

배양 노랑다발동충하초 부탄올분획의 급성경구독성

박은영 · 박형진¹ · 양기숙*

숙명여자대학교 약학대학, ¹한림대학교 의과대학

Acute Oral Toxicity of the Butanol Fraction from Cultured Fruitbody *Cordyceps bassiana* in Mice

Eun Young Park, Hyung Jin Park¹ and Ki Sook Yang*

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742

¹College of Medicine, Hallym University, Chuncheon 200-702

Abstract – *Cordyceps bassiana* is a parasitic fungus and used as a Chinese traditional medicine. It has been called as Dong-ChungHaCho(summer-plant, winter-worm) in China. Acute oral toxicity was examined in male and female ICR mice. Butanol fraction from *Cordyceps bassiana*(BuCb) was administered orally at a dose of 2,500 mg/kg, 5,000 mg/kg, 10,000 mg/kg. No death and abnormal clinical signs were observed throughout the administration period. The acute toxicity test on mouse did not show any oversign in net body weight gain, food and water consumptions, organ weights, gross pathological findings by different doses of BuCb. Also, biochemical examination revealed no evidence of specific toxicity. These findings show that BuCb has wide margin of safety on acute toxicity with single exposure.

Key words – *Cordyceps bassiana*, DongChungHaCho, acute oral toxicity, mouse, biochemical

동충하초는 모든 곤충군의 유충, 번데기, 성충 등에 걸쳐 침입하며 곤충을 죽게 한 후, 이를 기주로 하여 충체 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 등에 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 파상풍, 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. *Cordyceps militaris*^{15,16} BuOH 분획에서 항염 및 항암활성 등이 보고되었으며 인공배양을 통하여 얻은 노랑다발동충하초의 생리활성^{17,18} 검색 등을 통하여도 BuOH분획이 활성이 우수하므로 이 분획의 천연약물자원으로서의 안전성

을 규명하기 위하여 마우스를 이용한 급성경구독성을 실험하였다.

재료 및 방법

실험재료 – 노랑다발동충하초는 머쉬텍(주)으로부터 제공 받았으며 강원대학교 성재모교수에 의하여 기원을 확인하였다. 표본품(EFCC#15736)은 강원대학교 동충하초은행에 보관되어 있다.

시료의 조제 – 노랑다발동충하초 5 kg을 EtOH로 70°C에서 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(3,000 rpm, 20 min, 4°C)하여 세척하고 얻은 BuOH 분획(BuEp) 12.4 g(수득율 33.0%)을 시료로 사용하였다

실험동물 – 4주령의 특정병원체부재 ICR 마우스(웅성 16-18 g, 자성 16-18 g)는 (주)샘타코 BIO KOREA에서 구입하였으며, 1주일간의 순화사육기간 동안 일반증상을 관찰하

*교신저자 (E-mail): ksyang@sookmyung.ac.kr
(Tel): 82-2-710-9578

여 건강한 개체를 시험에 사용하였다. 순화 및 시험 기간 중에 사육환경은 온도 21-24°C, 상대습도 40-60%, 형광등 명암 12h cycle, 조도 300-500 Lux의 조건으로 유지하였으며, 사육상자에 5마리씩 넣고 대팻밥 깔집을 깔아 사육하였다. 실험 동물용 고품사료(주)샘타코와 음용수(평균 수도물)는 자유 급여시켰다. 동물실험은 숙명여자대학교 동물실험 윤리위원회에서 심의를 받은 후 수행하였다.

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

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 급속제 존테를 이용해서 체중 측정치 기준으로 1회 강제 경구투여하였다.

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

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

혈청생화학적 검사 - 생존 동물은 관찰기간 종료 후 Zoletyl과 Rompun을 이용하여 마취시키고 심장을 통해 혈

액을 채취한 후, 채취한 혈액에 대한 혈청생화학적검사로서 total protein (T-protein), total bilirubin (T-bilirubin), aspartic acid transaminase (AST), alkaline phosphatase (ALKP), blood urea nitrogen (BUN), creatinine 함량을 동아의료재단에 의뢰하여 자동분석장치 (HITACHI 7600-110)로 측정하였다.

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

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

결과 및 고찰

일반증상 및 사망률 - 시료를 경구투여 후 식품의약품안전청의 독성시험기준¹⁷⁾을 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). 박²⁰⁾ 등은 계면활성제의 2,500 mg/kg 투여, 장²¹⁾ 등은 DR-29 투여 마²²⁾ 등은 쌍화탕 투여에서 5,000 mg/kg이하의 값에서 무독함을 나타내었으나 신²³⁾ 등의 레몬그라스정유 투여에 의하여는 10,000 mg/kg 투여에 의하여도 독성이 없다고 보고하였다. 또한 기원 균주인 *Beauveria bassiana*는 독성이 있어 천연제제로 사용되고 있으나 본 실험을 통하여 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.²⁴⁻²⁶⁾

체중변화와 사료섭취량 및 섭취량의 변화 - 시험물질에 의한 체중변화 관찰결과 자성, 웅성 마우스 모두에서 체중

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 BuCp

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=5).

에 유의적인 영향을 주지 않았다(Fig. 1). 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 동물당 평균 일일 섭취량은 30.7, 28.5, 28.9, 29.2, 29.1 (g)이었다(Fig. 2). 섭취량에 있어서도 관찰기간 동안 시험물질 투

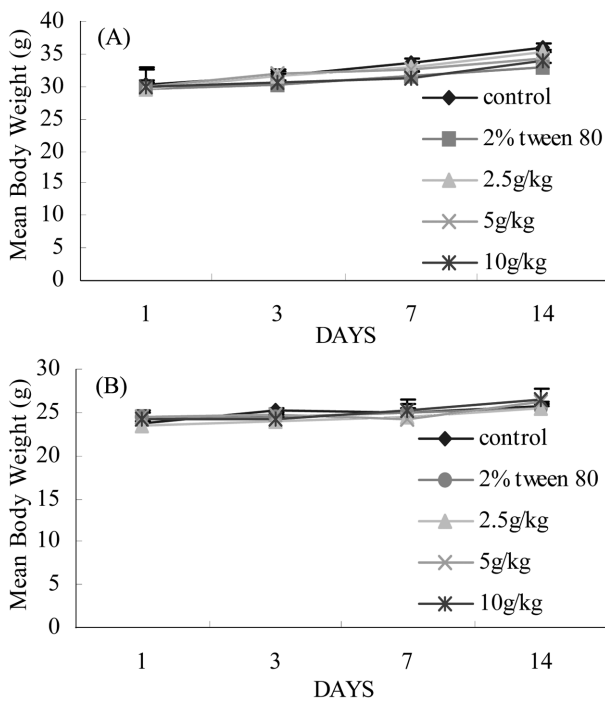


Fig. 1. Body weight increases in (A) male and (B) female mice treated orally with BuCp. Values are presented as mean±S.D. (n=5)

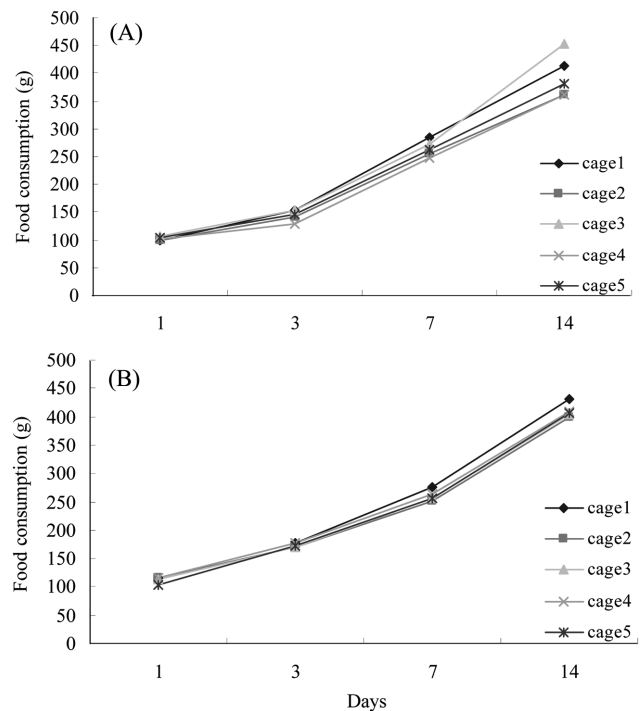


Fig. 2. Food consumption in (A) male and (B) female mice treated orally with BuCp. Values are presented as mean±S.D. (n=5)

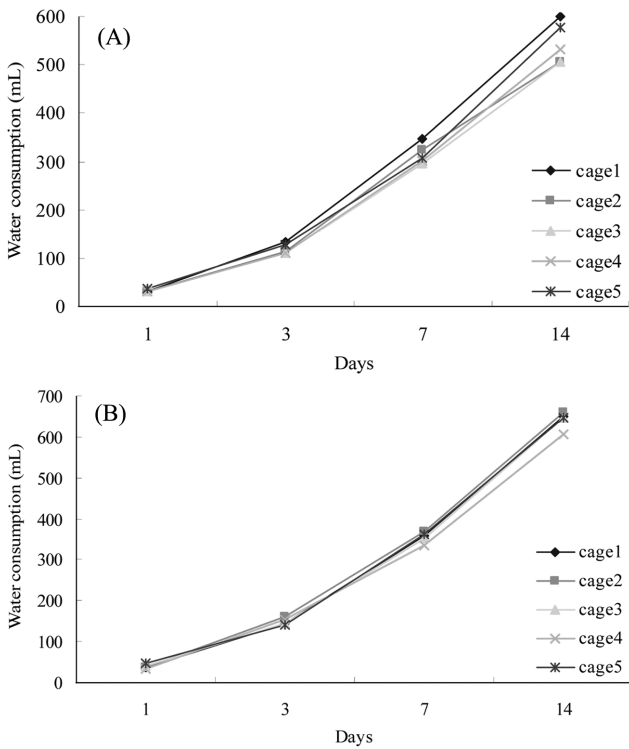


Fig. 3. Water consumptions in (A) male and (B) female mice treated orally with BuCp. Values are presented as mean±S.D. (n=5)

여와 관련된 유의한 변화는 관찰되지 않았다. 자성 마우스의 사육상자당 평균 일일 섭취량은 40.8, 36.1, 36.1, 38.0,

41.2 (ml)이었으며, 음성 마우스의 일일 평균 섭취량은 46.4, 47.1, 46.1, 43.2, 46.1 (ml)이었다(Fig. 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)

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 중량변화가 나타나지 않았다(Table IV, Fig. 4).

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 사망동물은 관찰되지 않았으며 체중은

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

Parametersa	Sex		Male			
	Dose (mg/kg)	Control	2% tween 80	2500	5000	10000
T-protein(g/dl)		4.28±1.14	5.20±0.72	6.35±0.44	5.78±0.15	5.80±0.24
T-bilirubin(mg/dl)		0.50±0.07	0.40±0.07	0.35±0.05	0.45±0.21	0.40±0.07
AST(IU/l)		129.50±14.52	211.50±55.00	157.00±58.53	153.75±28.60	124.50±15.24
ALKP(IU/l)		448.33±36.80	378.75±67.86	488.67±45.22	426.25±31.50	417.50±51.27
BUN(mg/dl)		31.07±3.67	26.88±6.66	33.93±7.22	30.95±4.71	27.00±2.46
CREA(mg/dl)		0.60±0.07	0.60±0.07	0.55±0.09	0.53±0.08	0.63±0.11
Parametersa	Sex		Female			
	Dose (mg/kg)	Control	2% tween 80	2500	5000	10000
T-protein(g/dl)		7.03±0.67	6.17±0.82	5.70±0.23	5.83±0.41	5.75±0.23
T-bilirubin(mg/dl)		0.77±0.11	0.60±0.07	0.55±0.11	0.63±0.11	0.45±0.27
AST(IU/l)		238.67±16.98	244.00±4.30	176.50±17.32	155.50±57.99	173.50±30.20
ALKP(IU/l)		426.67±20.72	306.67±56.61	310.50±15.34	423.67±16.13	480.00±3.54
BUN(mg/dl)		23.73±0.29	21.20±1.11	28.28±1.83	28.30±2.57	28.60±3.29
CREA(mg/dl)		0.57±0.04	0.70±0.07	0.50±0.07	0.53±0.04	0.58±0.15

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<0.01

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

Organ(%)(g)	Sex		Male				
	Dose (mg/kg)		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		Female				
	Dose (mg/kg)		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

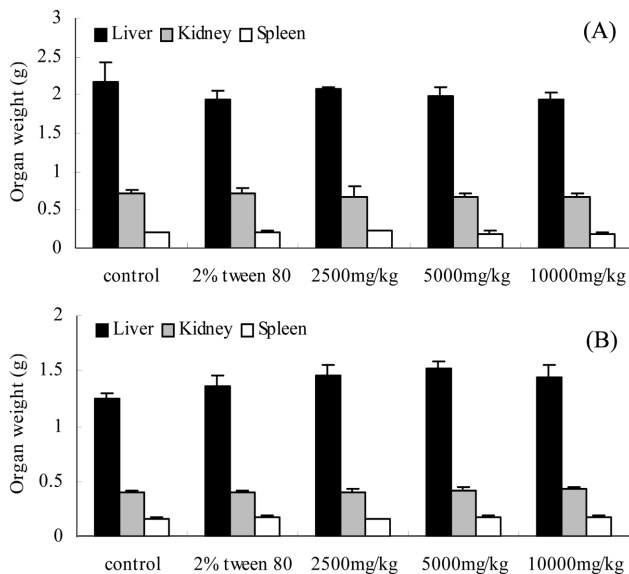


Fig. 4. Absolute organ weights (g) of (A) male and (B) female mice after single oral administration with BuCp. Values are presented as mean±S.D. (n=5)

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.

사 사

본 논문은 농림기술개발사업의 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. 성재모 (1996) 한국의 동충하초, 28, 교학사, 서울.
2. Li, Z., Li, C., Huang, B and Fan, M (2001) Discovery and demonstration of the telemorph of the *Beauveria bassiana*(BAls.) Vuill., an important entomogenous fungus. *Chinese Science Bulletin* **46**: 751-753.
3. Lee, J. O., Shrestha, B., Kim, T. W., Sung, G. H. and Sung, J. M. (2007) Stable formation of fruiting body in *Cordyceps bassiana*. *Mycobiology* **35**: 230-234.
4. Humber, R. A. (2000) Fungal pathogens and parasites of insects. 203-230. In: Priest, F. G. and Goodfellow, M. Eds. *Applied Microbial Systematics*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.
5. Cho, E. M. and Keyhani, N. O. (2007) EST analysis of cDNA libraries from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Mol. Cell. Toxicol.* **3**: 34.4-34.4.
6. Lee, J. O., Shrestha, B. and Han, S. K (2007) In vitro formation of *Cordyceps bassiana* fruiting bodies from the *Beauveria bassiana* Isolate. *Int. J. Med. Mush.* **9**: 323.
7. Sung, J. M., Lee, J. O., and Humber, R. A (2006) *Cordyceps bassiana* and production of stromata in vitro showing *Beauveria anamorph* in Korea. *Mycobiology*. **34**: 1-6.
8. 성재모 (1996) 한국의 동충하초, 291, 교학사, 서울.
9. 박찬성, 권충정, 최미애, 박금순, 최경호 (2002) 동충하초의 항산화작용 및 아질산염소거작용. *한국식품저장유통학회지* **9**: 109-113.
10. 허진철, 남성희, 강석우, 홍인표, 이광길, 박자영, 김경해, 한송이, 이상한 (2007) 동충하초의 균사 및 배양액의 항산화, 항암, 면역활성의 비교. *한국식품저장유통학회지* **14**: 681-687.
11. Park, S. E., Yoo, H. S. and Jin, C. Y. (2009) Induction of apoptosis and inhibition of telomerase activity in human lung carcinoma cells by the water extract of *Cordyceps militaris*. *Food Chem. Toxicol.* **47**: 1667-1675.

12. Jin, C. Y., Kim, G. Y. and Choi, Y. H. (2008) Induction of apoptosis by aqueous extract of *Cordyceps militaris* through activation of caspases and inactivation of Akt in human breast cancer cells. *J. Microbiol. Biotech.* **18**: 1997-2003.
13. Hao, L. (2008) Effectiveness of *Cordyceps sinensis* alone or in combination with chemotherapy in patients with non-small cell lung cancer. *Biotherapy* **22**: 345-350.
14. Cheung, J. K., Li, J. and Cheung, A. W. (2009) Cordysinocan, a polysaccharide isolated from cultured *Cordyceps*, activates immune responses in cultured T-lymphocytes and macrophages. *J. Ethnopharmacol.* **124**: 61-68.
15. Kim, M. N., Oh, S. W., Lee, D. S. and Ham, S. S. (2001) Antioxidant and antimutagenic effects of the ethanol extract from *Cordyceps militaris*. *Kor. J. POSTHARVEST SCI. TECHNOL.* **8**: 109-117.
16. Kim, M. N., Cui, C. B., Lee, D. S. and Ham, S. S. (2001) Cytotoxicity and antigenotoxic effects of *Cordyceps militaris* extracts. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **30**: 921-927.
17. 허진희 (2002) 노랑다발 동충하초 추출물의 생리활성 탐색에 관한 연구, 강원대 학위논문.
18. Sung, J. M., Kim, T. W., Kim, H. K., Lee, J. O., Yoon, D. H., Kim, G. H., Hwang, J. E. and Park, H. J. (2006) Anti-inflammatory effects of the cultured fruitbody of *Cordyceps bassiana* butanol fraction. 한국생화학분자생물학회 춘계학술대회집, 390, 서울.
19. 식품의약품안전청 (2005) 의약품등의 독성시험기준 - 식품의약품안전청 고시 제 2005-60호, 서울.
20. 박병권, 임종환, 황윤환, 김명석, 송인배, 이흥기, 한성진, 황미현, 김종우, 이만휘, 박승춘, 윤호인 (2006) 마우스에 대한 Surfactin C의 급성경구독성시험. *Toxicol. Res.* **22**: 453-458.
21. 장보윤, 강대길, 이호섭, 김성연 (2008) BDR-29의 랫트에 대한 13주 반복투여 독성에 관한 연구. *생약학회지* **39**: 60-67.
22. 마진열, 박대훈, 박경수, 도경탁, 신현규 (2007) 쌍화탕 급성독성에 대한 안전성 연구. *Kor. J. Orient. Med.* **13**: 161-164.
23. 신지영, 박승춘, 김기현, 배춘식, 김성호, 신동호, 김중춘 (2005) 랫드에서 레몬그라스 정유의 급성독성 평가. *Lab. Anim. Res.* **21**: 122-128.
24. Gosselin, M. E., Belair, G. and Simard, L. (2009) Toxicity of spinosad and *Beauveria bassiana* to the black cutworm, and the additivity of sublethal doses. *Biocont. Sci. Tech.* **19**: 201-217.
25. Dunkel, F. V. and Jaronski, S. T. (2003) Development of a bioassay system for the predator, *Xylocoris flavipes* (Heteroptera: Anthocoridae), and its use in subchronic toxicity/Pathogenicity studies of *Beauveria bassiana* strain. *J. Econ. Entomo.* **96**: 1045-1053.
26. Lee, Y. Y., Wang, Y. H. and Jan, L. C. (2007) Carcinogenicity profile of *Beauveria bassiana* via genetic and epigenetic toxicities. *Plant Protec. Bull.* **49**: 57-74.

(2009년 8월 14일 접수)