

대장암 세포암종 HCT-15 세포 및 위암 세포암종 AGS 세포에서 차가버섯 조성물에 의한 세포생육 억제 효과

차재영¹ · 전병삼² · 문재철³ · 유지현¹ · 조영수^{1†}

¹동아대학교 응용생명공학부

²경상대학교 의과대학 미생물학교실

³(주)홍재그린

Cytotoxic Effect of *Inonotus obliquus* Composition in HCT-15 Human Colon Cancer Cells and AGS Gastric Cancer Cells

Jae-Young Cha¹, Beong-Sam Jeon², Jae-Chul Moon³, Ji-Hyun Yoo¹ and Young-Su Cho^{1†}

¹Dept. of Biotechnology, College of Natural Resources and Life Science,
Dong-A University, Busan 604-714, Korea

²Dept. of Microbiology, College of Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 660-750, Korea

³Hong Jae Green Co., Ltd., Seoul 151-802, Korea

Abstract

This study was performed to investigate the cytotoxic effect of the water-extract from Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) compositions containing powdered green tea in HCT-15 human colon carcinoma, AGS human gastric carcinoma and NIH3T3 mouse normal fibroblast cells using viable cell count and MTT assay. The water-extract from Chaga mushroom compositions induced inhibitory effects on proliferation of HCT-15 and AGS cells in the MTT assay and viable cell count. However, mouse normal NIH3T3 cells were exhibited 80% survival under the same condition. Chaga mushroom compositions showed highly antiproliferative effect in human cancer cell line HCT-15 and AGS, but not in mouse normal cell line NIH3T3. These results suggest that Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) compositions containing powdered green tea are the candidate for chemoprevention in colon and gastric cancer.

Key words: *Inonotus obliquus*, HCT-15 human colon carcinoma, AGS human gastric carcinoma, NIH3T3 mouse normal fibroblast cell

서 론

생활수준의 향상과 식생활의 변화로 인해 고칼로리 음식의 과다한 섭취, 운동 부족, 환경오염, 산업 사회의 고도화에 따른 과다한 스트레스 및 의학 발달에 따른 고령화 현상 등으로 인해 질병양상도 점점 생활습관 위주로 서구화되고 있다. 우리나라에서도 2002년 국립암센터의 통계에 따르면 암 종류별로는 위암이 전체의 20.2%로 가장 많았고, 다음은 폐암, 간암, 대장암, 유방암, 갑상선암 등의 순이었다. 남자는 위암, 폐암, 간암, 대장암 순이었고, 여자의 경우는 유방암, 위암, 대장암, 갑상선암, 자궁경부암 순으로 암 환자가 발생하는 것으로 나타났다(1). 특히 연령별로 구분해 보면 남자는 모든 연령별에서도 위암이 1위로 나타났고, 여자는 15~34세에서 갑상선암, 35~64세에서 유방암, 65세 이상에서는 위암이 가장 많아 연령별로 큰 차이를 보였으며, 성별 비율

에서는 남자가 여자보다 1.3배 1의 비율로 암 발생빈도가 더 높게 나타났다. 위암의 경우 구미 선진국에서는 감소되고 있는 추세이나, 아직도 한국, 일본 등에서는 가장 많은 빈도를 차지하고 있다. 한편, 대장 및 직장암은 동물성 지방질과 육식을 좋아하는 미국이나 유럽에서 많이 발생하며, 특히 미국에서는 발병률과 사망률이 모두 두번째로 높은 암이다. 그러나, 최근의 조사에서 한국이나 일본을 비롯한 아시아 각국에서는 서구에 비하여 발병률이 낮았으나 식생활이 서구화 되어감에 따라 예전에 비하여 대장, 직장암의 발병률이 꾸준히 증가되어 가고 있는 추세이다(1).

최근까지의 항암제 연구는 종양세포처럼 세포 분열이旺盛한 조직에 대한 세포 독성을 근거로 하기 때문에 세포분열이 빠른 피부, 점막 및 골수 같은 정상조직 세포에서도 독성을 나타내게 됨으로서 항암제 치료에 따른 부작용이 가장 큰 문제점으로 지적되고 있다(2). 따라서 효과적인 항암제 개

[†]Corresponding author. E-mail: choys@daunet.donga.ac.kr
Phone: 82-51-200-7586, Fax: 82-51-200-7505

발을 위해서는 정상세포에 대해 독성이 적으면서 종양세포에만 특이적으로 작용하는 항암 활성 물질의 개발이 필요하다. 또한, 현재까지 진행되고 있는 항암제 개발의 대부분은 미생물의 2차 대사산물 및 생약제로부터 물질 추출과 정제에 의존하고 있는 실정이다(3,4). 따라서, 독성이 낮으면서 비교적 안전성이 확보된 우리의 일상적인 식생활에 밀접한 소재로부터 쉽게 접근이 가능하면서도 탁월한 항종양효과를 나타내고 있는 버섯류에 관심이 증대되고 있다(5-7). 버섯은 지구상에 널리 자생하며 특유의 맛과 향을 가진 천연자원으로 다양한 약리적 효과를 가진 생리활성의 보고로 알려져 있다(5-7). 일부 버섯에서 항암작용, 항산화작용, 항당뇨작용, 항콜레스테롤 작용이 보고되어 있어, 차가버섯의 기능성에 관해서도 많은 연구자들의 관심이 증대되고 있는 실정이다(8-11).

차가버섯은 학명이 *Inonotus obliquus*로 러시아를 비롯한 한랭지역에서 자생하는 자작나무, 오리나무, 물푸레나무 등에 기생하는 균핵으로 표면은 검고 내부는 황갈색을 띠고 있으며, 대부분 직경이 10~20 cm 정도의 크기로 주로 약용으로 이용되고 있다(12,13). 차가버섯은 다른 약용버섯과 마찬가지로 다당류, 폴리페놀, 옥시페놀 카본산, 리그닌, 셀유소, 유기산, 미네랄(다량의 망간 함유)을 많이 함유하고 있어 다양한 생리활성을 가진 것으로 보고되고 있다(13,14). Bulatov 등(15)이 차가버섯 추출물에 항종양활성이 있다는 보고를 시작으로 이들 성분의 팀색과 다양한 종양세포를 대상으로 항암작용에 관한 연구가 꾸준히 이루어지고 있다. 이러한 항종양 활성 성분으로는 lanosterol, ergosterol과 같은 sterol류와 inotodiol, butulin과 같은 triterpen류가 분리되었다(13,16). 또한, inotodiol, lanosterol, trametenolic acid 등의 성분은 유방암 세포주인 MCF-7 및 혈액암 세포주인 P388에 대해서 세포독성을 나타낸다고 보고된 바 있다(16,17). Ham 등(7)도 차가버섯에서 얻은 활성분획 중에서 특히 에틸아세테이트 분획물에서 폐암세포주 A549, 유방암세포주 MCF-7 및 위암세포주 AGS의 세포 성장을 억제시킨다고 하였다. 차가버섯을 비롯한 대부분 버섯류의 생리활성성분 중에서 주로 항암작용은 수용성 추출물 중에 함유되어 있는 단백다당체에 기인하는 것으로 알려져 있는데(18), 기능성식품을 개발하는데 있어서 경제성을 고려해 볼 때 수용성 추출물이 가장 바람직한 것으로 생각된다. 그러나, 차가버섯의 항종양 활성은 에틸아세테이트 분획물에서 강하게 나타났으며, 또한 수용성 분획에서는 상대적으로 종양세포 성장 억제작용이 약하면서도 정상세포에 대해서도 성장 억제작용이 있는 것으로 보고되어 이러한 문제점을 개선할 수 있는 연구가 필수적이라 사료된다(7). 한편, 녹차의 가용성 성분중 15~20% 을 차지하는 (-)-epigallo catechin(EC), (+)-gallocatechin, (-)-epicatechingallate 및 (-)-epigallo catechin-3-gallate (EGCg) 등으로 구성된 polyphenol 화합물이 종양세포에 대해 성장 억제작용을 나타내는 화학적 작용 기전이 알려져

있다(19,20). 따라서, 본 연구에서는 항종양 활성이 강한 기능성식품을 개발하기 위해, 차가버섯 단백다당체의 생리활성을 더욱 증진시키기 위한 방법으로 amylase와 protease 활성이 강한 *Bacillus* 및 *Aspergillus* 속 균주를 배양시킨 대두 발효원을 차가버섯 및 녹차 분말과 함께 혼합하여 일정기간 발효시킨 후 수용성 추출물을 얻어 위암과 대장암에 대한 항암효과를 검토하기 위하여 인체유래 위암 세포주 AGS(gastric cancer cell)와 대장암 세포주 HCT-15(colon cancer cell)의 생육에 미치는 항종양효과를 검토하였다.

재료 및 방법

실험재료의 조제

차가버섯 수용성 추출물중의 단백다당체의 생리활성을 더욱 증진시키기 위하여 본 연구자들에 의하여 분리 보관된 protease와 amylase 활성이 강한 *Bacillus* 속 및 *Aspergillus* 속 균주를 배양시킨 후 살균한 대두 발효기질에 접종하여 37°C에서 7일간 발효시켜 미생물원을 얻었다. 차가버섯 분말과 녹차분말을 10:1 비율(w/w)로 혼합하고, 여기에 대두 발효 미생물원을 다시 10:3 비율(w/w)로 혼합시켜 습도 50~60%, 온도 30~37°C에서 발효시켜 30일 정도 경과하였을 때 60~70°C로 속성 전조시킨 후 분말화 시켰다. 이와 같은 방법으로 조제된 차가버섯 조성물을 03032로 명명하였고, 5 g/100 mL(5%, w/v) 농도로 증류수에 용해하여 80~100°C에서 3시간동안 추출하였다. 추출물을 다시 Whatman filter paper(No. 2)로 여과시킨 후 동결건조시켜 얻은 분말을 시료로 사용하였다. 본 실험에 사용한 차가버섯은 (주)홍재그린에서 제공받아 사용하였고, 녹차분말은 시판용 가루설록차(태평양, 제주)를 사용하였다.

총당 측정

차가버섯 조성물의 총당은 phenol-sulfuric acid 법으로 측정하였다. 즉 시험판에 차가버섯 조성물 2% 추출물을 각각 0.5 mL씩 분주하고, 동시에 표준용액을 0.5 mL씩 각각 분주하여 5% 정제피놀수를 0.5 mL 첨가해 잘 혼합시키고, 여기에 농황산 2.5 mL를 첨가하여 발열반응에 의하여 발색시켜 20분경과 후 490 nm에서 흡광도를 측정하여 검량선으로부터 총당 함량을 계산하였다.

다당체 확인

차가버섯 조성물의 다당체를 확인하기 위하여 박층 크로마토그래피법을 사용하였다. 박층 크로마토그래피는 silica gel plate(25 DC-Alufolien Kieselgel 60, Merck Co., Ltd.) 상에 차가버섯과 차가버섯 조성물(03032)의 5% 수용성 추출물을 spot하여 전개용매인 1-butanol/ethanol/water(5:5:3)로 전개시켰다. 전개가 완료된 plate를 완전히 전조시킨 후 methanol에 3% 황산을 첨가하여 만든 발색용액을 살포한 후 100°C 이상의 hot plate 위에 놓고 10분간 가열하였다. 이때

사용한 표준물질은 standard malto-oligosaccharide(G1-G7)으로써 G1, G2, G3, G4, G5, G6 및 G7은 각각 glucose, maltose, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose, maltohexaose 및 maltoheptaose이었다.

정상세포 및 종양세포 배양

인체 위암 세포주인 AGS, 대장암 세포주인 HCT-15 및 정상 세포주인 NIH3T3은 Korea Cell Line Bank(KCLB, Seoul, Korea)에서 분양 받아 계대 배양하면서 사용하였다. 세포 배양에는 RPMI 1640(Invitrogen Co., USA)을 사용하였으며, 그 외 PBS(phosphate buffered saline, pH 7.2), trypsin-EDTA(Grand Island Biological Co., USA) 등을 사용하였다. 종양세포와 대조군으로 사용한 NIH3T3 세포 배양은 전보의 방법(21,22)에 따라 10% FBS, 0.1 mg/mL penicillin-G, 0.01 mg/mL streptomycin을 함유한 RPMI 1640 복합배지에 37°C, 5% CO₂, 95% 공기의 조건하에서 10 cm Falcon dish로 실험에 제공될 세포수가 되기까지 약 1주일간 배양하였으며, 이때 배지는 2~3일에 한번씩 교환하였다. 실험 개시전 세포를 배양기에 2×10⁵개씩 접종하여 세포성장이 배양기 표면의 80~90% 정도 되었을 때 trypsin을 사용하여 세포를 dish에서 분리하고 일정량의 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM; Bio Whittaker Co., USA)으로 세포를 2회 씻어준 다음 회석하여 본 실험에 사용하였다. 차가버섯 조성물의 5% 추출물을 동결건조시켜 얻은 분말을 RPMI 1640에 0.16~4.0 mg/mL 농도가 되도록 혼탁시킨 후 0.45 μm 필터(Millex-HD, Millipore Co., USA)로 각각 제균시켜 세포배양에 첨가하였다.

MTT 분석에 의한 세포 생존율 측정

MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)는 살아있는 세포의 미토콘드리아 내막에 존재하는 oxidoreductase의 효소 작용에 의해 환원되어 보라색의 불용성 formazan을 생성하고, 이를 용해액의 발색정도를 흡광도로 측정함으로 살아있는 세포수를 계측하는데 이용되는 방법이다(23). 본 실험에서는 먼저 차가버섯 조성물의 수용성 추출물에 의한 농도 의존적 세포 생육 저해 실험을 MTT assay로 분석하였다. 종양세포 및 정상세포를 2×10⁴cells/mL 농도가 되도록 조절한 후 96 well plate에 100 μL씩 분주하고 이것을 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 6시간 배양하여 세포를 부착시킨 후 각각 차가버섯 조성물의 추출물을 0.16, 0.4, 0.8, 1.6, 4.0 mg/mL씩 되도록 첨가하였다. 이것을 96시간 동안 배양시킨 후, MTT(Sigma chemical Co., Louis, Mo., USA) 용액을 각 well당 10 μL씩 넣고 세포 배양기에서 4시간 동안 반응시켰다. MTT 용액을 제거한 후, 0.04 N HCl이 함유된 isopropanol을 첨가하여 각 세포를 용해시킨 후, ELISA-reader(Bio-Rad Model 550 Microplate Reader, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 세포의 시료 무첨가군을 100%로 하여 상대적인 세포 성장을 측정하였다.

세포생육 저해실험(cytotoxic test)

AGS와 HCT-15 및 NIH3T3 세포를 2×10⁶ cells/mL 되도록 조절하여 24 well tissue culture dish에 분주하고 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 6시간 동안 배양하여 세포를 dish 바닥에 부착시킨 후, 차가버섯 조성물의 추출물 0.16, 0.4, 0.8, 1.6, 4.0 mg/mL을 각각 첨가하였다. 이를 24시간 간격으로 4일간 배양하면서 세포형태 관찰 및 세포수를 측정하였으며, 이 때 모든 세포는 3회 반복 측정하였다. 배양세포에 1 mL의 0.05% Trypsin-EDTA(Grand Island Biological Co., USA)를 처리하여 세포를 dish 바닥에서 부유시킨 후 10 mL의 PBS buffer로 씻어 원심분리하고 상층액을 제거한 후 PBS buffer에 재부유된 세포 50 μL를 0.4% trypan blue stain(Gibco, USA) 50 μL에 넣어 섞고, 1분 후 haematometer로 세포수를 측정하였다. 각 세포의 형태 변화의 관찰을 위한 카메라 촬영은 Culture microscopes(CKX41, Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan)에 디지털 카메라를 장착하여 200배 배율로 확대하여 촬영하였다.

통계처리

실험분석 결과는 평균과 표준오차로 표시하였으며, 버섯 추출물 무첨가군과 추출물 첨가군과의 평균값의 차이는 Student's t-test를 이용하여 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

차가버섯 조성물의 총당 함량 및 다당체 확인

차가버섯 조성물의 5% 수용성 추출물의 당 함량은 7.81 mg/mL로 나타났으며, 총당은 39.1%를 차지하였다(Table 1). Song과 Oh(24)는 상황버섯으로부터 수용성 열수 추출의 최적조건을 검토하기 위하여 추출 온도, 시간, 수율을 조사한 결과 시료 5%를 이용하여 80~100°C에서 3시간 추출에서 가장 높은 수율을 얻었다고 하였다. 본 실험에서도 이와 동일한 조건으로 처리하여 얻은 결과로서 상황버섯의 다당체 80.9%에 비해서는 낮았지만 일반적인 식용버섯보다 높은 것으로 나타났다(25). 또한, 차가버섯에서 추출된 수용성 및 불용성 polysaccharide는 각각 17.7% 및 13.3%로 나타났다고 하였다(26). 차가버섯 추출물의 다당체는 박층 크로마토그래피법으로 확인한 결과 대부분 분자량이 상당히 큰 고분자 당으로 확인되었으나, 차가버섯 조성물의 추출물 다당체는 G2과 G6 사이에 저분자 당도 나타났다(Fig. 1). 일반적으로 버섯유래의 항암효과를 갖는 다당체는 β-(1,3) 결합에

Table 1. Carbohydrate concentration of *Inonotus obliquus* composition

	Carbohydrate concentration
5% water-extract (mg/mL)	7.81
Total (%)	39.05

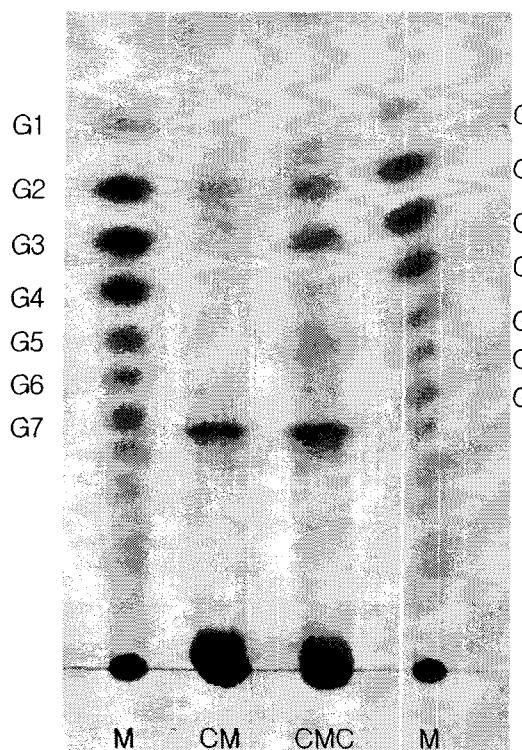


Fig. 1. Thin-layer chromatogram of 5% water extract from Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) compositions.

Standards were malto-oligosaccharides consisted of G1 (glucose), G2 (maltose), G3 (maltotriose), G4 (maltotetraose), G5 (malto-pentaose), G6 (maltohexaose) and G7 (maltoheptaose). CM: Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*), CMC: Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) compositions.

β -(1,6) 결가지를 가지는 비교적 고분자 glucan으로 수용성 추출물중에 존재하는 것으로 밝혀졌다(26).

MTT 분석에 의한 세포 생존율

NIH3T3, HCT-15 및 AGS 세포주에서 차가버섯 조성물에 의한 세포생육 억제 효과를 조사하기 위해 MTT assay를 시행하였다. Fig. 2에서와 같이 차가버섯 조성물의 추출물을

0.16~1.6 mg/mL 농도로 첨가하였을 때 NIH3T3 세포는 80%의 생존율을 보였으나, 4.0 mg/mL 첨가에서는 71%의 생존율을 보여 본 실험에서 가장 적절한 항종양 활성 농도를 1.60 mg/mL 이하로 설정하였다. 한편, HCT-15 종양세포에 대해서는 0.16, 0.4, 0.8, 1.6, 4.0 mg/mL 농도에서 각각 83, 68, 42, 41, 30%의 생존율을 나타내었고, AGS 종양세포에 대해서는 98, 86, 73, 47, 32%의 생존율을 나타내었다(Fig. 2). 이때 위상차 현미경을 이용하여 차가버섯 조성물의 추출물 첨가에 의한 세포형태 변화의 세포 사진은 Fig. 3~5와 같으며, 특히 HCT-15와 AGS 세포의 경우 추출물 첨가농도가 높을 수록 세포사멸 정도가 많아지는 것으로 나타났다. Hwang 등(27)은 대장암 세포 HT-29와 Caco-2에 표고버섯과 새송이 버섯 수용성 추출물 6 mg/mL 또는 12 mg/mL에서 유의적인 세포수 감소 효과가 있었으나, 위암 세포주 SNU484에 대해서는 이들 농도에서 별다른 영향을 미치지 못하였다고 하였다. 또한, 이들 버섯 추출물의 처리시간에 따른 실험에서 72시간 배양까지는 세포수 감소가 없다가 96시간 배양에 표고버섯 추출물 24 mg/mL과 새송이버섯 추출물 48 mg/mL 첨가에서 각각 40%와 50% 수준으로 감소한 것으로 보고하였다. 본 실험에서 차가버섯 조성물의 추출물 첨가량이 이들 실험에 사용한 농도보다 훨씬 낮음에도 불구하고 효과면에서는 비슷하여 버섯종류의 차이에 의한 영향이 큰 것으로 사료된다. 본 실험의 결과로 차가버섯 조성물의 추출물 농도가 1.6 mg/mL 이하에서는 정상세포인 NIH3T3 세포의 생육에는 큰 영향을 미치지 않았고 위암세포와 대장암 세포에는 특이적으로 세포 생육을 크게 저해시킴으로써 항암작용이 있는 것을 알 수 있었다(Fig. 3~5).

정상세포 및 종양세포의 세포수 측정에 의한 세포 생존율

차가버섯 조성물의 추출물을 1.6 mg/mL 농도로 각 세포에 첨가하여 최대 4일간 배양하면서 세포수를 측정하여 생존율을 나타낸 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 차가버섯 조성물의 추출물을 첨가하지 않은 각각의 무첨가군을 100%로 하여

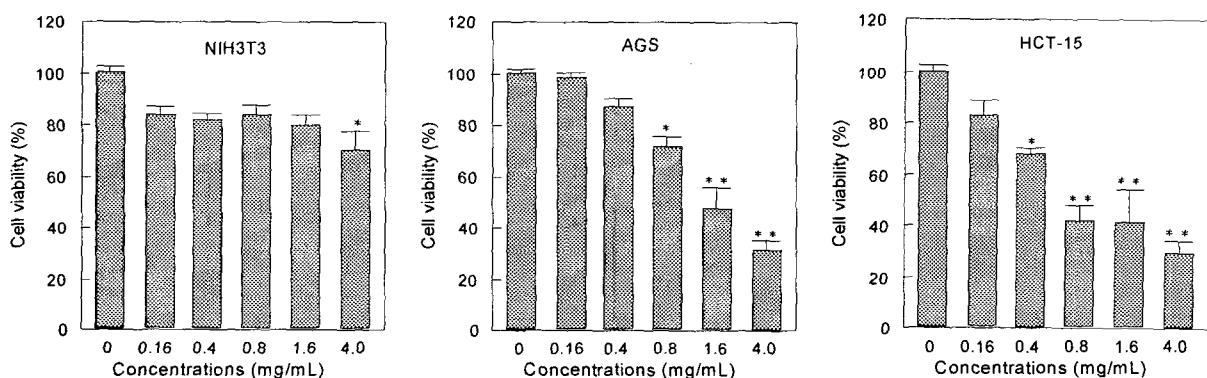


Fig. 2. MTT assay of the water-extract from Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) compositions in NIH3T3 mouse normal fibroblast, HCT-15 colon carcinoma and AGS gastric carcinoma cells.

Each cell was cultured in medium prepared with different concentrations (0~4 mg/mL) of the water-extract from Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) compositions for 4 days. Values represent means \pm SE. Asterisk means a significant difference from untreated group determined by Student's t-test: * p <0.05, ** p <0.01.

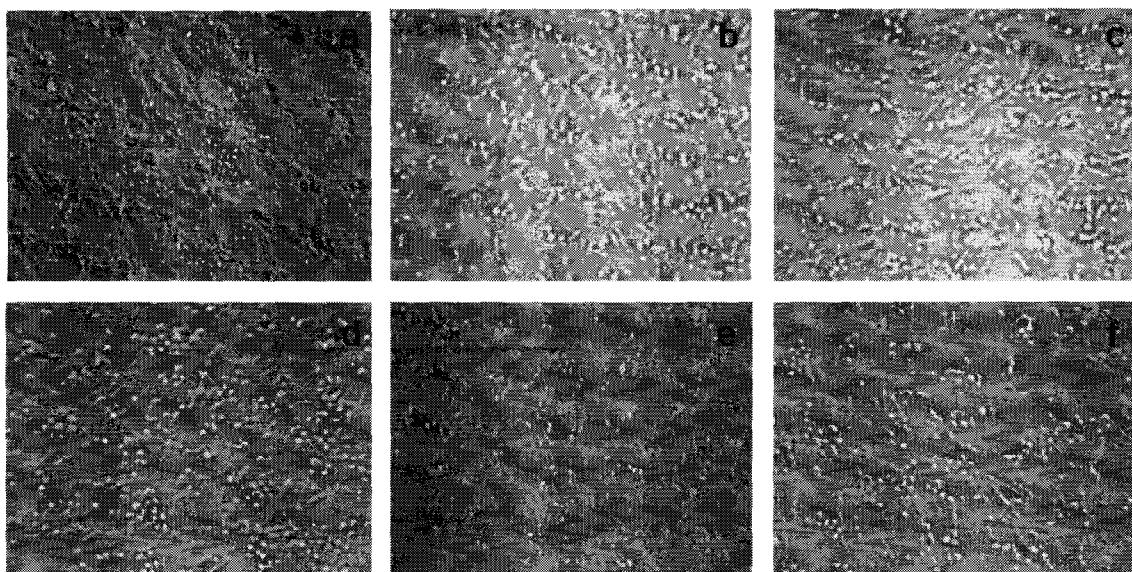


Fig. 3. Morphologic observations of NIH3T3 mouse normal fibroblast cells were treated with water-extract from Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) compositions.

NIH3T3 cells were cultured in medium prepared with different concentrations (0~4 mg/mL) of the water-extract from Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) compositions for 4 days. a: 0, b: 0.16, c: 0.4, d: 0.8, e: 1.6, f: 4.0 (mg/mL).

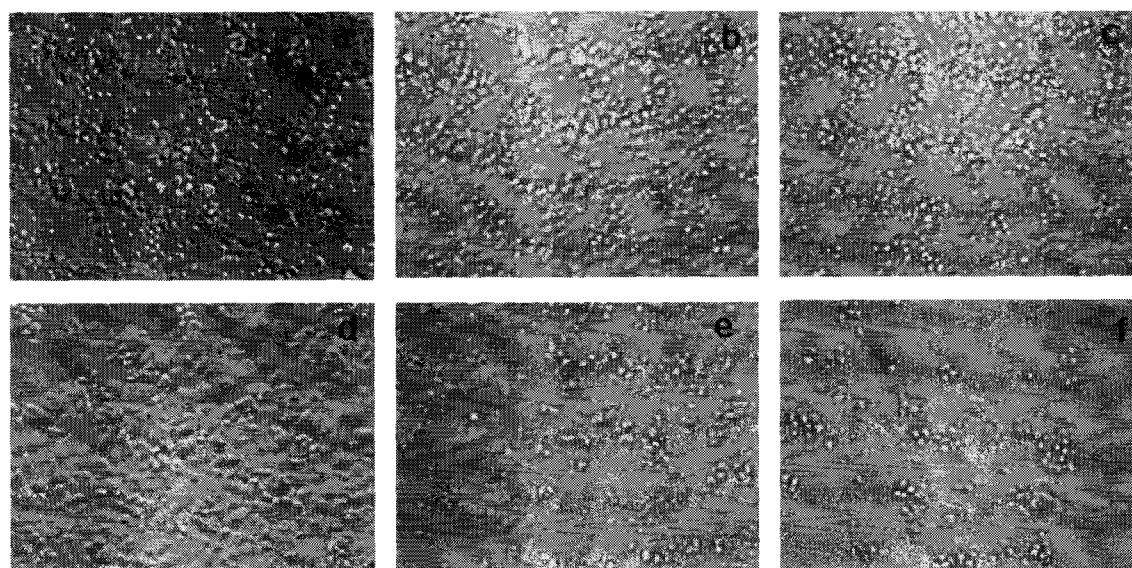


Fig. 4. Morphologic observations of AGS gastric carcinoma cells were treated with water-extract from Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) compositions.

AGS cells were cultured in medium prepared with different concentrations (0~4 mg/mL) of the water-extract from Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) compositions for 4 days. a: 0, b: 0.16, c: 0.4, d: 0.8, e: 1.6, f: 4.0 (mg/mL).

상대치로 나타내었을 때 정상세포주 NIH3T3은 96시간까지 배양에서도 80% 이상의 높은 생존율이 나타나 정상세포에는 거의 독성이 없는 것으로 나타났다(Fig. 6). 그러나, 동일 농도에서 위암 세포주 AGS는 47%의 세포 생존율과 대장암 세포주 HCT-15의 경우는 42%의 세포 생존율을 보여, 차가버섯 조성물의 추출물이 종양세포 억제 효과(HCT-15: 53% 및 AGS: 58%)가 있는 것으로 나타났다(Fig. 6). 이러한 결과는 차가버섯의 생리활성 물질중에서 특히 다당체인 xylogalactoglucomannan에 의한 항암작용이 있다는 결과를 고려해 볼

때 차가버섯 추출물의 총당 함량이 상당히 높았다는 것과 상관관계를 유추할 수 있다(17). Ham 등(7)은 차가버섯 분획물을 얻어 위암세포주 AGS의 성장저해 효과를 검토한 결과, 저분자 물질, 물분획물 및 수용성 다당체의 4.0 mg/mL 첨가농도에서 각각 57.9, 59.6 및 61.4%의 세포 성장 억제효과를 보고 하였다. 이들 분획물은 인체 정상 신장세포 293에 대한 세포 생육을 40% 정도까지 억제시킨 것으로 나타나 정상세포에 대해서도 상당한 세포독성이 있음을 제시하였다. 그러나, 위암 세포주 생육에 미치는 효과는 본 연구 결과와 비슷

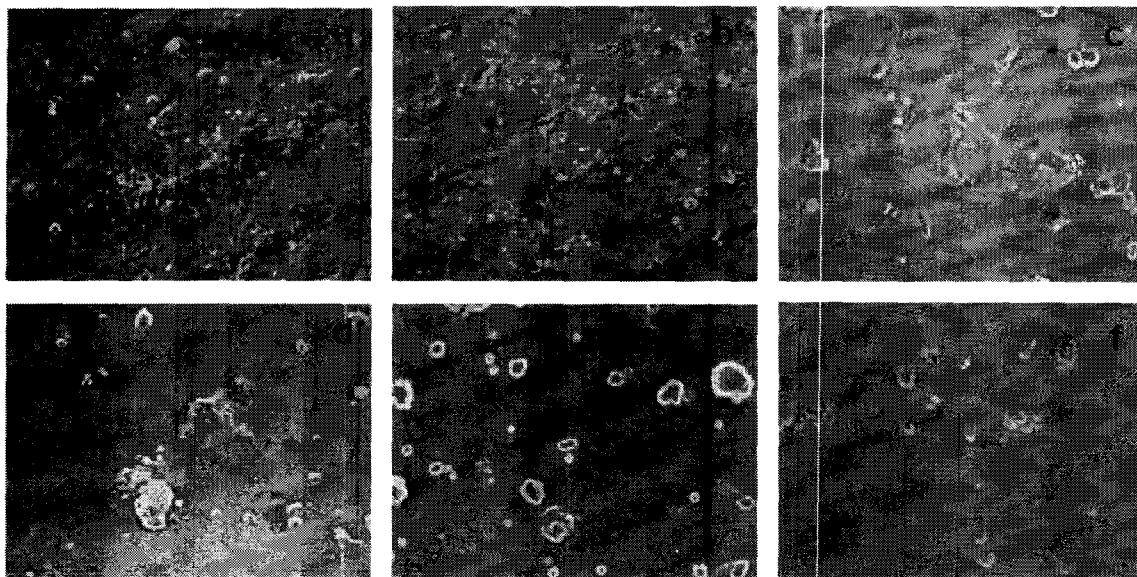


Fig. 5. Morphologic observations of HCT-15 colon carcinoma cells were treated with water-extract from Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) compositions.

HCT-15 cells were cultured in medium prepared with different concentrations (0~4 mg/mL) of the water-extract from Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) compositions for 4 days. a: 0, b: 0.16, c: 0.4, d: 0.8, e: 1.6, f: 4.0 (mg/mL).

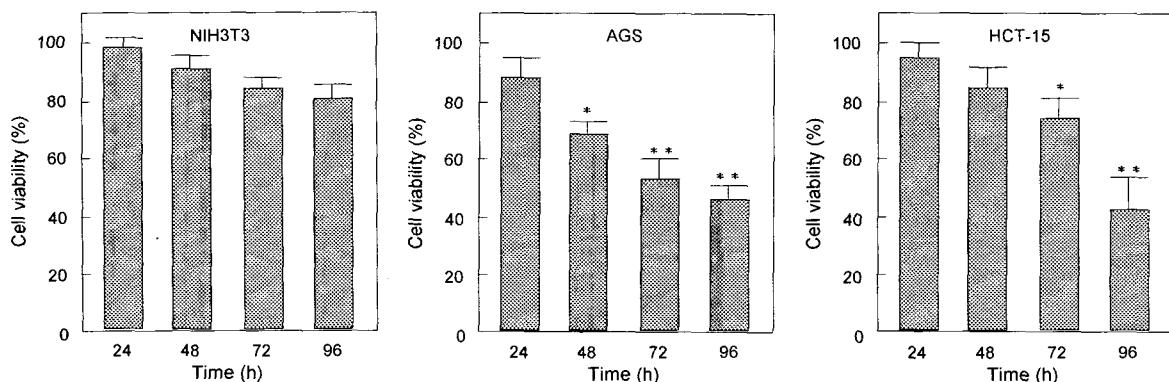


Fig. 6. Inhibitory effects of water-extract (1.6 mg/mL) from Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) compositions on the growth of NIH3T3 mouse normal fibroblast, HCT-15 colon carcinoma and AGS gastric carcinoma cells for 1 and 4 days.

Viable cells were counted by the trypan blue dye exclusion test, and represents an average of triplicate measurements.

Values represent means \pm SE. Asterisk means a significant difference from untreated group determined by Student's t-test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

하였지만 Ham 등(7)이 사용한 차가버섯 추출물 농도는 본 연구에서 사용한 농도보다 1.5배 많았으며, 정상세포에 대해서도 본 연구결과보다 더 높은 독성을 나타내었다. 이러한 차이는 소량의 녹차분말 첨가 또는 발효원 첨가로 인한 차가버섯 유래의 단백다당체 분해에 의해 생성된 물질의 영향을 받은 것으로 사료되나, 정확한 실험 내용에 대해서는 차후 보다 자세한 검토가 있어야 할 것으로 여겨진다.

한편, 차가버섯 조성물 추출물 1.6 mg/mL의 첨가 또는 무첨가로 정상세포 및 종양 세포주를 96시간 배양하면서 경시적으로 세포형태의 변화 정도를 현미경상으로 관찰한 결과에서도 종양 세포주 AGS 및 HCT-15의 생존은 차가버섯 조성물의 추출물 첨가 72~96시간째에 각각의 무첨가 세포 배양에 비해서 상당한 세포사멸이 일어난 것으로 확인되었다.

다. 최근 국내산 버섯을 소재로 하여 항종양 활성을 가지는 성분 탐색에 관한 다수의 연구에서 대부분 항종양 활성을 버섯 자실체 또는 균사체 배양에서 얻어지는 다당류에 기인하는 것으로 보고되고 있다(18,28). 표고버섯 자실체에서 순수 분리된 lentinan 성분이 실험쥐에 sarcoma-180으로 유발시킨 고형암에 대해 강한 항암작용을 나타내었고(29), 차가버섯 추출물 다당류에서도 인간 폐암세포주 A549 및 유방암 세포주 MCF-7에 대하여 비교적 높은 암세포 성장 억제효과를 나타내었다고 보고하였다(16). 이러한 버섯 다당체의 항종양 활성을 종양세포를 직접 공격하지 않고 숙주의 면역계에 작용하여 생체방어력 증강에 의한 것으로 시사되고 있다. 또한, 차가버섯의 inotodiol, lanosterol, ergosterol, butulin과 같은 triterpene류 성분이 유방암 세포주인 MCF-7 및 혈액

암 세포주인 P388에 대해서 세포독성을 나타낸다고 보고한 바 있다(16). 따라서, 본 실험에서 차가버섯 조성물이 정상세포에는 크게 영향을 미치지 않고 위암과 대장암 세포 생육을 저해시키는 결과를 근거로 종양 유발 동물실험에서도 유사한 결과가 얻어질 수 있는지 *in vivo* 검토가 있어야 할 것으로 사료된다.

이상의 실험 결과로부터 차가버섯 조성물 유래의 수용성 추출물은 정상세포의 세포 생육에는 크게 영향을 미치지 않으면서도 위암 세포와 대장암 세포의 생육을 크게 저해시킴으로써 새로운 암예방 및 항암 식·의품의 소재로서의 개발 가능성을 제시하게 되었다.

요 약

녹차분말을 포함하는 차가버섯 조성물의 수용성 추출물에 의한 인체 위암 세포 AGS 및 대장암 세포 HCT-15, 그리고 마우스 정상세포 NIH3T3 fibroblast의 세포생육에 미치는 효과를 세포수 측정방법과 MTT assay 방법으로 측정하였다. 차가버섯 조성물의 수용성 추출물은 인체 대장암 세포 주 HCT-15와 위암 세포주 AGS의 생육을 억제하였다. 그러나 동일한 실험조건하에서 마우스 정상 세포주 NIH3T3은 80% 이상의 생존율을 나타내었다. 본 연구의 결과로 차가버섯 조성물의 수용성 추출물은 정상세포에는 독성을 나타내지 않으면서 위암 및 대장암 세포에는 높은 생육억제 효과를 나타낼 수 있었다.

문 헌

- Korean national cancer center. 2002. Annual report on the cause of cancer statistics.
- Giampient A. 1981. Drug-mediated increase of tumor immunogenicity *in vivo* for a new approach to experimental cancer immunotherapy. *Cancer Res* 41: 681-687.
- Cho KH, Ham SH, Lim JK, Shon YH, Lee YT, Nam KS. 1999. Antitumor activity of gamdutang aqua-acu-puncture solution. *Korean J Life Sci* 9: 677-683.
- Liu WK, Xu SX, Che CT. 2000. Anti-proliferative effect of ginseng saponins on human prostate cancer cell line. *Life Sci* 67: 1297-1306.
- Ng ML, Yap AT. 2002. Inhibition of human colon carcinoma development by lentinan from shiitake mushroom (*Lentinus edodes*). *J Altern Complement Med* 8: 581-589.
- Lee IS, Nishikawa A. 2003. *Polyzillus multiplex*, a Korean wild mushroom, as a potent chemopreventive agent against stomach cancer. *Life Sci* 73: 3225-3234.
- Ham SS, Oh SW, Kim YK, Shin KS, Chang KY, Chung GH. 2003. Antimutagenic and cytotoxic effects of ethanol extract from the *Inonotus obliquus*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 1088-1094.
- Konno S, Tortorellis DG, Fullerton SA, Samadi AA, Hettiarachchi J, Tazaki H. 2001. A possible hypoglycaemic effect of Maitake mushroom on type 2 diabetic patients. *Diabetic Medicine* 18: 1010-1011.
- Bobek P, Ozdin L, Kajaba I. 1997. Dose-dependent hypocholesterolemic effect of oyster mushroom (*Pleurotus os-*

- treatus*) in rats. *Physiol Res* 47: 327-329.
- Kim BK, Shin GG, Jeong BS, Cha JY. 2001. Cholesterol-lowering effect of mushrooms powder in hyperlipidemic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 510-515.
 - Cha JY, Jeon BS, Park JW, Shin GG, Bae DW, Kim HK, Kim BK. 2003. Hypoglycemic effect of mushroom fermented milk in streptozotocin induced diabetic rats. Abstract of the 15th Annual Meeting of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology. Seoul, Korea. p 333.
 - Kier L. 1961. Triterpenes of *Poria obliqua*. *J Pharm Sci* 50: 471-474.
 - Shivrina AN. 1967. Chemical characteristics of compounds extracted from *Inonotus obliquus*. *Chem Abstr* 66: 17271-17279.
 - Kahlos K, Hiltunen R. 1983. Identification of some lanostane type triterpenes from *Inonotus obliquus*. *Acta Pharm Fenn* 92: 220-224.
 - Bulatov PK, Berezina MP, Jakimov PA. 1959. Tsaga ii ee letsebnoje primenie pri rake IV. Stadii, Leningrad. p 326.
 - Kahlos K, Kangas L, Hitunen R. 1987. Antitumor activity of some compounds and fractions from an n-hexane extract of *Inonotus obliquus*. *Acta Pharm Fenn* 96: 33-40.
 - Mizuno T, Zhuang C, Abe K, Okamoto H, Kiho T, Ukai S, Leclerc S, Meijer L. 1999. Antitumor and hypohlycemic activities of polysaccharides from the Sclerotia and Mycelia of *Inonotus obliquus* (Pers.: Fe.) Pil. (Aphyllophoromycetidae). *Int J Med Mushrooms* 1: 301-316.
 - Kim SW. 1998. Studies on anti-microbial and anti-cancer function of polysaccharide extracted *Ganoderma lucidum*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 1183-1188.
 - Murakami C, Hirakawa Y, Inui H, Nakano Y. 2002. Effect of tea catechins on cellular lipid peroxidation and cytotoxicity in HepG2 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 66: 1559-1562.
 - Vernon ES, Gary J. 2000. Comparative chemopreventive mechanism of green tea, black tea and selected polyphenol extracts measured by *in vitro* bioassay. *Carcinogenesis* 21: 63-67.
 - Yotsuji H, Yanagita T, Yamamoto K, Ogawa Y, Cha JY, Mori Y. 1997. Inhibitory effects of Oren-Gedoku-to and its components on cholestryler ester synthesis in cultured human hepatocyte HepG2 cells: Evidence from the cultured HepG2 cells and *in vitro* assay ACAT. *Planta Med* 63: 141-145.
 - Yanagita T, Hara E, Yotsuji H, Rahman SM, Han SY, Cha JY, Yamamoto K. 1999. NK-104, a potent new 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, enhances posttranslational catabolism of apolipoprotein B-100 and inhibits secretion of apolipoprotein B-100 and triacylglycerols from HepG2 cells. *Current Therapeutic Res* 60: 423-434.
 - Dnizor FD, Rita L. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 22: 271-277.
 - Song HN, Oh SW. 2002. Optimization of extraction and clarification condition for preparation of liquid extract tea from artificially cultivated *Phellinus linteus*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 636-641.
 - Watanabe T, Suzuki A, Hagiwara K, Kemmoku A. 2002. Food composition table for calculation of nutrient contents considering changes in weight induced by cooking. *J Jpn Soc Nutr Food Sci* 55: 165-176.
 - Wasser SP. 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol* 60: 258-274.

27. Hwang YJ, Nam HK, Chang MJ, Noh GW, Kim SH. 2003. Effect of *Lentinus edodes* and *Pleurotus eryngii* extracts on proliferation and apoptosis in human colon cancer cell lines. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 217-222.
28. Li X, Rong J, Wu M, Zeng X. 2003. Anti-tumor effect of polysaccharide from *Grifola frondosa* and its influence on immunological function. *Zhong Yao Cai* 26: 31-32.
29. Goro Cjnuli H, Yukiko Y, Yoshiko A, Fumoko F. 1970. Fractionation and purification of the polysaccharides with masked antitumor activity, especially lentinan from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (an edible mushroom). *Cancer Res* 30: 2776-2781.

(2003년 12월 27일 접수; 2004년 3월 31일 채택)