

Anti-Proliferative Activities of Solid-State Fermented Medicinal Herbs Using *Phellinus baumii* against Human Colorectal HCT116 Cell

Ho-Yong Sohn*, Yong-Kyu Shin¹ and Jong-Sik Kim²

Department of Food and Nutrition, Andong National University, Andong 760-749, Korea

¹Research Institute of Biotechnology, Bion Co, LTD., Andong, 760-380, Korea

²Department of Biological Science, Andong National University, Andong 760-749, Korea

Received July 20, 2010 / Accepted August 26, 2010

This study was carried out to investigate the anti-proliferative activity of solid-state fermented medicinal herbs which include *Phellinus baumii*. Methanol extracts were prepared from 36 different medicinal herbs and their fermented counterparts. These extracts were used to treat human colorectal HCT116 cell, human embryonic kidney cell HEK-293, pre-adipocyte cell 3T3-L1, and pre-osteoblast cell MC3T3-E1 for 24 hr. At a concentration of 100 µg/ml, the extracts of *Amomum villosum*, *Cnidium officinale* Makino, *Dendrobium moniliforme*, *Dictamnus dasycarpus*, *Diospyros kaki* Thunb, *Eucommia ulmoides* Oliv, *Ginkgo biloba* L, *Magnolia denudata* Desrousseaux, *Orostachys japonicus*, *Panax notoginseng*, *Pharbitis nil* Choisy, *Polygala tenuifolia* and *Trichosanthes kirilowii* (seed) led to a < 50% decrease in cell proliferation, and mycelium of *P. baumii* showed a 46.3% decrease in cell proliferation. Meanwhile, the extracts of the 25 fermented herbs showed similar anti-proliferative activities compared to those of individual non-fermented herbs. However, the extracts of the fermented *Drynaria fortunei* Kunze (1), *Lycium chinense* Mill (2), *Fritillaria thunbergii* Miquel (3) and *Prunus persica* showed increased anti-proliferative activity. The IC₅₀s of (1), (2) and (3) were especially decreased to 28, 85 and 80 µg/ml from 394, 917 and 149 µg/ml, respectively. Furthermore, the cytotoxicity of the extracts of fermented (1), (2) and (3) against HEK-293, 3T3-L1, and MC3T3-E1 was negligible up to 200 µg/ml. These results suggest that solid-state fermentation using the mycelium of *P. baumii* produce potential anti-cancer agents or strengthen the bioactivity of medicinal herbs.

Key words : Medicinal herbs, solid-state fermentation, mycelium of *Phellinus baumii*, anti-proliferation, colorectal HCT116, hemolytic activity

서론

버섯은 전 세계적으로 약용 및 식용으로 널리 이용되고 있으며 다양한 생리기능 조절작용과 항암 활성이 알려져 있다. 그 중에서도 상황버섯은 항암 활성 및 면역기능 증강 활성이 우수한 것으로 보고되어 있다[10,22]. 뽕나무 줄기 등에 자생하는 진흙버섯속 백색 부후균인 상황버섯은, 갓 표면을 제외하고는 모두 황색을 나타내어 상황이라 불리며 전 세계적으로는 약 220여종이 존재한다. 이 중 국내에서는 *Phellinus linteus*, *P. baumii*, *P. gilvus*, *P. igniarius* 등의 7종이 존재하며 *P. baumii* 와 *P. linteus*가 가장 일반적으로 재배, 유통되고 있다[1]. 상황버섯 자실체는 독성이 없어 식품 원재료로 사용 가능하며[3], 면역력 강화[21], 급성알러지 억제[24], 항산화[9,15], 항혈전[6], 항고혈압, 항돌연변이 활성 및 암, 심장병 등의 성인병 예방과 개선효과[15,22]를 나타내는 것으로 알려져 있다. 최근에는, 자실체 이외에 상황버섯 균사체에서도 항혈전 활성[6], 항

산화 및 항암작용[10,20], 위궤양 완화효과[14] 및 항염증 작용[7], 치매 관련 β-secretase 저해 활성[19] 등의 생리활성이 보고되면서, 경제적이면서도 배양이 용이한 상황버섯 균사체 이용에 관한 연구가 집중되고 있는 실정이다. 이와 더불어, 버섯의 강력한 섬유소 분해능 및 고체발효 능력을 이용하여 새로운 기능성 생물소재를 개발하고자 하는 시도가 있으며[11,12,17,18], 특히 생리활성이 우수한 다양한 한약재에 유용 버섯균사체를 접종하여 새로운 생리활성물질 개발 및 기존 한약재의 생리활성을 강화하려는 연구가 진행되고 있다[2,13,16].

본 연구팀에서도 최근 항산화 및 항혈전 활성이 우수하다고 알려진 36종의 한약재를 대상으로 *P. baumii* 균사체를 접종하여 고체발효를 성공하였으며[25,26], 고체발효에 의해 골쇄보, 천련자, 도엽, 와송의 경우 항혈전 활성이 발효전에 비하여 14~32% 증가되었고, 원지, 현삼, 백지, 향부자, 골쇄보 및 육종용에서는 항산화 활성이 발효전에 비해 20~60% 정도 증가됨을 보고한 바 있다[25]. 본 연구에서는, *P. baumii* 균사체를 이용한 한약재 고체발효 추출물의 암세포 성장억제 효과를 확인하고자, 36종의 한약재 및 이들의 고체발효 한약재 추출물을 대상으로 인간 대장암세포 성장억제능과 인간 적혈구

*Corresponding author

Tel : +82-54-820-5491, Fax : +82-54-820-7804

E-mail : hysohn@andong.ac.kr

용혈활성을 각각 평가하였다. 그 결과 일부의 고체발효 한약재 추출물이 정상세포에는 독성이 거의 나타나지 않으면서 대장암세포의 성장을 특이적으로 억제함을 확인하였다. 본 연구는 유용버섯을 이용한 한약재 고체발효가 새로운 생물자원 개발에 이용될 수 있음을 제시하고 있다.

재료 및 방법

사용균주, 배지, 종균, 한약재 및 세포주

Phellinus baumii (장수상황버섯)는 (주)바이온에서 보관중인 균주를 Potato dextrose agar (Difco Co., USA) 배지에서 25°C에서 20일 배양하여 사용하였고 4주 간격으로 계대배양

하였다[25]. 36종의 한약재는 2007년 및 2009년 대구 한약재 시장에서 구입하여 사용하였으며, 사용부위 및 이들의 고체발효 정도는 Table 1에 나타내었다. 한약재는 사용 전 흐르는 물에 30초간 수세하여 불순물을 제거한 후 탈수하여 사용하였으며, 한약재에 접종할 종균은 이미 보고한 방법[25,26]과 동일하게 준비하였다. 암세포 성장억제능 평가에는 인간 대장암 세포주 HCT116를 이용하였고, 정상세포에 대한 독성평가를 위해서는 인간 embryonic kidney 유래의HEK-293 세포, 마우스 지방 전구세포인3T3-L1 및 조골 전구세포 MC3T3-E1을 이용하였으며, 이들은 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

Table 1. The used part and fermentation acceptability of 36 medicinal herbs used in this study

Scientific name	Korean name	Used part	Fermentation
<i>Aconitum koreanum</i>	Baekbuja	root	- ¹
<i>Adenophora triphylla var. japonica</i>	Sasam	root	++ ³
<i>Amonum villosum</i>	Sain	seed	+ ²
<i>Ampelopsis japonica</i> Makino	Baekyeum	root	++
<i>Angelica dahurica</i>	Bakji	root	++
<i>Boschniakia rossica</i>	Yukjongyong	whole	++
<i>Chrysanthemum indicum</i>	Gamkuk	flower	-
<i>Cnidium officinale</i> Makino	Chungung	root	++
<i>Cuscuta japonica</i> Choisy	Tosaja	seed	+
<i>Cyperus rotundus</i>	Hwangbujja	root bark	++
<i>Dendrobium moniliforme</i>	Seokgok	root bark	++
<i>Dictamnus dasycarpus</i>	Baekseunpi	root bark	++
<i>Dioscorea batatas</i>	Sanyak	root	++
<i>Diospyros kaki</i> Thunb.	Sichae	calyx	++
<i>Drynaria fortunei</i> Kunze	Golsaebo	root, stem	++
<i>Eucommia ulmoides</i> Oliv.	Dochung	stem bark	++
<i>Fraxinus rhynchophylla</i> HANCE	Jinpi	stem bark	++
<i>Fritillaria thunbergii</i> Miquel	Paemo	stem	++
<i>Ginkgo biloba</i> L.	Baekgwa	seed	+
<i>Lilium tigrinum</i>	Baekhap	flower	++
<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Jachohwa	flower	++
<i>Lycium chinense</i> Mill.	Googija	fructus	++
<i>Magnolia denudata</i> Desrousseaux	Sinie	flower	-
<i>Melia azedarach var. japonica</i>	Chunryunja	fructus	++
<i>Orostachys japonicus</i>	Wasong	whole	++
<i>Panax notoginseng</i>	Samchil	root	++
<i>Pharbitis nil</i> Choisy	Kyunwooja	seed	+
<i>Polygala tenuifolia</i>	Wonji	root	++
<i>Polygonatum sibiricum</i> Redt.	Hwangjeong	root bark	-
<i>Prunus armeniaca</i> L.	Hangin	seed	++
<i>Prunus persica</i>	Doin	seed	+
<i>Prunus persica (Linne)</i> Batsch	Doyeup	leaf	++
<i>Scrophularia buergeriana</i>	Hyunsam	root	++
<i>Trichosanthes kirilowii</i> (seed)	Galruin	seed	+
<i>Trichosanthes kirilowii</i> (bark)	Chunhwabun	bark	++
<i>Zizyphus jujuba</i> Miller	Daechu	fructus	-

-¹: Poor fermentation, ++²: Moderate fermentation, +++³: Good fermentation

한약재의 methanol추출물의 조제

준비된 36종의 한약재 100 g을 각각 1 l 플라스크에 넣고, 이를 121°C에서 20분간 멸균한 후 상온에서 냉각하였으며, 이후 10배 부피의 methanol을 첨가하여 상온에서 24시간 동안 3회 반복 추출하였다. 추출액은 filter paper (Whatman No. 2)로 거른 후 감압 하에서 농축하여 한약재 추출물을 조제하였다.

균사체를 이용한 한약재의 고체발효 및 발효 한약재의 추출물 조제

준비된 36종의 한약재 100 g을 각각 850 ml polypropylene bottle (Namsan Eng., Korea)에 넣고 121°C에서 20분간 멸균한 후 냉각하였으며, PDB 배지에서 25±1°C, 130 rpm으로 10일간 배양한 장수상항버섯 균사체 액체 종균 20 ml씩을 한약재에 각각 무균적으로 접종하였다[25]. 이후 멸균마개를 이용하여 오염을 방지하고, 25°C, 상대습도 90%의 배양기에서 20일간 발효시켰다. 발효 한약재의 methanol 추출물은 한약재 추출물 조제와 동일한 방법으로 조제하였다. 접종에 사용된 액체 종균 균사체는 원심 집균한 후 멸균수로 2회 수세하고 2일간 동결건조 후, 상기와 동일한 방법으로 균사체의 methanol 추출물을 조제하였다[25,26].

세포주 배양 및 생존율 조사

본 실험의 HCT116, HEK-293, 3T3-L1 및 MC3T3-E1 세포주의 배양 및 계대에는 Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco-BRL Inc., USA)를 사용하였으며, 10% Fetal Bovine Serum (Gibco-BRL Inc., USA), 1% penicillin 및 streptomycin (WelGene Inc., Korea)을 첨가하여 사용하였다[4]. 한편 조제된 다양한 추출물들이 HCT116, HEK-293, 3T3-L1 및 MC3T3-E1 세포주의 세포 생육에 미치는 영향은 One solution cell proliferation assay kit (Promega, USA)을 이용하여 평가하였다[4]. 즉, 96 well plate에 well당 3×10³ 개의 세포를 접종하고 24시간 배양한 후 다양한 농도의 한약재 추출물, 발효한약재 추출물 및 균사체 추출물을 처리하였다. 각 추출물을 각각 24시간 동안 반응시킨 후, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS; Promega, USA) 용액을 각 well 당 20 µl씩 넣고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 4시간 동안 반응 시켰으며, 반응 종료 후 96 well plate reader (Expert 96 UV ASYS Hitech, Austria)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하여 성장률을 계산하였다. 결과 수치는 4개의 독립적인 well 에서 수행한 값을 mean±SD 값으로 나타내었으며, 50% 성장억제를 나타내는 농도를 IC₅₀ (Inhibitory Concentration 50)로 표시하였다.

인간 적혈구 용혈 활성 평가

제조된 추출물의 안전성 평가의 일환으로 인간 적혈구(4%)를 이용하여 용혈 활성을 평가하였다. 기존의 보고한 방법[23]

과 동일하게, PBS로 3회 수세한 인간 적혈구에 추출물 시료용액을 가하고 37°C에서 30분간 반응한 다음, 용혈에 따른 헤모글로빈 유출 정도를 414 nm에서 측정하였다. 용매 대조구로 DMSO (2%), 적혈구의 100% 용혈을 위한 실험 대조구로 triton X-100 (0.1%)을 사용하였으며, 다음의 수식을 이용하여 용혈활성을 계산하였다.

$$(\%) \text{ Hemolysis} = [(S - C) / (T - C)] \times 100$$

S: 시료 첨가구의 흡광도, C: DMSO 첨가구의 흡광도, T: triton X-100 첨가구의 흡광도.

통계분석

실험 결과는 SPSS 17.0 버전을 사용하여 mean±SD로 나타내었으며, ANOVA Tukey LSD 통계처리방법으로 통계적 유의성 검정을 조사하였다. 유의수준은 p<0.05로 하였다.

결과 및 고찰

한약재 추출물 및 발효한약재 추출물의 대장암세포 성장억제 활성

36종 한약재 추출물이 대장암세포 성장에 미치는 영향을 평가하고자 100 µg/ml 농도로 HCT116 배양액에 첨가하고 24시간 배양한 후 각각의 성장률을 측정하였다. 그 결과, 사인, 천궁, 석곡, 백선피, 시체, 두충, 백과, 신이, 와송, 삼칠, 견우자, 원지 및 팔루인의 13종에서 암세포 성장률이 50% 이하를 나타내어 이들 한약재가 대장암세포 성장억제능을 가짐을 알 수 있었다(Table 2). 특히 사인, 와송, 삼칠, 견우자 및 원지 추출물은 무첨가구에 비해 각각 29.3, 29.5, 17.5, 및 20.6%의 성장률을 나타내어 우수한 암세포 성장억제능을 나타내었다. 한편 한약재 고체발효의 경우, 백부자, 감국, 신이, 황정 및 대추의 경우 정상적인 균사체 성장이 이루어지지 않아[25] 대장암세포 성장억제능을 평가하지 못하였다. 발효에 이용된 장수상항버섯 균사체 추출물의 경우 100 µg/ml 농도에서 46.3%의 성장률을 나타내어 대장암세포 성장억제능을 확인할 수 있었다. 고체발효 한약재 추출물에서는 사인, 천궁, 석곡, 시체, 두충, 와송, 삼칠, 견우자, 원지 및 팔루인의 10종은 발효전과 거의 동일한 성장억제 활성을 나타내었으나, 백선피, 백과 및 신이의 경우에는 고체발효에 의해 대장암세포 성장억제능이 부분적으로 감소하였다. 반면 도인, 골쇄보, 구기자 및 패모 추출물의 경우에는 발효에 의해 대장암세포 성장억제능이 오히려 증가되어 암세포 성장률이 무첨가구에 비해 각각 26.6, 29.1, 23.4 및 26.3%를 나타내었다(Table 2). 최종적으로 한약재 고체발효에 의해 대장암세포 증식억제능이 증가된 경우는 도인, 골쇄보, 구기자 및 패모의 4종이었으며, 증식억제능이 감소된 경우에는 백선피, 백과, 신이, 황부자, 산약, 현삼 및 팔루인의 7종이었다(Fig. 1).

Table 2. Cell proliferation and hemolysis activity of the methanol extracts prepared from the 36 medicinal herbs and their fermented counterparts

Medicinal herbs	Proliferation (%)		Hemolysis (%)	
	BF ¹	AF ²	BF	AF
<i>Aconitum koreanum</i>	91.4±0.6	NT ³	1.8±2.5	NT
<i>Adenophora triphylla</i> var. <i>japonica</i>	86.5±1.1	92.8±6.6	0	1.2±0.5
<i>Anonum villosum</i>	29.3±1.6	25.2±2.1	50.4±4.6	41.2±0.9
<i>Ampelopsis japonica</i> Makino	64.8±1.3	70.3±2.6	20.2±1.9	0
<i>Angelica dahurica</i>	90.2±2.8	65.6±5.1	0	0
<i>Boschniakia rossica</i>	112.3±3.3	93.7±0.8	0	0
<i>Chrysanthemum indicum</i>	82.1±1.7	NT	13.9±1.2	NT
<i>Cnicidium officinale</i> Makino	44.9±4.4	43.2±1.9	60.3±3.6	98.2±0.6
<i>Cuscuta japonica</i> Choisy	78.8±5.1	77.5±4.7	0	7.5±4.5
<i>Cyperus rotundus</i>	64.0±6.0	91.9±4.2	0	5.9±4.1
<i>Dendrobium moniliforme</i>	34.9±4.2	34.7±1.6	4.2±2.7	31.1±6.3
<i>Dictamnus dasycarpus</i>	45.1±1.6	72.3±6.0	0	0
<i>Dioscorea batatas</i>	57.7±2.5	91.9±4.1	0	4.5±2.1
<i>Diospyros kaki</i> Thunb.	49.6±6.7	35.4±2.3	0	2.3±1.6
<i>Drynaria fortunei</i> Kunze	90.9±3.1	29.1±3.7	15.7±3.9	74.5±3.2
<i>Eucommia ulmoides</i> Oliv.	40.3±3.3	51.5±5.2	24.1±3.3	75.2±6.1
<i>Fraxinus rhynchophylla</i> HANCE	86.7±8.1	97.2±3.8	0	0
<i>Fritillaria thunbergii</i> Miquel	62.7±6.4	26.3±2.2	36.6±5.1	85.1±5.4
<i>Ginkgo biloba</i> L.	31.6±0.5	93.1±4.2	80.8±4.2	0
<i>Lilium tigrinum</i>	86.9±1.9	98.7±1.6	0	0
<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	97.5±1.6	98.2±1.9	0	0
<i>Lycium chinense</i> Mill.	88.8±3.7	23.4±3.6	1.3±1.6	69.2±3.3
<i>Magnolia denudata</i> Desrousseaux	37.4±8.6	NT	93.4±4.6	NT
<i>Melia azedarach</i> var. <i>japonica</i>	69.4±10.1	79.6±8.9	0	0
<i>Orostachys japonicus</i>	29.5±2.5	25.5±2.1	7.2±4.1	60.5±8.2
<i>Panax notoginseng</i>	17.5±1.6	14.3±2.9	27.7±5.9	14.2±5.2
<i>Pharbitis nil</i> Choisy	29.6±9.7	18.3±6.8	99.4±0.6	99.4±0.6
<i>Polygala tenuifolia</i>	20.6±0.5	19.4±3.4	0	99.5±0.6
<i>Polygonatum sibiricum</i> Redt.	90.6±3.3	NT	0	NT
<i>Prunus armeniaca</i> L.	79.0±1.5	90.6±4.6	71.1±0.9	21.8±7.4
<i>Prunus persica</i>	89.7±7.6	91.7±2.1	0	99.1±1.6
<i>Prunus persica</i> (Linne) Batsch	50.2±3.8	26.6±6.5	26.3±7.6	81.3±0.6
<i>Scrophularia buergeriana</i>	77.3±4.2	102.1±3.7	0	0
<i>Trichosanthes kirilowii</i> (seed)	32.4±7.5	29.1±1.6	7.9±4.9	68.5±3.9
<i>Trichosanthes kirilowii</i> (bark)	79.4±3.6	96.7±7.4	45.3±2.1	0
<i>Zizyphus jujuba</i> Miller	90.1±2.9	NT	0	NT
Mycelium of <i>Phellinus baumii</i>	46.3±3.1	-	2.2±1.5	-

Cell proliferation and hemolysis activity were determined against HCT116 human colorectal cell and human erythrocytes, respectively. The used concentrations of methanol extracts for cell proliferation and hemolysis activity assay were 100 µg/ml and 150 µg/ml, respectively. BF¹: Before fermentation, AF²: After fermentation, NT³: Not determined due to poor fermentation

한약재 추출물 및 발효 한약재 추출물의 인간 적혈구 용혈 활성

36종 한약재 추출물과 발효 한약재 추출물을 대상으로 인간 적혈구에 대한 용혈활성을 평가하였다. 먼저 50 µg/ml 농도에서 10% 이상의 용혈을 나타낸 한약재는 감국(11%)과 견우자(67%) 2종이었으며, 발효 한약재중에는 골쇄보에서 11%의 용혈현상을 나타내었다(result not shown). 그러나 150 µg/ml 농도에서는 12종의 한약재가 20% 이상의 용혈활성을 나타내

었으며, 특히 백과, 신이 및 견우자 추출물은 각각 80.8, 93.4 및 99.4%의 강력한 용혈활성을 보였다(Table 2). 한편, 발효에 이용된 장수상황버섯 균사체 추출물은 150 µg/ml 농도에서 3.56%의 무시할 만한 용혈활성을 나타내었음에도 불구하고, 고체발효 한약재의 경우에는 거의 모든 한약재에서 용혈활성이 증가되었다. 발효에 의해 용혈활성이 감소된 경우는 백령, 삼칠, 행인 및 팔루근의 4종이었다. 일반적으로 한약재의 경우 찌거나 발효에 의해 saponin성분들이 증가되고[5], 이에 따라

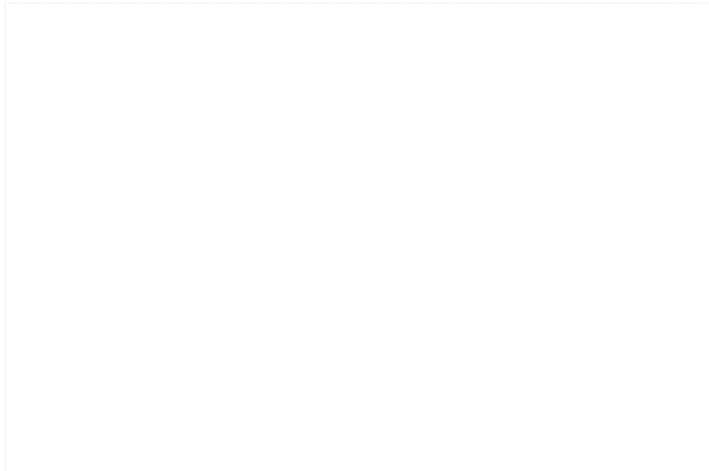


Fig. 1. Comparison of cell proliferation activities of the methanol extracts prepared from the 36 medicinal herbs and their fermented counterparts. The 100 µg/well of methanol extract was used to treat into HCT116 human colorectal cell in 96 well microplate for 24 hr, respectively, and the cell proliferation was determined using One solution cell proliferation assay kit. BF¹: Before fermentation, AF²: After fermentation. Symbols; (a) ●: *Angelica dahurica*, ○: *Drynaria fortunei* Kunze, ▼: *Fritillaria thunbergii* Miquel, ▽: *Lycium chinense* Mill, and ■: *Prunus persica* (Linne) Batsch, and (b) ●: *Cyperus rotundus*, ○: *Dictamnus dasycarpus*, ▼: *Dioscorea batatas*, ▽: *Ginkgo biloba* L, ■: *Scrophularia buergeriana*, and □: *Trichosanthes kirilowii* (bark).

항암활성 및 용혈활성이 증가됨을 고려할 때[5,8], 이러한 결과는 한약재의 고체발효 동안 사포닌 성분의 급격한 증가 때문에 나타나는 현상으로 이해되며, 향후 관련성분의 탐색이 필요하다. 따라서 한약재 고체발효과정을 통해 한약재의 다양한 성분 변화와 이에 따른 생리활성의 변화가 나타남을 확인하였으며, 본 실험에서는 고체발효에 의해 대장암세포 성장억제능이 의미있게 증가된 골쇄보, 구기자 및 패모를 대상으로 항암활성 및 정상세포에 대한 독성정도를 추가적으로 조사하였다.

고체발효 골쇄보, 구기자, 패모의 정상세포 및 대장암세포 생육억제 활성

HCT116 대장암세포에 대한 골쇄보, 구기자 및 패모 추출물의 농도별 생육억제능을 평가하였으며, 그 결과 50% 생육억제능을 나타내는 IC₅₀는 각각 394, 917 및 149 µg/ml로 계산되었다. 그러나 고체 발효시킨 골쇄보, 구기자 및 패모 추출물의 경우에는 각각 28, 85 및 80 µg/ml의 IC₅₀를 나타내었다(Table 3). 이는 골쇄보, 구기자 및 패모의 고체발효 과정 중 암세포 성장억제 활성물질이 생산되었음을 의미하며, 발효 골쇄보가 가장 강력한 암세포 성장억제능을 가짐을 알 수 있었다. 반면 인간 및 마우스 유래의 정상세포 HEK-293, 3T3-L1 및 MC3T3-E1에 대해 골쇄보, 구기자 및 패모 추출물을 처리한 경우 200 µg/ml 농도까지 세포독성은 나타나지 않았으며, 오히려 200 µg/ml의 고농도에서는 이들 세포들의 성장을 촉진하는 것으로 나타났다(Fig. 2). 또한 고체발효한 골쇄보, 구

자 및 패모 추출물 역시 정상세포들에 대해 심각한 세포독성을 나타내지 않았으며, 골쇄보(200 µg/ml)의 경우 HEK-293 세포에서 35%, 구기자(200 µg/ml)의 경우 MC3T3-E1세포에서 30%의 세포성장 억제를 나타내었다(Fig. 2). 그러나 대장암세포에 대한 발효 골쇄보 및 구기자의 IC₅₀가 28 및 85 µg/ml임을 고려할 때(Table 3), 100~200 µg/ml 처리농도 범위에서는 정상세포에 대한 세포독성은 미미하여 대장암세포에 우선적으로 세포독성을 나타낼 것으로 예상된다.

고체발효 골쇄보, 구기자, 패모의 인간 적혈구 용혈활성

고체발효 골쇄보, 구기자, 패모의 안전성 평가의 일환으로 인간 적혈구에 대한 용혈활성을 평가한 결과는 Table 4에 나타내었다. 먼저 장수상황버섯 균사체 추출물의 경우 150 µg/ml 농도까지는 거의 용혈이 나타나지 않았으며, 250 µg/ml 농도에서 15.5%, 1,000 µg/ml 농도에서는 84%의 용혈을 나타내었다. 선정 한약재 중 골쇄보 추출물은 125~250 µg/ml 농도에서 13~17%의 용혈을 나타내었으나, 발효 후 추출물에서는 50~125 µg/ml 농도에서 11~18%의 용혈을 나타내었다. 특히 150~250 µg/ml 농도에서는 74~88%의 매우 강력한 용혈현상을 확인하였다. 구기자의 경우에도 이러한 현상은 유사하게 나타났으며, 구기자 추출물 250 µg/ml 농도에서 11.2%의 용혈이 나타났으나 발효 후 추출물에서는 125 µg/ml 농도에서 10%, 150 µg/ml 농도에서는 69.2%의 용혈을 나타내어 발효과정 중 용혈활성 물질이 생성되었음을 알 수 있었다. 패모 추출

Table 3. Comparison of the IC₅₀s of the methanol extracts of three selected medicinal herbs and their solid state-fermented counterparts using *Phellinus baumii* mycelium against human HCT116 colorectal cell

Medicinal herbs	Korean Name	IC ₅₀ (µg/ml)	
		BF ¹	AF ²
<i>Drynaria fortunei</i> Kunze	Golsaebo	394±18.1	28±0.8
<i>Lycium chinens</i> Mill	Googija	917±27.7	85±1.4
<i>Fritillaria thunbergii</i> Miquel	Paemo	149±7.8	80±7.4

BF¹: Before fermentation, AF²: After fermentation



Fig. 2. Cell proliferation activities of the methanol extracts of (a) *Drynaria fortunei* Kunze, (c) *Lycium chinens* Mill, and (e) *Fritillaria thunbergii* Miquel and (b, d and f) their solid state-fermented counterparts using *Phellinus baumii* mycelium against HEK-293 (●), 3T3-L1 (○), and MC3T3-E1 (▼).

Table 4. Hemolytic activity of the methanol extracts of *Drynaria fortunei* Kunze, *Lycium chinens* Mill, and *Fritillaria thunbergii* Miquel and their solid state-fermented counterparts using *Phellinus baumii* mycelium against human erythrocytes

Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	<i>Drynaria fortunei</i> Kunze		<i>Lycium chinens</i> Mill		<i>Fritillaria thunbergii</i> Miquel		Mycelium of <i>P. baumii</i>
	BF ¹	AF ²	BF	AF	BF	AF	
0.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
15.6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
31.3	0.55	0.00	1.37	0.00	0.00	0.00	0.00
50.0	7.09	11.31	1.22	0.00	0.00	0.00	0.00
62.5	4.92	14.78	1.26	0.00	0.00	5.19	0.00
125.0	13.01	17.76	1.09	9.97	3.42	14.62	2.87
150.0	15.73	74.51	1.36	69.23	36.65	85.07	3.56
250.0	11.75	88.25	11.20	87.21	63.11	89.67	15.57
1000.0	95.13	87.75	88.63	93.75	83.88	87.63	84.13

BF¹: Before fermentation, AF²: After fermentation

물의 경우에는 150 µg/ml 농도에서 36.6%, 발효 후 추출물 150 µg/ml 농도에서 85.7%의 용혈 활성을 발효 골쇄보와 거의 유사한 용혈독성을 확인하였다. 이러한 결과는, 골쇄보, 구기자, 폐모의 고체발효 중 암세포 성장억제물질 및 용혈 활성물질이 동시에 매우 강력하게 생성됨을 시사하고 있으나, 발효 골쇄보, 구기자 및 폐모 추출물의 대장암 세포에 대한 IC₅₀농도 범위(28~85 µg/ml)에서는 용혈현상이 심각하게 나타나지는 않을 것으로 예상된다. 따라서, 향후 고체발효 최적화 및 대량 발효를 통한 대장암세포 성장억제 활성물질 및 용혈활성 물질의 각각의 분리연구가 필요하다고 판단된다. 본 연구 결과는 장수상황버섯 균사체를 이용한 한약재 고체발효가 새로운 항암 활성물질 개발 및 신구의 생리활성물질 생산에 이용될 수 있음을 제시하고 있다.

감사의 글

본 연구는 2009년 지역연계기술개발사업의 지원으로 이루어진 결과이며, 이에 감사드립니다.

References

- Bae, J. S., G. H. Jang, M. H. Lee, G. S. Jeong, U. S. Jo, S. G. Choe, Y. H. Kim, and S. C. Park. 2003. Comparison on the morphology, general composition, elemental composition and mineral contents of *Phellinus linteus*, *Phellinus baumii* and *Phellinus gilvus*. *Kor. J. Vet. Res.* **43**, 423-428.
- Choi, J. H., S. J. Hwang, S. N. Jeong, Y. K. Lee, M. H. Jin, S. G. Park, and C. K. Lee. 2009. Anti-aging effect on skin with 9 repetitive steaming and fermenting process herbal composition extract. *J. Herbology* **24**, 101-106.
- Han, Y. S., S. Y. Park, B. K. Choi, and S. Y. Choung. 2001. Acute oral toxicity studies of extract of sanghwang mushroom (*Phellinus linteus*). *J. Appl. Pharmacol.* **9**, 46-50.
- Jang, M. J., H. E. Kim, S. M. Son, M. J. Kim, E. W. Seo, Y. H. Kim, and J. S. Kim. 2009. Over-expression of NSAID activated gene-1 by caffeic acid phenethyl ester. *J. Life Sci.* **19**, 1787-1793.
- Jeong, J. H., J. J. Wee, J. Y. Shin, J. H. Cho, and D. H. Jung. 2005. Antioxidative effect of crude saponin fraction prepared from culture product of Basidiomycota cultured with fresh ginseng as substrate. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **37**, 67-72.
- Kim, J. S., M. H. Kwon, O. J. Lim, H. J. Seong, and H. C. Yang. 1998. Blood anticoagulation active substance from *Phellinus linteus* mycelia. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* (Spring symposium). 224.
- Kim, S. H., Y. S. Song, S. K. Kim, B. C. Kim, C. J. Lim and E. H. Park. 2004. Anti-inflammatory and related pharmacological activities of the n-BuOH subfraction of mushroom *Phellinus linteus*. *J. Ethnopharmacol.* **93**, 141-146.
- Kim, S. S., J. H. Ha, M. Y. Jeong, J. H. Ahn, W. B. Yoon, S. J. Park, D. H. Seong, and H. Y. Lee. 2009. Comparison of biological activities of fermented *Codonopsis lanceolata* and fresh *Codonopsis lanceolata*. *Kor. J. Med. Crop Sci.* **17**, 280-285.
- Kwoen, D. J., S. J. Youn, J. G. Cho, U. K. Choi, and S. C. Kang. 2006. Antioxidant activities and biological properties of *Phellinus linteus* extract according to different extraction methods. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* **49**, 91-96.
- Kwon, S. H., C. N. Kim, C. Y. Kim, S. T. Kwon, K. M. Park, and S. Hwangbo. 2003. Antitumor activities of protein bound polysaccharide extracted from mycelia of mushroom. *Kor. J. Food Nutr.* **16**, 15-21.
- Lee, C. H., M. H. Yang, S. R. Park, and Y. J. Kang. 2007. Major components of mushroom mycelia cultivated with citrus juice processing wastes. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **39**, 128-132.
- Lee, C. H., M. H. Yang, S. R. Park, and Y. J. Kang. 2007. Solvent extracted volatile components of mushroom mycelia cultivated with citrus juice processing wastes. *Kor. J. Food Preserv.* **14**, 351-355.
- Lee, H. B., H. J. Kim, M. S. Chong, H. E. Cho, Y. H. Choi, K. S. Lim, and K. N. Lee. 2008. Physiological activity of extracts from mixed culture of medicinal herbs and mycelia of *Tricholoma matsutake* and *Cordyceps militaris* by fermentation. *Kor. J. Herbology* **23**, 1-8.
- Lee, J. H. S. J. Lee, Y. H. Choi, K. T. Chung, Y. K. Jeong, and B. T. Choi. 2006. Effects of mycelial culture of *Phellinus linteus* on ethanol-induced gastric ulcer in rats. *Phytother. Res.* **20**, 396-402.
- Lee, K. H., H. J. Kown, S. S. Chun, J. H. Kim, Y. J. Cho and W. S. Cha. 2006. Biological activities of extract from *Phellinus linteus*. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* **49**, 298-303.
- Li, S. L., Z. N. Huang, H. H. Hsieh, W. C. Yu, W. Y. Tzeng, G. Y. Lee, Y. P. Chen, C. Y. Chang, and J. J. Chuu. 2009. The augmented anti-tumor effects of *Antrodia camphorata* co-fermented with Chinese medicinal herb in human hepatoma cells. *Am. J. Chin. Med.* **37**, 771-783.
- Mun, H. C., H. S. Lee, J. H. Park, D. H. Kim, S. Y. Lee, N. S. Seong, J. G. Bang, H. G. Jeong, and H. Y. Lee. 2004. Enhancement of immune activities of *Ganoderma lucidum* mycelium cultured with garlic enriched medium. *Kor. J. Med. Crop Sci.* **12**, 24-30.
- Park, E. M., S. J. Kim, E. J. Ye, M. J. Bae, and K. C. Jo. 2005. Effect of mycelia extracts of mushroom-cultured ginseng by-product on proliferation in cancer cell lines. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **34**, 323-329.
- Park, J. H., S. Y. Jeon, H. J. Lee, S. I. Kim, and K. S. Song. 2004. A β -secretase (BACE1) inhibitor hispidin from the mycelial cultures of *Phellinus linteus*. *Planta Med.* **70**, 143-146.
- Park, J. H., S. K. Chung, K. B. Lee, Y. C. Yoo, S. K. Kim, G. S. Kim, and K. S. Song. 2004. An antioxidant hispidin from the mycelial cultures of *Phellinus linteus*. *Arch. Pharm. Res.* **27**, 615-618.
- Pyo, M. Y., S. M. Hyun, and K. S. Yang. 2001. Effects of *Phellinus linteus* extracts on the humoral immune response in normal and cyclophosphamide-treated mice. *J. Appl. Pharmacol.* **9**, 194-200.

22. Rhee, Y. K., M. J. Han, S. Y. Park, and D. H. Kim. 2000. In vitro and in vivo antitumor activity of the fruit body of *Phellinus linteus*. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **32**, 477-480.
23. Ryu, H. Y., S. M. Ahn, J. S. Kim, and H. Y. Sohn. 2010. Evaluation of in-vitro anticoagulation activity of 33 different medicinal herbs. *J. Life Sci.* **20**, 922-928.
24. Shin, T. Y., H. Y. Shin, S. H. Kim, D. K. Kim, B. S. Chae, C. H. Oh, M. G. Cho, S. H. Oh, J. H. Kim, T. K. Lee, J. S. Park, and S. Y. Kim. 2006. *Phellinus baumii* inhibits immediate-type allergic reactions. *Nat. Product Sci.* **12**, 232-236.
25. Shin, Y. K., H. S. Jang, J. S. Kim, H. Y. Ryu, J. K. Kim, I. S. Kwun, and H. Y. Sohn. 2008. Solid fermentation of medicinal herb using *Phellinus baumii* mycelium and anti-thrombin and anti-oxidation activity of its methanol extract. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 201-208.
26. Shin, Y. K., J. C. Heo, J. H. Lee, and S. H. Lee. 2010. Analysis of the anti-allergic activities of active components produced by solid fermentation of *Phellinus baumii* and *Ephedra sinica*. *Kor. J. Food Preserv.* **17**, 297-300.

초록 : 장수상황버섯 균사체를 이용한 고체 발효한약재의 대장암 세포성장 억제 활성

손호용* · 신용규¹ · 김종식²

(안동대학교 식품영양학과, ¹(주) 바이온 생물공학연구소, ²안동대학교 생명과학과)

본 연구에서는, 장수상황버섯(*Phellinus baumii*) 균사체를 이용한 한약재 고체발효 추출물의 암세포 성장억제 효과를 확인하고자 36종의 한약재 및 이들의 고체발효 한약재 추출물을 대상으로, 인간 대장암세포(HCT116) 성장억제능, 정상세포(HEK-293, 3T3-L1 및MC3T3-E1)에 대한 세포독성 및 인간 적혈구 용혈활성을 평가하였다. 선별된 36종의 한약재 추출물은 100 µg/ml 농도에서, 사인, 천궁, 석곡, 백선피, 시체, 두충, 백과, 신이, 와송, 삼칠, 견우자, 원지 및 팔루인의 13종에서 암세포 성장률이 50% 이하를 나타내었으며, 균사체 추출물은 46.3%의 성장률을 나타내었다. 반면 25종의 발효한약재 추출물은 대부분 암세포 성장억제능의 변화가 미미하였으나, 백선피, 백과, 신이, 황부자, 산약, 현삼 및 팔루인은 암세포 증식억제능이 유의적으로 감소하였으며, 도인, 골쇄보, 구기자 및 패모에서는 암세포 성장억제능이 유의적으로 증가하였다. 특히 골쇄보, 구기자 및 패모 추출물의 대장암세포에 대한 IC₅₀는 각각 394, 917 및 149 µg/ml이었으나, 발효 후 각각 28, 85 및 80 µg/ml를 나타내었다. 또한 발효 골쇄보, 구기자 및 패모 추출물은 200 µg/ml 농도까지 정상세포에서 미미한 세포독성을 나타내었다. 이러한 결과는 장수상황버섯 균사체를 이용한 한약재 고체발효가 새로운 항암 활성물질 개발 및 신규의 생리활성물질 생산에 이용될 수 있음을 제시하고 있다.