

잎새버섯(*Grifola frondosa*)의 자실체에서 추출한 조다당류의 면역증강 및 항암효과

김정화¹ · 차윤정¹ · 심미자² · 이민웅³ · 이태수^{1*}

¹인천대학교 생명과학부, ²서울시립대학교 생명과학과, ³동국대학교 생물학과

Immuno-stimulating and Antitumor Effects of Crude Polysaccharides Extracted from Fruiting Body of *Grifola frondosa*

Jeong Hwa Kim¹, Youn Jeong Cha¹, Mi Ja Shim², Min Woong Lee³ and Tae Soo Lee^{1*}

¹Division of Life Sciences, University of Incheon, Incheon 406-772, Korea

²Department of Life Sciences, University of Seoul, Seoul 130-743, Korea

³Department of Applied Biology, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea

(Received 15, March 2011., Accepted 21, March 2011)

ABSTRACT : 80% methanol and 0.9% neutral saline soluble and hot water substances (hereinafter referred to Fr. NaCl, Fr. HW and Fr. MeOH, respectively) were extracted from fruiting bodies of *Grifola frondosa*. *In vitro* cytotoxicity tests, crude polysaccharides were not cytotoxic against cancer cell lines such as Sarcoma 180 and RAW 264.7 at the concentration of 10~2000 µg/ml, but crude polysaccharides from Fr. NaCl was slightly toxic to HT-29 and NIH3T3 at the concentration of 2000 µg/ml. Intraperitoneal injection with crude polysaccharides exhibited life prolongation effect of 25.0~52.9% in mice previously inoculated with Sarcoma 180. Fr. HW increased the numbers of spleen cells by 1.3 fold at the concentration of 200 µg/ml compared with control. Fr. NaCl improved the immuno-stimulating activity of B lymphocyte by increasing the alkaline phosphatase activity by 1.5 fold compared with control at the concentration of 200 µg/ml. 10~14 µM of nitric acid were generated when Fr. NaCl was added to RAW 264.7 at the concentration of 50~500 µg/ml, while the control group produced 4.3 µM of nitric oxide. The Fr. NaCl, Fr. HW and Fr. MeOH increased the production of TNF-α, IL-1β, IL-2 and IL-6 by more than 1.4 times compared with the control group. The Fr. of MeOH increased the numbers of peritoneal exudate cells and circulating leukocytes by 3.0 and 2.0 folds compared with the control at the concentration of 50 µg/ml, respectively. Therefore, the crude polysaccharides extracted from fruiting bodies of *Grifola frondosa* could improve antitumor activity of mice.

KEYWORD: Antitumor effect, Crude polysaccharides, Immuno-stimulating, *Grifola frondosa*

서 론

한국산 버섯의 항암효과에 대한 초기 연구는 구름버섯, 표고 및 느타리의 자실체를 열수로 추출한 물질이 Sarcoma 180을 이식한 생쥐에 투여했을 때 항암효과가 있으며 항암 효과를 나타내는 물질의 성분이 다당류와 단백질로 구성된 고분자의 단백다당체인 것을 보고하였다(Kim *et al.*, 1979). 최근 상황버섯의 자실체와 배양한 균사체에서 분리한 단백다당체가 생쥐의 Sarcoma 180에 대해 항암작용을 하며 추출한 항암물질의 유효성분은 β-D-glucan임을 보고하였다(Lee *et al.*, 2000). Shim 등(2003b)이 삼색도장버섯의 자실체에서 증성염용액으로 추출한 항암물질의 다당류 함량은 93.89%, 단백질 함량은 3.1%이었으며, Oh 등(2004)은 저령의 균핵을 증성염용액으로 추출한 물질의 다당류 함량은 98.25%, 단백질 함량은 1.44%로 보고하였다. 따라서 버섯에

서 추출한 대부분의 항암물질은 다량의 다당체와 소량의 단백질로 구성된 단백다당체인 것으로 보고되었다. 또한 생쥐의 Sarcoma 180에 대해 항암효과를 나타내는 표고, 매미눈꽃동충하초, 삼색도장버섯 및 저령의 자실체에서 추출한 조다당류를 Sarcoma 180, HepG2, HT-29, MCF-7, HL-60 등 암 세포주에 배양하여 독성검사를 한 결과 처리 농도를 증가시키에 따라 실험 세포주에 대한 독성이 증가하면서 세포주의 증식도 어느 정도 억제시키는 경향을 나타냈지만 세포주를 사멸시키지는 않는 것으로 나타났다(Chihara *et al.*, 1969; Shim *et al.*, 2003b; Shim *et al.*, 2003a; Oh *et al.*, 2004). 최근 뽕나무버섯과 장미무당버섯의 자실체를 열수로 추출한 조다당류가 여러 세포주에 대한 독성 실험에서도 위와 유사한 결과를 얻었으며, 고농도의 조다당류를 생쥐의 복강에 주사하면, B 림파구의 활성화, 총 복강 세포의 수 및 혈중 백혈구의 수도 증가하고 면역도 증강되는 효과가 있는 것이 보고되었다(Choi *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2006). 따라서 위의 여러 실험 결과를 보면 버섯에서 추출한

*Corresponding author <E-mail : tslee@incheon.ac.kr>

조다당류는 암세포에 직접적으로 작용하여 암세포의 증식을 억제하고 사멸시키기 보다는 숙주의 면역을 활성화하여 암세포에 대해 항암효과를 나타내는 역할을 한다고 사료된다. 또한 버섯의 다당류는 숙주의 면역을 활성화하는 것 외에 항암요법제 투여에 의한 나타나는 부작용을 줄여 항암제에 의한 치료효과도 높이는 것으로 보고되었다(Fukuda *et al.*, 1975).

잎새버섯(*Grifola frondosa*)은 분류학적으로 민주름버섯목(Aphyllphorales), 구멍장이버섯과(Polyporaceae), 잎새버섯속(*Grifola*)에 속하는 버섯으로 여름과 가을에 걸쳐 큰 활엽수의 지체부나 뿌리 주변에 다발로 발생하는 목재의 백색 부후성 버섯이다. 자실체는 1개의 큰 기부에서 생긴 몇 개의 작은 대가 다시 여러 개로 분지된 다량의 갓 집단으로 구성되어 있어서 갓의 전체의 지름이 30 cm 이상 되고 무게가 3 kg이 넘는 큰 버섯도 있다. 표면은 흑갈색~회색이고 방사상의 섬유무늬가 있다(Park and Lee, 1991). 맛과 향이 좋으며, 예로부터 한방에서는 혈압강하, 이뇨작용, 비만치료, 강장작용, 항빈혈작용 등에 효능이 탁월하다고 알려져 한약재로도 이용되고 있다(Ying *et al.*, 1987). 또한 잎새버섯의 균사체에서 추출한 β -glucan을 fibrosarcoma, L1210 leukemia 및 P388 leukemia 등의 암세포를 이식한 생쥐에 투여하고 조사한 결과 항암활성은 물론 면역에 관여하는 natural killer cell이나 macrophage의 활성화도 함께 상승시켜 생쥐의 암을 저해하는데 효과가 있다고 보고하였으며(Suzuki *et al.*, 1989), 버섯의 자실체에서 열수로 추출한 물질이 당뇨가 유발된 동물실험에서 인슐린에 대한 민감성 효과를 높여 혈당을 강하시키는 효과가 있는 것으로 보고되었다(Park *et al.*, 2007).

본 연구에서는 수확한 잎새버섯의 자실체를 40°C의 열풍 건조기에서 48시간동안 건조하고 마쇄한 후 메탄올(80%), 중성염용액(0.9%) 및 열수를 이용하여 조다당류를 추출하고 *in vitro*와 *in vivo*에서 여러 세포주에 대한 독성실험과 생쥐의 Sarcoma 180에 대한 항암 및 면역증강에 관한 연구를 수행하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 잎새버섯(*Grifola frondosa*)은 경기도 농업기술원 버섯연구소에서 제공받은 자실체에서 균사체를 순수 분리하여 인천대학교 소재 버섯균주 및 DNA은행에 보존(IUM 4000)한 후 자실체를 40°C의 건조기에서 48시간 동안 건조하고 마쇄하여 -70°C의 저온냉동고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

성분의 추출 및 분리

Cho 등(1995a; 1995b)과 심 등(2003a; 2003b)의 방법에 따라 80% 메탄올, 중성염용액(0.9% NaCl) 및 열수를 이용하여 추출하였으며, 각각 추출된 물질의 수율을 조사하였다.

실험동물

5주령의 웅성 ICR mouse(25~27 g)를 Orient Bio사(Seongnam, Korea)로부터 구입하여 polycarbonate cage 당 5마리씩 넣은 후 온도 23±2°C, 상대습도 55±5%와 12시간 간격으로 명암이 자동 조절되는 사육실에서 1주일 동안 적응시켰다. 사료와 음수는 제한하지 않았고 사료는 Orient Bio사의 실험동물용 고형사료를 구입하여 사용하였으며 실험은 인천대학교 동물실험윤리위원회의 지침을 준수하여 수행하였다.

세포독성 실험

실험에 사용한 암세포는 인간 대장암세포 HT-29, 마우스 복수암세포 Sarcoma 180, 정상세포는 마우스 섬유아세포 NIH3T3, 마우스 대식세포주 RAW 264.7 이었다. 세포독성 실험은 Denizot와 Lang(1986)의 방법에 따라 수행하였다. HT-29, NIH3T3 및 RAW 264.7 세포는 1×10^5 cells/ml가 되도록하여 96 well microtiter plate에 100 μ l씩 주입한 후 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 각 추출물의 농도가 10~2000 μ g/ml이 되도록 조정후 100 μ l씩 세포에 처리하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양한 후 5 mg/ml의 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide(MTT) solution 10 μ l를 각 well에 첨가한 후 4시간 동안 암 상태로 배양하였다. 푸른색의 MTT formazan이 생성되면 dimethylsulfoxide(DMSO) 100 μ l에 용해시켜 ELISA plate reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Sarcoma 180은 2×10^5 cells/ml의 세포를 96 well microtiter plate에 50 μ l씩 주입하고 각각의 조다당류 최종 농도를 10~2000 μ g/ml이 되도록 세포에 처리하여 최종 용적이 100 μ l가 되도록 하고 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 1 mg/ml 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide(XTT) solution 당 25 μ M phenazine methosulfate가 포함된 용액을 well 당 30 μ l씩 처리하여 암 조건에서 2시간 배양한 후 ELISA plate reader를 이용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 암세포의 생존율은 실험군의 흡광도와 대조군의 흡광도를 비교하여 구하였다.

$$\text{Viability (\%)} = (T-B)/(C-B) \times 100$$

T : 실험군의 평균 흡광도

C : 대조군의 평균 흡광도

B : Blank

수명연장 실험

잎새버섯에서 추출한 조다당류를 Sarcoma 180 복수암을 유발시킨 웅성 ICR mouse에 투여하여 수명연장에 미치는 효과를 조사하였다. 복수암은 4°C의 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4, Gibco BRL, USA) 5 ml에 5×10^6 cells/ml의 Sarcoma 180을 부유시킨 후 생쥐의 복강에 0.2 ml($1 \times$

10⁶ cells/ml)씩 주사기로 이식하여 유발시켰다. Sarcoma 180을 이식한 24시간 전후에 추출한 조다당류를 20 mg/kg body weight의 농도로 생리식염수에 용해하고 0.22 µm의 membrane filter로 여과한 후 각각의 추출물을 매일 1회 10일간 복강 내에 0.2 ml씩 주사기로 투여하였다. 대조군에는 같은 기간 동안 동량의 생리식염수를 투여하였다. 평균 수명 일수는 Sarcoma 180을 이식한 후 생쥐가 사망할 때까지의 일수를 관찰하여 계산하였다. 또한 아래의 식으로 Increase of life span(ILS)을 계산하여 Sarcoma 180을 이식한 생쥐에 잎새버섯의 자실체 추출 조다당류를 투여하여 나타나는 수명연장의 효과를 측정하였다.

$$ILS = [(T-C)/C] \times 100$$

C : 대조군의 평균 수명 (일)

T : 실험군의 평균 수명 (일)

비장세포의 증식에 미치는 영향

비장세포의 증식능은 WST-1 assay로 측정하였다. 6주령의 ICR 수컷 생쥐를 경추 탈골하여 치사시키고 무균적으로 비장을 적출하여 100 mesh 망(Belco Glass Inc., USA) 위에서 분쇄하였다. 이로부터 얻어진 세포 부유액에 2배 부피의 lymphocyte separation medium(PAA Laboratories GmbH, Austria)에 조심스럽게 첨가하여 400 ×g에서 20분 동안 원심분리 하였다. 단핵 세포층만 조심스럽게 취하여 300 ×g에서 5분씩 3회 원심분리하여 비장세포를 준비하였다. 생쥐의 비장세포를 2 × 10⁵ cells/ml가 되도록 10% heat-inactivated FBS가 함유된 RPMI 1640 배지로 희석하여 96 well plate에 100 µl씩 분주하였다. 50, 200, 500 µg/ml 농도로 희석한 각각의 추출물 100 µl와 5, 50 µg/ml 농도의 lipopolysaccharide (LPS, Sigma Co., USA)를 100 µl씩 처리한 후 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 48시간 배양하였다. 암 조건에서 5 mg/ml 농도의 WST-1 solution을 각 well 당 10 µl씩 첨가한 후 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 4시간 동안 배양한 뒤 microplate plate reader를 이용하여 440 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

마우스의 B 임파구 활성화에 미치는 영향

분화된 B 임파구 표면에 발현되는 alkaline phosphatase의 활성을 측정하기 위해 Kurihara 등(2003)의 방법을 수정하여 실험에 사용하였다. 비장세포를 1 × 10⁶ cells/ml의 농도로 조정하여 각 well 당 100 µl 씩 분주하고 50, 200, 500 µg/ml의 추출물과 5, 50 µg/ml의 LPS를 가하여 37°C의 5%의 CO₂ 배양기에서 48시간 배양하였다. -70°C에서 얼리고 37°C 항온수조에서 녹이는 작업을 3회 반복하여 세포를 터트리는 과정을 거쳤다. 세포부유액 25 µl에 1 mM MgCl₂를 포함한 50 mM sodium carbonate buffer에 1 mg/ml가 되도록 p-nitrophenyl phosphate (Sigma Co., USA)를 첨가한 용액을 100 µl를 넣고 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 1시간 반응시

켰다. 병액의 0.3 N NaOH 용액 50 µl를 첨가하여 반응을 종결시킨 후 405 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였으며, alkaline phosphatase 1 unit은 1 × 10⁵ lymphocyte에서 발현되는 효소가 37°C에서 1시간동안 1 µM의 p-nitrophenol을 절단할 수 있는 양으로 정의하였다. B 임파구의 alkaline phosphatase 활성은 다음 식에 따라 계산하였다.

Alkaline phosphatase activity

(p-nitrophenol µmol / 5 × 10⁵ lymphocytes / 60 min)

$$= 1.15 \times OD_{405}$$

대식세포 활성화에 미치는 영향

활성화된 대식세포가 nitric oxide(NO)의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 생쥐의 단핵구 기원의 RAW 264.7 세포주를 이용하여 NO의 생성량을 NO detection kit(iNtRON Biotech. Inc. Korea)로 측정하였다(Choi *et al.*, 1993). RAW 264.7의 세포를 96 well plate에 1 × 10⁵ cells/ml로 100 µl 분주하고 추출물의 최종농도가 50, 100, 200 µg/ml가 되도록 하여 100 µl 첨가하였으며, 양성 대조군으로 1, 10, 50 µg/ml의 LPS를 첨가하여 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 48시간 배양하였다. Cell debris를 제거한 배양 상등액을 각 well당 100 µl씩 분주하고 sulfanilamide가 함유된 N1 buffer(substrate solution)를 50 µl 첨가한 후 상온에서 10분간 반응시킨 후 naphthylethylenediamine이 함유된 N2 buffer(coloring solution)를 첨가하여 상온에서 10분간 발색시켜 ELISA plate reader를 사용하여 540 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 추출물의 RAW 264.7에 대한 NO 생성농도의 정량은 1 mM의 nitrite를 이용하여 표준곡선을 작성한 후 계산하여 측정하였다.

Cytokine의 분비에 미치는 영향

잎새버섯 추출 조다당류가 생쥐의 비장세포를 자극하여 cytokine의 분비에 관여하는지 알아보기 위해 생쥐의 TNF-α(TNF-α), interleukin-1β(IL-1β), interleukin-2(IL-2) 그리고 interleukin-6(IL-6)를 ELISA Kit(KOMA BIOTECH Co., Korea)를 이용하여 측정하였다. 6주령의 ICR 계열 수컷 생쥐에서 무균적으로 비장을 적출하여 complete medium (10% heat inactivated FBS, 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 µg streptomycin을 첨가한 RPMI 1640 medium)에서 스테인레스 스틸 망을 통과시켜 단핵세포를 만들었다. 이로부터 얻은 세포를 Ficoll-Paque Plus 용액(Sigma, USA) 3 ml에 넣고 현탁액을 7 ml까지 세포가 섞이지 않도록 넣은 후 400 ×g로 30분 간 원심 분리하였다. 이 후 가운데 위치한 유헤세포의 수를 혈구계산기를 이용하여 계수하였고, trypan blue exclusion 방법(Allison and Ridolpho, 1980)으로 생존율(85% 이상)을 확인한 후 유헤세포를 5 × 10⁶ cells/ml로 맞추고 버섯 추출 조다당류를 각각 10 µg/ml, 100 µg/ml, 1000 µg/ml의 농도로 24 well plate에서 37°C의 5% CO₂

배양기에서 24시간 배양하여 상등액에 분비된 싸이토카인 (TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6)의 양을 ELISA Kit(KOMA BIOTECH Co. Korea)를 이용하여 측정하였다. 양성대조 군으로는 T 세포(concanavalin A; ConA) 및 B 세포 mitogen (lipopolysaccharide; LPS)을 사용하였다.

총 복강세포 수에 미치는 영향

6주령의 ICR 음성 생쥐를 각각 실험군과 대조군으로 나누어 3일간 연속으로 10, 20, 50 mg/kg body weight의 농도로 잎새버섯 추출 조다당류를 복강 내에 투여하였으며, 대조군은 생리 식염수를 투여하였다. 조다당류를 투여한 최종일로부터 24시간 후 마우스를 경추 탈골시키고 10 ml의 PBS buffer(pH 7.2)로 복강 내를 세척하여 복강세포를 채취하고 Turk's solution으로 염색한 후 혈구계수기를 이용하여 총 복강세포의 수를 측정하였다.

혈 중 백혈구 수에 미치는 영향

6주령의 ICR 수컷 생쥐를 실험군과 대조군으로 각각 5마리씩 나누어 추출한 조다당류를 10일간 연속으로 복강 내에 10, 20, 50 mg/kg body weight의 농도로 0.2 ml씩 투여하였으며 대조군에는 동량의 생리식염수를 투여하였다. 조다당류 투여 최종일로부터 2일 후 심장채혈하여 ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)가 들어있는 용기(Becton Dickinson Ltd., USA)에 넣어 골고루 섞은 후 자동혈구분석기(XE-2100, SYSMEX Co., Japan)로 백혈구(white blood cell, WBC)의 수를 측정하였다.

결과 및 고찰

성분의 추출 및 분리

잎새버섯의 자실체를 80%의 메탄올을 이용하여 추출한 조다당류의 수득률은 36.15 g으로 가장 높은 32.86%의 수득률을 보였고, 0.9%의 중성염에서는 2.55 g이 추출되어 2.32%의 수득률, 그리고 열수에서 가장 적은 1.96 g이 추출되어 1.78%의 수득률을 나타내었다(Table 1). 이와 같은 결과는 송이버섯 자실체에서 메탄올, 중성염 및 열수로 추출한

조다당류의 수득률이 각각 13%, 1.2% 및 0.4%에 비해서는 비교적 높게 나타났다(Hur *et al.*, 2008). 또한 본 실험에서 메탄올, 중성염용액 및 열수를 이용해 추출한 조다당류의 수득률은 삼색도장버섯과 금목이를 메탄올, 중성염 및 열수를 이용해 얻어진 수득률과 매우 유사하게 나타났다(Shim *et al.*, 2003b; Lee, *et al.*, 2008a).

세포독성 효과

잎새버섯의 자실체에서 메탄올, 중성염용액 및 열수로 추출한 조다당류를 10~1000 μ g/ml의 농도로 처리한 배지에서 HT-29 암세포의 생존율은 66% 이상이었어서 독성을 나타내지 않았다. 그러나 이들 조다당류를 2000 μ g/ml 농도로 HT-29 세포에 처리하였을 때 메탄올과 열수 추출 조다당류는 각각 80% 이상의 생존율을 보여 독성을 나타내지 않았으나 중성염 추출 조다당류에서의 세포 생존율은 45%로 나타나 약한 독성을 보였다(Fig. 1A).

Sarcoma 180 암세포는 10~2000 μ g/ml 농도의 메탄올, 중성염 및 열수로 추출한 조다당류에서 80% 이상의 생존율을 보여 독성을 나타내지 않았다(Fig. 1B). NIH-3T3 세포는 메탄올과 열수로 추출한 조다당류의 농도 10~2000 μ g/ml에서 모두 60%이상의 생존율을 나타내 조다당류의 모든 농도에서 독성을 보이지 않았다. 또한 NIH3T3 세포는 중성염으로 추출한 조다당류 10~1000 μ g/ml의 농도에서 62~69%의 세포생존율을 보여 독성은 없었으나 2000 μ g/ml의 농도에서는 세포의 생존율이 36%로 독성을 보이는 것으로 나타났다(Fig. 1C). 이 실험에서 중성염으로 추출한 조다당류는 농도가 높아질수록 농도에 비례해 NIH3T3 세포의 생존율을 낮추는 농도 의존적 독성을 보여주었다. RAW 264.7 세포는 메탄올, 중성염 및 열수로 추출한 조다당류의 10~2000 μ g/ml의 농도에서 73% 이상의 높은 생존율을 보여 이들 조다당류에 대해 독성이 없었다(Fig. 1D). 따라서 본 실험에 사용한 HT-29, Sarcoma 180, NIH3T3 및 RAW 264.7 세포주는 잎새버섯의 자실체에서 메탄올과 열수로 추출한 조다당류 10~1000 μ g/ml의 농도에서는 독성을 나타내지 않았으나 HT-29와 NIH3T3 세포주만 조다당류 2000 μ g/ml의 농도에서 독성을 나타냈다. 이에 잎새버섯 자실체에서 3종류의 용매로 추출한 조다당류는 1000 μ g/ml의 농도까지는 실험에 사용한 여러 세포주에 대해 비교적 독성이 낮게 나타내는 것으로 판단된다. 그러나 Oh 등 (2006)은 흰목이(*Tremella fuciformis*)의 자실체를 중성염과 열수로 추출한 조다당류를 2000 μ g/ml의 농도로 NIH3T3와 Sarcoma 180에 처리했을 때 세포 독성을 나타내지 않았으나 메탄올 추출물은 2000 μ g/ml의 농도에서 NIH3T3의 생존율이 20% 이하로 감소하는 등 독성이 높았다고 보고하였다. Choi 등(2008)은 장미무당버섯의 자실체에서 메탄올로 추출한 조다당류는 1000~2000 μ g/ml 농도에서 Sarcoma 180에 대해 약간의 독성을 나타내었지만 다른 세포주인 HepG2, HT29 및 NIH3T3은 10~2000 μ g/ml의 농도에서 독성을 보이지 않았다고 보고하였다.

Table 1. Recovery rate of crude polysaccharides extracted from fruiting body of *Grifola frondosa*

Fraction ^a	Weight of the used mushroom (g)	Weight of extract (g)	Recovery rate ^b (%)
Fr. MeOH	110	36.15	32.86
Fr. NaCl	110	2.55	2.32
Fr. HW	110	1.96	1.78

^aFr. MeOH, Fraction extracted with 80% methanol; Fr. NaCl, Fraction extracted with 0.9% NaCl solution; Fr. HW, Fraction extracted with hot water.

^bRecovery rate (%)

= [Weight of extract (g)/Weight of the used mushroom (g)] $\times$ 100.

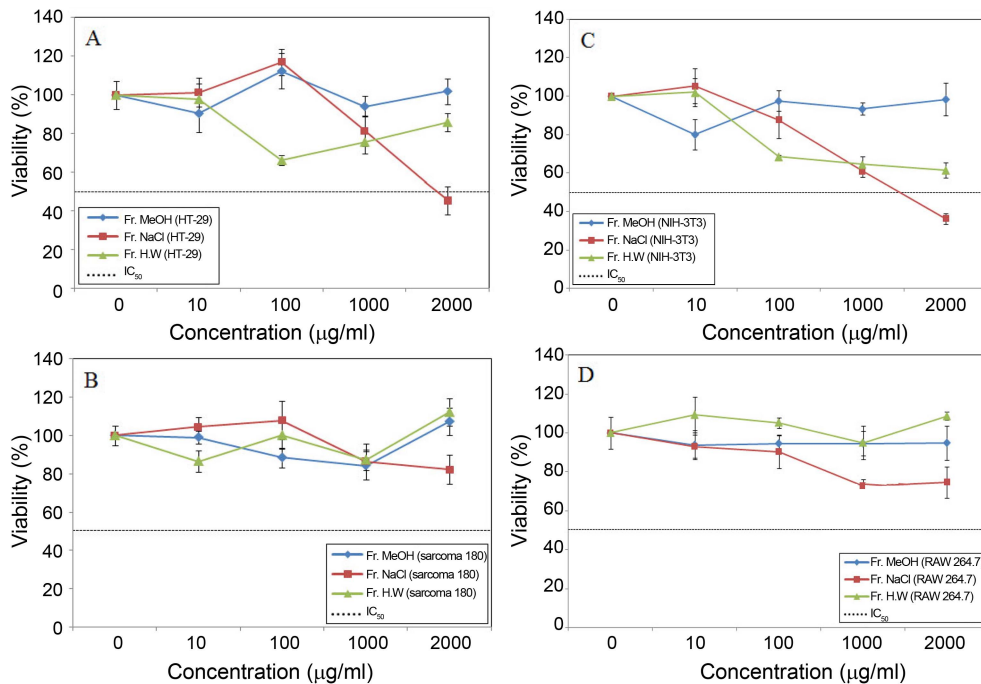


Fig. 1. *In vitro* cytotoxicity of fractions extracted from fruiting body of *Grifola frondosa* against (A) HT-29, (B) Sarcoma 180, (C) NIH3T3, (D) RAW 264.7. Concentration of cells was 1×10^5 cells/well. The Fr. MeOH was extracted with 80% methanol. The Fr. NaCl was extracted with 0.9% NaCl solution. The Fr. HW was extracted with hot water. IC₅₀ means 50% inhibition concentration.

따라서 여러 종류의 버섯자실체에서 추출한 조다당류가 여러 세포주에 대해 각각 독성이 다르게 나타난 것은 이들 버섯의 자실체에서 추출한 조다당류의 성분도 다르고 또한 실험에 사용한 세포주의 유전적 특성도 다르기 때문인 것으로 사료된다.

평균 수명 연장효과

앞새버섯의 자실체에서 메탄올, 중성염 및 열수로 추출한 조다당류를 Sarcoma 180으로 접종한 생쥐에 주사하여 수명연장 효과를 조사한 결과, 대조군의 생쥐는 평균 생존 일수는 17일이었으나 메탄올, 중성염 및 열수로 추출한 조다당류를 20 mg/kg body weight로 투여한 실험군 생쥐의 평균 생존일수는 각각 26일, 24.5일 및 21.3일로 나타나 평균 수명을 25.0~52.9% 연장시키는 효과가 있는 것으로 나타났다(Fig. 2). 본 실험 결과는 금목이와 삼색도장버섯의 자실체를 각각 메탄올과 중성염용액으로 추출한 조다당류를 Sarcoma 180으로 접종한 생쥐에 투여한 후 나타난 수명연장 효과인 66.7%와 77.4%에 비해서는 낮았으나 매미눈꽃동충하초의 자실체를 메탄올로 추출한 조다당류를 투여해서 나타난 32.3%의 수명연장 효과에 비해서는 높았다(Lee *et al.*, 2008a; Shim *et al.*, 2003b; Shim *et al.*, 2003a).

따라서 이제까지 Sarcoma 180을 접종한 생쥐에 약용버섯의 자실체에서 추출한 조다당류를 투여한 생쥐의 수명은 대조군에 비해 32%~77.4%의 범위 내에서 연장이 가능한 것으로 사료된다.

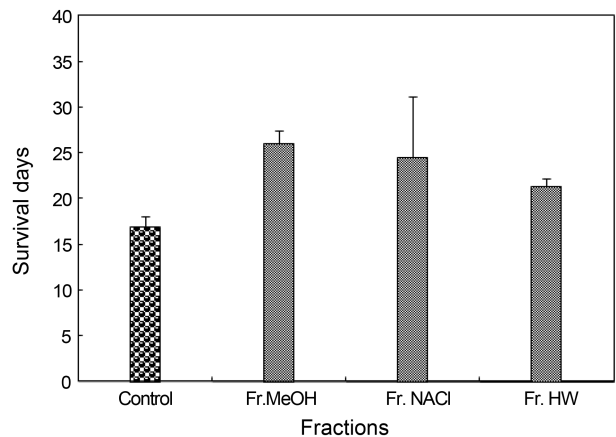


Fig. 2. Effect of crude polysaccharides^a extracted from fruiting body of *Grifola frondosa* on the life elongation of ICR mice^b inoculated with Sarcoma 180 (i.p. injection^c)

^aFr. MeOH; Fraction extracted with 80% methanol, Fr. NaCl; Fraction extracted with 0.9% NaCl solution, Fr. HW; Fraction extracted with hot water.

^bEach experimental group consisted of 10 mice.

^ci.p. injection intraperitoneal injection.

비장세포의 증식에 미치는 효과

앞새버섯의 자실체에서 추출한 조다당류가 비장세포의 증식에 미치는 영향을 WST-1 법을 이용하여 조사하였다. 앞새버섯에서 3종류의 용매로 추출한 조다당류는 50~500 μg/ml 농도에서 비장세포의 수를 대조군에 비해 1.2~1.3배 증식

시키는 것으로 나타났다. 양성 대조군으로 사용된 LPS는 5~50 µg/ml의 농도에서 대조군에 비해 비장세포의 수를 각각 1.3배와 1.4배 증식시켜 LPS가 잎새버섯에서 추출한 조다당류보다는 비장 세포의 수를 높게 증식시키는 것으로 나타났다(Fig. 3). Choi 등(2008)은 장미무당버섯의 메탄올, 중성염 용액 및 열수로 추출한 조다당류가 50~500 µg/ml의 농도에서 비장세포의 수를 대조군에 비해 약 1.42~2.15배 높게 증식시켰으며, 양성대조군으로 사용된 LPS는 5~50 µg/ml의 농도에서 대조군에 비해 4.17~4.34배 높은 비장세포의 증식능을 나타냈다고 보고하였다. 또한 액체배지에서 배양한 잣나무버섯의 균사체 추출 다당류인 lepidan은 비장세포를 대조군에 비해 10배 이상 증식시켰으며, 비장세포의 B 임파구 증식도 촉진하였다고 보고하였다(Jin, 1996).

따라서 생쥐에 Sarcoma 180을 투여한 후 잎새버섯 추출 조다당류를 투여한 생쥐의 수명이 연장된 것은 조다당류 투여에 의해 면역에 관여하는 비장세포의 증식이 촉진되면서 면역 활성이 증강된 것과 연관이 있는 것으로 판단된다.

생쥐의 B 임파구 활성화에 미치는 효과

잎새버섯의 자실체에서 메탄올, 중성염용액 및 열수를 이용해 추출한 조다당류가 생쥐의 면역과 관련된 효소인 alkaline phosphatase의 활성화에 미치는 효과를 측정하였다. 중성염 용액에서 추출한 조다당류는 200 µg/ml 농도에서 대조군에 비해서 1.5배의 활성을 보였으며, 열수 추출 조다당류는 200~500 µg/ml의 농도에서 1.4~1.5배의 활성을 보였다. 그러나 양성 대조군으로 사용한 LPS는 중성염 용액 추출 조다당류에 비해 낮은 농도인 5~50 µg/ml에서 1.7~1.9배의 alkaline phosphatase 활성을 보여 LPS가 중성염 용액과

열수로 추출한 조다당류에 비해 활성이 높았다(Fig. 4). 본 실험 결과는 Kim 등(2006)이 뽕나무버섯의 자실체에서 중성염용액으로 추출한 조다당류가 50~500 µg/ml의 농도에서 대조군에 비해 3배의 높은 활성을 나타낸 것에 비해 낮았지만, 금목이의 자실체에서 메탄올 및 중성염 추출물이 200~500 µg/ml의 농도에서 대조군이 1.10~1.16배의 활성을 나타낸 것(Lee *et al.*, 2008a)에 비해서는 높게 나타났다. 따라서 잎새버섯을 비롯한 식의약용 버섯에서 추출한 조다당류는 생쥐의 B 임파구 활성을 증진시키는 것으로 사료된다.

대식세포 활성화에 미치는 효과

잎새버섯 추출 조다당류에 의해 활성화된 대식세포 RAW 264.7이 생성하는 nitric oxide (NO)의 양을 알아보기 위해 생쥐 단핵구 기원의 RAW 264.7 세포주를 이용하여 NO의 농도를 측정하였다. RAW 264.7이 대조군에 의해 발생된 NO의 농도는 4.3 µM이었으며 중성염용액과 열수추출 조다당류를 50~500 µg/ml의 농도로 처리한 RAW 264.7은 4.9~13.7 µM의 NO가 발생하였다. 특히 50~200 µg/ml 농도의 중성염용액 추출물은 양성대조인 LPS의 10.7~12.3 µM보다 생성량이 높았으며 대조군에 비해서는 3.0~3.2배 농도가 증가하였다(Fig. 5).

Shim 등(2003a)은 매미동충하초의 자실체에서 중성염용액으로 추출한 조다당류를 50 µg/ml 농도로 처리한 RAW 264.7은 103 µM의 NO를 생성하여 양성대조군인 LPS의 생성량 79 µM 보다 높았으며, Shim 등(2003b)은 삼색도장버섯의 중성염 추출물과 열수 추출물을 50~200 µg/ml의 농도로 RAW 264.7에 처리하였을 때 38~98 µM의 nitric oxide를 발생하여 대조군의 2 µM에 비해 19~48배 높은 NO의 생성량을 보였

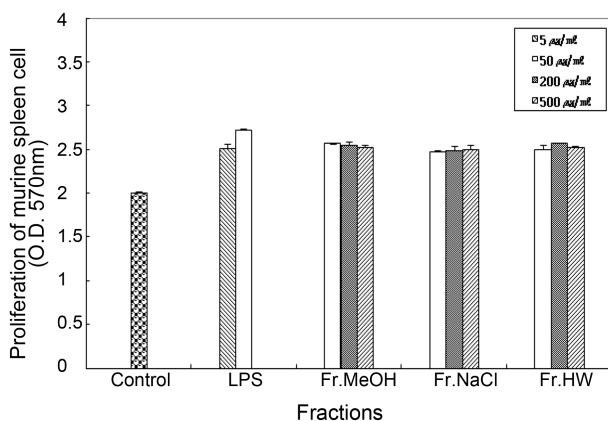


Fig. 3. Effect of fractions extracted from fruiting body of *Grifola frondosa* on proliferation of murine spleen cells. Concentration of spleen cells was 2×10^5 cells/ml. Proliferation of murine spleen cells was measured after 48 hours of incubation by MTT method. Fr. MeOH was extracted with 80% methanol. Fr. NaCl was extracted with 0.9% NaCl solution. Fr. HW was extracted with hot water. LPS (lipopolysaccharide) was purified from *Escherichia coli* 0111:B and was used in positive control.

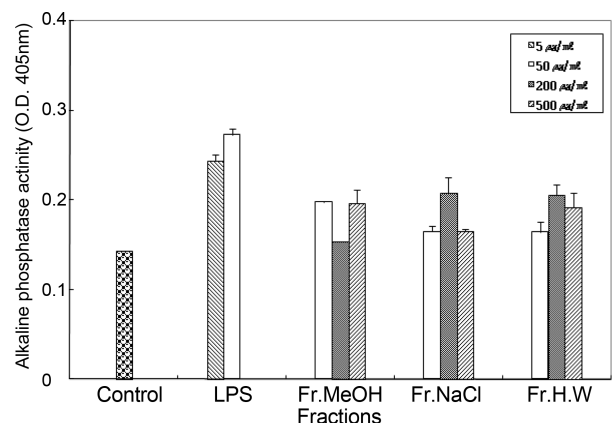


Fig. 4. Effect of fractions extracted from fruiting body of *Grifola frondosa* on the alkaline phosphatase activity in the murine spleen cells. Alkaline phosphatase activity was calculated as follows: Alkaline phosphatase activity (p-nitrophenol µmol/1 × 10⁵ lymphocytes/60mins) = 1.15 × optical density at 405 nm. MeOH was extracted with 80% methanol. Fr. NaCl was extracted with 0.9% NaCl solution. Fr. HW fraction was extracted with hot water. LPS (lipopolysaccharide) was purified from *Escherichia coli* 0111:B and was used in positive control.

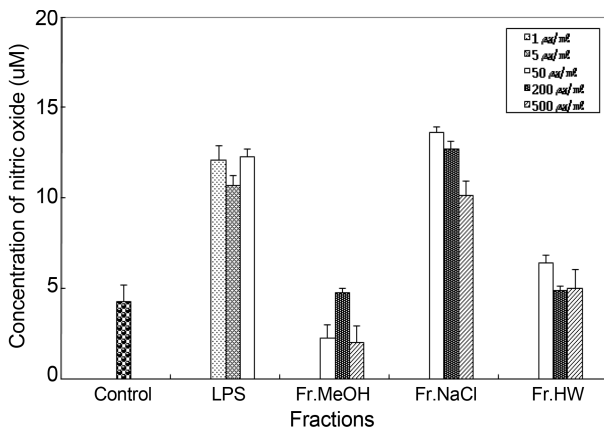


Fig. 5. Effect of fractions extracted from fruiting bodies of *Grifola frondosa* on nitric oxide production in RAW 264.7. Concentration of RAW 264.7 cell was 1×10^6 cells/ml. MeOH was extracted with 80% methanol. Fr. NaCl was extracted with 0.9% NaCl solution. Fr. HW fraction was extracted with hot water. LPS (lipopolysaccharide) was purified from *Escherichia coli* 0111:B and was used in positive control.

다고 보고하였다. 따라서 버섯에서 추출한 조다당류는 대식세포 RAW 264.7의 활성을 증가시켜 면역과 항암효과를 증진시키는 것으로 사료된다.

Cytokine 분비에 미치는 영향

앞서 버섯의 자실체에서 추출한 조다당류가 세포수준에서 면역을 증강시키는 효과를 확인하기 위하여 생쥐의 비장 세포가 분비하는 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β , IL-2 그리고 IL-6의 양을 ELISA assay kit로 측정하였다(Fig. 6). 중성염 추출 조다당류를 10~1000 μ g/ml 농도로 처리한 비장세포에서의 TNF- α 활성은 대조군의 13.1 pg/ml에 비해 79.7~165.4 pg/ml로 나타나 6.1~12.6배 많이 분비되었고, 10 μ g/ml의 메탄을 추출 조다당류는 같은 농도의 양성대조군인 LPS에 비해서 1.5배 높았다(Fig. 6A). IL-1 β 생성량은 대조군에서 10.9 pg/ml, 양성대조군인 LPS는 10 μ g/ml의 농도에서 143.05 pg/ml로 가장 높게 나타났으며 또 다른 양성대조군인 Con A는 1 μ g/ml의 농도에서 159.5 pg/ml로 생성량이 가장 높았다(Fig. 6B).

IL-2의 활성은 열수로 추출한 조다당류 1000 μ g/ml의 농도에서 가장 높은 146.5 pg/ml가 분비되어 대조군에 비해서 4.9배 높았고 양성대조군인 LPS와 ConA는 10 μ g/ml의 농도에서 대조군에 비해 각각 9.2배, 5.6배의 높은 활성을 나타냈다(Fig. 6C). IL-6의 분비량은 중성염용액 추출 조다당류를 100 μ g/ml의 농도로 처리한 군에서 505.33 pg/ml이 분비되어 대조군의 65.0 pg/ml에 비해 7.8배 높았다. 양성대조군인 LPS는 5 μ g/ml의 농도에서 511.74 pg/ml, Con A는 1 μ g/ml의 농도에서 119.37 pg/ml로 대조군에 비해 각각 7.9배, 1.8배 활성이 높았다(Fig. 6D). 그러나 메탄을 추출 조

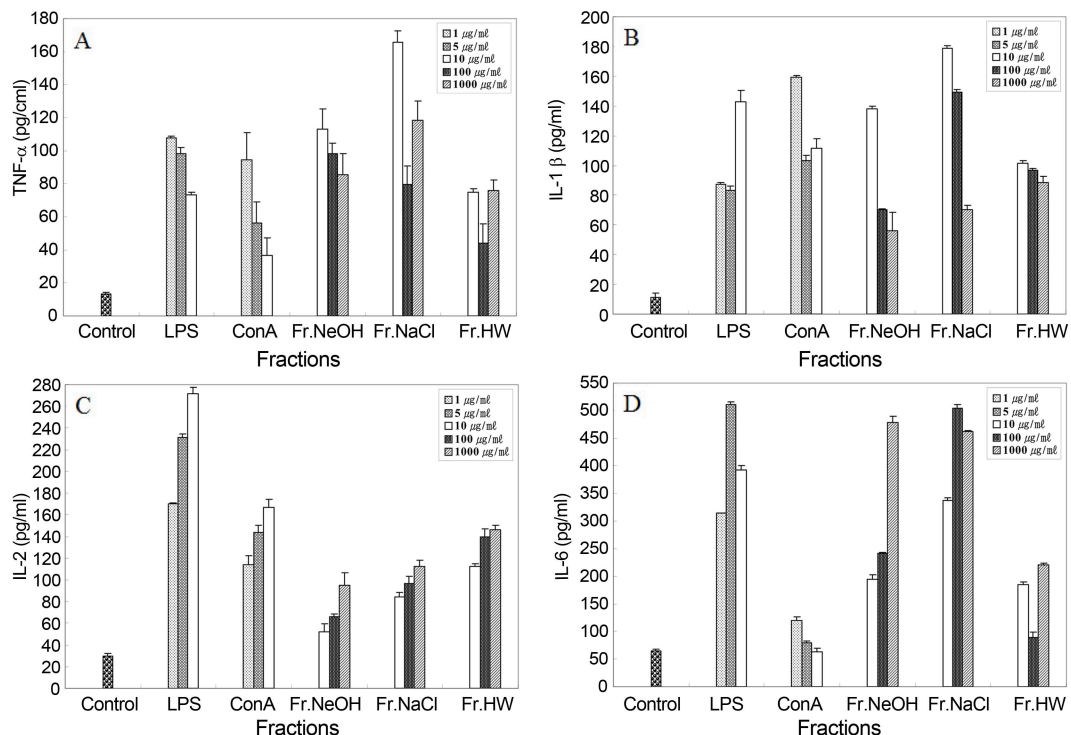


Fig. 6. Effects of fractions extracted from fruiting body of *Grifola frondosa* on cytokine(A:TNF- α , B:IL-1 β , C:IL-2, D:IL-6) production in splenocytes. Concentration of splenocytes was 5×10^6 cells/ml. Fr. MeOH was extracted with 80% methanol. Fr. NaCl was extracted with 0.9% NaCl solution. Fr. HW fraction was extracted with hot water. LPS(lipopolysaccharide) was purified from *Escherichia coli* 0111:B and was used in positive control on B cell. Con A(Concanavalin A) was used in positive control on T cell.

다당류는 투여농도가 높아지면서 이에 비례해 분비된 IL-6의 양도 증가하였다. 그러나 중성염용액은 100 µg/ml의 농도에서 IL-6의 생성량이 가장 높았고 열수는 100 µg/ml의 농도에서 IL-6의 생성량이 가장 적었다. Lee 등(2007)도 뽕나무버섯부치의 자실체에서 중성염용액, 메탄올과 열수로 추출한 조다당류가 10~1000 µg/ml 농도의 범위에서 대조군에 비해서 높은 TNF-α의 활성을 보였으나 양성 대조군인 Con A나 LPS에 비해서 활성이 낮아지는 경향을 보였다.

따라서 본 실험의 결과 잎새버섯의 자실체에서 추출한 조다당류가 TNF-α, IL-1β, IL-2와 IL-6 등의 사이토카인 분비를 촉진하여 면역을 증강시켜 Sarcoma 180을 접종시킨 생쥐에 항암효과를 나타낼 수 있는 것으로 판단된다.

총 복강 세포 수에 미치는 영향

잎새버섯에서 3종류의 용매로 추출한 조다당류를 투여한 모든 생쥐의 복강 세포의 수는 대조군의 복강세포 수 9.85×10^5 cells/ml에 비해 증가하였다. 메탄올 추출 조다당류를 20~50 mg/kg body weight의 농도로 투여한 실험군은 대조군에 비해 총 복강 세포수가 2.7~3.0배로 증가하였고, 50 mg/kg body weight의 농도의 중성염으로 추출한 조다당류의 투여군에서도 2.7배 증가하였다(Fig. 7).

Kim 등(2007)은 민긴뿌리버섯의 열수 추출물의 농도를 20, 50 mg/kg body weight로 증가함에 따라 대조군의 2.09×10^5 cells/ml에 비해 2.80×10^5 cells/ml, 6.89×10^5 cells/ml로 복강 세포 수가 증가하는 것을 관찰되었고, 중성염용액 추출물을 50 mg/kg body weight로 투여한 실험군의 경우도 복강 세포의 수가 대조군에 비해 2배 가까이 증가되는 것을 보고하였다. Lee 등(2008b)은 대향고의 메탄올과 중성염 추출 조다당류를 10, 20, 50 mg/kg body weight의 농도로 생쥐에 투여한 결과 복강세포의 수는 대조군에 비해 4.6~7.7배 증가하였다고 보고하였다. 오 등(2006)도 흰목이의 중성염 추출물을 50 mg/kg의

농도로 투여한 생쥐의 복강세포 수가 대조군에 비해 7.4배 증가하였다고 보고하였다. 따라서 식의약용 버섯의 자실체에서 추출한 조다당류는 생쥐의 면역에 관여하는 복강의 세포 수를 증가시키는 효과가 있는 것으로 사료된다.

혈액 중 백혈구의 수에 미치는 영향

잎새버섯 추출 조다당류가 생쥐의 백혈구 수에 미치는 효과를 알아보기 위하여 잎새버섯 자실체에서 추출한 조다당류를 10, 20, 50 mg/kg body weight 농도로 생쥐에 투여하여 혈액 내 백혈구의 수를 조사하였다. 잎새버섯의 메탄올, 중성염 및 열수 추출물을 투여한 실험군의 백혈구 수는 대조군의 2.33×10^3 cells/ml에 비하여 1.5배 이상 증가하였다. 특히 중성염 추출 조다당류를 20 mg/kg body weight의 농도로 투여한 실험군의 경우 대조군에 비해 총 백혈구의 수가 3.2배의 높게 증가되었다(Table 2).

Lee 등(2007)은 뽕나무버섯부치의 자실체에서 메탄올로 추출한 조다당류를 50 mg/kg body weight로 투여한 실험군의 백혈구 수가 대조군에 비해 1.9배 증가하였고 열수로 추출한 조다당류를 같은 농도로 투여한 생쥐의 백혈구 수도 1.4배 증가하였다고 보고하였다. 그러나 본 실험에서 중성염용액 추출물을 50 mg/kg body weight 농도로 투여하였을 때 실험군의 생쥐가 5일 안에 모두 사멸되어 백혈구 수를 측정할 수 없었다. Shim (2003)은 민자주방망이버섯의 중성염 조다당류를 생쥐에 투여하여 혈액 내 백혈구의 수 변화를 조사하려고 하였으나 실험군의 생쥐가 실험 4일 만에 모두 사멸하여 그 원인을 조사한 결과 중성염 추출 조다당류의 독성성분은 조다당류와 결합되어있는 소량의 단백질이라고 보고하여서 본 잎새버섯의 중성염용액 추출 조다당류에는 생

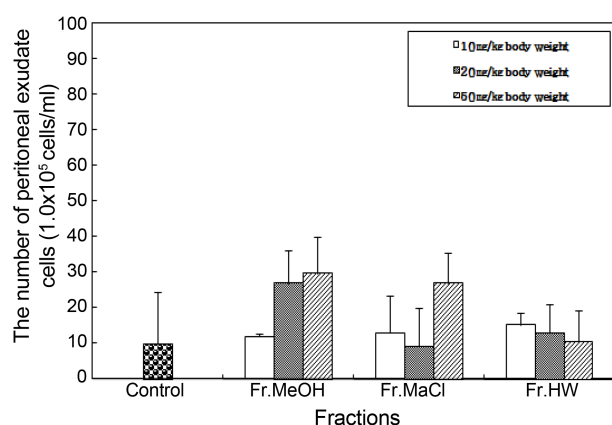


Fig. 7. Effect of fractions extracted from fruiting body of *Grifola frondosa* on the numbers of peritoneal exudate cells in ICR mice. Fr. MeOH was extracted with 80% methanol. Fr. NaCl was extracted with 0.9% NaCl solution. Fr. HW was extracted with hot water.

Table 2. Effect of crude polysaccharides extracted from fruiting body of *Grifola frondosa* on the numbers of circulating leukocytes in ICR mice

Group ^a	Dose (mg/kg body weight)	No. of mice	No. of leukocytes ($\times 10^3$ /ml)
Control	-	5	2.33±1.03
Fr. MeOH	10	5	4.25±1.65
	20	5	3.69±1.86
	50	5	4.70±2.44
Fr. NaCl	10	5	5.83±1.02
	20	5	7.36±2.47
	50	5	-
Fr. HW	10	5	6.55±1.57
	20	5	4.21±2.09
	50	5	3.43±0.43

^aFr. MeOH, Fraction extracted with 80% methanol; Fr. NaCl, Fraction extracted with 0.9% NaCl solution; Fr. HW, Fraction extracted with hot water.

^bMean±S.E.

쥐에 독성을 나타내는 단백질이 결합되어 있을 가능성이 높다고 사료된다.

따라서 위의 실험을 통해 잎새버섯의 자실체에서 3종류의 용매로 조다당류를 투여한 생쥐의 백혈구 수의 증가는 잎새버섯의 조다당류가 생쥐의 백혈구 수를 증가시켜 면역을 증강시키는 효과가 있는 보여준 것으로 사료된다.

적요

잎새버섯의 자실체로부터 메탄올, 중성염용액 및 열수를 이용하여 조다당류를 추출하고 ICR mouse에 주사하여 항암 및 면역증강 효과를 조사하였다. 잎새버섯 조다당류의 Sarcoma 180 및 RAW 264.7에 대해 세포독성을 조사한 결과 10~2000 µg/ml의 조다당류 농도에서 각각의 세포는 독성을 나타내지 않았고, HT-29 및 NIH3T3 세포의 경우에는 중성염용액으로 추출한 조다당류 10~1000 µg/ml의 농도에서는 독성을 보이지 않았으나 2000 µg/ml의 농도에서는 약한 독성을 나타내었다. Sarcoma 180으로 접종된 ICR mouse에 잎새버섯의 자실체에서 추출한 각각의 조다당류를 투여한 실험군은 조다당류를 투여하지 않은 대조군에 비해 평균수명이 각각 25.0~52.9% 연장되었다. 열수로 추출한 조다당류를 200 µg/ml의 농도를 처리한 비장세포 수는 대조군에 비하여 1.3배 증가하였으며, 200 µg/ml의 농도로 중성염 추출 조다당류를 투여한 실험군 생쥐 B 임파구의 alkaline phosphatase 활성은 대조군에 비해 약 1.5배 증가하였다. 대식세포 RAW 264.7에 의해 발생된 nitric oxide(NO)의 농도는 대조군이 4.3 µM인 것에 비해 중성염 추출 조다당류를 50~500 µg/ml의 농도로 처리한 실험군의 대식세포는 10~14 µM의 nitric oxide를 발생시켰다. 메탄올, 중성염용액 및 열수로 추출한 조다당류로 처리한 비장세포는 모든 농도에서 대조군에 비해 TNF-α, IL-1β, IL-2, IL-6 등의 사이토카인 분비량이 1.4배 이상 높았다. 메탄올 추출 조다당류를 50 mg/kg body weight의 농도로 투여한 실험군의 총 복강세포의 수와 백혈구의 수는 대조군에 비하여 각각 3.0배, 2.0배 증가하였다. 따라서 잎새버섯의 자실체에서 추출한 조다당류는 생쥐의 면역을 증강시키고 Sarcoma 180에 대한 항암효과가 있는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 교육과학기술부, 한국연구재단, 연구소재지원사업의 “버섯균주 및 DNA은행”에 지원한 연구비와 인천대학교 2010년도 자체 연구비에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

Allison, D. C. and Ridolpho, P. 1980. Use of a trypan blue assay

- to measure the deoxyribonucleic acid content and radioactive labeling of viable cells. *J. Histochem. Cytochem.* 28:700-203.
- Chihara, G., Maeda, Y., Hamuro, J., Sasaki, T. and Fukuoka F. 1969. Inhibition of mouse Sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. *Nature* 222:687-688.
- Cho, S. M., Lee, J. H., Han, S. B., Kim, H. M., Yoo, S. H. and Yoo, I. D. 1995a. Immuno-stimulating polysaccharides from the fruiting bodies of *Fomitella fraxinea* (1)-Characterization of polysaccharides extracted with neutral sodium chloride solution. *Kor. J. Mycol.* 23:332-339.
- Cho, S. M., Lee, J. H., Han, S. B., Kim, H. M., Yoo S. H. and Yoo, I. D. 1995b. Immuno-stimulating polysaccharides from the fruiting bodies of *Fomitella fraxinea* (2)-Isolation and characterization of hot-water extracted with polysaccharides. *Kor. J. Mycol.* 23:340-347.
- Choi, H. S., Jun, C. D., Lee, B. S., Lee, B. S., Park, S. D., Oh, J. S. and Chung, H. T. 1993. Effect of various extrinsic and intrinsic factors on the nitric oxide production of murine macrophage. *Kor. J. BRC.* 3:15-22.
- Choi, Y. I., Lee, K. W., Hur, H., Lee U. Y. and Lee, T. S. 2008. Immuno-potentiating and antitumor effects against mouse Sarcoma 180 by crude polysaccharides extracted from fruiting body of *Russula rosacea*. *Kor. J. Mycol.* 36:84-92.
- Deonizot, F. and Lang, R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* 89:271-277.
- Fukuda, K., Uematsu, T., Hamada, A. Ariya, S. and Komatsu, N. 1975. The polysaccharide from *Lampteromyces japonicus*. *Chem. Pharm. Bull.* 23:1955-1961.
- Hur, H., Choi, Y. I. and Lee, T. S. 2008. Antitumor and immuno-potentiating activity against mouse Sarcoma 180 by crude polysaccharides extracted from fruiting body of *Tricholoma matsutake*. *Kor. J. Life Science.* 18:1290-1298.
- Jin, M. L. 1996. A study on the activation of immune cell and transcription factor of pine nut mushroom. Ph. D. thesis of Seoul National University Graduate School. pp. 1-121.
- Kim, B. K., Park, E. K. and Shim, M. J. 1979. Studies on constituents of higher fungi of Korea(XXIII), antineoplastic activities of *Coriolus versicolor* (Fr.), *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kumer and *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. *Arch Pharm. Res.* 2:145-151.
- Kim, S. B., Lee, K. W., Kim, H. Y., Shim, M. J., Rho, H. S., Lee, H. S., Lee, M. W. Lee, U. Y. and Lee, T. S. 2006. Inhibitive effect of mouse Sarcoma 180 by crude polysaccharides extracted from fruiting Body of *Armillaria mellea*. *Kor. J. Mycol* 34:98-104.
- Kim, S. B., Lee, K. W., Lee, U. Y. and Lee, T. S. 2007. Studies on immuno-modulatory and antitumor effects of crude polysaccharides extracted from fruiting body of *Oudemansiella radicata*. *Kor. J. Mycol.* 35:109-114.
- Kurihara, K., Shingo, Y., Miura, N. N., Horie, S., Usui, Y., Adachi, Y., Yadomae, T. and Ohno, N. 2003. Effect of CAWS, a mannoprotein-β-glucan complex of *Candida albicans*, on leukocyte, endothelial cell, and platelet functions *in vitro*. *Biol. Pharm. Bull.* 26:233-240.
- Lee, G. W., Kim, H. Y., Lee, U. Y. and Lee, T. S. 2007. Antitumor and immuno-modulatory effect against mouse Sarcoma 180 of crude polysaccharides extracted from fruiting body of *Armillaria tabescens*. *Kor. J. Mycol.* 35:101-108.
- Lee, G. W., Kim, H. Y., Hur, H., Lee, M. W., Shim, M. J., Lee, U. Y. and Lee, T. S. 2008a. Antitumor and immuno-modulatory effect of crude polysaccharides from fruiting body of *Tremella aurantialba* against mouse Sarcoma 180. *Kor. J. Mycol.* 36:66-74.

- Lee, G. W., Kim, H. Y., Hur, H., Lee, T. S. and Lee, U. Y. 2008b. Antitumor and immuno-potentiating activity against mouse Sarcoma 180 by crude polysaccharides from fruiting body of *Lentinus giganteus*. *Kor. J. Mycol.* 36:75-83.
- Lee, K. Y., Han, M. J., Park, S. Y. and Kim, D. H. 2000. *In vitro* and *in vivo* antitumor activity of the fruit body of *Phellinus linteus*. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 32:477-480.
- Oh, Y. H., Lee, U. Y., Lee, M. W., Shim, M. J. and Lee, T. S. 2004. Immuno-modulatory and antitumor effect of crude polysaccharides extracted from sclerotium of *Grifola umbellata*. *Kor. J. Mycol.* 32:23-30.
- Oh, Y. H., Kim, S. B., Lee, K. W., Kim, H. Y., Shim, M. J., Rho, H. S. Lee, H. S., Lee, M. W., Lee, U. Y. and Lee, T. S. 2006. The immuno-modulatory and antitumor effects of crude polysaccharides extracted from *Tremella fuciformis*. *Kor. J. Mycol.* 34: 105-111.
- Park, K. J., Oh, Y. J., Lee, S. Y., Kim H. S. and Ha, H. C. 2007. Anti-diabetic effect of crude polysaccharides from *Grifola frondosa* in KK-Ay diabetic mouse and 3T3-L1 adipocyte. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 39:330-335.
- Park, W. H. and Lee, H. D. 1991. Mushrooms in Korea. Kyo-Hak Publishing Co. Ltd., Seoul, Korea.
- Shim, S. M. 2003. Studies on immuno-modulatory and antitumor effects of crude polysaccharides extracted from wild medicinal mushrooms in Korea. University of Ineeon Graduate School. pp. 1-62.
- Shim, S. M., Im, K. H., Lee, U. Y., Kim, J. W., Shim, M. J., Lee, M. W. and Lee, T. S. 2003a. Studies on immuno-modulatory and antitumor effects of crude polysaccharides extracted from *Paecilomyces sinclairii*. *Kor. J. Mycol.* 31:155-160.
- Shim, S. M., Im, K. H., Kim, J. W., Lee, U. Y., Kim, H. W., Lee, M. W. and Lee, T. S. 2003b. The immuno-modulatory and antitumor effects of crude polysaccharides extracted from *Daedaleopsis tricolor*. *Kor. J. Mycol.* 31:161-167.
- Suzuki, I., Hashimoto, K., Oikawa, S., Sato, K., Osawa, M. and Yadomae, T. 1989. Antitumor and immunomodulating activities of β -glucan obtained from liquid-cultured *Grifola frondosa*. *Chem. Pharm. Bull.* 37:410-413.
- Ying, J. Z., Mao, X. L., Ma, Q. M., Zong, Y. C. and Wen, H. A. 1987. Icons of medicinal fungi from China. Science Press, Beijing, China.