

새로운 번데기 동충하초의 수집, 동정 및 간기능에 미치는 효과

이기원¹ · 남병혁¹ · 조월순¹ · 오수정¹ · 강은영¹ · 최영¹ · 이재윤³ · 천상철² · 정민호^{1*} · 이재동³

¹동아대학교 의과대학 연구원, 동아대학교병원 임상시험연구센터, ²생물산업연구원,
³부산대학교 자연과학대학 미생물학과

Collection, Identification and Hepatic Effect of Native *Cordyceps militaris*

Ki-Won Lee¹, Byung-Hyoun Nam¹, Wool-Soon Jo¹, Su-Jung Oh¹, Eun-Young Kang¹, Yong Cui¹,
Jae-Yun Lee³, Sang-Cheol Cheon², Min-Ho Jeong^{1*} and Jae-Dong Lee³

¹Dong-A University Medical Science Research Center, Clinical Research Center, Busan 602-714, Korea

²Institute for Bioindustry, Busan 608-737, Korea

³Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

(Received June 1, 2006)

ABSTRACT: Entomopathogenic fungus *Cordyceps militaris* is famous for its medicinal efficacies. It has been reported to have various pharmacological activities such as anti-tumour, insecticidal, antibacterial, immunomodulatory and antioxidant. In this study, we investigated the effect of the extract of *C. militaris* (MPUN8501), which was identified by the analysis of the nucleotide sequences of 5.8S ribosomal RNA, on the function of liver. *C. militaris* powder was extracted using hot water extracts method as time, volume and temperature and using method as differential polarity of organic solvent. Each fraction was tested for the improvement of hepatic enzyme alcohol dehydrogenase (ADH) and acetaldehyde dehydrogenase (ALDH) activity. The BuOH extracts (CME) had highest activity which was used for the test of toxicity and efficacy of *C. militaris*. The enhancing effect of CME on the activity of ADH and ALDH was much more than medicine, drink, natural tea etc. Thus CME promoted the resolution of alcohol and acetaldehyde in rats, inducing recovery to normal condition rapidly. Furthermore, oral administration of CME effectively protected the carbon tetrachloride-induced acute hepatic injury as revealed by the hematological parameters (levels of sGOT and sGPT) and histological observation. CME was ascertained to be safe by regulatory toxicity studies of single dose toxicity and genotoxicity. These results suggest that CME would be useful for the maintaining normal hepatic activity as a functional health food.

KEYWORDS: *Cordyceps militaris*, Extract, Hepatic injury, Liver function, Protection

동충하초는 겨울에는 곤충의 몸에 있다가 여름에 풀처럼 나타난다는 데서 유래한말이다. 감염된 곤충으로부터 대형의 신장된 형태의 직립된 병을 가진 유색의 자낭자좌를 형성하는 것에 의해 최초로 곤충에 감염하는 균류로서 인식되었다(Lee, 1998). 즉, 동충하초균은 곤충의 몸에 침입하여 죽게 한 다음 그 기주의 양분을 이용하여 겨울에 자실체를 형성하면서 자라나며, 숙주특이성을 가지고 있어 이것에 따라 이름을 명명하기도 한다. 예로부터 동충하초는 증류본초와 본초비요를 비롯한 중의학문헌에 보폐보신(補肺補腎), 지혈화담(止血化痰), 비정익기(秘精益氣) 등의 효능이 있으며(Jo, 1998), 맛은 달(甘)고 따뜻(溫)하며 향(香)이 있는 것으로 기록되어 있다(Bae and Keun, 1998).

동충하초는 분류학상으로 자낭균아문 핵균강 맥각균목 Clavicipitaceae과에 속하며, *Cordyceps*속으로 흔히 불린

다. *Cordyceps*속은 200균종 이상의 다수의 균종으로 구성되는 속으로 지중생의 균류 및 다양한 곤충류의 기생성을 나타낸다. 현재 우리나라에서는 70여종의 자생 동충하초가 보고되고 있으며, 눈꽃동충하초(*Cordyceps japonica*)와 번데기 동충하초(*Cordyceps militaris*)를 식품으로 인정하고 있다. 그 중에서도 번데기 동충하초라고 불리는 종은 주로 나비목(Lepidoptera)의 유충 또는 번데기를 기주로 하여 주황색의 곤봉형 자좌를 형성하는 곤충기생균(Entomopathogenic fungi)의 일종으로 인공재배가 활발하게 이루어지고 있다. 에너지원인 탄수화물이나 당의 비율은 낮지만 비타민 A나 미네랄 등을 다른 종에 비해 풍부하게 함유하고 있어 건강기능성 식품으로 인지도가 높아지고 있다(Oh et al., 2003).

번데기 동충하초는 항염증, 항균, 항종양, 면역증강 등 외부물질에 대한 보호작용, 자양강장, 정력증강, 항피로, 운동능력 향상, 노화방지, 수명연장 등 기초대사활성 증강작용, 그리고 동맥경화 억제, 콜레스테롤과 중성지방 저하,

*Corresponding author <E-mail: mhjeong@dau.ac.kr>

혈당강화, 고혈압 치료 등 질병억제 및 완화 작용 등 다양한 기능성을 보유하고 있는 것으로 알려져 있다(Park *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002, 2004; Kim *et al.*, 2001, 2002, 2004, 2005; Lim *et al.*, 2004; Koh, 2001, 2002; Kwon *et al.*, 2001). 그러나 이들 기능성의 근간이 되는 주요장기인 간에 대한 구체적인 효능을 입증한 예는 없다. 간은 인체에서 가장 큰 장기이며 소화배설기능, 영양소 저장, 새로운 물질합성, 해로운 화학물질을 해독시키는 중요한 역할을 담당하고 있다. 한편 간은 혈액의 흐름이 매우 풍부한 기관으로 혈류를 통한 독성물질의 침투도 용이하게 일어날 수 있다. 간 손상으로 인한 간 장애에 대하여 다양한 치료약이 개발되어 사용되고 있으나 결정적으로 유효한 약물은 별로 없으며, 우리나라를 비롯하여 동아시아 지역에서는 천연물을 기원으로 하는 한약재를 조합한 한방방제가 경험적으로 널리 이용되고 있다.

본 연구에서는 한국산 자생 번데기 동충하초 균주에서 간에 대한 기능성을 안전성 측면과 효소활성작용 및 독성 물질에 대한 간손상의 보호 및 회복효과로 구체화 하고자 하였다. 이를 위하여 직접 채집한 균주를 대상으로 번데기 동충하초를 확인 동정하고, 인공배양을 통하여 대량의 자실체를 확보하였다. 또한 추출방법을 다양화하여 최적의 효능성분 추출조건을 확립하고, 간관련 효소의 활성시험을 통해 효능성분의 존재를 확인하였다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 배양

버섯채집회 등을 통해서 확보한 자생균주에서 염기서열 분석을 통하여 번데기 동충하초를 확인하고, 균사체 분리 배양과 자실체 배양실험을 통해 배양수율(자실체 수확 시기가 빠르고 자실체의 양이 많은 종)이 우수한 균종(MPNU8105)을 선별하였다. 자연에서 채취한 번데기 동충하초 균주를 세균증식을 막기위해 chloramphenicol 50 ppm을 넣은 Potato Dextrose Agar(PDA)배지에 21°C에서 10일간 배양한다. 이것을 진탕배양용 플라스크에 옮겨 일주일정도 배양한 후에 스테인레스 망을 사용하여 포자는 제거하고 균사체 부분만 소형발효조(3 l)에 접종한다. 재배조건은 습도 95%, 온도 16°C, 조도 500 Lux, 환기량 1000 ppm에서 2개월간 재배하였다.

염기서열 분석

균주 확인을 위한 염기서열 분석은 ITS1, ITS2 및 5.8S rRNA gene을 coding하는 rDNA영역을 증합연쇄반응으로 증폭하여 시행하였다[White *et al.*, 1990]. DNA는 자실체 0.2 g에서 DNeasy Plant Maxi Kit(Qiagen, Germany)를 사용하여 추출하고, 0.8% agarose gel에서 확인하였다. PCR(Gene Amp PCR System 2400, Perkin-Elmer)은 ITS5F(5'-GGAAGTAAAAGTGGTAACAAGG-3')과 ITS4R

(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')을 primer로 PCR premix(Bioneer Co., Korea)를 이용하여 pre-denaturation 94°C/5분, denaturation 94°C/30초, annealing 50°C/30초, extension 72°C/1분 30 cycle, 72°C/7분 추가연장 반응으로 시행하였다. PCR 반응물을 1.6% agarose gel에서 확인하고, 겔 밴드를 잘라 QIAquick gel extraction kit(Qiagen, Germany)로 정제하여 염기서열분석에 사용하였다. 염기서열은 Bigdye Terminator Cycle DNA sequencing v2.0 Kit(PE and Roche, USA)와 ABI 310 auto DNA sequencer(PE and Roche, USA)를 이용하여 분석하고, 결정된 염기서열을 Clustal G mutiple alignment를 이용하여 NCBI Gene bank에 등록된 번데기 종 및 유사 종들과 Neighbor-Joining method로 비교분석하였다[Park *et al.*, 2001].

시험물질 추출법

열수추출은 100 g의 시료를 기준으로 500, 1000, 2000 ml의 증류수를 첨가한 다음 40, 70, 100, 121°C의 온도조건에서 시간별(1시간, 4시간 7시간, 12시간)로 시행하였다. 각각의 조건별로 얻은 추출물을 여과한 후(Whatman No.2), 동결건조기를 이용하여 건조시켰다. 유기용매추출은 일차적으로 환류추출기를 이용하여 40°C에서 메탄올로 조추출하고, 흡입펌프를 이용하여 여과한 다음, 회전진공농축으로 유기용매를 제거하였다. 조추출물을 n-hexane, CHCl₃, ethyl acetate, butanol, 물의 순서로 극성의 차이에 따라 단계적 분리과정을 진행하였다(Fig. 2).

설치류 단회독성시험

설치류에서 단회 경구투여 시 나타나는 독성을 알아보기 위해 5주령 ICR mouse(샘타코)를 대상으로 시험물질 2000, 1000, 500 mg/kg/Day 시험군 및 음성대조군(멸균 증류수)에 대하여 암수 각각 10마리를 실험하였다. 동물 실험은 시험군간 변이 요인을 최소화하기 위하여 식품의약품안전청에서 권고하는 good laboratory practice(GLP) 조건하에서 시행하였다. 시험물질 경구투여 후 1시간 동안은 지속적으로 관찰하고, 6시간까지는 매시간, 투여 일일부터는 매일 최소 1회씩 관찰하여 최종 14일간 이상반응을 관찰하였다. 체중은 입수 시, 군 분리 시, 시험물질 투여 후 1일, 3일, 7일, 14일째에 측정하였고, 투여 14일 이후에 모든 생존동물은 외관검사를 실시한 다음 부검하여 육안적 이상소견을 검사하였다.

미생물복귀 돌연변이시험

시험물질의 돌연변이 유발성의 유무를 검색하기 위해 *Salmonella typhimurium* 히스티딘 요구성 균주 TA98, TA100, TA1535 및 TA1537의 4개의 균주와 *E. coli* 트립토판 요구성 균주인 *E. coli* WP2uvrA를 이용하여 복귀돌연변이 여부를 시험하였다. 시험물질은 생육저해를 보이지 않는 5000 µg/plate을 최고농도로 1000, 500, 100 및

50 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 5단계로 희석하였으며, 직접법(S9-)와 대사활성화법(S9+)을 적용하여 실시하였다.

알콜대사와 관련한 효소활성 측정

Alcohol dehydrogenase(ADH)의 활성은 반응액(1 M tris-HCl(pH 8.8), 20 mM NAD^+ , ethanol, DW)에 시료와 ADH를 넣고 30°C, 5분간 반응한 다음, 5분 동안 340 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. Acetaldehyde dehydrogenase(ALDH)의 활성은 반응액(1 M tris-HCl(pH 8.0), 20 mM NAD^+ , 1 M acetaldehyde, 3 M KCl, 0.33 M 2-mercaptoethanol, DW)에 시료와 ALDH를 넣고 30°C, 5분간 반응한 다음, 5분 동안 340 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다.

랫드에서 혈중 알코올 및 아세트알데히드 측정

설치류에서 시험물질에 의한 알콜분해 효과를 알아보기 위하여 6주령 수컷 Sprague Dawley(SD) Rat 4개의 시험군(G1 : 증류수, G2 : 시험물질 250 mg/kg, G3 : A사 천 연차, G4 : D사 일반의약품)에 대하여 각각 20마리를 실험하였다. 반나절 동안 절식시킨 실험동물에 25% 에탄올을 1회 경구투여하고, 30분, 1시간, 3시간, 6시간째 복대 동맥에서 군당 5마리씩 혈액을 채취하여 혈중 ethanol 및 혈중 acetaldehyde양을 측정하였다. 혈중 알콜 또는 아세트알데히드 측정을 위하여 반응액(potassium phosphate buffer(pH 9.0), NAD^+ tablet)에 혈액을 첨가하여 20°C, 3분간 반응시키고 340 nm에서 흡광도를 측정한다(A1) 다음, 다시 ADH 또는 ALDH를 가하여 20°C, 5분간 반응시켜 340 nm에서 흡광도를 측정하였다(A2). 혈중 alcohol 또는 acetaldehyde 농도는 다음과 같은 식으로 계산하였다.

$$\text{Alcohol} = 0.7259/3.6 \times \Delta A,$$

$$\Delta A = \text{sample (A2-A1)} - \text{blank (A2-A1)}$$

$$\text{Acetaldehyde} = 0.7158/3.6 \times \Delta A,$$

$$\Delta A = \text{sample (A2-A1)} - \text{blank (A2-A1)}$$

사염화탄소를 이용한 급성 간 손상유발

설치류에서 급성 간손상에 대한 시험물질의 효과를 알아보기 위하여 6주령 수컷 Sprague Dawley(SD) Rat 4개의 시험군(G1 : 음성대조군, G2 : 사염화탄소 손상군, G3 : 시험물질 250 mg/kg, G4 : 양성대조물질)에 대하여 각각 7마리를 실험하였다. 간독성은 7일간 순화시킨 실험동물에 올리브오일과 사염화탄소를 1 : 4로 혼합한 용액 2 ml/kg를 복강투여하여 유발하였다. 시험물질은 독성유발물질 투여 4시간 전, 후에 경구투여하고, 독성유발물질 투여 48시간 후 에테르 마취하여 개복하여 혈액 및 간 조직을 절취하였다. 혈액은 혈액생화학분석기기를 통해서 GOT, GPT 등을 측정하였으며, 포르말린에 고정된 간 조직은 H&E 일반염색으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

유전자 염기서열 분석을 통한 번데기 동충하초 확인

본 연구에서 사용한 번데기 동충하초는 버섯채집회 등을 통해서 확보한 자생균주 중에서 internal transcribed spacer(ITS) 영역 염기서열 분석법으로 확인동정된 것을 이용하였다. ITS 부위는 가운데의 5.8S를 포함하여 약 500 bp 정도로, 그 염기서열을 결정하기가 간편하고, 시간적인 제약을 덜 받기 때문에 다수의 균종을 대상으로 하는 분류학적 연구에 적합하며, 분자 진화속도가 빨라 염기서열의 다양성을 요구하는 중, 속의 분류에 적합하다. 더구나, 보존성이 높은 5.8S 부위를 포함하고 있으므로 ITS 부위와의 각각의 비교가 가능하며, 이러한 풍부한 정보량과 간편성으로 동일 속내의 종간 및 속간의 유연관계 연구에 유용한 수단으로 평가되고 있다[Chen *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2001]. MPNU8105 균주는 자실체 배양수율이 가장 우수하면서, ITS영역 염기서열의 계통발생학적

(a)

```

1  gtgaacctgc  ggagggatca  ttaacgagtt  ttccaactcc  caaccctttg
51  tgaacatacc  tatcgttgct  tggcgggact  cgcccagcgc  ctggagcggg
101  gcctggggcg  cggccgtcgg  gggccccaac  cactgtatct  accagttttt
151  ctgaatccgc  cgcaaggcaa  aacaatgaa  tcaaaacttt  caacaacgga
201  tctcttggct  ctggcatcga  tgaagaacgc  agcgaatgc  gataagtaat
251  gtgaattgca  gaattcagtg  aatcatcgaa  tctttgaagc  cacattgegc
301  ccgccagcat  tctggcgggc  atgctgttcc  gagcgtcatt  tcaaccctcg
351  acgtccctcg  ggggatgtcg  gcgttgggga  ccggcagcac  accgcccgcc
401  ccgaatgaa  gtggcggccc  gtccggcgcc  acctctgagt  agtactccaa
451  ctgcaccgg  gaaccggcgc  tggccaccgc  gtaaacgcc  caactctgaa
501  cgttgacctc  ggatcaggta  ggaataccgc  ctgaa
  
```

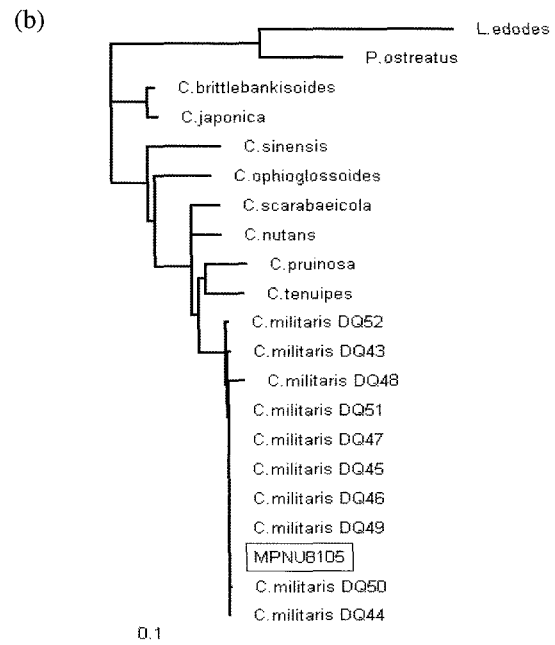


Fig. 1. Phylogenetic analysis of genus *Cordyceps* based on the sequences of ITS1, 5.8S and ITS2 rRNA region. Phylograms were generated from 1,000 bootstrap replications from data recorded as described in materials and methods. a) ITS1, 5.8S and ITS2 sequence of MPNU8105, b) Phylogenetic tree of genus *Cordyceps*.

비교분석에서 *Cordyceps militaris*와 가장 높은 일치성을 가지는 것으로 확인되었다(Fig. 1). 기존에 번데기 동충하초들은 4~5회 이상의 계대배양을 하면 배양수율의 급격한 하락 및 자실체 모양의 기형성과 세균 등에 쉽게 오염되는 경향을 보였으나, 새로 분리한 균주는 10회 정도의 계대배양에도 거의 동일한 배양수율 및 곧은 모양의 자실체를 생산하였다.

추출 조건

열수추출은 일반적으로 사용하는 방법으로 시행하였으며, 추출되는 유효성분의 함량을 극대화하기 위해서 온도와 압력, 추출액량, 추출시간 등을 다양화하여 추출 후 지표성분 함량을 비교분석하였다. 추출액량은 500 ml/100 g을 기준하여 각각 ×2, ×4 volume으로 추출하였으며,

×1 volume은 추출 후 filter시 액량이 작아 일정한 수율을 얻기 어려웠고, ×4 volume은 액량이 많아 작업상 번거로움이 있었다. 추출시간은 1, 4, 7, 12시간 각각 추출하여 그 수율을 비교하였으나, 간 효소활성 test의 결과를 볼 때 1시간 이상의 추출은 불필요한 것으로 판단되었다. 또한 추출온도는 40°C 정도가 가장 적절하였으며, 특히 100°C 이상의 추출물에서는 효소활성이 거의 나타나지 않았다. 열수추출 조건 중 간효소활성이 가장 높은 조건은 ×2 volume, 40°C, 1시간에서 고형분 32 g이었다.

유기용매 추출은 메탄올 조추출물에 대하여 극성의 차이에 따라 다양한 용매로 단계적 추출을 시행하였다(Fig. 2a). 건조한 번데기 동충하초 100 g을 메탄올(250 ml)을 이용하여 3회 반복 추출하여 36 g의 조추출물을 획득하였다. 조추출물을 Hexan(250 ml)으로 2회 분리하여 Hexan 분획과 수층부분으로 분리하였다. 수층부분을 CH₃Cl(250 ml)로 2회 분리하여 CH₃Cl 분획과 수층부분으로 분리하였다. 수층부분을 다시 EtOAc(250 ml)로 2회 분리하여 EtOAc 분획과 수층부분으로 분리하였다. 수층부분을 BuOH(250 ml)로 2회 분리하여 BuOH 분획과 물분획으로 분리하였다. 결과적으로 36 g의 조추출물에서 Hexan 분획 4.2 g, CH₃Cl 분획 2 g, EtOAc 분획 0.4 g, 물분획 24.6 g, BuOH 분획 4.8 g을 획득하였다.

간 관련 효소활성을 이용한 유효성분 확인시험

열수 및 유기용매로 추출한 각각의 추출물들에 대해서 간관련 효소인 ADH와 ALDH의 효소 활성을 얼마나 증가시키는지 확인하였다(Fig. 2b~c). 열수 추출물에서는 40°C에서 1시간 추출하였을 때의 추출물이 ADH와 ALDH의 활성을 가장 많이 증가시켰고, 유기용매 추출물에서는 에틸아세테이트, 부탄올분획에서 높은 활성을 나타내었다. 특히 부탄올분획인 CME에서 아주 높은 활성증가를 나타내어, 이 분획을 중심으로 *in vitro* 효소활성시험 및 *in vivo* 생체효소활성 및 혈액과 간조직등에서 효능연구를 하였다.

번데기 동충하초 추출물의 안전성과 유효성

안전성시험: 번데기 동충하초 BuOH 추출물에 대해서 설치류 단회와 유전독성시험(복귀돌연변이시험)을 통하여 독성을 확인하였다. 단회독성시험에서 최고용량 2000 fmg/kg/day에서도 경구투여 후 일반증상, 체중변화 및 부검소견 등에서 아무런 독성이 나타나지 않았다. 미생물 복귀돌연변이시험 결과 본 시험에 사용된 시험물질은 TA98, TA100, TA1535, TA1537 및 *E. coli* WP2uvrA의 5 균주를 사용한 직접법(-S9)과 대사 활성화법(+S9) 모두에서 음성대조군에 비하여 각 농도별 처리군에서의 콜로니 생성 수치는 증가양상을 나타내지 않았다. 즉, 번데기 동충하초 BuOH 추출물은 두가지 스크리닝 독성시험에서 뚜렷한 독성을 보이지 않는 안전한 물질임을 확인할 수 있

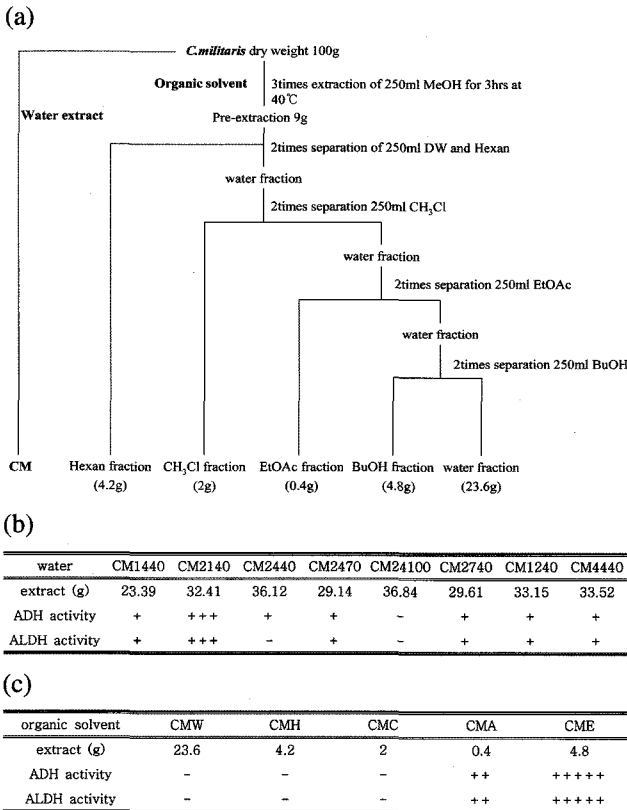


Fig. 2. Extraction and separation of *Cordyceps militaris* by water and organic solvent (a) methods of water organic solvent extraction, (b) ADH and ALDH activity of water extraction, (c) ADH and ALDH activity of organic solvent extraction.
 *CM1440 : water 500 ml, 4 hour, 40°C; CM2140 : water 1000 ml, 1 hour, 40°C; CM2440 : water 1000 ml, 4 hour, 40°C; CM2470 : water 1000 ml, 4 hour, 70°C; CM24100 : water 1000 ml, 4 hour, 100°C; CM2740 : water 1000 ml, 4 hour, 40°C; CM1240 : water 500 ml, 2 hour, 40°C; CM4440 : water 2000 ml, 4 hour, 40°C; CMH : n-Hexan fraction; CMC : CH₃Cl fraction; CMW : water fraction.

었다.

간 효소활성에 대한 효과: 알코올분해 효소인 ADH의 활성을 얼마나 증가시켜서 알코올을 빨리 분해하는지 비교 실험하였다(Fig. 3a). A사의 숙취해소용 천연 차를 비롯하여 B사의 피로회복용 일반의약품, 숙취해소용 음료인 C사의 혼합음료, 약국에서 숙취해소용으로 알약과 함께 마시는 D사의 일반의약품 음료, 약국 등에서 숙취해소용 일반드링크제인 E사의 드링크, 버섯추출물을 이용한 F사의 숙취해소용 드링크를 동충하초 100 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 와 비교하여 알코올을 분해하는 효소의 활성을 증가시키는 능력을 비교하였다. 시판 중인 제품 중에서는 B사의 제품이 ADH 활성이 1095.05%로 가장 높았고, 동충하초 100 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 는 각각 activity가 1805.04%, 3802.09%, 2666.77%로 시중의 제품보다 ADH activity가 월등하게 높은 것으로 판정이 되었다.

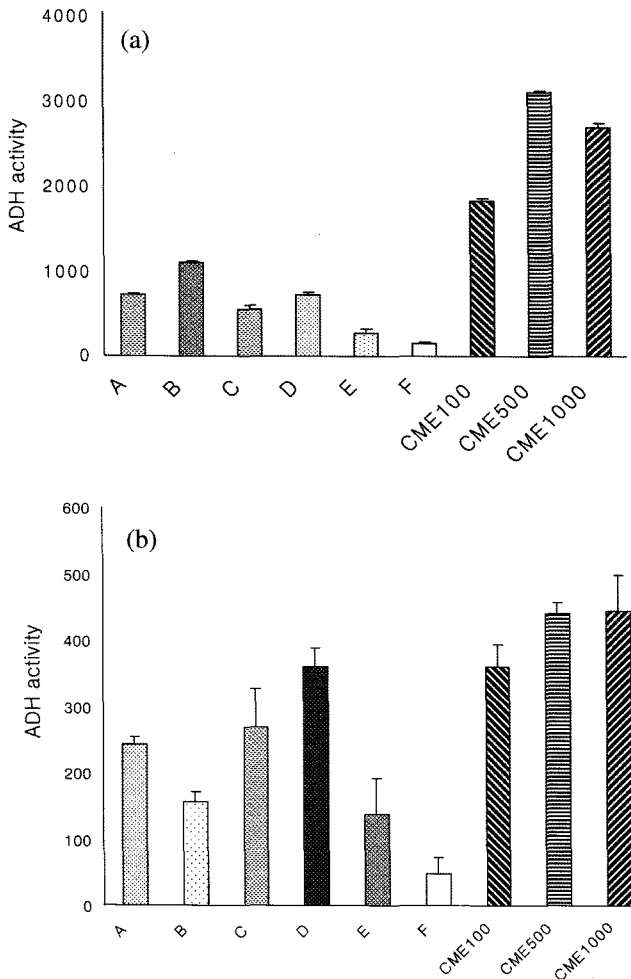


Fig. 3. *In vitro* (a) ADH (alcohol dehydrogenase), (b) ALDH (acetaldehyde dehydrogenase) activity test existent in liver. A : natural tea; B : medicine; C : drink; D : medicine; E : drink; F : drink (mushroom extract); CME100 : *C. militaris* extract 100 $\mu\text{g/ml}$; CME500 : *C. militaris* extract 500 $\mu\text{g/ml}$; CME1000 : *C. militaris* extract 1000 $\mu\text{g/ml}$.

또한 생체 내에서 독성을 일으키는 아세트알데히드를 분해하는 효소인 ALDH의 활성에 얼마나 영향을 미치는지 비교실험 하였다(Fig. 3b). Fig. 3a에서와 마찬가지로 시중 판매되고 있는 A~F사의 음료를 대상으로 비교실험하였고, 시판제품 중에서 D사의 제품이 ALDH activity가 360.22%로 가장 높게 나왔고 동충하초 100 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 는 각각 activity 361.00%, 440.29%, 444.46%로 최소 1.5배에서 5배 이상 높은 활성증가율을 나타내었다. 이는 활성화된 ALDH의 작용으로 독성물질인 아세트알데히드가 빠르게 아세트산으로 전환되는 것으로 사료된다.

생체내 효소활성에 증가에 의한 알콜 대사효과: 생체에서 일어나는 반응양상을 알아보기 위해 설치류 모델을 이용하여 숙취를 일으키고, 효소활성시험에서 좋은 효능을 보였던 A사의 천연 차와 D사의 숙취해소용 일반의약품 드링크를 동충하초 추출물과 비교 실험하였다(Fig. 4). Fig. 4a는 설치류에서 알코올을 섭취한 후 시간별로 변화하는 체내 알코올의 농도변화를 측정하는 것으로 시중 제품 중 D사의 제품이 6시간 후의 알코올 농도 212 $\mu\text{g/ml}$ 로 알코올감소 속도가 제일 빨랐다. 이에 대하여 동충하초는 6시간 후의 알코올 농도가 86 $\mu\text{g/ml}$ 로 타사 제품에 비해

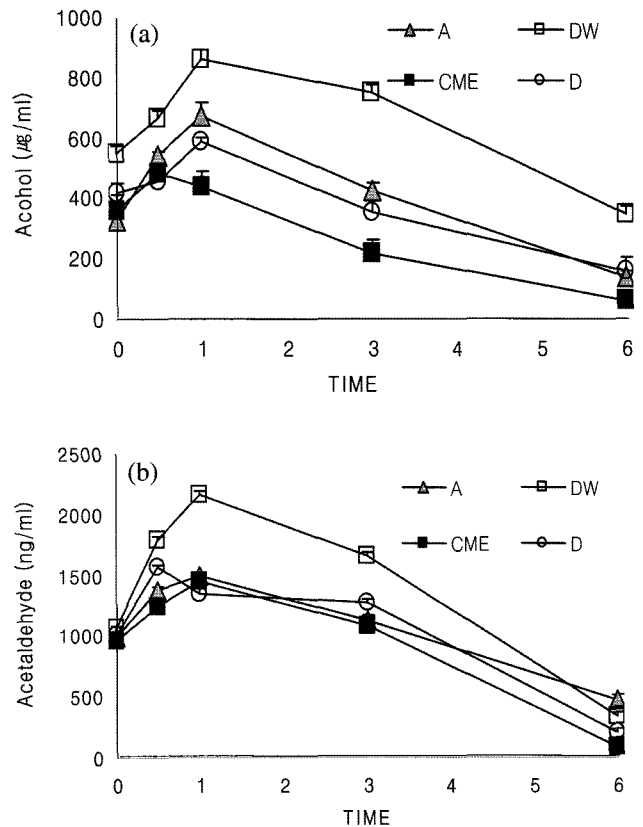


Fig. 4. The change of (a) alcohol and (b) acetaldehyde in blood after administrating alcohol. Δ : Natural tea; \square : distilled water; \blacksquare : *C. militaris* extraction 250 mg/kg; \circ : medicine.

체내 알코올을 빨리 감소시켜주는 것을 알 수 있었다.

Fig. 4b는 생체 내에서 실제로 독성을 일으키는 아세트알데히드의 농도 변화를 비교 실험한 것이다. 효소활성 실험에서 효능이 높았던 시중판매제품인 A사의 천연 차와 D사의 숙취해소용 일반의약품 드링크를 비교실험하였다. 음성대조 그룹인 물투여군은 6시간 후의 혈중아세트알데히드 농도가 342 ng/ml로 3배 이상 그리고 타사제품과 A사 제품은 135 ng/ml, D사 제품은 158 ng/ml로 56 ng/ml이 나온 동충하초가 1.5배 이상 아세트알데히드 농도가 빠르게 낮춰졌으며, 이로 인해 숙취가 빠른 시간에 해소됨을 확인할 수 있었다.

급성 간 손상 유발 모델에서의 효과: 간 손상 모델로 사용한 사염화탄소는 가축의 구충제, 용매, 지용성 비가연성 및 비휘발성 세제 또는 소화제로 널리 사용되어온 지방족탄화수소인 메탄, 에탄 등에서 분자내의 수소일부 또는 전체가 할로겐원소 치환된 형태의 제제(halogenated hydrocarbon)이지만(Ilett *et al.*, 1973) 사람을 비롯한 거의 모든 종에 대해 간 손상을 일으키는 대표적인 물질로 알려져 있다. 사염화탄소의 간 독성 작용기전은 화학적 세포 파괴설이 주를 이루고 있다(Recknagel, 1959). 사염화탄소를 투여하면 생체막의 endoplasmic reticulum(ER)에서 사염화탄소의 등방성 분해(homolytic cleavage)에 의해 반응 대사물질인 trichloromethyl 유리기(CCl_3)로 대사되거나(Poli *et al.*, 1979) 혹은 사염화탄소가 산소와 반응하며 생성된 trichloromethyl peroxy 유리기(CCl_3OO)로 산화되어 세포막의 다가불포화 지방산을 과산화 시킴으로써 막의 구조와 기능을 파괴한다고 보고되어 있다(Di Luzio, 1973; Dinis *et al.*, 1993; Goodman Gilman, 1985). 사염화탄소 투여시 일어나는 간손상의 주된 해부학적 이상은 지방간(hepatic steatosis)과 간소엽 중심성 괴사(hepatic centrilobular necrosis)이다(Brown *et al.*, 1974; Kim, 1998; Plass, 1991).

사염화탄소로 유발시킨 급성 간 손상에 대한 동충하초 추출물의 보호효과를 Fig. 5에 나타내었다. 6주령의 수컷 SD Rat에 올리브오일과 혼합한 사염화탄소를 복강내 투여하여 급성 간 손상을 유도하였다. 12~16시간 절식한 Rat에 독성유발물질 투여 4시간 전, 후에 동충하초 추출물(250 mg/kg/day)을 경구투여하고 독성유발물질 투여 48시간 후에 채혈하여 간 손상 지표인 GOT, GPT를 측정하였다. 사염화탄소로 독성유발만 시킨 군은 GOT 1997.33 U/L, GPT 1090 U/L로 현저하게 증가하였고, 이에 대하여 양성대조 물질인 silymarin 투여군은 GOT 560 U/L, GPT 542.67 U/L로 손상군에 비해 수치가 유의성 있게 감소한 것을 알 수 있으며, 동충하초 추출물의 투여군은 GOT 375.33 U/L, GPT 223.67 U/L로써 Silymarin보다도 감소하였다.

또한 이들 군에 대한 간의 조직적 손상정도 및 상태를 Fig. 6에 나타내었다. 올리브오일과 사염화탄소를 1:4로

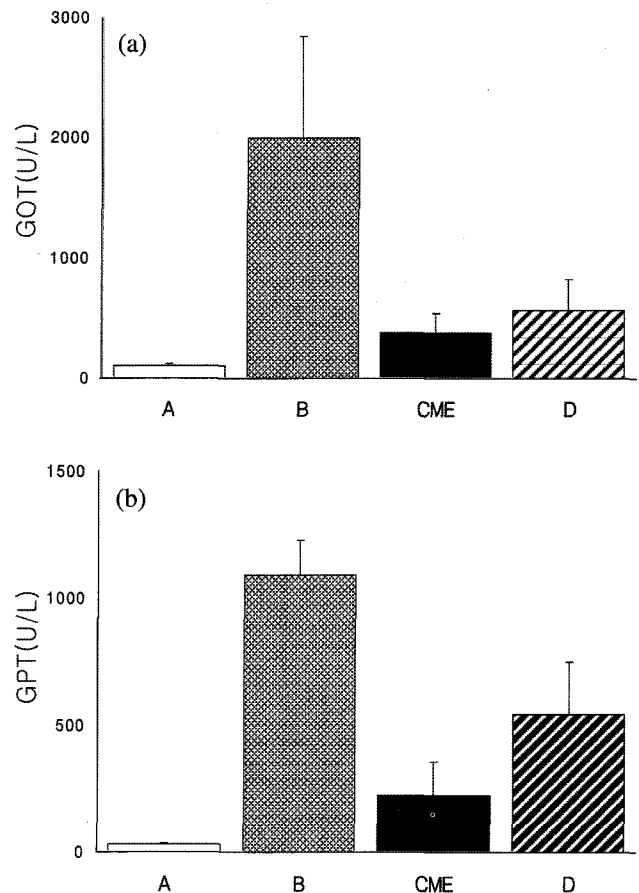


Fig. 5. The change of (a) GOT and (b) GPT in blood after administrating CCl_4 . A : negative control; B : CCl_4 ; CME : *C. militaris* (250 mg/kg); D : silymarin.

혼합한 용액을 2 ml/kg(body weight)의 용량으로 SD rat에 복강투여하여 간독성을 유발하였다. 독성유발물질 투여 4시간 전, 후 동충하초 추출물(유기용매 추출물)을 250 mg/kg 경구투여하고, 독성유발물질 투여 48시간 후에 테르 마취하에 개복하여 간 소엽사이 결합조직(Glisson's capsule) 중 소엽사이 동맥, 소엽사이 정맥, 소엽사이담관 즉 소엽사이 간삼조(hepatic triad) 부분이 보이게 간 조직을 절취한 후 H&E 염색하여 관찰하였다. Fig. 6a는 정상간의 간삼조 조직이 나타나있다. 정상세포로서 핵이 뚜렷이 보이며 그 간격이 일정하고, 세포간극이 좁은 잘 짜인 소엽구조를 관찰 할 수 있다. Fig. 6b는 독성물질인 사염화탄소에 의하여 조직에 구멍이 난 것처럼 세포의 지방산의 탈락으로 인한 공포가 생겨 간세포가 괴사된 모습을 볼 수 있다. Fig. 6c는 번데기 동충하초 추출물을 복용한 군에서는 사염화탄소에 의해 일부 간 손상이 일어나 세포의 일부가 파괴되고 세포간극이 넓어져 있으나 세포의 손상정도가 정상군과 크게 차이가 없음을 확인할 수 있다. 즉, 손상만 시킨 그룹과 비교할 때 동충하초 추출물을 복용시킨 그룹에서 독성물질에 대한 간 손상이 상당히 보호되었다. 사염화탄소 투여로 증가한 간 손상 혈액지표인

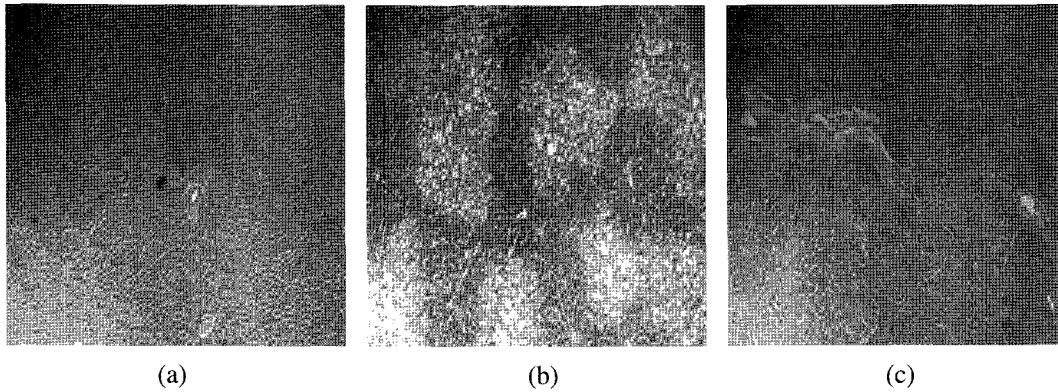


Fig. 6. The histological change of liver tissue by administrating CCl_4 . (a) normal liver tissue (b) damaged liver tissue (c) administration CME liver tissue. All the tissues were observed by Epifluorescence Microscope, West Germany Co. Ltd. $\times 40$.

GOT, GPT를 감소시킨 것은 세포막의 다가불포화 지방산의 과산화를 억제하여 세포막이 파괴되는 것을 억제하였거나, endoplasmic reticulum(ER)에서 사염화탄소의 등방성 분해(homoytic cleavage)를 억제하고 간조직의 재생, 회복을 촉진시킨 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합하면 유전자염기서열분석을 통해 번데기 동충하초로 밝혀진 MPNU8105는 시중에 시판되는 제품들보다 알코올이나 사염화탄소 같은 독성물질에 대한 간의 보호 및 손상된 간의 회복기능이 뛰어났으며 그 안전성도 확인되었다. 본 연구의 결과를 바탕으로 독성물질에 대한 간 보호작용의 주된 작용기전에 대한 연구가 계속적으로 진행되어야 할 것이다. 더 나아가 만성적으로 인간에게서 발생하는 질환과 유사한 동물모델시스템을 구축하고, 만성적인 간 손상 및 지방간에 대한 효능연구를 계속적으로 진행하여 향후 건강기능성 식품이나 약품으로 개발의 기초자료로 활용할 수 있으리라 사료된다.

요 약

수집, 동정된 새로운 동충하초의 간에 관한 기전연구 및 기능향상을 확인하고자 본 연구를 수행하였다. 번데기 동충하초를 버섯채집회 등을 통해서 수집하고, 염기서열 분석을 실시하였다. 분석된 염기서열을 유전자은행에 등록된 번데기 동충하초와 계통발생학적인 비교를 통해 동일종으로 확인하였다. 추출조건 및 방법을 다양화시켜 열수 및 유기용매 추출법으로부터 얻어진 분획중에서 간관련 효소활성 시험을 통해 효능이 있는 추출물 분획을 찾아내고, 이 추출물을 이용하여 간의 대사효소인 ADH, ALDH의 활성증가가 시판되고 있는 의약품, 천연차, 혼합음료, 드링크 등의 6종류의 제품과 비교 실험하여 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 동충하초 추출물이 월등한 활성증가를 확인하였다. 또한 생체에 투여하여 동충하초 추출물에 의해 혈중 알코올과 아세트알데히드의 분해 및 대사가 촉진되고 정상상태로 빠르게 회복됨을 관찰하였다. 그리고 설치류 단

회독성시험 및 유전독성시험을 통하여 시험물질의 무독성을 확인하였고, 간을 손상물질인 사염화탄소를 투여하여 급성손상에 대한 혈액생화학변화(GOT, GPT) 및 조직에서 동충하초 추출물에 의한 보호 및 회복작용을 확인하였다. 본 연구에서는 번데기 동충하초의 추출물이 독성물질에 대한 급성적인 반응을 보였지만, 저독성의 오랜기간 노출로 인한 만성간장해와 이로 인해 발생하는 지방간 등에 대한 효과에 대해서는 앞으로 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2004년도 동아대학교 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

참고문헌

- Ahn, Y. J., Park, S. J., Lee, S. G., Shin, S. C. and Choi, D. H. 2000. Cordycepin: selective growth inhibitor derived from liquid culture of *Cordyceps militaris* against *Clostridium* spp. *J. Agric. Food Chem.* **48**(7): 2744-2748.
- Bae, S. Y. and Keun, L. J. 1998. A bibliographical study on the origin of chinese caterpillar fungus. *Kor. J. Herbology* **13**(2): 181-187.
- Brown, B. R., Sipes, I. G. Sagalyn and Ann, M. 1974. Mechanisms of acute hepatic toxicity. *Anesthesiology* **41**:554.
- Chen, Y. Q., Wang, N., Qu, L. H., Li, T. H. and Zhang, W. M. 2001. Determination of the anamorph of *Cordyceps sinensis* inferred from the analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacers and 5.8S rDNA. *Biochem. Sys. Ecol.* **29**: 597-607.
- Di Luzio, N. R. 1973. Antioxidants, lipid peroxidation and chemical induced liver injury. *Fed. Proc.* **32**: 1875.
- Dinis, T. C. P., Almeida, L. M. and Madeira, V. M. C. 1993. Lipid peroxidation in sarcoplasmic reticulum membrane : Effect on functional and biophysical properties. *Arch. Biochem. Biophys.* **301**: 256.
- Goodman Gilman, A. 1985. Carbon tetrachloride in the pharmacological basis of therapeutics, 7th ed., Macmillan Publishing

- Co. New York. 1635-1636.
- Ilett, K. F., Reid, W. D., Sipes, I. G. and Krishna, G. 1973. Chloroform toxicity in mice : Correlation renal and hepatic necrosis with covalent binding of metabolites to tissue macromolecules. *Exp. Molecul. Pathol.* **19**: 215.
- Jo, J. S. 1998. Study on the origin of Chinese caterpillar fungus. *The Journal of East-West Medicines* 671-680.
- Kim, H. S., Roh, Y. J. and Choe, M. 2005. *Cordyceps militaris* increases hepatic glucokinase activities. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **34**(2): 158-161.
- Kim, J. H., Cho, M. R., Ryu, C. R. and Chae, W. S. 2002. Effect of *Cordyceps militaris* Mycelia (CMM) oral administration and herbal acupuncture at BL13, LU4 on asthma induced by ovalbumin in rats. *The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society* **19**(2): 39-50.
- Kim, M. N., Oh, S. W., Lee, D. S. and Ham, S. S. 2001. Antioxidative and antimutagenic effect of the ethaol extract from cordyceps militaris. *Korean J. Postharvest Sci. Technol.* **8**(1), 109-117.
- Kim, M. R. 1998. Effect of oldenlandia diffusa and *Cordyceps sinensis* on hepatic injury induced by carbon tetrachloride. *The Journal of East-West Medicines* **19**(2): 52-60.
- Kim, S. J., Lim, D. K., Park, C. W., Cerbo, R. M., Hyung, S. W., Lee, K. K., Kim, J. O. and Ha, Y. L. 2004. Inhibition of free radical-induced lipid oxidation by the extract from submerged-liquid culture of mushrooms in the medium containing mulberry tree powders. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **33**(2): 255-261.
- Koh, J. B. 2002. The effects of *Cordyceps militaris* on lipid metabolism, protein levels and enzyme activities in rats fed a high fat diet. *The Korean Nutrition Society* **35**(4): 414-420.
- _____ and Choi, M. A. 2001. Effect of cordyceps militaris on lipid metabolism in rats fed cholesterol diet. *The Korean Nutrition Society* **34**(3): 265-270.
- Kwon, S. H., Woo, H. J., Han, D. S. and Kim, M. K. 2001. Effect of dried powders and water extracts of paecilomyces tenuipes and *Cordyceps militaris* on lipid metabolism, antioxidative capacity and immuné status in rats. *The Korean Nutrition Society* **34**(3): 271-284.
- Lee, H. M., Lee, Y. J. and Park, T. S. 2004. Tumor growth inhibitory and immunomodulatory activities of *Cordyceps militaris* water extracts in ICR mice bearing sarcoma-180 solid tumor. *J. Koreun Soc. Food Sci. Nutr.* **33**(1): 59-65.
- Lee, J. D. 1998. Mycology 3rd edition, Gu-duck publishing company.
- Lee, S. H., Ko, S. S., Youn, Y. J. and Lee, J. I. 2002. Effect of *Cordyceps militaris* on maximal aerobic power and recovery of fatigue. *JKSSPE* **6**(2): 187-193.
- Lee, W. H., Kwon, H. Y., Park, J. S., Choi, S. Y. and Lee, K. S. 1999. Effect of *Cordyceps millitaris* on the mutagenicity and DNA fragmentation of *E. coli*. *J. Toxicol. Pub. Health* **15**(3): 363-367.
- Lim, H. W., Kwon, Y. M., Cho, S. M., Kim, J. H., Yoon, G. H., Lee, S. J., Kim, H. W. and Lee, M. W. 2004. Antitumor activity of *Cordyceps militaris* on human cancer cell line. *Kor. J. Pharmacogn.* **35**(4): 364-367.
- Oh, S. W., Kim, S. H., Song, H. N. and Han, D. S. 2003. Comparative chemical composition of four kinds of tochukaso. *Korean J. Food Sci. Technol.* **35**(1): 15-22.
- Park, C. S., Kwon, C. J., Choi, M. A., Park, G. S. and Choi, K. H. 2002. Antibacterial activities of *Cordyceps* spp., Mugwort and Pine needle Extracts, *Korean Journal of Food Preservation*, **9**(1): 109-113.
- Park, J. E., Kim, G. Y., Park, H. S., Nam, B. H., An, W. G., Cha, J. H., Lee, T. H. and Lee, J. D. 2001. phylogenetic analysis of Caterpillar fungi by comparing ITS1-5.8S-ITS2 ribosomal DNA sequence. *Mycobiol.* **29**: 121-131.
- Plaa, G. L. 1991. Toxic response of the liver. In : Casarett and Doull's Toxicology (M. O. Amdur, J. Doull and C. D. Klassen, Eds.), pp. 334-353.
- Poli, G., Gravela, E., Albano, E. and Dianzani, M. U. 1979. Studies on fatty liver with isolated hepatocytes : The action of carbon tetrachloride on lipid peroxidation, protein and triglyceride synthesis and secretion. *Exp. Molecul. Patho.* **30**: 116.
- Recknagel, R. O. 1959. Biochemical changes in carbon tetrachloride fatty liver : Separation of fatty changes from mitochondrial degeneration. *J. Biol. Chem.* **234**: 1052.
- White, T., Burns, J., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, Pp. 482. In Innis, M. A. D. H. Gelfand, J. J. Sinsky and T. J. White Eds. PCR protocols: a guide to methods and applications, Academic Press, San Diego, California.
- Yoshikawa, N., Nakamura, K., Yamaguchi, Y., Kagota, S., Shinozuka, K. and Kunitomo, M. 2004. Antitumour activity of cordycepin in mice. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **31**(2): S51-S53.