

## 차가버섯과 어성초 함유 발효 조성물이 인체 위암 AGS 및 대장암 HCT-15 세포 생육에 미치는 영향

차재영 · 전병삼<sup>1</sup> · 박정원<sup>1</sup> · 문재철<sup>2</sup> · 조영수\*

동아대학교 응용생명공학부, <sup>1</sup>경상대학교 의과대학 미생물학교실, <sup>2</sup>(주)흥재그린

(2003년 1월 2일 접수, 2004년 2월 16일 수리)

어성초 분말을 포함하는 차가버섯 발효 조성물의 물 추출물이 인체 위암 세포 AGS 및 대장암 세포 HCT-15, 그리고 정상세포 NIH3T3 fibroblast의 세포 생육에 미치는 영향을 검토하였다. 세포독성 실험은 세포수 count와 MTT 방법으로 측정하였다. 어성초 분말을 포함하는 차가버섯 발효 조성물의 제조는 차가버섯과 어성초 분말을 혼합하고, 여기에 대두 발효 미생물원을 다시 혼합시켜 습도 50~60%, 온도 30~37°C에서 30일 정도 발효시킨 후 건조시킨 분말에서 5% 물 추출물을 얻어 동결건조 시켜 실험에 제공하였다. MTT assay 방법에서 차가버섯 발효 조성물의 수용성 추출물 0.16, 0.4, 0.8, 1.6 및 4.0 mg/ml 첨가 농도에서 AGS 세포 생육은 13, 25, 40, 67 및 78% 억제 되었으며, HCT-15 세포 생육은 22, 40, 50, 69 및 76%씩 각각 억제되었다. 그러나 동일한 실험조건에서 정상 세포주 NIH3T3은 86% 이상의 생존율을 나타내었다. 차가버섯 발효 조성물의 수용성 추출물은 인체 대장암 세포주 HCT-15와 위암 세포주 AGS에 대해 생육억제 작용이 강한 반면, 정상세포 NIH3T3에 대해서는 세포 독성을 거의 나타내지 않아 가장 바람직한 암예방 또는 항암식품 개발가능성을 제시하였다.

**Key words:** *Inonotus obliquus*, *Houttuynia cordata*, HCT-15, AGS, NIH3T3

### 서 론

차가버섯(*Inonotus obliquus*)은 Hymenochaetae에 속하는 약용버섯으로 주로 러시아를 비롯한 한랭지역에서 자생하는 검은자작나무에 덩이 모양으로 기생하는 균핵으로 이루어져 표면은 검고 내부는 황갈색을 띄고 있다.<sup>1,2</sup> 차가버섯은 다른 약용버섯과 마찬가지로 항종양 활성을 나타내는 다당체를 많이 함유하고 있는데, 특히 xylogalactoglucan이 주요 생리활성 성분으로 알려져 있다.<sup>3,5</sup> 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 보고되었다.<sup>5</sup> 이러한 다당체의 구조는 β-(1,3) 주쇄에 β-(1,6) 곁가지로 구성된 glucan으로 고분자의 다당체에서 항종양 활성이 강하다고 하였다.<sup>6</sup> 또한, 항종양 활성을 나타내는 다른 성분으로는 lanosterol, ergosterol과 같은 sterol류와 inotodiol, butulin과 같은 triterpene류가 분리되었으며,<sup>2,3</sup> 유방암 세포주인 MCF-7 및 혈액암 세포주인 P388에 대해서 세포독성을 나타낸다고 보고된 바 있다.<sup>3,4</sup> Ham 등도 차가버섯에서 얻은 활성분획 중에서 특히 에틸아세테이트 분획물에서 폐암세포주 A549, 유방암세포주 MCF-7 및 위암세포주 AGS의 세포 성장을 억제시킨다고 하였다.<sup>7</sup> 차가버섯을 비롯한 대부분 버섯류의 생리활성성분 중에서 항종양 활성 성분은 물 추출물중에 함유된 다당체에 기인하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 기능성식품을 개발하는데 있어서 안전성과 경제성을 고려해 볼 때 수용

성 추출물이 가장 바람직한 것으로 생각된다. 그러나, 차가버섯의 항종양 활성은 에틸아세테이트 분획물에서 강하게 나타났으나, 수용성 분획에서는 상대적으로 약하면서도 정상세포에 대해서도 약간의 성장억제 작용이 있는 것으로 보고되어 이러한 문제점을 개선할 수 있는 연구가 필요하다고 본다.<sup>7</sup> 본 연구자들은 이러한 점을 감안하여 물 추출물중에 종양세포에 대해 성장억제 작용을 나타내는 catechin과 같은 polyphenol 화합물을 많이 함유한 녹차<sup>8,9</sup>를 일부 첨가하여 발효시킨 조성물의 물 추출물에 위암 및 대장암 세포의 생육억제 작용이 있는 결과를 선행연구를 통하여 얻을 수 있었다.

어성초는 삼백초(Saururaceae)과에 속하는 다년생의 전통약용 식물로서 항균작용, 항virus작용, 항콜레스테롤 작용, 면역기능 증강작용 등이 보고되어 있다.<sup>10-12</sup> 또한, 어성초에는 aristolactam, piperolactam, splendidine 같은 alkaloids와 quercitrin, quercetin, kaempferol 같은 polyphenol류가 많이 함유되어 있어 항산화 활성 및 항암작용이 강한 것으로 보고된 바 있다.<sup>13,14</sup> 본 연구에서도 차가버섯의 항종양 활성을 증가시킬 목적으로 항종양 활성이 강한 어성초를 첨가하여 발효시킨 조성물의 물 추출물을 얻어 최근 우리나라 남녀 모두에서 가장 많이 발생하는 위암과 대장암에 대한 항암효과를 검토하기 위하여 인체유래 위암 세포주 AGS(gastric cancer cell)와 대장암 세포주 HCT-15(colon cancer cell) 생육에 미치는 항종양 효과를 검토하였다.

### 재료 및 방법

**실험재료의 조제.** 어성초를 포함하는 차가버섯 발효 조성물의 물 추출물중의 항종양 활성을 나타내는 다당체의 기능을 높이기 위하여 본 연구자들에 의하여 분리 보관된 protease와

\*연락처

Phone: 82-51-200-7586, Fax: 82-51-200-7505

E-mail: choys@daunet.donga.ac.kr.

amylase 활성이 강한 *Bacillus*속 균주를 배양시킨 후 살균한 대두 발효기질에 접종하여 37°C에서 7일간 발효시켜 미생물원을 얻었다.<sup>15)</sup> 차가버섯 분말과 어성초분말을 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 건조시킨 후 분말화 시켰다. 이렇게 조제된 차가버섯 발효 조성물을 5%(w/v) 농도로 증류수에 취하여 80~100°C에서 3시간 추출한 후 여과지로 여과시킨 후 동결건조시켜 얻은 분말을 시료로 사용하였다. 본 실험에 사용한 차가버섯과 어성초 분말은 (주)홍재그린(Seoul, Korea)에서 제공받아 사용하였다.

**총당 측정 및 다당체 확인.** 차가버섯 발효 조성물의 총당은 phenol-sulfuric acid법으로 발색시켜 490 nm에서 흡광도를 측정 한 검량선으로부터 총당 함량을 계산하였다.

차가버섯 발효 조성 + 물의 다당체를 확인하기 위한 박층 크로마토그래피는 silica gel plate(25 DC-Alufolien Kieselgel 60, Merck Co., Ltd.) 상에 5% 수용성 추출물을 spot하여 1-butanol/ethanol/water(5:5:3) 용매로 전개시켰다. 전개가 완료된 plate는 3% 황산을 함유한 methanol 발색용액을 살포 한 후 hot plate 상에서 가열시켜 다당체의 분획을 확인하였다. 이때 사용한 표준물질은 standard malto-oligosaccharides(G1-G7)로서 G1, G2, G3, G4, G5, G6 및 G7은 각각 glucose, maltose, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose, maltohexaose 및 maltoheptaose이었다.

**정상세포 및 종양세포 배양.** 인체 위암 세포주 AGS, 대장암 세포주 HCT-15 및 NIH3T3은 Korea Cell Line Bank (KCLB, Seoul, Korea)에서 분양 받아 계대 배양하면서 사용하였다. 세포 배양에는 RPMI media 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<sup>16,17)</sup>에 따라 10% FBS, 0.1 mg/ml penicillin-G, 0.01 mg/ml streptomycin을 함유한 RPMI media 1640 복합배지에 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% 공기의 조건하에서 10 cm Falcon dish로 약 1주일간 배양하였으며, 이때 배지는 2~3일에 한번씩 교환하였다. 실험 개시전 세포를 배양기에 2×10<sup>6</sup>개씩 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 희석하여 본 실험에 사용하였다. 차가버섯 발효 조성물의 5% 추출물을 동결건조시켜 얻은 분말을 RPMI 1640에 0.16~4.0 mg/ml 농도가 되도록 현탁 시킨 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 살아 있는 세포의 미토콘드리아 내막에 존재하는 oxido-reductase의 효소 작용에 의해 환원되어 보라색의 불용성 formazan을 생성한다. 이렇게 생성된 fomazan을 용해시켜 그 발색정도를 흡광도로 측정함으로써 살아있는 세포의 수를 계측할 수 있다. 본 실험

**Table 1. Carbohydrate concentration of fermented compositions containing *Inonotus obliquus* with *Houttuynia cordata***

5% water-extract (mg/ml)	Total (%)
8.59	42.94%

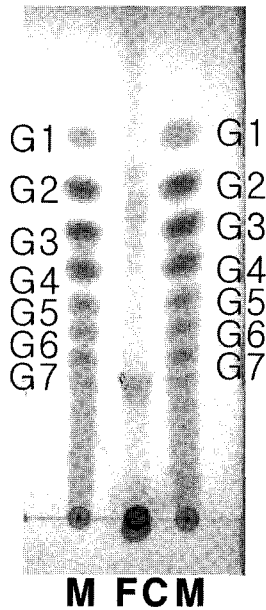
험에서는 먼저 차가버섯 발효 조성물의 수용성 추출물의 농도별 세포 생육 저해실험을 MTT assay로 분석하였다. 종양세포 및 정상세포를 2×10<sup>4</sup> cells/ml 농도가 되도록 조절한 후 96 well plate에 100 μl씩 분주하고 이것을 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 6시간 배양하여 세포를 부착시킨 후 각각 차가버섯 조성물의 추출물을 0.16, 0.4, 0.8, 1.6, 4.0 mg/ml 농도로 만들 실험용액을 각각 20 μl씩 되도록 첨가하였다. 이것을 96시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 배양시킨 후, 5 mg/ml 농도로 PBS로 희석한 MTT(Sigma chemical Co., Louis, Mo., USA) 용액을 각 well당 10 μl씩 넣고 세포배양기에서 4시간 동안 반응시켰다. 이때 생성된 MTT formazan을 용해하기 위해 solubility solution(0.04 N HCl in isopropanol)을 각 well당 100 μl씩 첨가하고, dark blue crystal을 용해시킨 후 ELISA-reader(Bio-Rad Model 550 Microplate Reader, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 세포의 시료 무첨가구를 100%로 하여 상대적인 세포 성장률을 구하였다. 또한, 농도별 세포 배양 실험에서 얻어진 결과를 바탕으로 정상세포에 80% 이상의 생존율을 보이는 1.6 mg/ml 농도로 각 세포 배양에 첨가하여 96시간 배양시켜 상기와 동일한 방법으로 MTT assay를 분석하였다.

**Viable Cell Count에 의한 세포생육 저해실험(Cytotoxicity test).** AGS와 HCT-15 및 NIH3T3 세포를 2×10<sup>6</sup> cells/ml 되도록 조절하여 24 well tissue culture dish에 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 6시간 동안 배양하여 세포를 dish 바닥에 부착시킨 후, 차가버섯 발효 조성물의 추출물을 0.16, 0.4, 0.8, 1.6, 4.0 mg/ml 농도로 만든 실험 용액을 각각 20 μl씩 첨가하였다. 이를 24시간 간격으로 최대 96시간까지 배양하면서 세포수를 측정하였는데, 이 때 모든 세포 실험은 3회 반복 측정하였다. 경시적으로 배양된 세포에 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, 1 분후 haematometer로 세포수를 측정하였다.

**세포 형태 관찰.** 각 세포의 형태 변화의 관찰을 위하여 1.6 mg/ml 농도로 첨가하여 96시간 배양한 후 디지털 카메라가 장착된 culture microscopes(CKX41, Olympus Optical Co., Ltd. Tokyo, Japan)에 200배 배율로 확대하여 촬영하였다.

**결과 및 고찰**

**차가버섯 조성물의 총당 함량 및 다당체 확인.** 우리나라를 비롯한 동양권에서 약용버섯으로 알려진 *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes*, *Agricus blazei* 및 *Grifola frondosa* 등에서 항종양 활성을 나타내는 성분은 주로 polysaccharides가 알려져

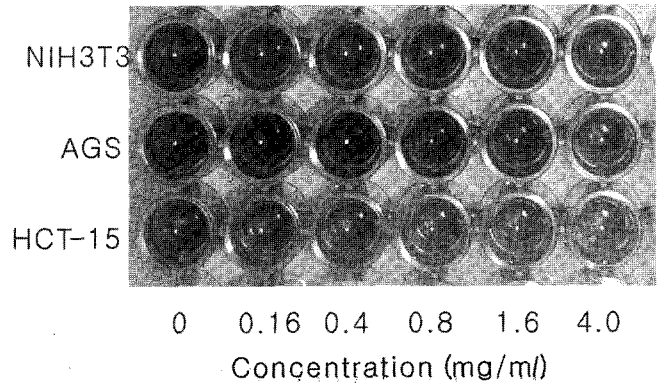


**Fig. 1.** Thin-layer chromatogram of 5% water extract from fermented compositions containing *Inonotus obliquus* with *Houttuynia cordata*. Standards were malto-oligosaccharides consisted of G1 (glucose), G2 (maltose), G3 (maltotriose), G4 (maltotetraose), G5 (maltopentaose), G6 (maltohexaose) and G7 (maltoheptaose).

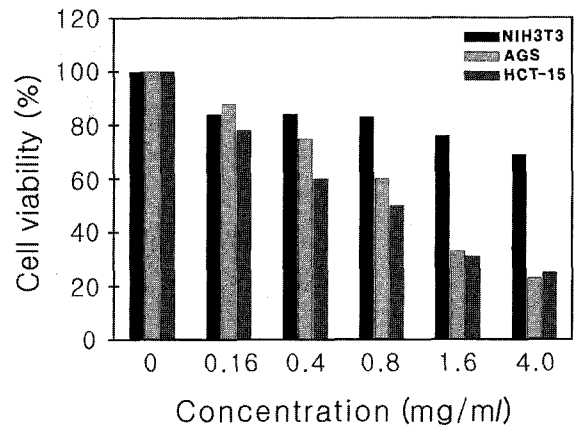
있다.<sup>18-21)</sup> 이들 다당체는 주로 glucuronoglucan, galacglucmannan, glucomannan 및 xyloglucan으로서 대부분 열수 추출물에 함유되어 있다. 상항버섯으로부터 물 열수 추출의 최적조건을 검토한 실험에서 시료 5% 농도, 온도 80~100°C, 3시간 추출에서 가장 수율이 높았다고 하였다.<sup>22)</sup> 본 실험에서도 이와 동일한 조건으로 처리하여 얻은 결과, 차가버섯 발효 조성물의 5% 수용성 추출물의 phenol-sulfuric acid법으로 측정된 총당 함량은 8.59 mg/ml로 나타났으며, 총당은 42.94%를 차지하였다. 차가버섯으로부터 추출된 수용성 및 불용성 polysaccharides 수율이 각각 17.7% 및 13.3%로 나타나 본 연구 결과보다 약간 낮았으며, 버섯 자실체 추출물중의 다당체가 균사체 배양 다당체보다 2~3배 정도 높은 항암효과를 가진다고 하였다.<sup>5)</sup> 이러한 다당체의 구조는 β-(1,3) 주쇄에 β-(1,6) 곁가지가 결합된 glucan인 xylogalactoglucan으로 밝혀졌다.<sup>5,6)</sup>

TLC 전개용매로 butanol : ethanol : water(5 : 5 : 3)를 사용하여 다당체를 분리한 TLC chromatogram은 Fig. 1과 같다. 차가버섯 추출물의 다당체를 박층 크로마토그래피법으로 확인한 결과 대부분 분자량이 상당히 큰 고분자의 당으로 확인 되었으며, G7 부근에 저분자 당이 조금 나타났다. 일반적으로 버섯유래의 항암효과를 가지는 다당체는 β-(1,3) 결합에 β-(1,6) 곁가지를 가지는 비교적 고분자 glucan으로 수용성 추출물중에 있는 것으로 알려져 있다.<sup>5,23,24)</sup>

MTT 분석에 의한 세포 생존율. 최근의 조사에서 우리나라의 경우 식생활이 서구화 되어감에 따라 위암 및 대장암 발생률이 꾸준히 증가 추세로 나타나고 있다.<sup>25)</sup> 따라서, 본 실험에서는 최근 들어 성인 남녀 모두에서 급속히 증가되어 사회적 문제로 제기되고 있는 위암 및 대장암에 대한 항종양 효과를 검토하기 위하여 인체유래 위암 세포주 AGS(gastric cancer cell)와 대장



**Fig. 2.** Photograph of MTT assay of the water-extract from fermented compositions containing *Inonotus obliquus* with *Houttuynia cordata* against NIH3T3 normal mouse 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 for 96 hours.



**Fig. 3.** MTT assay of the water-extract from fermented compositions containing *Inonotus obliquus* with *Houttuynia cordata* against NIH3T3 normal mouse 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 for 96 hours.

암 세포주 HCT-15(colon cancer cell)를 선택하였다.

MTT assay는 살아있는 세포의 미토콘드리아 내막에 존재하는 oxido-reductase의 효소 작용에 의해 분해 되면서 생성되는 황색 수용성 물질인 MTT에 의해 dark blue formazan 생성량은 대사적으로 활성이 있는 살아있는 세포수와 거의 비례하는 것으로 알려져 세포의 생육과 분화를 측정하는데 아주 효과적으로 사용되는 방법이다.<sup>26)</sup> 차가버섯 발효 조성물의 추출물 첨가 농도에 의한 정상 및 종양세포의 MTT assay 결과를 사진으로 나타내면 Fig. 2와 같다. 차가버섯 발효 조성물의 추출물을 각 세포에 0~4.0 mg/ml 농도별로 증가시킬 때 정상세포인 NIH3T3 세포는 생육이 크게 저해되지 않았지만, 위암 세포주 AGS 및 대장암 세포주 HCT-15는 무첨가구에 비해 각각 첨가 농도가 높을수록 살아있는 세포가 상대적으로 적은 것으로 나타나 세포생육 저해가 일어났다는 것을 의미한다. 이러한 MTT assay의 결과는 Fig. 3과 같이 차가버섯 발효 조성물의 추출물을 0.16~1.60 mg/ml 농도로 첨가하였을 때 NIH3T3 세포는

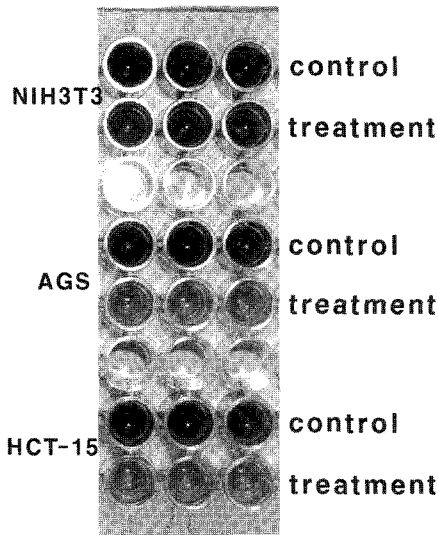


Fig. 4. Photograph of MTT assay of the water-extract at 1.6 mg/ml from fermented compositions containing *Inonotus obliquus* with *Houttuynia cordata* against NIH3T3 normal mouse fibroblast, HCT-15 colon carcinoma and AGS gastric carcinoma cells for 96 hours.

86% 이상의 높은 생존율을 보였으나, 단지 4.0 mg/ml 고농도에서는 71%의 생존율을 보였다. AGS 종양세포에 대해서는 0.16, 0.4, 0.8, 1.6, 4.0 mg/ml 농도에서 각각 13, 25, 40, 67, 78%의 생육 저해율을 나타내었고, HCT-15 종양세포에 대해서는 22, 40, 50, 69, 76%의 생육 저해율을 나타내었다.

차가버섯 발효 조성물의 추출물 1.60 mg/ml 농도로 각 세포 배양에 첨가하여 96시간 배양한 후 MTT assay를 나타낸 결과는 Fig. 4와 같다. 정상세포인 NIH3T3은 차가버섯 발효 조성물의 추출물 첨가에 의해서도 세포독성이 거의 없었다. 그러나, 종양 세포주인 AGS와 HCT-15에서는 dark blue formazan 생성량이 많아 짙은 자색을 띄고 있는 무첨구에 비해서 첨가구에서는 옅은 색을 띄어 살아있는 세포수가 상대적으로 적어 생육 억제 효과가 확인되었다.

이때 위상차 현미경을 이용하여 차가버섯 발효 조성물의 추출물 1.6 mg/ml 첨가에 의한 세포형태 변화의 사진은 Fig. 5와 같으며, 특히 종양 세포주 HCT-15와 AGS 세포의 경우 세포사멸 정도가 분명하게 나타난 것을 알 수 있다. 따라서 차가버섯 발효 조성물의 추출물 농도가 1.60 mg/ml 이하에서는 정상세포인 NIH3T3 세포의 생육에는 큰 영향을 미치지 않으면서 위암 세포와 대장암 세포에는 특이적으로 세포 생육을 크게 저해시킴으로써 항암작용이 있는 것으로 확인되었다.

**정상세포 및 종양세포의 세포수 측정에 의한 세포 생존율.** 차가버섯 발효 추출물의 1.6 mg/ml 농도로 각 세포에 첨가하여 최대 96시간까지 배양하면서 세포수를 측정하여 생존율을 나타낸 결과는 Fig. 6과 같다. 차가버섯 발효 조성물의 추출물을 첨가하지 않은 각각의 무첨가구를 100%로 하여 상대치로 나타내었을 때 정상세포주 NIH3T3은 96시간까지의 세포 배양에서도 80% 이상의 높은 생존율을 나타내어 MTT assay와 동일한 결과로써 정상세포에는 거의 독성이 없는 것으로 확인되었다. 그러나, 동일 농도에서 위암 세포주 AGS는 73%의 세포 생육 억

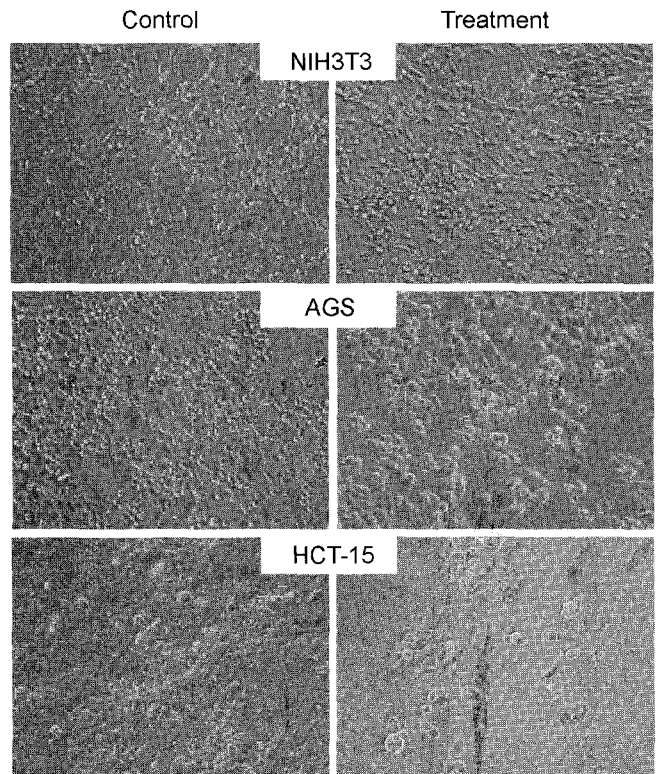


Fig. 5. Morphologic observations of NIH3T3 normal mouse fibroblast, HCT-15 colon carcinoma and AGS gastric carcinoma cells were treated with water-extract at 1.6 mg/ml from fermented compositions containing *Inonotus obliquus* with *Houttuynia cordata* for 96 hours.

제율과 대장암 세포주 HCT-15의 경우는 79%로 나타나 상당한 종양세포 억제 효과가 확인되었다. 이러한 결과는 이전의 연구에서 어성초 첨가 대신 녹차분말을 넣었을 때 나타난 HCT-15의 53%와 AGS 세포의 58% 생육 억제 효과보다 높게 나타나 일부는 어성초의 효과에 의한 것으로 사료되어 진다. 어성초에도 aristolactam, piperolactam, splendidine 같은 alkaloids와 quercitrin, quercetin, kaempferol 같은 polyphenol류가 많이 함유되어 있어 일부 항종양 활성이 밝혀져 있다.<sup>13)</sup> 한편, 차가버섯의 생리활성 물질중에서 특히 수용성 다당체인 xylogalactoglucan에 의한 항암작용이 있다는 결과를 고려해 볼 때 차가버섯 발효 조성물의 수용성 추출물중에 총당 함량이 상당히 높았기 때문에 이러한 성분을 함유할 가능성이 있어서 차가버섯 유래의 항종양 활성의 일부 작용과 상관관계를 유추할 수 있다.<sup>9)</sup> Ham 등은 차가버섯 분획물을 얻어 인간 위암세포주 AGS의 성장저해 효과를 검토한 결과, 저분자 물질, 물분획물 및 수용성 다당체의 4.0 mg/ml 첨가 농도에서 각각 57.9, 59.6 및 61.4%의 세포 성장 억제효과가 나타난 것으로 보고 하였다.<sup>7)</sup> 이들 분획물은 인체 정상 세포주 293(transformed primary human embryonal kidney)에 대해서도 세포 생육을 40% 정도 까지 억제시킨 것으로 나타나 정상세포에 대해서도 상당한 세포독성이 있었음을 의미하였다. 따라서 Ham 등이 사용한 차가버섯 분획물 첨가량보다 1.5배 정도 적은 양임에도 불구하고 종양 세포 성장 억제작용이 강한 것은 어성초 유래의 물질 또

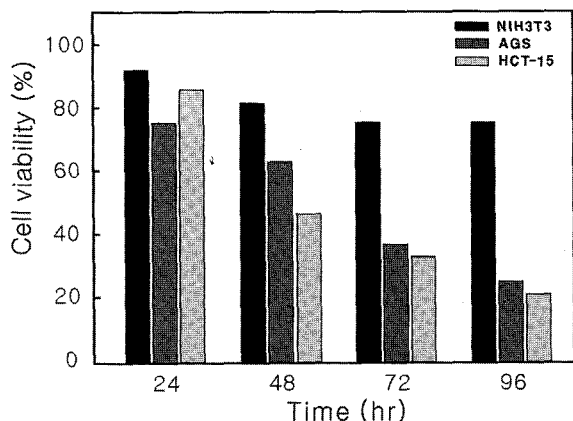


Fig. 6. Inhibitory effects of water-extract at 1.6 mg/ml from fermented compositions containing *Inonotus obliquus* with *Houttuynia cordata* on the growth of NIH3T3 normal mouse fibroblast, HCT-15 colon carcinoma and AGS gastric carcinoma cells for 24 and 96 hours. Viable cells were counted by the trypan blue dye exclusion test, and represents an average of triplicate measurements.

는 발효원 첨가로 인한 차가버섯 유래의 다당체 분해에 의해 생성된 물질의 영향을 받은 것으로 사료되어 지나, 정확한 실험 내용에 대해서는 차후 보다 자세한 검토가 있어야 할 것으로 여겨진다.

최근 국내산 버섯을 소재로 하여 항종양 활성을 가지는 성분 탐색에 관한 다수의 연구에서 대부분 버섯 자실체 또는 균사체 배양에서 얻어지는 다당류에 기인하는 것으로 보고되고 있다.<sup>18,19)</sup> 표고버섯 자실체에서 순수 분리된 *lentianin* 성분이 실험쥐에 sarcoma-180으로 유발시킨 고형암에 대해 강한 항암작용을 나타내었고,<sup>20)</sup> 차가버섯 추출물 다당류에서도 인간 폐암세포주 A549 및 유방암 세포주 MCF-7에 대하여 비교적 높은 암세포 성장 억제효과를 나타내었다고 보고하였다.<sup>3)</sup> 이러한 버섯 다당체의 항종양 활성은 종양세포를 직접 공격하지 않고 숙주의 면역계에 작용하여 생체방어력 증강에 의한 것으로 시사되고 있다. 또한, 차가버섯의 *inotodiol*, *lanosterol*, *ergosterol*, *butulin*과 같은 *triterpene*류 성분이 유방암 세포주인 MCF-7 및 혈액암 세포주인 P388에 대해서 세포독성을 나타낸다고 보고한 바 있다.<sup>3)</sup> 따라서, 본 실험에서 차가버섯 조성물이 정상세포에는 거의 영향을 미치지 않으면서도 위암과 대장암 세포 생육을 저해시키는 결과를 근거로 종양 유발 동물실험에서도 유사한 결과가 얻어 진다면 기존에 시판되고 있는 항암제의 부작용을 최소화하면서도 안전성이 높은 기능성 식의약품 개발 가능성을 기대할 수 있을 것이다.

이상의 실험 결과로부터 어성초를 함유한 차가버섯 발효 조성물 유래의 수용성 추출물은 정상세포의 세포 생육에는 크게 영향을 미치지 않으면서도 위암 세포와 대장암 세포의 생육을 크게 저해시킴으로써 가장 바람직한 새로운 암예방 및 항암식·의약품의 소재 개발 가능성을 제시하게 되었다.

## 참고문헌

1. Kier, L. (1961) Triterpenes of *Poria obliqua*. *J. Pharm. Sci.* **50**,

471-474.

- Shivrina, A. N. (1967) Chemical characteristics of compounds extracted from *Inonotus obliquus*. *Chem. Abstr.* **66**, 17271-17279.
- Kahlos, K., Kangas, L. and 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. and Meijer, L. (1999) Antitumor and hypohlycemic activities of polysaccharides from the *Sclerotia* and *Mycelia* of *Inonotus obliquus* (Pers.: Fe.) PII. (Aphyllphoromycetidae). *Int. J. Med. Mushrooms* **1**, 301-316.
- Wasser, S. P. (2002) Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**, 258-274.
- Mizuno, T., Minato, K., Ito, H., Kawade, M., Terai, H. and Tsuchida, H. (1999) Antitumor polysaccharide from the mycelium of liquid-cultured *Agricus blazei* Murrill. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **47**, 707-714.
- Ham, S. S., Oh, S. W., Kim, Y. K., Shin, K. S., Chang, K. Y. and Chung, G. H. (2003) Antimutagenic and cytotoxic effects of ethanol extract from the *Inonotus obliquus*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **32**, 1088-1094.
- Murakami, C., Hirakawa, Y., Inui, H. and Nakano, Y. (2002) Effect of tea catechins on cellular lipid peroxidation and cytotoxicity in HepG2 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**, 1559-1562.
- Vernon, E. S. and Gary, J. (2000) Comparative chemopreventive mechanism of green tea, black tea and selected polyphenol extracts measured by *in vitro* bioassay. *Carcinogenesis* **21**, 63-67.
- Song, J. H., Kim, M. J., Kwon, H. D. and Park, I. H. (2003) Antimicrobial activity of fractional extracts from *Houttuynia cordata* root. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **32**, 1055-1058.
- Sung, N. J., Lee, S. J., Shin, J. H. and Kim, H. S. (1998) The effect of feeding juice and powder of *Houttuynia cordata* Thunb on serum lipids in rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **27**, 1223-1229.
- Hayashi, K., Kamiya, M. and Hayashi, T. (1995) Virucidal effects of the steam distillate from *Houttuynia cordata* Thunb and its components on HSV-1, influenza virus and HIV. *Planta Med.* **61**, 237-240.
- Kim, S. K., Ryu, S. Y., No, J., Choi, S. U. and Kim, Y. S. (2001) Cytotoxic alkaloids from *Houttuynia cordata*. *Arch. Pharm. Res.* **24**, 518-521.
- Lee, S. T., Lee, Y. H., Choi, Y. J., Shon, G. M., Lee, H. J. and Heo, J. S. (2002) Composition of quercetin and soluble tannin in *Houttuynia cordata* Thunb according to growth stages and plant parts. *Korean J. Medicinal Corp Sci.* **10**, 12-16.
- Ok, M., Kim, M. S., Seo, W. S. and Cha, J. Y., Cho, Y. S. (2000) Characterization of extracellular protease of *Bacillus* sp. WRD-1 isolated from soil. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 329-333.
- Yotsumoto, H., Yanagita, T., Yamamoto, K., Ogawa, Y., Cha, J. Y. and Mori, Y. (1997) Inhibitory effects of Oren-Gedoku-to and its components on cholesteryl ester synthesis in cultured human hepatocyte HepG2 cells: Evidence from the cultured

- HepG2 cells and *in vitro* assay ACAT. *Planta Med.* **63**, 141-145.
17. Yanagita, T., Hara, E., Yotsumoto, H., Rahman, S. M., Han, S. Y., Cha, J. Y. and 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. *Curr. Ther. Res.* **60**, 423-434.
  18. 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.
  19. Li, X., Rong, J., Wu, M. and Zeng, X. (2003) Anti-tumor effect of polysaccharide from *Grifola frondosa* and its influence on immunological function. *Zhong Yao Cai.* **26**, 31-32.
  20. Goro, C. Jnuli, H., Yukiko, Y., Yoshiko, A. and 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.
  21. Kawagishi, H., Inagaki, R., Kanao, T., Mizuno, T., Shimura, K., Ito, H., Hagiwara, T. and Hakamura, T. (1989) Fractionation and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agricus blazei* fruiting bodies. *Carbohydr. Res.* **186**, 267-274.
  22. Song, H. N. and Oh, S. W. (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.
  23. Ohno, N., Miura, N. N., Nakajima, M. and Yadomae, T. (2000) Antitumor 1,3-beta-glucan from cultured fruit body of *Sparassis crispa*. *Biol. Pharm. Bull.* **23**, 866-872.
  24. Suzuki, K., Mikami, T., Okawa, Y., Tokoro, A., Suzuki, S. and Suzuki, M. (1986) Antitumor effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose. *Carbohydr. Res.* **151**, 403-408.
  25. Korean National Cancer Center (2002) Annual Report on the Cause of Cancer Statistics.
  26. Dnizot, F. D. and 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.

---

#### Effect of Fermented Compositions Containing *Inonotus obliquus* with *Houttuynia cordata* on Growth of Human AGS Gastric and HCT-15 Colon Cancer Cells

Jae-Young Cha, Beong-Sam Jeon<sup>1</sup>, Jeong-Won Park<sup>1</sup>, Jae-Chul Moon<sup>2</sup> and Young-Su Cho\* (Dept. of Biotechnology, College of Natural Resources and Life Science, Dong-A University, Busan 604-714, Korea;<sup>1</sup>Dept. of Microbiology, College of Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 660-750, Korea; <sup>2</sup>Hong Jae Green Co., Ltd. Seoul 151-802, Korea)

**Abstract:** This study was performed to investigate the inhibitory effect of the water-extract from fermented compositions containing *Inonotus obliquus* with added *Houttuynia cordata* on the growth of either human AGS gastric and HCT-15 colon cancer cells or NIH3T3 normal mouse fibroblast cells. Cytotoxic activity on cancer cells was investigated by viable cell count, MTT assay and morphological observation. Mixtures of *Inonotus obliquus* with added *Houttuynia cordata* were fermented at 30~37°C, 50~60% humidity for 30 days, extracted with water, freeze dried, powdered, and then dissolved in water for the experiment. In MTT assay, the fermented compositions exhibited inhibitory effects of 13, 25, 40, 67 and 78% for AGS and 22, 40, 50, 69 and 76% for HCT-15 at 0.16, 0.4, 0.8, 1.6 and 4.0 mg/ml, respectively. However, normal NIH3T3 cells were exhibited 86% survival under the same experimental condition. Fermented compositions showed highly inhibitory effect against human cancer cell line HCT-15 and AGS, but not on normal cell line NIH3T3.

---

Key words: *Inonotus obliquus*, *Houttuynia cordata*, HCT-15, AGS, NIH3T3

\*Corresponding author