

발효 차가버섯 추출물이 인체 종양세포주 증식에 미치는 영향

차재영¹ · 박상현 · 허진선 · 조영수*

동아대학교 응용생명공학부, ¹대선주조(주) 연구소

Received March 27, 2007 / Accepted April 30, 2007

Effects of Water Extract from Fermented *Chaga* Mushroom (*Inonotus obliquus*) on the Proliferation of Human Cancer Cell Lines. Jae Young Cha¹, Sang Hyun Park, Jin Sun Heo and Young Su Cho*. Dept. of Biotechnology, College of Natural Resources and Life Science, Dong-A University, Busan 604-714, Korea, ¹Alcoholic Beverage Research Institute, Daesun Distilling Co., Ltd. Busan – This study was performed to investigate the effect of the water-extract from non-fermented or fermented *Chaga* mushrooms (*Inonotus obliquus*) on the proliferation and apoptosis of the NIH3T3 mouse normal fibroblast cells and various human cancer cell lines including HCT-15 human colon carcinoma, AGS human gastric carcinoma, MCF-7 human breast adenocarcinoma, Hep3B human hepatocellular carcinoma and HeLa human cervical carcinoma using MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay and DNA fragmentation. In an anti-cancer test using various human cancer cells, fermented *Chaga* mushroom extract showed higher antiproliferating effect than that of non-fermented *Chaga* mushroom extract. Mouse normal NIH3T3 cells were exhibited 80% above survival under fermented or non-fermented *Chaga* mushroom extract of various concentrations (0, 0.5 and 1 mg/ml). Fermented *Chaga* mushroom extract significantly inhibited cell growth on HCT-15 cells in a dose-dependent manner. HCT-15 cells treated with non-fermented or fermented *Chaga* mushrooms extract produced a distinct oligonucleosomal ladder with different sizes of DNA fragments, a typical characteristic of cells undergoing apoptosis. These results suggest that fermented *Chaga* mushroom extract suppresses growth of HCT-15 human colon carcinoma cells through apoptosis.

Key words – *Inonotus obliquus*, NIH3T3, HCT-15, AGS, MCF-7, Hep3B, HeLa

서 론

천연물 유래의 항종양 활성을 가진 생리활성물질 탐색은 선진국을 중심으로 세계 각국에서 이루어지고 있으며, 독성이 낮으면서 비교적 안전성이 확보된 우리의 일상적인 식생활에 밀접한 소재로부터 쉽게 접근이 가능하면서도 탁월한 항종양효과를 나타내고 있는 버섯류에 관심이 증대되고 있다[9,13,19]. 여러 종류의 식물체 중에서도 특히 버섯은 지구상에 널리 자생하며 특유의 맛과 향을 가진 천연자원으로 항암, 항산화, 항당뇨, 항콜레스테롤 작용과 같은 다양한 약리적 효과를 가진 생리활성의 보고로 알려져 있다[2,3,15]. 고등담자균류에 속하는 약용 및 식용버섯 중에서 다당류와 단백질로 구성된 고분자기능성물질을 가진 차가버섯에 관해서도 많은 연구자들의 관심이 증대되고 있는 실정이다[9,12,17].

차가버섯은 학명이 *Inonotus obliquus*로 러시아, 캐나다, 일본 홋카이도와 같은 한랭지역에서 자생하는 자작나무, 오리나무, 물푸레나무 등에 기생하는 균핵으로 표면은 검고 내부는 황갈색을 띄고 있으며, 대부분 직경이 10~20 cm 정도의 크기로 주로 약용으로 이용되고 있다[20]. 차가버섯 수용성

추출물은 검은 황금색을 띄며, 맛과 향기는 거의 없으며, 소화기계 암과 당뇨병에 효험이 있다고 알려져 있다[3-5,9]. 차가버섯은 다른 약용버섯과 마찬가지로 항종양 활성을 나타내는 다당체인 xylogalactoglucan이 알려져 있으며[12,21], 또한 폴리페놀, 옥시페놀 카본산, 리그닌, 섬유소, 유기산, 미네랄 등도 함유하고 있다[5,20]. 차가버섯 자실체로부터 추출된 수용성 및 불용성 다당체는 각각 17.7% 및 13.3%를 차지하고 있는데, 균사체 배양으로부터 얻어진 다당체 보다 항종양 활성이 2~3배 높은 것으로 보고 되었다[21]. 이러한 다당체의 구조는 β -(1,3) 결합 주쇄에 β -(1,6) 결합 곁가지로 구성된 glucan으로 고분자의 다당체에서 항종양 활성이 강하다고 하였다[16,18]. 이 외에도 차가버섯 추출물의 항종양활성은 lanosterol, ergosterol과 같은 sterol류와 inotodiol, butulin과 같은 triterpen류가 분리되었다[20]. 또한, inotodiol, lanosterol, trametenolic acid 등의 성분은 유방암 세포주인 MCF-7 및 혈액암 세포주인 P388에 대해서 세포독성을 나타낸다고 보고 된 바 있다[12,17]. Ham 등[9]도 차가버섯에서 에틸아세테이트 분획물에서 폐암세포주 A549, 유방암세포주 MCF-7 및 위암세포주 AGS의 세포 성장을 억제시킨다고 하였고, Burczyk 등도 차가버섯 추출물 10~2,000 mg/ml 농도에서 자궁경부암 세포 HeLa S3 생육을 억제시킨다고 하였다[1].

한편, 본 연구자들도 여성초를 첨가한 차가버섯 발효조성

*Corresponding author

Tel : +82-51-200-7586, Fax : +82-51-200-7505

E-mail : choys@dau.ac.kr.

물의 수용성 추출물에서도 대장암 세포주 HCT-15 및 위암 세포주 AGS에 세포독성을 나타내는 결과를 보고한 바 있다 [4,6]. 차가버섯 분말을 *Bacillus* sp. WRD-2로 발효시켜 올리고당을 증가시킨 발효 차가버섯이 비발효 차가버섯보다 제1형 streptozotocin-유발 당뇨쥐 및 제2형 Otsuka Long-Evans Tokushima fatty (OLETF) 당뇨쥐에서 항당뇨 효능이 강한 것으로 확인된 바 있다[3,5].

따라서 본 실험에서도 발효 차가버섯의 생리활성작용을 탐색하는 연구의 일환으로 우리나라 성인 남녀에서 주로 발생하는 위암, 대장암, 간암, 유방암, 자궁경부암에 대한 항종양 활성을 검토하기 위하여 동물 정상 세포주 NIH3T3 mouse normal fibroblast cell 뿐만 아니라 인체 종양 세포주 AGS human gastric cancer cell (위암), HCT-15 human colon cancer cell (대장암), Hep3B human hepatoma cancer cell (간암), MCF-7 human breast cancer cell (유방암), HeLa human cervical cancer cell (자궁경부암)을 사용하였다.

재료 및 방법

실험재료의 조제

차가버섯 분말에 *Bacillus* sp. WRD-2를 대두 배양원으로 전배양 시킨 것을 접종시켜 습도 50~60%, 온도 30°C에서 3일 발효시킨 후 70°C로 건조시켜 미세 분말화 시켰다. 조제된 발효 차가버섯 및 비발효 차가버섯 분말을 5 g/100 ml (5%, w/v) 농도로 증류수에 용해하여 끓는 물에서 3시간 동안 추출하였다. 추출물을 다시 Whatman filter paper (No. 2)로 여과시킨 후 동결 건조시켜 얻은 분말을 시료로 사용하였다. 본 실험에 사용한 러시아산 차가버섯은 (주)홍제그린에서 제공받았다.

정상세포 및 종양세포 배양

정상세포주 NIH3T3 (mouse normal fibroblast cell), HCT-15 human colon carcinoma (대장암), 인체 위암 세포주 AGS (human gastric carcinoma), 간암 세포주 Hep3B (human hepatocellular carcinoma), 유방암 세포주 MCF-7 (human breast adenocarcinoma), 자궁경부암 세포주 HeLa (human cervical carcinoma)는 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[4]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 2×10^5 개씩 접종하여 세포성장 이 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 희석하여 본 실험에 사용하였다. 차가버섯 조성물의 5% 추출물을 동결건조 시켜 얻은 분말을 RPMI 1640에 0, 0.5, 1 mg/ml 농도가 되도록 현탁 시킨 후 0.45 µm 필터(Millex-HD, Millipore Co.)로 각각 제균시켜 세포배양에 첨가하였다.

MTT 분석에 의한 세포 생존율 측정

MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (Sigma chemical Co., Louis, Mo., USA)는 살아있는 세포의 미토콘드리아 내막에 존재하는 oxido-reductase의 효소 작용에 의해 환원되어 보라색의 불용성 formazan을 생성하고, 이들 용해액의 발색정도를 흡광도로 측정함으로써 살아있는 세포수를 측정하는데 이용되는 방법이다[7]. 발효 및 비발효 차가버섯 수용성 추출물에 의한 농도 의존적 세포 생존 저해실험을 MTT assay로 분석하였다. 종양세포 및 정상세포를 각각 2×10^4 cells/ml 농도가 되도록 조절한 후 96 well plate에 100 µl씩 분주하고 이것을 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 6시간 배양하여 세포를 부착시킨 후 추출물 농도를 0, 0.5, 1 mg/ml씩 첨가하였다. 이것을 96 시간 동안 배양시킨 후, MTT 용액을 각 well당 10 µl씩 넣고 세포배양기에서 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 무첨가 대조군을 100%로 하여 상대적 인 세포 증식도를 나타내었다.

세포 형태 관찰

각 세포의 형태 변화의 관찰을 위하여 0, 0.5, 1 mg/ml 농도로 첨가하여 96시간 배양한 후 디지털 카메라가 장착된 Culture microscopes (CKX41, Olympus Optical Co., Ltd. Tokyo, Japan)에 200배 배율로 확대하여 촬영하였다.

DNA fragmentation 측정

차가버섯 추출물에 의한 암세포증식 억제효과가 세포사멸 (apoptosis)에 의한 것인지를 측정하기 위하여 각 암세포를 기본 배양액으로 희석하여 1×10^6 cells/dish의 농도로 100 mm dish에 분주하여 상기와 같은 방법으로 96시간 배양하였다. 배양된 암 세포들을 PBS로 2회 가볍게 헹군 다음 세포를 긁고 원심분리 하여 세포를 회수하였다. 회수된 세포에 extraction buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM EDTA,

1% Nonidet P-40) 2 ml를 넣고 저온에서 2시간 동안 추출하였다. 여기에 sodium dodecyl sulfate (SDS) 1% 및 RNase (0.5 mg/ml)를 첨가하여 잘 혼합한 후 37°C에서 2시간 교반하고, proteinase K 0.5 mg/ml를 첨가하여 42°C에서 2시간 다시 반응시켰다. DNA는 phenol-chloroform-isoamylalcohol (25:24:1)을 넣고 잘 추출한 후 원심분리로 DNA가 함유된 상층액을 얻어 0.1배의 3 M sodium acetate와 2.5배의 ethanol을 넣어 DNA pellet을 침전시키고, 다시 70% ethanol로 헹구어 준 다음 건조시켰다. 건조된 DNA pellet은 Tris-EDTA buffer (20 mM Tris, 1 mM EDTA)로 녹인 다음 260 nm 흡광도에서 정량한 후 20 µg DNA를 2% agarose gel에서 전기영동하고 ethidium bromide로 염색하고 탈색하여 DNA fragmentation 정도를 확인하였다[8].

결과 및 고찰

정상세포주의 생육 및 형태변화

발효 및 비발효 차가버섯 추출물을 0.5 및 1 mg/ml 농도로 처리하여 위상차 현미경을 이용하여 NIH3T3 세포의 형태변화를 Fig. 1에 나타내었다. 각 시료를 처리하지 않는 대조군의 세포는 균집을 형성하며 자랐고, 1 mg/ml 첨가 농도에서도 80% 이상의 생존율을 나타내었고(Fig. 2), 특이적인 변화는 관찰되지 않았다. 이전의 실험에서도 차가버섯 조성물의 추출물을 1.6 mg/ml 농도로 첨가하였을 때 NIH3T3 세포가 80%의 생존율을 보여 가장 적절한 항종양 활성 농도로 설정한 바 있다[6].

대장암세포주의 생육 및 형태변화

최근의 조사에서 우리나라의 경우 식생활이 서구화 되어

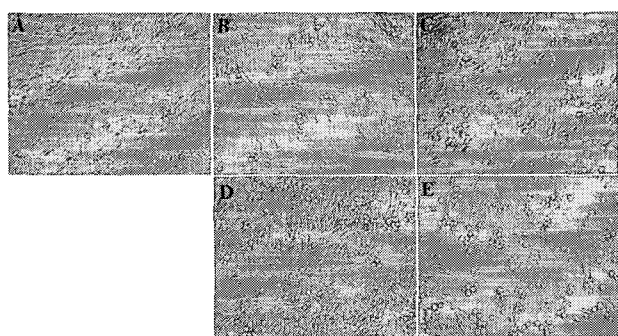


Fig. 1. Morphology of NIH3T3 mouse normal fibroblast cells treated with water extract from non-fermented or fermented *Chaga* mushrooms (*Inonotus obliquus*). A: Control (0 mg/ml), B: 0.5 mg/ml of non-fermented *Chaga* mushroom extract, C: 1 mg/ml of non-fermented *Chaga* mushroom extract, D: 0.5 mg/ml of fermented *Chaga* mushroom extract, E: 1 mg/ml of fermented *Chaga* mushroom extract.

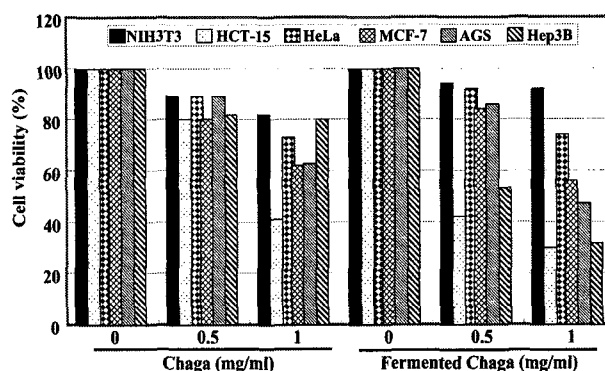


Fig. 2. MTT assay of the water-extract from non-fermented or fermented *Chaga* mushroom (*Inonotus obliquus*) on the NIH3T3 mouse normal fibroblast cells and various human cancer cell lines. Each cell was cultured in medium prepared with 1 mg/ml concentration of the water-extract from non-fermented or fermented *Chaga* mushrooms (*Inonotus obliquus*) for 4 days.

감에 따라 대장암이 성인 남녀 모두에서 많이 발생되고 있는 점을 감안하여 인체 유래 대장암 세포주 HCT-15를 선택하여 발효 차가버섯의 항종양 효과를 검토하였다. 발효 및 비발효 차가버섯 추출물을 0.5 및 1 mg/ml 농도로 처리한 대장암세포주인 HCT-15 세포의 형태변화를 Fig. 3에 나타내었다. 발효 및 비발효 차가버섯 추출물의 1 mg/ml 농도 처리구에서 각각 가장 낮은 세포 생육도를 나타내어 차가버섯이 대장암 세포에 상당히 효과적인 것으로 사료되었다(Fig. 2). 특히 발효 차가버섯 추출물에서 대장암 세포주 HCT-15에 대해 강한 증식억제 효과가 있음을 확인한 후 추출물의 낮은 첨가 수준에 따른 증식억제 효과를 검토한 결과 첨가량이 많아질수록 세포증식이 억제되었고(Fig. 4), 0.25 mg/ml에서도 50% 이상의 효과를 나타내어 차가버섯이 대장암 치료제 개발에 응용

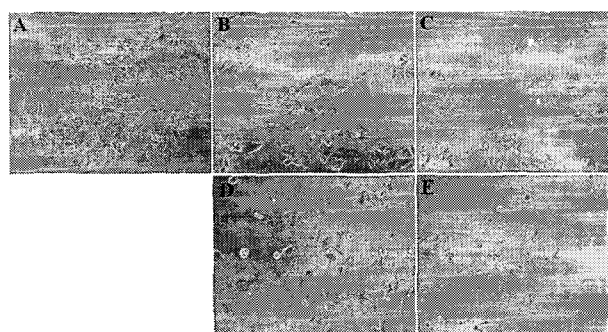


Fig. 3. Morphology of HCT-15 human colon carcinoma cells treated with water extract from non-fermented or fermented *Chaga* mushrooms (*Inonotus obliquus*). A: Control (0 mg/ml), B: 0.5 mg/ml of non-fermented *Chaga* mushroom extract, C: 1 mg/ml of non-fermented *Chaga* mushroom extract, D: 0.5 mg/ml of fermented *Chaga* mushroom extract, E: 1 mg/ml of fermented *Chaga* mushroom extract.

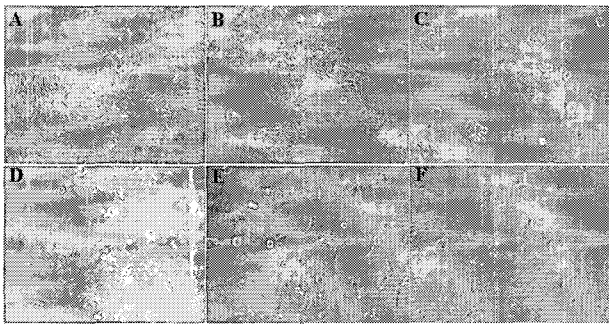


Fig. 4. Morphology of HCT-15 human colon carcinoma cells treated with various concentrations (0~1 mg/ml) of water extract from fermented *Chaga* mushrooms (*Inonotus obliquus*). A: Control (0 mg/ml), B: 0.0625 mg/ml, C: 0.125 mg/ml, D: 0.25 mg/ml, E: 0.5 mg/ml, F: 1 mg/ml of fermented *Chaga* mushroom extract.

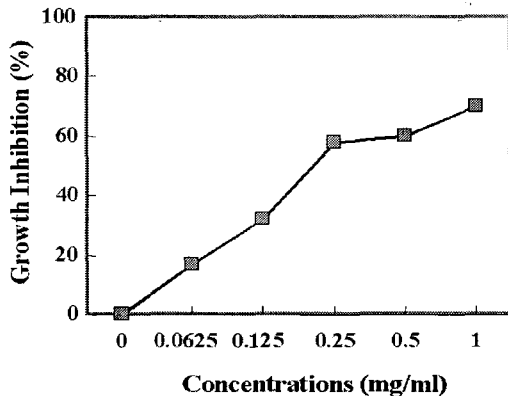


Fig. 5. Growth inhibitory effects of various concentrations treatment of the water-extract from fermented *Chaga* mushroom (*Inonotus obliquus*) on the HCT-15 human colon carcinoma cells.

해볼 수 있음이 시사되었다(Fig. 5).

Hwang 등[11]은 차가버섯 12.5% 열수 추출물을 대장암 세포주 HT-29에 1.5, 6 및 12 mg/ml 첨가시 배양시간과 첨가 수준이 높아질수록 증식억제 효과가 강하다고 하여 본 실험의 결과와 일치하였다. 한편, Hwang 등[10]은 대장암 세포 HT-29와 Caco-2에 표고버섯과 새송이버섯 수용성 추출물을 6 mg/ml 또는 12 mg/ml 처리하였을 때 유의적인 세포 생육 감소 효과가 있었다고 하였으나, 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 발효 또는 비발효 차가버섯 추출물의 첨가량이 이들 실험에 사용한 농도보다 훨씬 낮음에도 불구하고 효과면에서는 오히려 더 좋은 것으로 나타나 버섯종류 또는 발효와 같은 처리에 의한 영향이 큰 것으로 사료된다.

자궁경부암세포주의 생육 및 형태변화

발효 및 비발효 차가버섯 추출물을 0.5 및 1 mg/ml 농도로 처리한 자궁경부암세포주 HeLa의 형태 변화를 Fig. 6에 나타내었다. 발효 또는 비발효 차가버섯 추출물의 0.5 mg/ml 농도 처리구에서는 세포 생육 저해에 거의 영향을 미치지 못하였으나, 1 mg/ml 농도 처리구에서 각각 27% 정도의 저해 효과를 나타내어 본 실험에 사용한 세포주 중에서는 상당히 약한 항종양 효과를 보였다(Fig. 2).

유방암세포주의 생육 및 형태변화

발효 또는 비발효 차가버섯 추출물을 0.5 및 1 mg/ml 농도로 처리한 유방암세포주 MCF-7의 형태 변화를 Fig. 7에 나타내었다. 최근 국내산 버섯을 소재로 하여 항종양 활성을

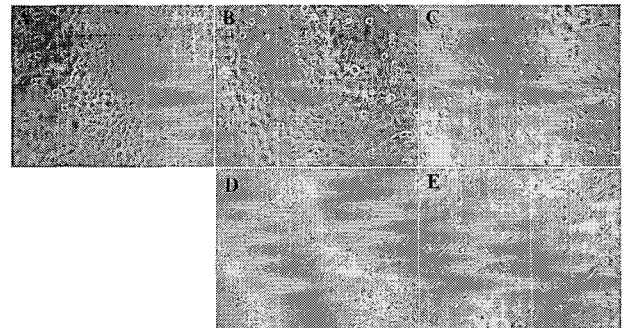


Fig. 6. Morphology of HeLa human cervical carcinoma cells treated with water extract from non-fermented or fermented *Chaga* mushrooms (*Inonotus obliquus*). A: Control (0 mg/ml), B: 0.5 mg/ml of non-fermented *Chaga* mushroom extract, C: 1 mg/ml of non-fermented *Chaga* mushroom extract, D: 0.5 mg/ml of fermented *Chaga* mushroom extract, E: 1 mg/ml of fermented *Chaga* mushroom extract.

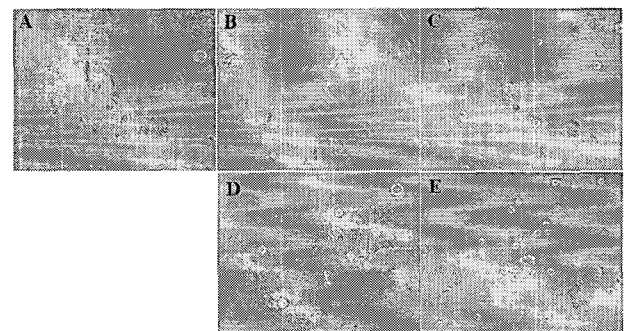


Fig. 7. Morphology of MCF-7 human breast adenocarcinoma cells treated with water extract from non-fermented or fermented *Chaga* mushrooms (*Inonotus obliquus*). A: Control (0 mg/ml), B: 0.5 mg/ml of non-fermented *Chaga* mushroom extract, C: 1 mg/ml of non-fermented *Chaga* mushroom extract, D: 0.5 mg/ml of fermented *Chaga* mushroom extract, E: 1 mg/ml of fermented *Chaga* mushroom extract.

가지는 성분 탐색에 관한 다수의 연구에서 대부분 항종양 활성은 버섯 자실체 또는 균사체 배양에서 얻어지는 다당류에 기인하는 것으로 보고 되는 가운데[18,21], 차가버섯 추출물 다당류에서도 인간 유방암 세포주 MCF-7에 대하여 비교적 높은 암세포 성장 억제효과가 보고 된 바 있다[12]. 또한, 차가버섯의 inotodiol, lanosterol, ergosterol, butulin과 같은 triterpen류 성분이 유방암 세포주인 MCF-7 및 혈액암 세포주인 P388에 대해서도 세포독성을 나타낸다고 하였다[12].

본 실험에서도 MCF-7에 대한 차가버섯 추출물의 세포증식 억제효과는 차가버섯의 발효에 의한 영향은 거의 없는 것으로 나타났다. 그러나 발효 및 비발효 차가버섯 추출물의 첨가농도 0.5 mg/ml에서 20% 정도의 억제는 1 mg/ml의 첨가에서 약 40% 정도로 높게 나타나 첨가량이 많을수록 증식이 억제되었다(Fig. 2).

위암세포주의 생육 및 형태변화

발효 및 비발효 차가버섯 추출물을 0.5 및 1 mg/ml 농도로 처리한 위암세포주인 AGS 세포의 형태변화를 위상차 현미경을 이용하여 Fig. 8에 나타내었다. 발효 및 비발효 차가버섯 추출물의 첨가농도 0.5 mg/ml에서는 위암세포의 증식 억제 효과는 미미하게 나타났으나, 1 mg/ml의 첨가농도에서는 발효 및 비발효 차가버섯 추출물에서 각각 37% 및 53%의 세포증식 억제 효과가 나타났다. 이러한 결과는 이전의 어성초 첨가 차가버섯 조성물에서도 유사한 효과가 확인된 바 있다[4].

Hwang 등[11]은 차가버섯 추출물을 1.5~24 mg/ml의 농도별로 첨가하여 48시간 배양한 결과, 1.5 mg/ml 첨가구의 세포수가 9.2×10^5 으로 무첨가 대조구의 19.5×10^5 에 비해 유의적으로 감소하였고, 최고 첨가 농도인 320 mg/ml에서는 세포가 거의 관찰되지 않았다고 하였다. Ham 등[9]도 위

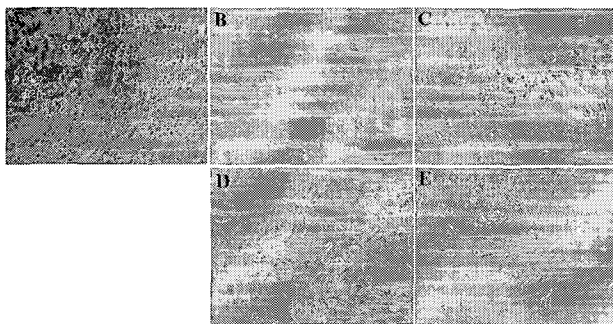


Fig. 8. Morphology of AGS human gastric carcinoma cells treated with water extract from non-fermented or fermented *Chaga* mushrooms (*Inonotus obliquus*). A: Control (0 mg/ml), B: 0.5 mg/ml of non-fermented *Chaga* mushroom extract, C: 1 mg/ml of non-fermented *Chaga* mushroom extract, D: 0.5 mg/ml of fermented *Chaga* mushroom extract, E: 1 mg/ml of fermented *Chaga* mushroom extract.

암세포주 AGS의 성장저해 효과에 대해 차가버섯의 저분자 물질, 수용성 분획물 및 수용성 다당체의 4 mg/ml 첨가 농도에서 각각 57.9, 59.6 및 61.4%의 세포 성장 억제효과가 있다고 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 비슷하였지만 Ham 등[9]이 사용한 차가버섯 추출물 농도는 본 실험에서 사용한 농도보다 4배 정도 높았을 뿐만 아니라 정상세포에 대해서도 본 연구결과 보다 더 높은 독성을 나타내었다.

간암세포주의 생육 및 형태변화

발효 및 비발효 차가버섯 추출물을 0.5 및 1 mg/ml 농도로 처리한 간암세포주 Hep3B의 형태변화를 Fig. 9에 나타내었다. 발효 차가버섯 추출물의 0.5 및 1 mg/ml 농도 처리구에서는 세포 생육 저해가 각각 47% 및 68%로 나타났는데, 비 발효 차가버섯 추출물의 동일 농도에서는 각각 18% 및 20% 세포생육 저해 효과가 나타나 발효 차가버섯에서 더 좋은 효능을 보였다. 발효 차가버섯 추출물에 의한 인체 종양 세포의 생육저해 효과는 대장암과 유사하게 높게 나타났으나, 비발효 차가버섯 추출물 처리구와는 다른 양상을 나타내어 향후 이들에 대한 좀더 구체적인 실험이 있어야 할 것으로 사료되어 진다.

이전의 실험에서 제1형 및 제2형 당뇨 동물모델 실험에서 항당뇨 효과를 보였던 발효 차가버섯 추출물은 다당체가 39.1% 차지하였고, 비발효 차가버섯은 이보다 약간 높은 42.9%를 함유하였다[35]. 또한 *Bacillus* sp. WRD-2로 발효시킨 발효 차가버섯이 다당체를 39.1% 함유하고 있고, 박충크로마토그래피법으로 확인한 G2와 G6 사이의 저분자 올리고당을 3.8%를 함유한 것으로 나타나 차가버섯이 발효되는 과정에서 생성된 올리고당과 함께 항당뇨 활성뿐만 아니라 인체유래 종양세포주의 생육 저해 활성도 비발효 차가버섯보다 강한 것으로 생각되어 진다. Kim 등[14]은 차가버섯 균사

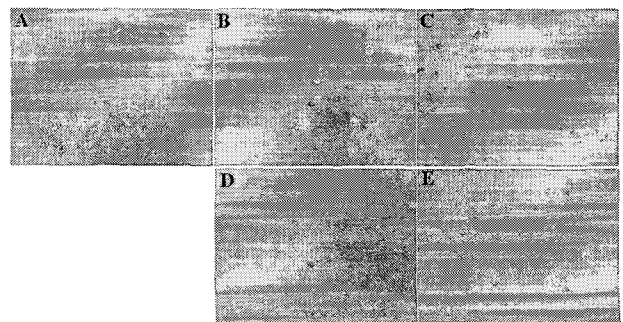


Fig. 9. Morphology of Hep3B human hepatocellular carcinoma cells treated with water extract from non-fermented or fermented *Chaga* mushrooms (*Inonotus obliquus*).

체로부터 면역활성 증가물질로 crude-polysaccharide를 추출한 결과, *Inonotus obliquus* DSMZ 8695 및 BELYU 1102에서 각각 35.6% 및 26.9% 함유되어 있었다고 하였다. 일반적으로 버섯유래의 항암효과를 갖는 다당체는 β -(1,3) 결합에 β -(1,6) 결합 결합을 가지는 glucan으로 수용성 추출물중에 존재하는 것으로 밝혀졌다[21].

DNA fragmentation

발효 및 비발효 차가버섯 추출물에 의한 암세포 증식억제가 어떤 기전에 의한 것인지를 검토하기 위해 apoptosis가 일어날 때 나타나는 DNA fragmentation을 세포로부터 genomic DNA를 분리하여 agarose gel electrophoresis 방법으로 조사하였다(Fig 10). 정상세포인 NIH3T3 세포는 DNA fragmentation이 거의 일어나지 않아 세포 생존율 결과와 같은 경향을 보였다. 특히 대장암 세포주인 HCT-15 세포는 MTT assay에 의한 결과와 마찬가지로 발효 차가버섯 추출물뿐만 아니라 비발효 차가버섯 추출물에서도 DNA laddering이 많이 일어나는 것이 관찰되어 1 mg/ml 농도에서 59%의 생육 저해율을 뒷받침 해 주었다. 또한 비발효 차가버섯 추출물보다는 발효 차가버섯 추출물에서 각 종양세포의 DNA laddering이 많이 일어나 세포증식 억제 효과가 높다는 결과를 뒷받침 해주고 있다.

이상의 실험 결과로부터 발효 차가버섯 유래의 수용성 추출물은 정상세포의 세포 생육에는 크게 영향을 미치지 않으면서도 특히 대장암, 위암, 간암 세포의 생육을 크게 저해시킴으로써 이 분야의 새로운 항암 식·의약품 소재 개발 가능

성이 있는 것으로 사료되어 진다.

요 약

발효 및 비발효 차가버섯 수용성 추출물이 정상 세포주 NIH3T3 mouse normal fibroblast cell 및 인체 종양 세포주 AGS human gastric cancer cell (위암), HCT-15 human colon cancer cell (대장암), Hep3B human hepatoma cancer cell (간암), MCF-7 human breast cancer cell (유방암), HeLa human cervical cancer cell (자궁경부암)에서 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay 방법에 의한 세포 증식 억제와 암세포 증식억제의 기전 연구의 일환으로 apoptosis가 일어날 때 나타나는 DNA fragmentation을 agarose gel electrophoresis 방법으로 검토하였다. 인체 종양 세포주의 생육저해 효과가 발효 차가버섯 추출물이 비발효 차가버섯 추출물보다 강한 것으로 나타났다. 그러나 동일한 실험조건하에서 마우스 정상 세포주 NIH3T3은 80% 이상의 생존율을 나타내어 정상 세포주에는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 특히, 발효 및 비발효 차가버섯 추출물에서 본 실험에 사용한 세포주 중에서 대장암 세포주 HCT-15에 대해 가장 세포 증식 억제효과가 뛰어났으며, 이러한 효과는 첨가 농도 의존적 이었다. 발효 및 비발효 차가버섯 추출물에 의한 암세포 증식억제가 기전 연구로 apoptosis가 일어날 때 나타나는 DNA fragmentation을 세포로부터 genomic DNA를 분리하여 agarose gel electrophoresis 방법으로 조사한 결과, 정상세포인 NIH3T3 세포는 DNA fragmentation이 거의 일어나지 않아 세포 생존율 결과와 유사한 경향을 보였으나, 특히 대장암 세포주인 HCT-15에서는 발효 차가버섯뿐만 아니라 비발효 차가버섯 추출물에서도 DNA fragmentation이 많이 일어나는 것이 관찰되어 암세포 증식억제 효과가 높다는 결과를 뒷받침 해주고 있다.

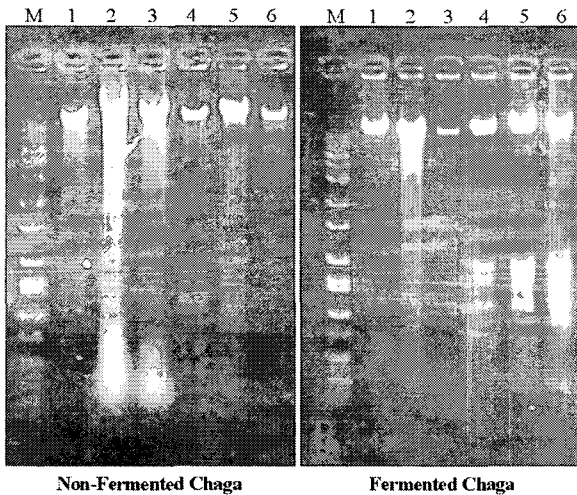


Fig. 10. Effects of the water-extract (1 mg/ml) from non-fermented or fermented *Chaga* mushroom (*Inonotus obliquus*) on DNA fragmentation in the NIH3T3 mouse normal fibroblast cells and various human cancer cell lines. DNA samples were prepared and analyzed by 2% agarose gel electrophoresis. M: Marker, 1: NIH3T3, 2: HCT-15, 3: HeLa, 4: MCF-7, 5: AGS, 6: Hep3B.

감사의 글

본 연구 논문은 2005년도 동아대학교 교내 연구비(공모과제) 지원에 의해 얻어진 결과이므로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Burczyk, J., A. Gawron, M. Slotwinska, B. Smietana and K. Termiska. 1996. Antimitotic activity of aqueous extracts of *Inonotus obliquus*. *Bull Chem. Farm* 135, 306-309.
2. Cha, J. Y., B. S. Jun, K. S. Yoo, J. R. Hahm and Y. S. Cho. 2006. Fermented *Chaga* mushroom (*Inonotus obliquus*) effects on hypolipidemia and hepatoprotection in the Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. *Food*

- Sci. Biotechnol.* **15**, 122-127.
3. Cha, J. Y., B. S. Jun, J. W. Kim, S. H. Park, C. H. Lee and Y. S. Cho. 2006. Hypoglycemic effects of fermented *Chaga* mushroom (*Inonotus obliquus*) in the diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. *Food Sci. Biotechnol.* **15**, 739-745.
 4. Cha, J. Y., B. S. Jeon, J. W. Park, J. C. Moon and Y. S. Cho. 2004. Effect of fermented compositions containing *Inonotus obliquus* with *Houttuynia cordata* on growth of human AGS gastric and HCT-15 colon cancer cells. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **47**, 202-207.
 5. Cha, J. Y., B. S. Jeon, C. H. Lee, K. S. Yoo, J. S. Moon and Y. S. Cho. 2005. Hypoglycemic and antioxidative effects of fermented *Chaga* mushroom (*Inonotus obliquus*) on streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Life Sci.* **15**, 809-818.
 6. Cha, J. Y., B. S. Jeon, J. C. Moon, J. H. Yoo and Y. S. Cho. 2004. Cytotoxic effect of *Inonotus obliquus* composition in HCT-15 human colon cancer cells and AGS gastric cancer cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **33**, 633-638.
 7. Dnizot, F. D. and L. Rita. 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.
 8. Goh, E. L. K., R. J. Pircher and P. E. Lobie. 1998. Growth hormone promotion of tubulin polymerization stabilized the microtubule network and protects against colchicin-induced apoptosis. *Endocrinology* **139**, 4364-4372.
 9. Ham, S. S., S. W. Oh, Y. K. Kim, K. S. Shin, K. Y. Chang and G. H. Chung. 2003. Antimutagenic and cytotoxic effects of ethanol extract from the *Inonotus obliquus*. *J. Korean Soc.. Food Sci. Nutr.* **32**, 1088-1094.
 10. Hwang, Y. J., H. K. Nam, M. J. Chang, G. W. Noh and S. H. Kim. 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.
 11. Hwang, Y. J., G. W. Noh and S. H. Kim. 2003. Effect of *Inonotus obliquus* extracts on proliferation and caspase-3 activity in human gastro-intestinal cancer cell lines. *Korean J. Nutr.* **36**, 18-23.
 12. Kahlos, K., L. Kangas and R. Hitunen. 1987. Antitumor activity of some compounds and fractions from an *n*-hexane extract of *Inonotus obliquus*. *Acta. Pharm. Fenn.* **96**, 33-40.
 13. Kim, S. W. 1998. Studies on anti-microbial and anti-cancer function of polysaccharide extracted *Ganoderma lucidum*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **27**, 1183-1188.
 14. Kim, Y. O., S. B. Han, H. W. Lee, H. J. Ahn, Y. D. Yoon, J. K. Jung, H. M. Kim and C. S. Shin. 2005. Immuno-stimulating effect of the crude-polysaccharide produced by submerged culture of *Inonotus obliquus*. *Life Sciences* **77**, 2438-2456.
 15. Lee, I. S. and A. Nishikawa. 2003. *Polyzellus multiplex*, a Korean wild mushroom, as a potent chemopreventive agent against stomach cancer. *Life Sci.* **73**, 3225-3234.
 16. Li, X., J. Rong, M. Wu and X. Zeng. 2003. Anti-tumor effect of polysaccharide from *Grifola frondosa* and its influence on immunological function. *Zhong Yao Cai* **26**, 31-32.
 17. Mizuno, T., C. Zhuang, K. Abe, H. Okamoto, T. Kiho, S. Ukai, S. Leclerc and L. Meijer. 1999. Antitumor and hypoglycemic activities of polysaccharides from the *Sclerotia* and *Mycelia* of *Inonotus obliquus* (Pers.: Fe.) PII. (Aphyllphoromycetidae). *Int. J. Med. Mushrooms* **1**, 301-316.
 18. Mizuno, T., K. Minato, H. Ito, M. Kawade, H. Terai and H. Tsuchida. 1999. Antitumor polysaccharide from the mycelium of liquid-cultured *Agricus blazei* Murrill. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **47**, 707-714.
 19. Ng, M. L. and A. T. Yap. 2002. Inhibition of human colon carcinoma development by lentinan from shiitake mushroom (*Lentinus edodes*). *J. Altern Complement Med.* **8**, 581-589.
 20. Shivrina, A. N. 1967. Chemical characteristics of compounds extracted from *Inonotus obliquus*. *Chem. Abstr.* **66**, 17271-17279.
 21. Wasser, S. P. 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**, 258-274.