 유의하게($P < 0.05$) 증가하였다(Fig 3-2B). 표피층 두께는 CBW-Es 로션을 도포하면 $52.07 \pm 10.86 \mu\text{m}$ 로 아토피군에 비해 유의하게 감소하였다($P < 0.05$).



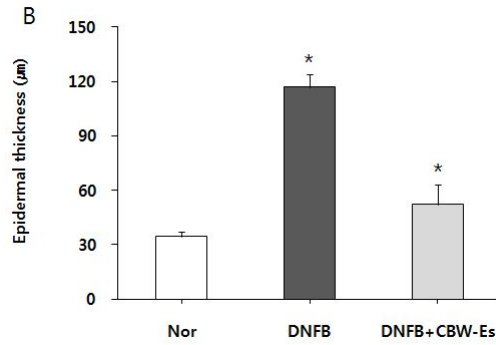


Fig. 3-6 Effects of CBW-Es on pathological changes of the skin lesion in DNFB-treated NC/Nga mice. (A) Histology of the skin tissue. Hematoxylin-eosin staining. Original magnification $\times 100$, Scale bar = 100 μm . (B) Mean epidermal thickness of the skin lesion. Data represent mean \pm S.E. of 6 mice. *: indicates statistical significance ($P < 0.05$) compared to the DNFB group. Nor: normal control.

(5) CBW-Es 처리 후 혈청 IgE 농도의 변화

아토피 피부염이 유발된 mouse에서 혈청 IgE 농도의 변화를 Fig. 3-7에 제시한다. 혈청 IgE 농도가 아토피군(3803.77 ± 509.71 ng/ml)에서 정상군(501.67 ± 133.15 ng/ml)에 비해 유의하게 증가하였다 ($P < 0.05$). 혈청 IgE 농도는 CBW-Es 로션을 도포하면 1483.23 ± 253.34 ng/ml 로 아토피군에 비해 유의하게 감소하였다 ($P < 0.05$).

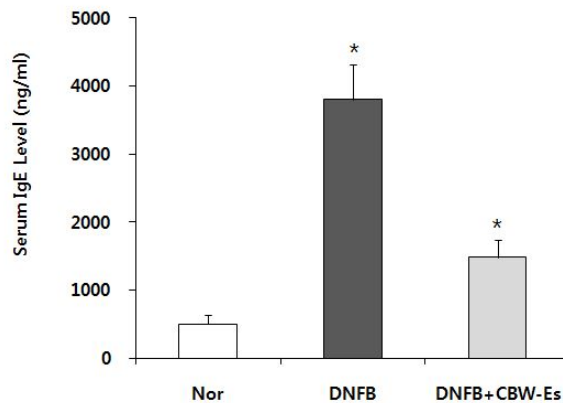


Fig. 3-7 Effects of CBW-Es on serum IgE level in DNFB-treated NC/Nga mice. The serum IgE concentration was measured by ELISA. Data represent mean \pm S.E. of 6 mice. *: indicates statistical significance ($P < 0.05$) compared to the DNFB group. Nor: normal control.

(6) CBW-Es 처리 후 피부 조직 비만세포 수의 변화

아토피 피부염이 유발된 환부의 피부조직을 toluidine blue으로 염색한 결과를 Fig. 3-8에 제시한다. 피부조직 내의 비만세포 수가 아토피군 31.56 ± 1.95 에서 정상군 4.89 ± 0.51 에 비해 유의하게 증가하였다($P < 0.05$). 비만세포 수는 CBW-Es 로션을 도포하면 23.69 ± 1.97 로 아토피군에 비해 유의하게 감소하였다($P < 0.05$).

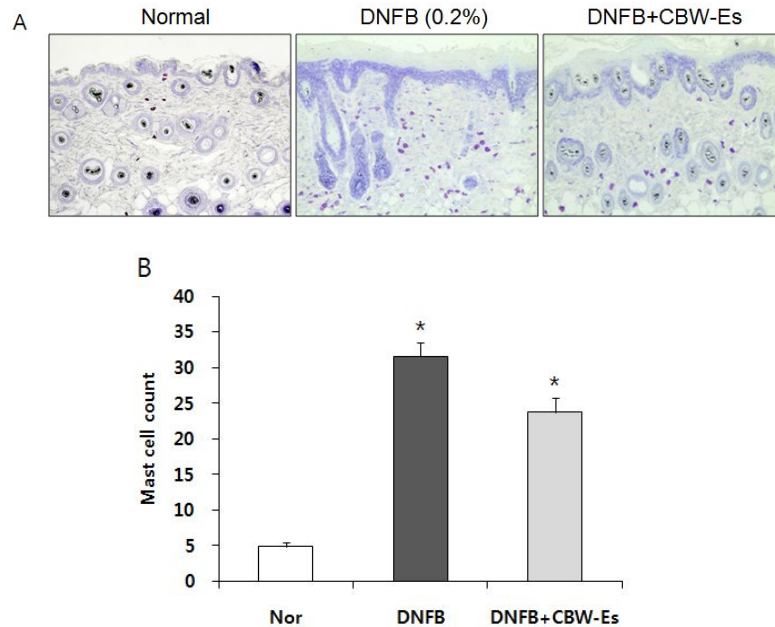


Fig. 3-8 Effects of CBW-Es on mast cell infiltration in the skin of DNFB-treated NC/Nga mice. (A) Photos of the skin tissue. Toluidine blue staining. Original magnification $\times 100$. Scale bar = 100 μm . (B) The number of infiltrated mast cells in tissue sections of the skin lesion. Mast cells were counted in 5 sites chosen randomly. Data represent mean \pm S.E. of 6 mice. *: indicates statistical significance($P < 0.05$) compared to the DNFB group. Nor: normal control.

(7) 아토피 피부염에 대한 CBW-Ep의 효과

0.2 % DNFB를 3일에 1회씩 3회 처리하여 아토피 피부염을 유발하면서 노랑다발 동충하초 추출물인 CBW-Ep 로션을 환부에 14일간 도포하고 다음과 같은 결과를 Fig. 3-9에 제시한다. CBW-Ep 로션은 DNFB로 유발한 아토피 피부염의 임상증상에 아무런 영향을 미치지 않았다.

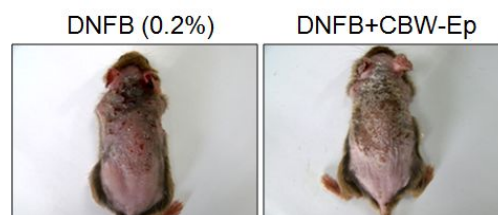


Fig. 3-9 Effects of CBW-Ep on the skin lesion of atopic dermatitis in DNFB-treated NC/Nga mice. Clinical sings were not modified by CBW-Ep lotion.

3. 항아토피 제품의 예비임상평가

가. 연구목표

본 협동과제의 연구개발 목표는 첫째 노랑다발 동충하초에서 새로이 개선된 방법에 의해 추출된 아토피성 피부염 억제물질의 효능을 실험동물을 이용한 *in vivo* 연구를 통하여 규명하고, 둘째 간이 임상시험을 통하여 아토피성 피부염 환자를 통한 간이임상시험에서 그 치료효능을 검증하여, 셋째 최종적으로 아토피성 피부염을 위한 상품의 시제품을 제조하는 것이다.

나. 아토피성 피부염 억제물질 추출방법의 개선

건조된 노랑다발 동충하초 자실체를 (주) 머쉬텍에서 제공받아 시료로 사용하였으며 새로 시도한 공정을 Fig. 3-10에 제시한다. 즉, 시료를 중량의 10배에 해당하는 증류수와 혼합하고 105 °C에서 3시간 동안 가열하여 추출하고 여과한 다음 추출액을 55 °C에서 감압 농축하였다. 물 추출물에 2배 중량의 미리 냉동시킨 (-20 °C) 에탄올을 혼합한 다음 -20 °C에서 하룻밤 동안 침전시켰다. 혼합물을 원심분리하여 침전물은 제거하고 상청액을 50 °C에서 감압 농축한 후 동결건조하여 갈색의 분말 (CBWE)을 얻었다. CBWE의 수익률은 24.7 ± 0.4 %이었다.

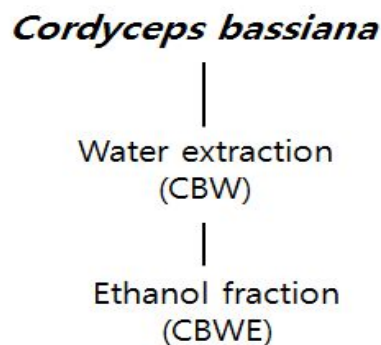


Fig. 3-10. Advanced procedure for extraction and fractionation of active material from *Cordyceps bassiana*.

노랑다발 동충하초의 부탄올 분획물인 CBBF를 얻기 위해서는 에탄올 추출, 여과, 감압농축, 헥산 분획, 부탄올 분획, 감압농축, 동결건조 등 7개 단계를 거치고 3일이 소요되며 헥산과 부탄올 등 인체에 유해한 유기용매가 사용된다. 이러한 과정을 거쳐 추출한 CBBF의 수율이 4.8 %에 지나지 않기 때문에 산업화의 가능성이 매우

낮은 것으로 판단되어 새로운 추출을 시도하였다. 노랑다발 동충하초의 에탄올 분획인 CBWE를 얻기 위해서는 물 추출, 여과, 감압농축, 에탄올 분획, 원심분리, 감압농축, 동결건조 등 7개의 단계를 거치나 2일이 소요되며 단지 에탄올을 사용할 뿐 인체에 유해한 유기용매를 사용하지 않는 등 많은 개선이 있었다. 그리고 CBWE의 수율은 24.7 %로 CBBF 추출 수율에 비해 5배 이상 향상되었다.

다. 실험동물에서 아토피성 피부염에 대한 동충하초 추출물의 효과

(1) 실험동물에서 아토피성 피부염의 유발 및 처치

앞의 연구에서 이용한 방법을 다소 변경하여 아토피성 피부염을 유발하였다. NC/Nga mice(수컷, 6주령)의 제모한 부위에 0.2 % DNFB 150 μ l를 3일에 1회씩 3회 도포하였다. 정상 대조군에서는 제모만 실시하였으며, 실험군에서는 제모한 부위에 DNFB로 아토피성 피부염을 유발하면서 첫날부터 CBWE를 20 mg/ml의 농도로 크림에 혼합하여 매일 2회씩 14일간 환부에 도포하였으며, 아토피 대조군에서는 CBWE가 포함되지 않은 크림 기제만을 환부에 도포하였다(Fig. 3-11).

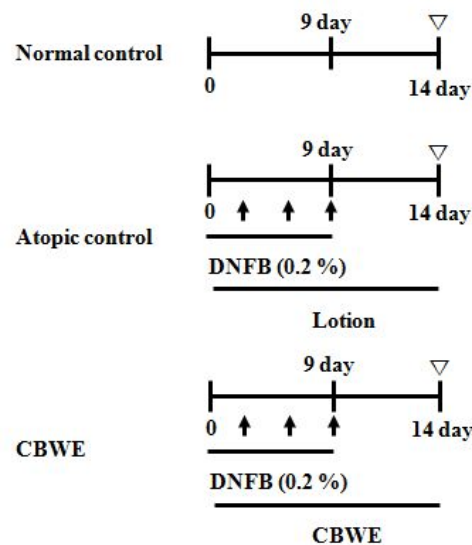


Fig. 3-11. The protocol for induction and treatment of atopic dermatitis in animal model. Atopic dermatitis were induced by application of 0.2 % DNFB 3 times with interval of 3 days. CBWE was pasted on the skin lesion 2 times a day from the beginning until the end of the experiment for 14 days.

(2) 노랑다발 동충하초 추출물에 의한 환부의 육안적 변화

실험이 종료되면 실험동물을 마취시키고 환부를 육안으로 관찰하고 홍반, 출혈, 가피 등의 변화를 1~10의 단계로 나누어 3인이 각각 평가하여 피부염 지수

(dermatitis score)로 삼았다. 아토피성 피부염 환부에 CBWE를 도포한 후 환부의 육안적 변화를 Fig. 3-12에 제시한다. 피부염 지수가 아토피 대조군(AC: 7.92 ± 1.11)에서 정상 대조군(NC: 0.83 ± 0.11)에 비해 유의하게($p < 0.01$) 증가하였다. 이러한 피부염 지수의 증가는 CBWE를 20 mg/ml의 농도로 도포하면 1.92 ± 1.04 로 아토피 대조군에 비해 유의하게($p < 0.01$) 감소하였다.

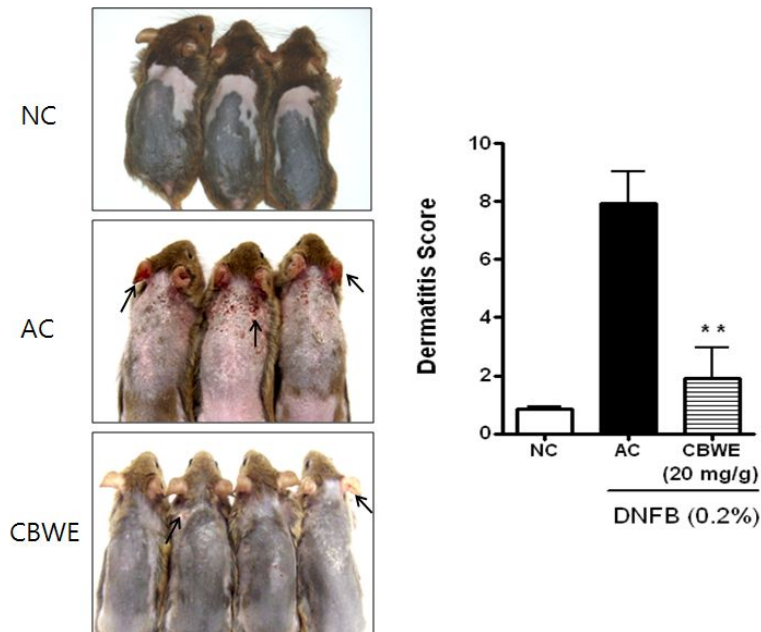


Fig. 3-12. Effects of CBWE on the clinical signs of atopic dermatitis in NC/Nga mice. Atopic dermatitis was induced by repeated application of 0.2 % DNFB on the dorsal skin every 3 days for 3 times. Cream containing CBWE at a concentration of 20 mg/ml was topically applied on the skin lesion twice a day for 14 days from the beginning to the end of the experiment. Dermatitis scores (right) is illustrated as mean \pm S.E. of 6 mice. **: indicates statistical significance ($p < 0.01$) compared to that of the AC group. NC: normal control group, AC: atopy control group, CBWE: DNFB+CBWE group.

(3) 노랑다발 동충하초 추출물E에 의한 환부의 조직학적 변화

환부의 육안적 관찰이 끝나면 심장에서 채혈한 후 실험동물로부터 환부 중앙부의 피부조직을 0.5 cm x 1 cm의 크기로 채취하여 formalin-free zinc fixative (BD Pharmingen, CA, USA) 용액으로 고정하였다. 조직을 paraffin으로 포매한 뒤 4 μ m의 두께의 연속절편을 만들고 각 절편을 poly-L-lysine으로 코팅된 슬라이드에 부착시켰다. 이어서 파라핀 제거와 수화과정을 거친 뒤 hematoxylin-eosin으로 염색하고 광학현미경을 이용하여 100배로 확대하고 5 시야를 선택하여 표피층 두께를 측정하였다. 아토피성 피부염 환부에 CBWE를 도포한 후 병리학적 변화를 Fig.

3-13에 제시한다. 표피층 두께가 아토피 대조군(AC: $116.99 \pm 6.93 \mu\text{m}$)에서 정상 대조군(NC: $34.55 \pm 2.66 \mu\text{m}$)에 비해 유의하게($p < 0.01$) 증가하였다. 이러한 표피층 두께의 증가는 CBWE를 20 mg/ml의 농도로 도포하면 $52.07 \pm 10.86 \mu\text{m}$ 로 아토피 대조군에 비해 측정치가 유의하게($p < 0.01$) 감소하였다.

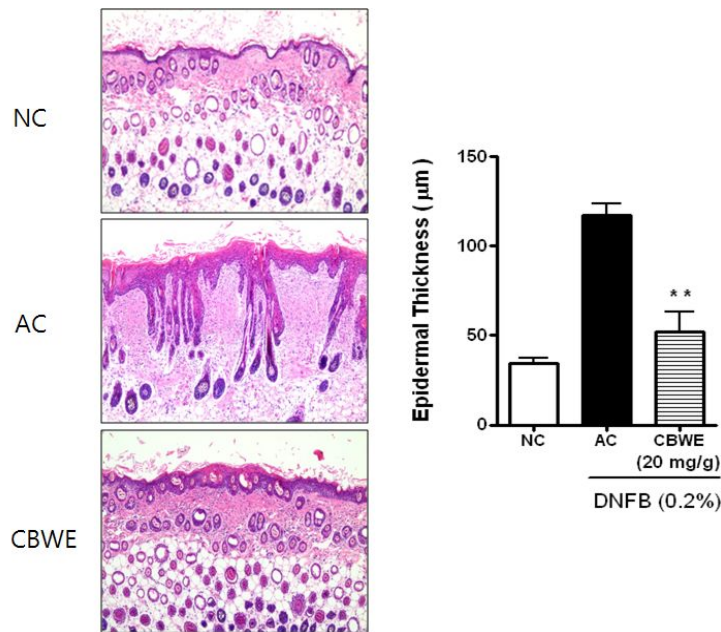


Fig. 3-13. Effects of CBWE on the pathological signs of atopic dermatitis in NC/Nga mice. Atopic dermatitis was induced by repeated application of 0.2 % DNFB on the dorsal skin every 3 days for 3 times. Cream containing CBWE at a concentration of 20 mg/ml was topically applied on the skin lesion twice a day for 14 days from the beginning to the end of the experiment. Tissue sections of the lesion were stained with hematoxylin-eosin. Original magnification $\times 100$, Epidermal thickness (right) is illustrated as mean \pm S.E. of 6 mice. **: indicates statistical significance ($p < 0.01$) compared to that of the AC group. NC: normal control group, AC: atopy control group, CBWE: DNFB+CBWE group.

(4) 노랑다발 동충하초 추출물에 의한 환부의 비만세포 침윤의 변화

환부 중앙부의 피부조직을 0.5 cm x 1 cm의 크기로 채취하여 formalin-free zinc fixative (BD Pharmingen, CA, USA) 용액에 고정하였다. 조직을 paraffin으로 포매한 뒤 4 μm 의 두께의 연속절편을 만들고 절편을 poly-L-lysine으로 코팅된 슬라이드에 부착시켰다. 이어서 파라핀 제거와 수화과정을 거친 뒤 toluidine blue로 염색하였다. 광학현미경을 이용하여 200배로 확대하고 5 시야를 선택하여 비만세포의 수를 산출하였다. 아토피성 피부염 환부에 CBWE를 도포한 환부 조직 내 비만세포의 침윤 상태를 Fig. 3-14에 제시한다. 비만세포 수가 아토피 대조군(AC: $31.56 \pm$

1.95)에서 정상 대조군(NC: 4.89 ± 0.51)에 비해 유의하게($p < 0.01$) 증가하였다. 이러한 비만세포 수의 증가가 CBWE를 20 mg/ml의 농도로 도포하면 23.69 ± 1.97 로 아토피 대조군에 비해 유의하게($p < 0.01$) 감소하였다.

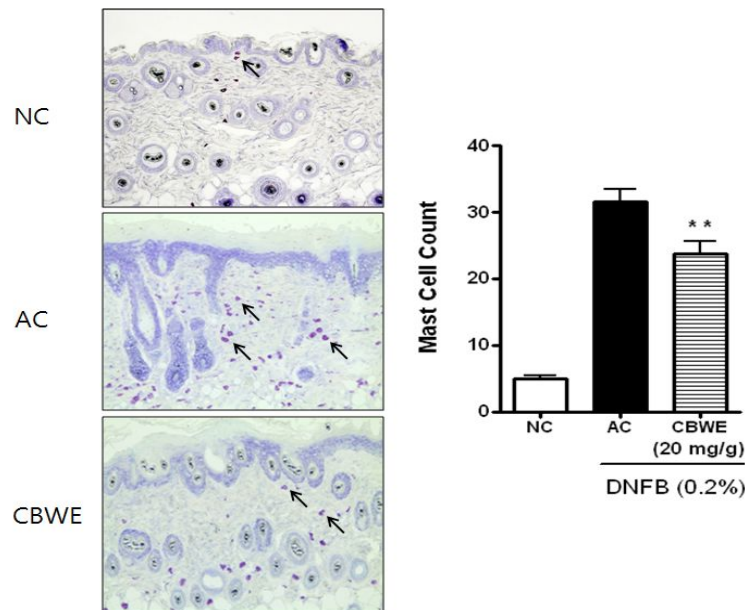


Fig. 3-14. Effects of CBWE on infiltration of mast cells in the dermis of the skin in NC/Nga mice with atopic dermatitis. Atopic dermatitis was induced by repeated application of 0.2 % DNFB on the dorsal skin every 3 days for 3 times. Cream containing CBWE at a concentration of 20 mg/ml was topically applied on the skin lesion twice a day for 14 days from the beginning to the end of the experiment. Tissue sections of the lesion were stained with toluidine blue. Original magnification $\times 100$, Mast cell count (right) is illustrated as mean \pm S.E. of 6 mice. **: indicates statistical significance ($p < 0.01$) compared to that of the AC group. NC: normal control group, AC: atopy control group, CBWE: DNFB+CBWE group.

(5) 노랑다발 동충하초 추출물에 의한 혈청 IgE 농도의 변화

실험동물을 마취시킨 다음 심장에서 채혈하고 원심분리하여 혈청을 얻어 냉동보관하였다. 혈청에서 IgE 농도는 mouse IgE ELISA kit (Shibayagi, Japan)를 이용해 흡광도 450 nm에서 microplate reader (Biotek, VT, USA)로 측정하였다. 아토피성 피부염 환부에 CBWE를 도포한 후 혈청 IgE 농도의 변화를 Fig. 3-15에 제시한다. 혈청 IgE 농도가 아토피 대조군(AC: $3.80 \pm 0.51 \mu\text{g/ml}$)에서 정상 대조군(NC: $0.50 \pm 0.13 \mu\text{g/ml}$)에 비해 유의하게($p < 0.01$) 상승하였다. 이러한 혈청 IgE 농도의 상승은 CBWE를 20 mg/ml의 농도로 도포하면 $1.48 \pm 0.25 \mu\text{g/ml}$ 로 아토피 대조군에

비해 유의하게($p < 0.01$) 감소하였다.

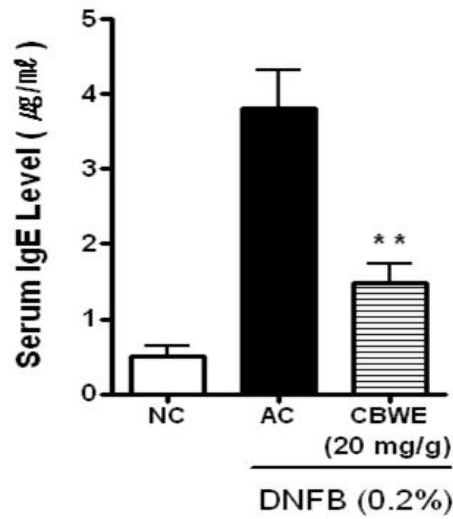


Fig. 3-15. Effects of CBWE on the serum level of IgE in NC/Nga mice with atopic dermatitis. Atopic dermatitis was induced by repeated application of 0.2 % DNFB on the dorsal skin every 3 days for 3 times. Cream containing CBWE at a concentration of 20 mg/ml was topically applied on the skin lesion twice a day for 14 days from the beginning to the end of the experiment. The serum IgE level was measured by ELISA. Data represent mean \pm S.E. of 6 mice. **: indicates statistical significance ($p < 0.01$) compared to the AC group. NC: normal control group, AC: atopy control group, CBWE: DNFB+CBWE group.

라. 인체에서 아토피성 피부염에 대한 노랑다발 동충하초 추출물의 간이임상시험

CBWE가 실험동물에서 아토피성 피부염을 억제하였으므로 CBWE가 환자에서 아토피성 피부염에 미치는 효과를 관찰하였다. 아토피성 피부염을 앓고 있는 환자에서 CBWE를 20 mg/ml 함유하는 크림을 환부에 매일 2회씩 도포한 결과를 Fig. 3-16에 제시한다. 크림 도포 7일 후부터 아토피성 피부염이 억제효과가 나타나기 시작하였다. 지원자 10명 중 4명에서는 아주 만족스러운 억제효과가 관찰되었으며 3명에서는 만족스럽지는 않으나 다소의 억제효과가 관찰 되었고 3명에서는 개선효과가 관찰되지 않았다.

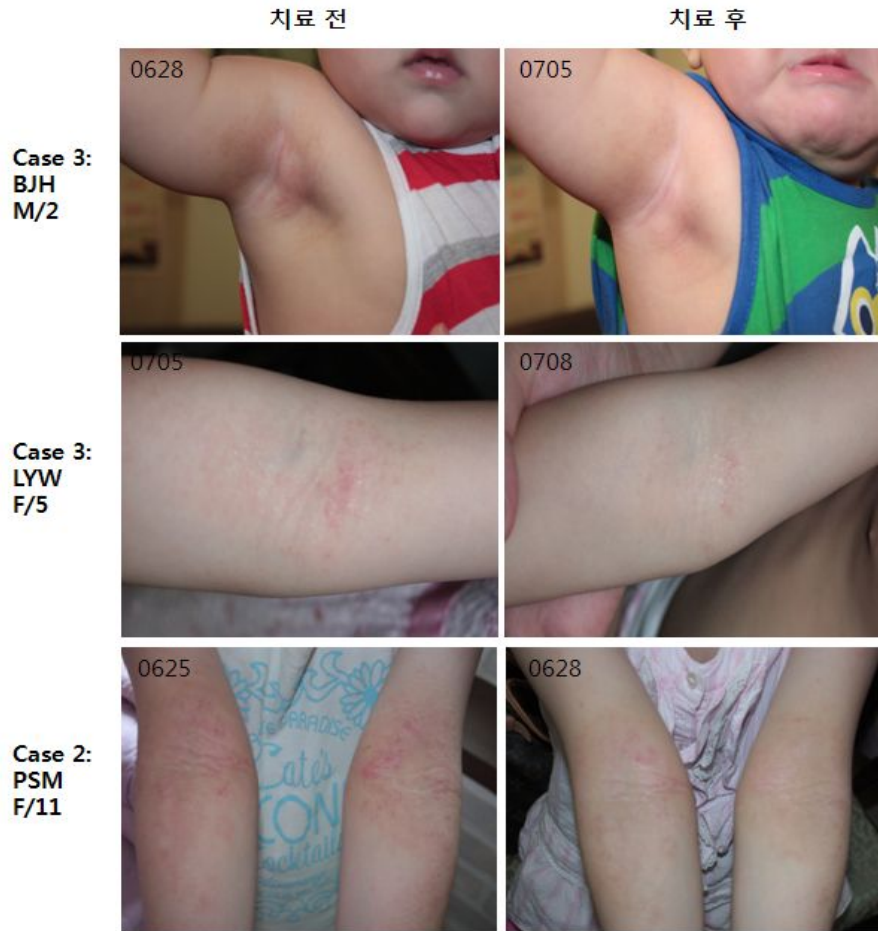


Fig. 3-16. Effects of CBWE on the clinical signs of atopic dermatitis in patients. Cream containing CBWE at a concentration of 20 mg/ml was topically applied on the skin lesion twice a day for 14 days. The numerals in the photos illustrate month/day.

마. 아토피성 피부염 개선을 위한 외용제의 개발

노랑다발 동충하초 추출물의 항 아토피성 효과가 실험동물을 이용한 예비임상실험과 환자를 대상으로 실시한 간이 임상실험에서 입증되었으므로 노랑다발 동충하초 추출물을 함유하고 있는 보습제를 개발하여 OEM 방식으로 시제품을 제작하였다 (Fig. 3-17).



Figure 3-17. A deep moisturizing cream for dry, pruritic and sensitive skin containing extract of *Cordyceps bassiana*

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1절. 1차년도 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2008 -2009)	In vitro 항아토피 (Th1/Th2)시험	-사이토카인 분비능 정량평가	100%	CBBF와 CBEE에 의한 IFN- γ 와 IL-4 분비 억제 효능을 평가한 결과, IFN- γ 의 경우 서로 다른 stimuli에서도 모두 억제하였으며 IL-4의 경우 CBBF는 ConA 조건에서 그리고 CBEE는 LPS 조건에서 IL-4 분비를 억제하였다.
		-염증매개물질 분비능 정량평가	100%	CBBF와 CBEE에 의한 염증매개물질인 NO 분비 억제 효능을 평가한 결과, CBBF는 세포 생존률에 비해 효과적으로 NO를 억제하였다.
		-adhesion molecule 활성능 정량평가	100%	CBBF와 CBEE에 의한 세포-세포간의 응집능을 확인한 결과, CBBF는 CD29에 의한 세포간의 응집을 억제하였으며, CBEE는 CD43에 의한 세포간의 응집을 2시간에서 억제하였다.
		-신호전달단백질 활성조절능 정량평가	100%	CBBF와 CBEE에 의한 MAPK 신호전달 단백질의 인산화 수준을 확인한 결과, CBBF는 ERK1 인산화 수준을 15분에서 억제하였으며 CBEE는 p38의 인산화 수준을 5분에서 억제하였다.
			-Transcription factor 활성능 평가	100%
	원료 특성시험 및 추출공정 개선 연구	-원료 특성(성상/물성/화학적 특성)시험	100%	노랑다발동충하초를 HPLC로 분석하여 포함됨 당 (sugar)의 pattern을 비교하였을 때, ethyl acetate 분획물 및 buthanol 분획물의 peak는 retention time이 느린 non-polar한 peak들이 나타나는 것을 알수 있었다. 노랑다발동충하초는 일반적으로 물

			<p>(water)로 추출하여 사용하므로 4, 100도에서의 추출물 및 water fraction과의 HPLC pattern을 비교하였다. 그 결과, 커다란 차이는 보이지 않았으며, water fraction에서는 0-10분까지의 polar 성분이 보이지를 않았다.</p> <p>노랑다발 동충하초의 total lipid를 Gas Chromatography를 이용하여 지방산 분석을 하였다. 그 결과, 노랑다발 동충하초는 특이적으로 80%의 높은 불포화 지방산 (unsaturated fatty acid)을 함유하고 있다.</p>
	-원료제조공정 및 방법 관련 연구자료작성	100%	<p>노랑다발동충하초의 aqueous layer를 각각, hexane, Ethyl acetate, butanol, 및 water로 분획을 하여, hexane, Ethyl acetate, butanol, 및 water fraction을 얻었다. 노랑다발동충하초의 수율 (yield)을 계산하여 보면, 360g의 노랑다발동충하초를 사용하여 ethanol추출을 하여 66.1g (19%의 수율)을 얻었다. 66.1g의 ethanol 추출물에서 water fraction (63.4%), hexane fraction (22%), butanol (7.3%), and ethyl acetate fraction (7.3%)을 얻었다.</p>
	-원료안전성 시험 (독성)	100%	<p>노랑다발동충하초의 BuOH 분획에 대한 안전성 평가의 일환으로 식품의약품안전청 독성시험기준에 근거하여 마우스를 이용한 급성 경구독성시험을 실시하였다. 그 결과 독성학적 이상변화 및 치사한 개체가 관찰되지 않았으므로 10000 mg/kg의 용량에서도 독성 발현이 없는 안전한 물질임을 확인하였다.</p>
	-원료 성분들의 제제용해성 증가연구	100%	<p>동충하초의 부탄올 분획의 가용성 성분은 불용성 분획보다 낮은 용해도를 보였지만 tween80에서는 가장 높은 용해도를 보임. 불용성 분획은 대체로 다양한 매질에서 보다 우수한 용해성을 보임. 이는 시험에 사용된 매질의 성질이 유용성에 가까워 불용성 성분의 용해에</p>

동충하초의 in vivo 아토피성 피부염 억제 효능 및 예비 임상 연구	-유발원에 따른 in vivo 효능차이 연구	100%	적합했기 때문으로 생각됨. DNFB를 이용한 아토피 피부염에서는 대조군에 비해 CBBF-E를 처리한 NC/Nga mice의 아토피 피부염이 억제되었다. 그러나 mite antigen으로 유발한 피부염에서는 CBBF-E에 의해 억제되지 피부염이 억제되지 않았으며, 대조군인 steroid 물질에서도 억제하지 않는 것으로 보아 아토피 피부염을 연구에 부적합한 모델로 판단되었다.
	-추출용매조건에 따른 in vivo 효능차이 연구	100%	TPA를 acetone에 용해하여 쥐의 귀에 염증을 유도하고 olive oil에 혼합한 CBBF-E를 처리한 결과 쥐의 귀 두께가 낮아진 것을 확인하였으며, 광학 현미경에 의한 관찰에서도 진피층의 부종이 감소한 것을 확인하였다.

제 2절. 2차년도 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차년도 (2009-2010)	in vitro 항아토피 (APC/mast cells) 시험	-사이토카인 분비능 (IL-12/IL-3) 정량평가	100%	노랑다발 동충하초 추출물인 CBEE와 CBBF 모두 IL-12의 mRNA 레벨을 억제하였다.
		-염증매개물질 (히스타민) 분비능 정량평가	100%	히스타민 분비에 관여하는 TNF- α , PGE2, NO의 분비를 확인한 결과, CBBF는 TNF- α 를 모든 농도에서 약하게 억제하였으며, NC는 농도 의존적으로 억제하였다. 반면에 PGE2는 농도 의존적으로 증가시켰다.
		-adhesion molecule 활성능 정량평가	100%	CBEE와 CBBF는 Fibronectin에 의한 점착능에는 크게 영향을 주지 않았다.
		-신호전달단백질 활성조절능 정량평가	100%	CBEE의 경우, p38 억제제가 IL-12의 발현을 억제시키는 것으로 보아 p38을 통해 IL-12를 조절하는 것으로 생각되어진다. CBBF의 경우 JAK2의 인산화를 조절함으로써 STAT-3에 의한 IFN- γ 의 생성을 조절하는 것으로

				보여진다.
		-Transcription factor 활성능 평가	100%	CBEE의 경우 p65와 c-jun의 핵내 이동을 억제하였으며, CBBE는 STAT-1과 c-fos의 핵 내 이동을 억제하는 것으로 나타났다.
기능성 성분분리 및 분석법 정립 (구조분석)		- 항아토피 성분의 추출분리 및 구조분석	100%	노랑다발 동충하초 3,000g을 100% Ethanol로 추출하여 533.7g(17.8% yield)을 얻었고 냉각시켜 얻은 흰 침전물은 39.16g(1.31% yield), 분홍색 결정물은 99.86g(3.33% yield)을 얻었다 Major Extract를 다시 Hexane, Butanol, EA 유기용매를 사용하여 분획을 한 결과 hexane에선 87.34g(2.91%), Butanol은 72.48g(13.9%), EA 1.18g(0.04%), 그리고 나머지 H ₂ O에서는 336.9g(11.22%)를 얻었다.
		-신규 효능성분의 안전성 시험	100%	노랑다발 동충하초 시료는 ICR 마우스에 대한 급성독성시험 결과, 독성학적 이상변화 및 치사한 개체가 관찰되지 않았으므로 1000 mg/kg의 용량에서도 독성 발현이 없는 안전한 물질로 사료된다.
		- 원료제제화	100%	- 아토피치료기전에 적합한 동충하초 외용제의 제제조성 수립 - 동충하초 함유 크림제의 제조공정 수립
		-원료(효능성분) 구조분석 및 합성법 연구	100%	불소를 함유하는 Cordycepin 유도체 6종 합성
		-효능성분 분석법 확립	100%	동충하초의 BuOH 분획 (CBBE)은 mushroom tyrosinase의 발현을 농도 의존적으로 억제하였고 MTT assay를 통하여 독성이 없음을 확인하였다.
동충하초 추출분획의 항 아토피 효능에 관한 in vivo 연구: 제품화에 따른 효능 차이 연구		-가용 제제용매조건에 따른 in vivo 효능차이 연구	100%	아토피군에서는 정상군에 비해 표피층이 두꺼워졌고 표피 돌기가 진피 속으로 깊이 침투하였으며 염증성 세포의 침윤이 증가하였으며 이러한 변화는 CBW-Es 로션을 도포하면 개선되었다
		-제품화에 따른 in vivo 효능차이 연구	100%	0.2 % DNFB를 3일에 1회씩 3회 처리하여 아토피 피부염을 유발하면서 노랑다발 동충하초 추출물인 CBW-Ep 로션을 환부에 1달간 도

				포였다. 그 결과 CBW-Ep 로션은 DNFB로 유발한 아토피 피부염의 임상증상에 아무런 영향을 미치지 않았다.
--	--	--	--	--

제 3절. 3차년도 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
3차 년도 (2010 -2011)	In vitro 항 아토피 기전 (분자표적단 백질)연구	- 신호전달단백질 활성조절능 정량평가	100%	SNP에 의한 NO생성을 조절하지 않는 것을 확인함으로써 TLR4 매개의 NO 생성을 조절한다는 것을 확인하였다. 하지만, TLR4 발현을 직접적으로 조절하지 않는 것으로 나타났다.
		- Transcription factor 활성능 평가	100%	Adaptor molecule인 MyD88과 TRIF에 의한 NF-kappaB luciferase 프로모터 활성을 확인한 결과, CBBF의 25 mg/ml 농도가 TRIF에 의한 NF-kappaB luciferase 프로모터 활성을 약간 억제한 것을 제외하고는 조절 효과가 없었다. 이러한 억제 정도도 그 효과가 미미하여 효과가 없다고 판단하였다. 따라서, 동충하초 추출물은 adaptor molecule인 MyD88과 TRIF를 타겟으로 하지 않는다는 것을 확인하였다.
		- kinase assay 평가	100%	염증반응 신호전달 기전 중, 상위 신호전달 단백질로 알려진 Src와 Syk은 인산화에 의해 kinase activity를 갖는 것으로 알려져 있다. 따라서, 동충하초 추출물에 의한 인산화 수준의 조절 정도를 조사한 결과, CBEE의 경우 Src 음 CBBF의 경우 Src 과 Syk 의 kinase activity를 억제한다는 것을 확인하였다.
	유해물질 분석 및 시험방법 정립	-아토피 제제의 유효성분의 효 능 시험	100%	노랑다발동충하초 추출물 및 분획물의 항염 실험을 진행하였으며, Hexane 분획물의 IC50은 0.88mg/ml 였으며, Buthanol 분획물의 IC50은 0.34mg/ml를 보였으며, Ethyl acetate 분획물의 IC50은 0.6mg/ml를 보였다. 정제분리된 분획물의 항암 및 항염 실험을 진행하였으며, Cloroform의 함량이 100% 와 90%에서 가장 좋은 항암 및 항염 결과를 얻었다. 차 분리한 분획물을 2차 Silica

			chromatography 이용하여 재분리하였고, 이를 이용하여 항암 및 항염 특성을 확인하였다. 그 결과 100-1, 100-2, 100-3, 100-4, 90-1, 90-2, 20, 0에서 항암 효능을 보였으며, 90-4 및 90-5에서 항염 효능을 보였다. 노랑다발 동충하초의 Beauvericin의 항염, 세포독성 그리고 항암 효능을 평가한 결과, Beauvericin은 세포독성이 강하여 항염제로 사용할 수 없고 항암 효능이 있음을 알 수 있었다.
	-아토피 제제의 유효성분의 구조분석	100%	Buthanol 분획물(CBBF)를 silica chromatography를 이용하여 정제 분리하였다. 2차 활성 분획을 합친 후 HPLC 및 LC-MASS로 분석한 결과, 노랑다발 동충하초인 <i>Cordyceps bassiana</i> 에 Beauvericin 이 함유되어있다는 것을 확인하였다.
항 아토피 제품의 예비임상평가	- 예비 임상 시험	100%	병의원을 통하여 아토피성 피부염 환자를 대상으로 본 제제의 효능을 시험한 결과, 아토피 피부염을 억제하는 것으로 나타났다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1절. 연구성과

1. 연구개발결과의 성과 및 활용목표 대비 실적

가. 연구성과 목표

(단위 : 건수)

구분		특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타
		출원	등록	품종명칭 등록	품종생산 수입 판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
						출원	등록				
1차년도	목표	2						2	2		
	달성	4						2	1		
2차년도	목표	2	2					4	3		
	달성							1			
3차년도	목표	2	2					4	3		
	달성		1					3			
4차년도	목표										
	달성										
5차년도	목표										
	달성										
계	목표	6	4					10	8		
	달성	4	1					6	1		

나. 연구성과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분		기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표						
	달성		1		2	1	

2. 논문게재 성과

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2009	배양 노랑다발동충하 초분획 부탄올분획의 급성경구독성	박은영	양기숙	박형진	생약학회지	40(3)	국내	비SCI

2009	Effects of Ranolazine on Norepinephrine-Induced Cell Death by Inhibition of the β -adrenoceptor Signal Pathway in Cardiomyocytes	황기철	황기철	김태웅	Tissue Engineering and Regenerative Medicine,	Vol. 6,	국외	SCI
2009. 12	Bioavailability enhancing activities of natural compounds from medicinal plants	Myung Joo Kang Jae Youl Cho	Jaehwi Lee	Byung Ho Shim, Duk Ki Kim	Journal of Medicinal Plants Research	Vol. 3(13), pp. 1204-1211	국외	SCI
2010. 03	Cordyceps pruinosa extracts induce apoptosis of HeLa cells by a caspase dependent pathway	김태웅		조재열, 박해일, 황기철	Journal of Ethnopharmacology	128(342-351)	국외	SCI
2011. 03	p38-Targeted inhibition of interleukin-12 expression by ethanol extract from Cordyceps bassiana in lipopolysaccharide-activated macrophages.	Se Eun Byeon	Jae Youl Cho	Tae-Woong Kim, Hyoung Jin Park	Immunopharmacology and immunotoxicology	33(1):90-6	국외	SCI

2011.01	Inhibition of cytokine expression by butanol extract from <i>Cordyceps bassiana</i>	Se Eun Byeon, Jae hwi Lee	Jae Youl Cho	Hyun-Jae J a n g , Tae-Woo ng Kim, Hyoung Jin Park	Pharmazie	66(1):58-62.	국외	SCI
2011.03	Inhibition of 2,4-dinitrofluoro benzene-induced atopic dermatitis by topical application of the butanol extract of <i>Cordyceps bassiana</i> in NC/Nga mice.	Wu G	Li L, Sung GH, Kim TW, Byeon SE, Cho JY, Park CW	Park HJ	Journal of Ethnopharmacology	134(2):504-9	국외	SCI

3. 특허 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2009,03,06	노랑다발 동충하초 부탄올 분획물을 함유하는 항염증 활성약학 조성물	김태웅	한국	10-2009-19407	2011.03.22	노랑다발 동충하초 아토피성 주증상을 완화하는 방법 및 그 포아토피 예방 또는 치료용 조성물	박형진	한국	10-2011-0025336

2009.05.12	항아토피 기능성 아이스크림 조성물	박형진, 김태웅, 성재모, 조재열	한국	10-2009-0 041355					
2009.05.12	항아토피 기능성 식품 조성물	박형진, 조재열, 성재모, 김태웅	한국	10-2009-0 041353					
2009.05.12	항아토피 기능성 화장료 조성물	박형진, 김태웅, 조재열, 성재모	한국	10-2009-0 041352					

4. 인력활용/양성 성과

가. 인력지원 성과

연차	지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
		박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
1차년도	14			1			1			1
2차년도	14	2	2	1		5				5
3차년도	14	1	1			2		1		1

나. 취업 현황

이름	성별	취업현황	학위
김병훈	남	제주대학교 아열대원예산업연구소, 연구원	박사
이용규	남	Post Doctor, University of illinois	박사
오광	남	한림대학교 박사후 과정	박사
김민호	남	(주)매일유업, 연구원	석사
유대성	남	(주)ACT, 연구원	석사

다. 산업기술인력 양성 성과

프로그램명	프로그램 내용	교육기관	교육 개최회수	총 교육시간	총 교육인원
현장실습	노랑다발동충하초의 재배 실습	(주)머쉬텍	2회	8시간	20명

5. 경제사회 파급효과

산업지원 성과 (단위 : 건)				고용창출 성과 (단위 : 명)		
기술지도	기술이전	기술평가	합계	창업	사업체 확장	합계
4			4			

제 2절. 연구개발결과의 활용방안(사업화 및 현장적용 계획 포함)

- 동충하초의 생리활성물질에 대한 향장품 가공처리 기술 개발에 따른 동충하초 관련 향장품 가공제품의 기능성 증대에 활용
- 향장품 관련업체에 기술을 이전하여 고품질/고기능성 향장가공제품 생산에 활용
- 가공시 제품 제작을 통한 고부가가치의 가공제품 개발 가능성을 제시하여 부작용이 적고 효과가 항알러지/항아토피 효과가 증대된 고기능성 향장품 개발 의욕 및 관련산업 활성화 유도
- 개발된 최적 항알러지성/항아토피성 향장품 연구 및 제품 생산공정 기술을 다양한 기능성 향장 가공제품 생산성 향상에 활용
- 동충하초의 신규 활성에 따른 특허등록 및 권리 확보에 활용
- 항아토피 성분을 차후 신약으로 개발 활용

1. 기대성과

가. 기술적 측면

- 항아토피 기능성 소재 탐색시 근원적인 병인을 치유할 수 있는 방법적인 면역학 연구모델을 완성해냄으로써 향후 국내 생약 및 약용식물을 이용한 다양한 소재개발 연구시 활용될 수 있음

- 고효능 고기능성 향아토피 생리활성물질 개발을 통한 기능성 향장제품의 다양화 및 산업화에 기여
- 최적 생산 및 분리정제 공정기술을 개발함으로써 동충하초가 가지는 고부가가치 생리활성물질 생산성을 향상시켜 산업화를 이루는데 크게 기여

나. 경제적·산업적 측면

- 동충하초의 부가가치 향상으로 수요 창출 및 기능성 가공제품의 다양화를 통하여 동충하초재배 관련 농가소득 증대에 크게 기여
- 동충하초를 이용한 향장품 산업화는 지역경제를 더욱 부흥시키며, 지역내 추가적인 고용효과 창출에 기여
- 향아토피 기능성을 강화시킨 고품질의 안전한 향장품 개발을 통해 고가의 외국산 아토피 관련 기능성 제품의 수입대체 효과를 이룸과 동시에 국내시장 뿐 아니라 국제시장에 수출할 수 있는 고급 기능성 향장품으로서의 경쟁력을 갖출 것으로 기대
- 생산 및 분리정제 공정 최적화 기술을 개발함으로써 가공시 소비되는 생산비용 절감에 따른 시장경쟁력 강화

다. 지역 농산업의 발전 측면

- (주)머쉬텍(공장)은 강원도 횡성군 청일면 고시리 오지 마을에 위치하고 있으므로 동충하초 수출 증대는 곧 지역농민들의 고용효과가 증대되어 이들 지역을 잘 살 수 있도록 기여함.
- 동충하초는 청정 지역에서 생산한 벼의 현미를 사용하여 재배하기 때문에, 본 사업의 성공은 횡성지역내 쌀소비를 증진하게 할 중요 방안이 될 수 있음. 이는 곧 FTA 대처 방법의 하나가 될 수 있음.
- 본 버섯가공수출 연구는 생 버섯 수출의 한계점을 극복하고 소비자의 욕구를 충족시키고 시장을 다변화하며, 공격적인 생산을 가능하게 하고 버섯산업의 적절한 발전에 기여함으로써 폭넓은 버섯의 수출증대를 꾀할 수 있음.
- 미세분말 분쇄기술은 식품가공의 원재료, 부재료 또는 첨가제로 사용범위를 확대할 수 있음. 과립기술은 다양한 제품을 개발하여 관련 산업과의 연계성을 높일 수 있으며, 분말멸균기술은 식품 산업 전체에 응용 가능한 기초기술을 확보할 수 있다.
- 국가 농산업의 발전 유도 :
 1. 본 사업의 성공은 현재 100만불정도를 수출하고 있는 실적이 수출성공 전략으로 사용될 성공모델이 됨.
 2. 농산물 수출의 증대를 통해 무역수지 개선에 기여함으로써 최근 발생되고 있는 외환위기를 극복하는데 기여.
 3. 동충하초 관련 분야의 수출성공은 관련업계의 일자리 창출을 유도함으로써, 어려운 경제 여건에서도 구직자들에게 구직의 기회라는 희망을 안겨주는데 기여.

2. 연구성과 활용계획

가. 제 1세부

- 1) 염증 반응에 관련된 효능 평가 시스템을 확립함으로써 보다 효율적으로 염증 억제 효능 평

- 가를 조금 더 효과적으로 진행할 수 있으며, 현재의 결과들을 대조군으로 사용 가능함.
- 2) 알러지/아토피 반응에 관련된 효능 평가 시스템을 확립함으로써 보다 효율적으로 염증 억제 효능 평가를 진행할 수 있으며, 현재의 결과들을 대조군으로 사용 가능함. 또한 In vitro에서의 평가 뿐만 아니라 In vivo에 대한 평가가 가능하므로 실용 가능성을 높을 수 있음.
 - 3) 동충하초 유래 성분의 염증 반응 및 알러지/아토피 억제 효과가 있음을 확인하였으며, 그 신호전달 기전을 밝힘으로써 차후 동충하초를 이용한 아토피/알러지 질환 치료제로써 쉬운 적용이 가능함.
 - 4) 동충하초 유래 성분의 스크리닝 및 항아토피 효능 검증법을 이용하여 제품 개발을 위한 연구가 가능해짐.

나. 제 2세부

- 1) 동충하초에서 유효성분을 찾아내고 추출함으로써 아토피/알러지 질환 뿐만 아니라 암 및 염증 등 다른 질병에 쉽게 적용이 가능함.
- 2) 유효성분의 독성 및 효능 평가법을 설립하여 다양한 유효성분에 대한 손쉬운 평가가 용이해 짐.
- 3) 유효성분의 용해도 증가 및 제제를 연구함으로써 제품 개발 시 적용 가능.

다. 협동과제

- 1) 마우스를 통한 항아토피 질환 동물모델을 설립함으로써 동충하초 외 다른 천연물 성분의 항아토피 연구 진행시 적용이 가능함.
- 2) 아토피 환자에게 직접 임상실험을 진행함으로써 제품으로써 적용이 용이해 짐.
- 3) 동충하초 추출물을 이용한 항아토피 치료/개선을 위한 시제품 생산 완료.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. The Extract of *Cordyceps sinensis* Inhibited Airway Inflammation by Blocking NF- κ B Activity. Chiou YL, Lin CY. *Inflammation*. 2011 Nov 9.
2. *Cordyceps militaris* extract suppresses dextran sodium sulfate-induced acute colitis in mice and production of inflammatory mediators from macrophages and mast cells. Han ES, Oh JY, Park HJ. *J Ethnopharmacol*. 2011 Apr 12;134(3):703-10. Epub 2011 Jan 26.
3. Anti-inflammation Effects of *Cordyceps sinensis* Mycelium in Focal Cerebral Ischemic Injury Rats. Liu Z, Li P, Zhao D, Tang H, Guo J. *Inflammation*. 2011 Dec;34(6):639-44.
4. Constituents isolated from *Cordyceps militaris* suppress enhanced inflammatory mediator's production and human cancer cell proliferation. Rao YK, Fang SH, Wu WS, Tzeng YM. *J Ethnopharmacol*. 2010 Sep 15;131(2):363-7. Epub 2010 Jul 13.
5. Role of Cordycepin and Adenosine on the Phenotypic Switch of Macrophages via Induced Anti-inflammatory Cytokines. Shin S, Moon S, Park Y, Kwon J, Lee S, Lee CK, Cho K, Ha NJ, Kim K. *Immune Netw*. 2009 Dec;9(6):255-64. Epub 2009 Dec 31.
6. Cordycepin Suppresses Expression of Diabetes Regulating Genes by Inhibition of Lipopolysaccharide-induced Inflammation in Macrophages. Shin S, Lee S, Kwon J, Moon S, Lee S, Lee CK, Cho K, Ha NJ, Kim K. *Immune Netw*. 2009 Jun;9(3):98-105. Epub 2009 Jun 30.
7. Effects of the immunomodulatory agent *Cordyceps militaris* on airway inflammation in a mouse asthma model. Hsu CH, Sun HL, Sheu JN, Ku MS, Hu CM, Chan Y, Lue KH. *Pediatr Neonatol*. 2008 Oct;49(5):171-8.
8. Immunoglobulin and cytokine production from mesenteric lymph node lymphocytes is regulated by extracts of *Cordyceps sinensis* in C57Bl/6N mice. Park DK, Choi WS, Park PJ, Kim EK, Jeong YJ, Choi SY, Yamada K, Kim JD, Lim BO. *J Med Food*. 2008 Dec;11(4):784-8.
9. Inhibitory effects of cordycepin (3'-deoxyadenosine), a component of *Cordyceps militaris*, on human platelet aggregation induced by thapsigargin. Cho HJ, Cho JY, Rhee MH, Kim HS, Lee HS, Park HJ. *J Microbiol Biotechnol*. 2007 Jul;17(7):1134-8.
10. Evaluation of the anti-inflammatory and anti-proliferation tumoral cells activities of *Antrodia camphorata*, *Cordyceps sinensis*, and *Cinnamomum osmophloeum* bark extracts. Rao YK, Fang SH, Tzeng YM. *J Ethnopharmacol*. 2007 Oct 8;114(1):78-85. Epub 2007 Aug 2.
11. Cordycepin (3'-deoxyadenosine) inhibits human platelet aggregation in a cyclic AMP- and cyclic GMP-dependent manner. Cho HJ, Cho JY, Rhee MH, Park HJ. *Eur J Pharmacol*. 2007 Mar 8;558(1-3):43-51. Epub 2006 Dec 12.
12. Cordycepin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation by the suppression of NF- κ B through Akt and p38 inhibition in RAW 264.7 macrophage cells.

Kim HG, Shrestha B, Lim SY, Yoon DH, Chang WC, Shin DJ, Han SK, Park SM, Park JH, Park HI, Sung JM, Jang Y, Chung N, Hwang KC, Kim TW. *Eur J Pharmacol.* 2006 Sep 18;545(2-3):192-9. Epub 2006 Jun 28.

13. Methanol extract of *Cordyceps pruinosa* inhibits in vitro and in vivo inflammatory mediators by suppressing NF- κ B activation. Kim KM, Kwon YG, Chung HT, Yun YG, Pae HO, Han JA, Ha KS, Kim TW, Kim YM. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2003 Jul 1;190(1):1-8.

14. Down-regulation of apoptotic and inflammatory genes by *Cordyceps sinensis* extract in rat kidney following ischemia/reperfusion. Shahed AR, Kim SI, Shoskes DA. *Transplant Proc.* 2001 Sep;33(6):2986-7.

15. Regulation of bronchoalveolar lavage fluids cell function by the immunomodulatory agents from *Cordyceps sinensis*. Kuo YC, Tsai WJ, Wang JY, Chang SC, Lin CY, Shiao MS. *Life Sci.* 2001 Jan 19;68(9):1067-82.

16. Effects of the mycelial extract of cultured *Cordyceps sinensis* on in vivo hepatic energy metabolism in the mouse. Manabe N, Sugimoto M, Azuma Y, Taketomo N, Yamashita A, Tsuboi H, Tsunoo A, Kinjo N, Nian-Lai H, Miyamoto H. *Jpn J Pharmacol.* 1996 Jan;70(1):85-8.

제 7 장 참고문헌

1. The Extract of *Cordyceps sinensis* Inhibited Airway Inflammation by Blocking NF- κ B Activity. Chiou YL, Lin CY. *Inflammation*. 2011 Nov 9.
2. *Cordyceps militaris* extract suppresses dextran sodium sulfate-induced acute colitis in mice and production of inflammatory mediators from macrophages and mast cells. Han ES, Oh JY, Park HJ. *J Ethnopharmacol*. 2011 Apr 12;134(3):703-10. Epub 2011 Jan 26.
3. Anti-inflammation Effects of *Cordyceps sinensis* Mycelium in Focal Cerebral Ischemic Injury Rats. Liu Z, Li P, Zhao D, Tang H, Guo J. *Inflammation*. 2011 Dec;34(6):639-44.
4. Constituents isolated from *Cordyceps militaris* suppress enhanced inflammatory mediator's production and human cancer cell proliferation. Rao YK, Fang SH, Wu WS, Tzeng YM. *J Ethnopharmacol*. 2010 Sep 15;131(2):363-7. Epub 2010 Jul 13.
5. Role of Cordycepin and Adenosine on the Phenotypic Switch of Macrophages via Induced Anti-inflammatory Cytokines. Shin S, Moon S, Park Y, Kwon J, Lee S, Lee CK, Cho K, Ha NJ, Kim K. *Immune Netw*. 2009 Dec;9(6):255-64. Epub 2009 Dec 31.
6. Cordycepin Suppresses Expression of Diabetes Regulating Genes by Inhibition of Lipopolysaccharide-induced Inflammation in Macrophages. Shin S, Lee S, Kwon J, Moon S, Lee S, Lee CK, Cho K, Ha NJ, Kim K. *Immune Netw*. 2009 Jun;9(3):98-105. Epub 2009 Jun 30.
7. Effects of the immunomodulatory agent *Cordyceps militaris* on airway inflammation in a mouse asthma model. Hsu CH, Sun HL, Sheu JN, Ku MS, Hu CM, Chan Y, Lue KH. *Pediatr Neonatol*. 2008 Oct;49(5):171-8.
8. Immunoglobulin and cytokine production from mesenteric lymph node lymphocytes is regulated by extracts of *Cordyceps sinensis* in C57Bl/6N mice. Park DK, Choi WS, Park PJ, Kim EK, Jeong YJ, Choi SY, Yamada K, Kim JD, Lim BO. *J Med Food*. 2008 Dec;11(4):784-8.
9. Inhibitory effects of cordycepin (3'-deoxyadenosine), a component of *Cordyceps militaris*, on human platelet aggregation induced by thapsigargin. Cho HJ, Cho JY, Rhee MH, Kim HS, Lee HS, Park HJ. *J Microbiol Biotechnol*. 2007 Jul;17(7):1134-8.
10. Evaluation of the anti-inflammatory and anti-proliferation tumoral cells activities of *Antrodia camphorata*, *Cordyceps sinensis*, and *Cinnamomum osmophloeum* bark extracts. Rao YK, Fang SH, Tzeng YM. *J Ethnopharmacol*. 2007 Oct 8;114(1):78-85. Epub 2007 Aug 2.
11. Cordycepin (3'-deoxyadenosine) inhibits human platelet aggregation in a cyclic AMP- and cyclic GMP-dependent manner. Cho HJ, Cho JY, Rhee MH, Park HJ. *Eur J Pharmacol*. 2007 Mar 8;558(1-3):43-51. Epub 2006 Dec 12.
12. Cordycepin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation by the suppression of NF- κ B through Akt and p38 inhibition in RAW 264.7 macrophage cells.

Kim HG, Shrestha B, Lim SY, Yoon DH, Chang WC, Shin DJ, Han SK, Park SM, Park JH, Park HI, Sung JM, Jang Y, Chung N, Hwang KC, Kim TW. *Eur J Pharmacol*. 2006 Sep 18;545(2-3):192-9. Epub 2006 Jun 28.

13. Methanol extract of *Cordyceps pruinosa* inhibits in vitro and in vivo inflammatory mediators by suppressing NF- κ B activation. Kim KM, Kwon YG, Chung HT, Yun YG, Pae HO, Han JA, Ha KS, Kim TW, Kim YM. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2003 Jul 1;190(1):1-8.

14. Down-regulation of apoptotic and inflammatory genes by *Cordyceps sinensis* extract in rat kidney following ischemia/reperfusion. Shahed AR, Kim SI, Shoskes DA. *Transplant Proc*. 2001 Sep;33(6):2986-7.

15. Regulation of bronchoalveolar lavage fluids cell function by the immunomodulatory agents from *Cordyceps sinensis*. Kuo YC, Tsai WJ, Wang JY, Chang SC, Lin CY, Shiao MS. *Life Sci*. 2001 Jan 19;68(9):1067-82.

16. Effects of the mycelial extract of cultured *Cordyceps sinensis* on in vivo hepatic energy metabolism in the mouse. Manabe N, Sugimoto M, Azuma Y, Taketomo N, Yamashita A, Tsuboi H, Tsunoo A, Kinjo N, Nian-Lai H, Miyamoto H. *Jpn J Pharmacol*. 1996 Jan;70(1):85-8.

17. Mite serine protease activates protease-activated receptor-2 and induces cytokine release in human keratinocytes. Kato T, Takai T, Fujimura T, Matsuoka H, Ogawa T, Murayama K, Ishii A, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H. *Allergy*. 2009 Sep;64(9):1366-74. Epub 2009 Mar 23.

18. Kallikrein 5 induces atopic dermatitis-like lesions through PAR2-mediated thymic stromal lymphopoietin expression in Netherton syndrome. Briot A, Deraison C, Lacroix M, Bonnart C, Robin A, Besson C, Dubus P, Hovnanian A. *J Exp Med*. 2009 May 11;206(5):1135-47. Epub 2009 May 4.

19. Atopic eczema: genetics or environment? Wüthrich B, Cozzio A, Roll A, Senti G, Kündig T, Schmid-Grendelmeier P. *Ann Agric Environ Med*. 2007 Dec;14(2):195-201. Review.

20. Upregulation of the release of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor from keratinocytes stimulated with cysteine protease activity of recombinant major mite allergens, Der f 1 and Der p 1. Ogawa T, Takai T, Kato T, Kikuchi Y, Niyonsaba F, Ikeda S, Okumura K, Ogawa H. *Int Arch Allergy Immunol*. 2008;146(1):27-35. Epub 2007 Dec 14.

21. Immunomodulatory effects of ultraviolet B irradiation on atopic dermatitis in NC/Nga mice. Mutou Y, Ibuki Y, Kojima S. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2007 Aug;23(4):135-44.

22. Serum chemokine profiles in patients with alopecia areata. Kuwano Y, Fujimoto M, Watanabe R, Ishiura N, Nakashima H, Ohno Y, Yano S, Yazawa N, Okochi H, Tamaki K.

Br J Dermatol. 2007 Sep;157(3):466-73. Epub 2007 May 8.

23. CCL23 expression is induced by IL-4 in a STAT6-dependent fashion. Novak H, Müller A, Harrer N, Günther C, Carballido JM, Woisetschläger M. *J Immunol.* 2007 Apr 1;178(7):4335-41.
 24. Wogonin suppresses TARC expression induced by mite antigen via heme oxygenase 1 in human keratinocytes. Suppressive effect of wogonin on mite antigen-induced TARC expression. Lee BS, Shim SM, Heo J, Pae HO, Seo BY, Han SY, Sohn DH, Jang SI, Chung HT. *J Dermatol Sci.* 2007 Apr;46(1):31-40. Epub 2007 Feb 20.
 25. Atopic myelitis: a clinical, biological, radiological and histopathological diagnosis. Gregoire SM, Mormont E, Laloux P, Godfraind C, Gilliard C. *J Neurol Sci.* 2006 Sep 25;247(2):231-5. Epub 2006 Jun 19.
 26. Fish oil supplementation in pregnancy modifies neonatal progenitors at birth in infants at risk of atopy. Denburg JA, Hatfield HM, Cyr MM, Hayes L, Holt PG, Sehmi R, Dunstan JA, Prescott SL. *Pediatr Res.* 2005 Feb;57(2):276-81. Epub 2004 Dec 7.
 27. Serum levels of cutaneous T-cell attracting chemokine (CTACK) as a laboratory marker of the severity of atopic dermatitis in children. Hon KL, Leung TF, Ma KC, Li AM, Wong Y, Fok TF. *Clin Exp Dermatol.* 2004 May;29(3):293-6.
 28. Tacrolimus ointment: a new therapy for atopic dermatitis--review of the literature. Pustisek N, Lipozencić J, Ljubojević S. *Acta Dermatovenerol Croat.* 2002 Mar;10(1):25-32. Review.
 29. Evaluation of dietary intake of vitamin E in the treatment of atopic dermatitis: a study of the clinical course and evaluation of the immunoglobulin E serum levels. Tsourelis-Nikita E, Hercogova J, Lotti T, Menchini G. *Int J Dermatol.* 2002 Mar;41(3):146-50.
 30. Heterogeneity within tissue-specific macrophage and dendritic cell populations during cutaneous inflammation in atopic dermatitis. Kiekens RC, Thepen T, Oosting AJ, Bihari IC, Van De Winkel JG, Bruijnzeel-Koomen CA, Knol EF. *Br J Dermatol.* 2001 Dec;145(6):957-65.
 31. Expression of Fc receptors for IgG during acute and chronic cutaneous inflammation in atopic dermatitis. Kiekens RC, Thepen T, Bihari IC, Knol EF, Van De Winkel JG, Bruijnzeel-Koomen CA. *Br J Dermatol.* 2000 Jun;142(6):1106-13.
 32. Reduced interferon-gamma but normal IL-4 and IL-5 release by peripheral blood mononuclear cells from Xhosa children with atopic asthma. Nurse B, Haus M, Puterman AS, Weinberg EG, Potter PC. *J Allergy Clin Immunol.* 1997 Nov;100(5):662-8.
-