

긴꼬리말불버섯 (*Lycoperdon pedicellatum*)의 항암 면역활성

정경수[#] · 김진향

충남대학교 약학대학 미생물면역학교실

(Received July 24, 2000)

Antitumor and Immunomodulatory Activity of *Lycoperdon pedicellatum*

Kyeong-Soo Chung[#] and Jin Hyang Kim

Laboratory of Microbiology and Immunology, College of Pharmacy, Chung-Nam National University

Abstract — Protein-polysaccharide fractions separated from nine Korean wild mushrooms were subjected to an *in vitro* screening test for lymphoblastogenic activity. Of these, PPLP, the protein-polysaccharide fraction of *Lycoperdon pedicellatum*, showed the most potent activity, and were further investigated for its antitumor activity. When intraperitoneally injected into ICR mice once daily for six days at a dose of 30 mg/kg, PPLP strongly inhibited the growth of sarcoma 180 tumor cells, showing the inhibition ratio of 97.6%. PPLP also showed *in vitro* inhibitory activity on sarcoma 180 or leukemia L1210 at the concentration of 500 µg/ml or higher. These results strongly suggest that PPLP might exert its antitumor activity through immunostimulation as well as inhibitory activity on the tumor cells.

Keywords □ Basidiomycetes, *Lycoperdon pedicellatum*, PPLP, protein-polysaccharide, antitumor, immunostimulation, lymphoblastogenic, flow cytometry.

담자균류(버섯류)의 항암성 단백질/다당체들은 숙주의 면역기능을 비특이적으로 활성화시켜 항암효과를 나타내기 때문에 면역요법제 중 비특이적 면역활성화제로 분류¹⁾되며, 뚜렷한 부작용이 없어서 암의 치료에 널리 사용될 수 있다.^{1,2)} 의약품으로 개발되어 암의 치료에 사용되고 있는 것으로는 *Lentinus edodes*(표고버섯)의 lentinan,^{3,4)} *Coriolus versicolor*(구름버섯, 운지)의 PS-K(Krestin)^{5,6)} 및 Copolang,^{7,8)} *Schizophyllum commune*(치마버섯)의 schizophyllan,^{9,10)} *Phellinus linteus*(목질진흙버섯, 상황)의 균사배양 추출물(메시마-엑스)¹¹⁻¹⁴⁾ 등이 있으며 *Grifola frondosa*(임새버섯)의 D-grifolan¹⁵⁻¹⁷⁾도 임상 실험 중에 있다.

한편 담자균류 유전자원은 매우 방대하여 한국 내에 자생하는 등록된 담자균류 만도 1150여종¹⁸⁾에 이른다

그중 항암효과가 연구 보고된 것은 일부에 지나지 않는다. 따라서 보다 광범위한 검색을 수행할 경우 새로운 면역요법제를 개발할 수 있는 가능성은 상존하고 있으며, 특히 새로운 연구수단을 도입할 경우 그 가능성은 더욱 높을 것으로 사료된다. 이러한 관점에서 저자들은 지난 수년간 유세포분석법(flow cytometry)을 이용하여 한국산 담자균류(버섯류)의 항암면역활성을 연구 보고하고 있는 바,¹⁹⁻²²⁾ 본 연구에서는 한국산 담자균류 9종의 면역활성을 검색하고 그 중 *Lycoperdon pedicellatum*(긴꼬리말불버섯)의 항암효과를 최초로 확인하였기에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

담자균류 시료 - 대전 및 충남북 일원으로부터 야생 담자균류(버섯)를 채집하여 도감²³⁻²⁹⁾에 의거 동정한 후 이 중 *Lycoperdon pedicellatum*(긴꼬리말불버섯), *Lyc-*

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 042-821-5900 (팩스) 042-823-6566

perdon perlatum(말뚝버섯), *Laccaria vinaceoavellanea*(색시줄각버섯), *Russula nigricans*(질구버섯), *Russula bella*(수원무당버섯), *Lepista sordida*(자주방망이버섯아재비), *Amanita spissacea*(뽕겹질광대버섯), *Amanita longistriata*(긴글광대버섯아재비), *Pycnoporus coccineus*(간버섯) 등의 9종을 실험대상으로 하였다.

단백다당체의 분리 정제 - 채집된 시료를 음건 또는 동결건조한 후 2 g 정도의 건조시료를 취하여 잘게 자르고 50~100 ml의 증류수를 가하여 121°C에서 1 시간씩 2 회 추출하여 추출여액을 얻은 후, 이미 보고한 바와 같이¹⁹⁾ 에탄올 침전, 투석, 동결건조하여 무정형의 분말을 획득하였다. 이 중 *Lycoperdon pedicellatum*으로부터 분리한 시료를 PPLP(Protein-Polysaccharide of *L. pedicellatum*)라 칭하기로 한다.

실험동물 - 약 4 주령의 SPF(specific pathogen free) ICR 및 BALB/c계 생쥐 암컷을 대한실험동물센터로부터 구입하여, 공조시설을 갖춘 동물실내에서 사육하며 생후 6 주령 정도되었을 때 실험에 사용하였다. 사료(삼양유지, 항생제 무첨가 마우스용)와 물은 제한 없이 공급하였고, 실온은 22±2°C, 습도는 50%를 유지하였으며 하루에 12 시간씩 조명을 시행하였다.

암세포주 - 마우스 육종암 세포인 sarcoma 180(ATCC catalog No. TIB66)은 ICR 마우스의 복강내 계대 배양 중인 것을, 마우스 백혈병 세포인 L1210(ATCC catalog No. 219)은 RPMI 1640 배지에 배양 중인 것을 사용하였다.

세포 배양 배지 - RPMI 1640(Sigma, Missouri, USA) 분말배지를 주사용증류수(중외제약)에 용해시킨 후 1 M HEPES buffer(Sigma) 10 ml, sodium bicarbonate(Sigma) 2 g, penicillin-streptomycin solution(Sigma) 10 ml 및 56°C로 30 분간 불활성화 시킨 fetal bovine serum(Hyclon, Utah, USA)을 10% 첨가하여 세포배양 배지로 사용하였다.

비장세포 및 암세포 배양 - 시료의 면역활성 및 암세포 성장 저해 효과를 실험하기 위하여 세포배양을 실시하였다. 이 중 BALB/c 마우스 비장 백혈구는 이미 보고한 바¹⁹⁾와 같이 비장을 100-mesh stainless steel 스크린을 통해 단세포로 분리한 후 2회 세척하고 2×10⁶ cell/ml로 현탁하였고, 암세포는 1×10⁵ cells/ml로 현탁하여 각각 6 ml culture tube에 500 μl씩 분주한 후 동일 용적의 시료 용액을 가하여 72 시간 동안 37°C, 5% CO₂ 상태에서 배양하였다. 시료

의 최종 농도는, 비장백혈구에 대한 실험에서는 25 및 100 μg/ml이 되도록 하였고 암세포에 대해서는 250, 500 및 1000 μg/ml이 되도록 하였다.

생존율 분석 - 배양 중인 세포현탁액을 정해진 시간에 따라 300 μl 씩 취해 3% bovine calf serum 첨가 인산염완충액(3% PBS)으로 1회 세척하고 이를 0.5 ml의 3% PBS에 부유시켜 propidium iodide (PI, 최종농도 : 25 μg/ml)를 가하고 3~4분 후에 FACS-calibur를 이용하여 분석하였다.^{30,31)} 시료마다 total event 10,000개에 대한 자료를 취합하였으며, 취합한 자료를 forward scatter(FSC)/fluorescence 3(FL3) dot plot에 나타낸 후 FL3-음성 세포의 백분율을 세포 생존율로 구했다.

Lymphoblast 자극 효과 분석 - 전항의 실험에서 FL3-음성으로 나타난 세포들만을 세포포기에 비례하는 변수인 forward scatter(FSC) 값에 따라 FSC histogram에 나타내고 아래 공식(공식 1)에 따라 FSC 값 증가율을 구해 이를 시료의 lymphoblast 생성 자극 효과 지표로 사용하였다.

$$\% \text{ increase of FSC} = \frac{\text{FSCt} - \text{FSCc}}{\text{FSCc}} \times 100 \quad (\text{공식 1})$$

(단 FSCt 및 FSCc는 각각 실험군 및 대조군의 FSC 평균값)

CD4/CD8 비율 분석 - 배양 중인 세포현탁액을 취해 3% PBS로 1회 세척한 후 세포침전물에 phycoerythrin(PE)-conjugated anti-mouse CD4 monoclonal antibody(mAb)(Sigma) 및 fluoresceinisothiocyanate (FITC)-conjugated anti-mouse CD8 mAb(Sigma)를 가하여 직접 2중 면역형광염색(direct dual immunofluorescence staining)을 시행하였다. 2회 세척 후 생존율분석 항에 따라 FL3-음성 세포를 구분하고 이들을 FL1/FL2 dot plot 상에 나타내어 quadrant 분석을 시행하되 FL1-FL2*인 CD4⁺ 세포 및 FL1*FL2⁻인 CD8⁺ 세포로부터 CD4/CD8 비율을 계산하였다.

항암 실험 - 실험군당 12 마리의 ICR 마우스를 사용하였으며 제 1일부터 제 6일까지 생리식염수 또는 시료(PPLP, 30 mg/kg)를 1 일 1회 복강주사하고 제5일에 sarcoma 180 암세포(4×10⁵ cells/mouse)를 복강내 이식하였다. 제8일에 실험동물을 희생시켜 복강내용물을 회수한 후 이미 언급한 바와 같이²²⁾ 복강유입백혈구(PEC)를 FITC-conjugated anti-mouse

CD45 mAb(Sigma)로 형광표지하였다. 표지한 시료는 유세포 분석기를 이용하여 PEC 및 sarcoma 180 cell를 분별계수하였다.

실험결과 및 고찰

단백다당체 시료의 성상 - 본 연구에서 제조한 단백질다당체 시료들은 담갈색-암갈색의 무정형 분말들로서 절구버섯의 것을 제외한 모든 시료가 상온에서 혹은 약간의 가온으로 증류수에 잘 용해되었다. 절구버섯의 단백질다당체는 쉽게 용해되지 않았으며 용해되더라도 10 mg/ml 정도의 농도에서 겔에 가까운 점도를 나타내었다.

Lymphoblast 생성 자극 효과 - lymphoblast 생성 자극 효과는 통상 ³H-thymidine uptake를 측정하여 확인할 수 있으나, 이 방법은 방사성 동위원소를 사용해야 할 뿐만 아니라 lymphoblast로 전환된 세포들의 아형(subtype)을 분석할 수 없다. 그러나 flow cyto-

metry는 방사성 동위원소를 사용하지 않을 뿐만 아니라 lymphoblast 아형 분석도 가능하다. 이에 본 연구자 등은 이미 flow cytometry를 이용하여 *Phellinus linteus*(목질진흙버섯, 상항)¹²과 *Ganoderma lucidum*(영지버섯) 단백질다당체들의 lymphoblast 생성자극 효과를 입증한 바 있으며^{19,21,22} 본 연구에서는 9종의 야생담자균의 lymphoblast 생성자극 효과 등을 분석하였다. 그 결과, Table I에 나타난 바와 같이 24시간 후의 분석에서는 대체적으로 미약한 효과가 관찰되었으나, 48시간 후에는 뚜렷한 효과가 나타나서 100 µg/ml 농도에서 *Lycoperdon pedicellatum*(PPLP)과 *Russula nigricans* 등 2종이 BALB/c 마우스 비장 lymphocyte의 FSC 값을 각각 21.0% 및 21.1% 증가시켰으며, *Lycoperdon perlatum*, *Laccaria vinaceoavelleana*, *Amanita longistriata*, *Lactarius sordida* 등도 10% 이상의 증가 효과를 나타내었다. 반면 *Russula bella*, *Amanita spissacea* 및 *Pycnoporus coccineus* 등 3종은 10% 미만의 미약한 증가 효과를 나타내었다.

Table I - *In vitro* Lymphoblastogenic effect of protein-polysaccharide fractions separated from the carpophores of Korean basidiomycetes on the splenocytes^a of BALB/c mouse

stimulant	conc. (µg/ml)	24 hr		48 hr	
		FSC mean ^b	% increase ^c	FSC mean	% increase
-	-	277.34	0	270.38	0
<i>Concanabalin A</i>	2.5	350.78	26.5	520.19	92.4
<i>Lycoperdon perlatum</i>	100	295.72	6.63	317.28	17.4
	25	283.09	2.07	297.91	10.18
<i>Lycoperdon pedicellatum</i>	100	297.05	7.11	327.16	21.0
	25	286.95	3.47	306.93	13.5
<i>Laccaria vinaceoavelleana</i>	100	290.95	4.91	314.01	16.1
	25	285.11	2.80	301.59	11.5
<i>Russula nigricans</i>	100	277.56	0.08	290.55	7.46
	25	276.54	-0.29	280.96	3.91
<i>Russula bella</i>	100	292.15	5.31	327.54	21.1
	25	287.66	3.72	303.92	12.4
<i>Lepista sordida</i>	100	284.69	2.65	307.19	13.6
	25	278.29	0.34	291.86	7.94
<i>Amanita spissacea</i>	100	279.21	0.67	289.78	7.18
	25	273.18	-1.50	277.73	2.72
<i>Amanita longistriata</i>	100	292.79	5.6	316.18	16.9
	25	284.17	2.46	297.10	9.91
<i>Pycnoporus coccineus</i>	100	278.17	0.33	277.50	2.63
	25	276.15	-0.43	272.28	0.70

^aThe splenocytes were cocultured with protein-polysaccharide (100 µg/ml) or Con A (2.5 µg/ml) for 24~48 hours.

^bFSC mean is the mean value of Forward Scatter (FSC) of 10,000 cells analysed.

^c% increase = {(T-C)/C} × 100, where T and C, respectively, stands for FSC mean of the treated and the control cells.

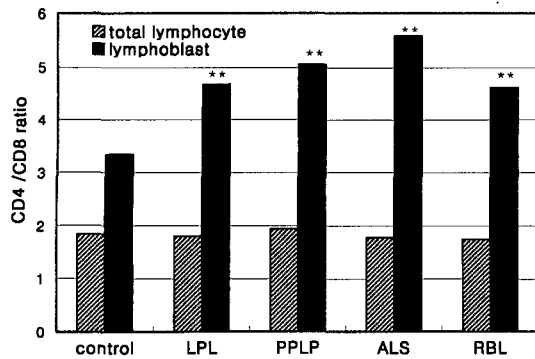


Fig. 1 - *In vitro* effect of protein-polysaccharide fractions of four mushrooms on the CD4/CD8 ratio of splenic lymphocytes of an ICR mouse. The cells were cocultured with the samples (100 µg/ml) for 48 hours and then two-color immunofluorescence-stained with FITC-conjugated anti-mouse CD8 monoclonal antibody (mAb) and PE-conjugated anti-mouse CD4 mAb prior to flow cytometric analysis. Each data point shows the mean value of 10^4 cells. LPL: *Lycoperdon perlatum*, PPLP: *Lycoperdon pedicellatum*, ALS: *Amanita longistriata*, RBL: *Russula bella*.

**significantly different ($p < 0.001$) from the control.

한편 25 µg/ml 농도에서도 유사한 경향이 관찰되었으며(Table I) 특히 PPLP는 6.25~50 µg/ml 농도에서 농도의존적인 효과를 나타낼 뿐만 아니라 T cell mitogen인 Concanavalin A와 상가적으로 작용함이 관찰되었다(약학회지 투고 준비중).

CD4/CD8 비율 증가 효과 - CD4⁺ 및 CD8⁺ T cell의 비율을 분석한 결과, 다당체 100 µg/ml 처리군 모두에서 전체 lymphocyte 중의 CD4/CD8 비율은 증가되지 않았지만 lymphoblast 영역 중의 CD4/CD8 비율이 현저히 증가되었다(Fig. 1). 이는 PPLP 등 다당체 시료가 T lymphocyte 중 CD4⁺ T cell을 더 많이 lymphoblast로 전환시켰음을 의미한다. 한편 CD4⁺ T cell은 통상적으로 T_H cell로 작용하여 B cell, CD8⁺ T cell, monocyte, macrophage 등을 활성화시키기 때문에 PPLP 등 버섯 다당체들에 의한 CD4⁺ T cell의 활성화는 전반적인 면역의 활성화로 이어질 가능성을 시사한다.

이상의 두 가지 실험 결과, 식용 버섯의 일종인 긴 꼬리말뚝버섯(*Lycoperdon pedicellatum*)의 단백다당체 PPLP가 lymphoblast 생성 효과가 가장 강력하였을 뿐만 아니라 lymphoblast 중 CD4/CD8 비율도 현저

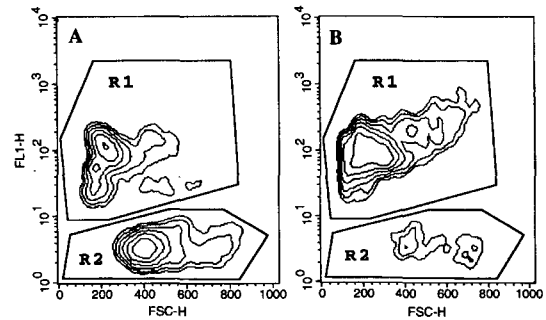


Fig. 2 - A flow cytometric analysis of the antitumor activity of PPLP against murine tumor sarcoma 180 cells. The peritoneal washout cells were depicted on FSC/FL1 contour plots. Regions R2 and R3, respectively, encompass the peritoneal exudated cells (PECs) and sarcoma 180 cells. Before analysis, the peritoneal washout cells were stained with FITC-conjugated anti-mouse CD45 mAbs to distinguish PEC from sarcoma 180 cells. Panel A and Panel B shows the representative result of a control mouse and a PPLP-treated mouse, respectively.

히 증가시켰기 때문에 이를 우선적으로 *in vivo* 항암 실험 대상으로 결정하였다. 한편 *A. longistriata*의 단백다당체는 lymphoblast 중 CD4/CD8 비율 증가 효과에서는 PPLP 보다 다소 우수하였으나 lymphoblast 생성 효과는 PPLP 보다 떨어졌고 또한 맹독성 버섯으로 알려져 있기 때문에 일단은 항암실험 대상에서 제외하기로 하였다.

항암 효과 - 복강내에 암세포를 이식하거나 항원성 물질을 투입하면, 통상적으로 호중구나 대식세포, 또는 림프구 등의 백혈구(peritoneal exudated cells, PEC)가 유입되어 암세포의 계수에 혼란을 초래하게 된다. 따라서 본 연구에서는 PEC를 면역형광 염색하여 sarcoma 180 암세포와 분별시킨 후 FSC/FL1 dot plot(Fig. 2)에서 각각을 계수하였다. 그 결과 대조군의 sarcoma 180 세포수는 336.4×10^2 인데 비하여 PPLP 투여군은 8.1×10^2 으로, PPLP가 sarcoma 180의 증식을 97.6% 억제한 것으로 판명되었다(Table II). 한편 대조군의 PEC 수치는 239.6×10^2 인데 비하여 PPLP 처치군은 3배 이상 증가한 825.5×10^2 이었다. 따라서 PPLP의 항암효과는 PEC의 유입 증가 및 이들의 활성화에 기인한 것으로 보인다. 이와 매우 유사한 현상은 잎새버섯 다당체 *grifolan*에서도 관찰¹⁵⁾되고 있어서 PEC의 증가 및 활성화는 버섯 다당체들의 *in*

Table II – Antitumor effect of PPLP^a against sarcoma 180 tumor cells in ICR mice

	n	sarcoma 180 cells ^b		PEC ^d	
		Number (× 10 ² cells)	% inhibition ^c	Number (× 10 ² cells)	SI ^e
control	12	336.4 ± 112.0 ^f	-	239.6 ± 58.1	-
PPLP	12	8.1 ± 3.5**	97.6	825.5 ± 62.3**	2.45

^a PPLP (30 mg/kg) was ip injected once daily for six days (days 0, 1, 2, 3, 4 and 5) and sarcoma 180 cells (4 × 10⁵ cells/mouse) were ip implanted on day 4.

^b The cells in the peritoneum of a mouse were washed out on day 7 using 5 ml of heparin-saline and then immunofluorescence-stained with FITC-conjugated anti-mouse CD45 mAb to distinguish the peritoneal exudate cells (PECs) from sarcoma 180 cells. Sarcoma 180 cells (FL-1-negative cells) and PECs were simultaneously counted for 20 sec using a FACScalibur flow cytometer at the flow rate of 35 µl/min.

^c % inhibition = (C_N - T_N) / C_N × 100, where C_N and T_N, respectively, stands for the number of sarcoma 180 cells of the control group and the treated group.

^d The PECs (FL-1-positive cells) were counted as described above.

^e SI (stimulatory index) = T_N / C_N, where C_N and T_N, respectively, stands for the number of the PEC of the control group and the treated group.

^f each data stands for mean ± S.E.

**significant at p < 0.01

in vivo 항암효과 특히 ascitic tumor에 대한 항암효과와는 밀접한 관계가 있을 것으로 추정된다.

한편 *Lycoperdon* 속(말벌버섯속)에 속하는 버섯들은 민간에서 지혈약으로 사용되어 왔으며²⁵⁾ *Lycoperdon perlatum* 인공배양 균사체로부터 추출한 항암성 단백 다당체는 일본의 연구자들에 의해 1977년 특허출원된 바 있다.³²⁾ 그러나 *Lycoperdon pedicellatum*에 관해서는 언급된 바 없으며, 특히 그 자실체의 항암 효과에 관한 연구 결과는 전혀 찾아 볼 수 없다. 따라서 *Lycoperdon pedicellatum*의 항암효과 및 lymphoblast 생성 자극 효과에 관한 연구는 본 연구자들의 것이 최초의 것으로 보인다.

또한 *in vitro* lymphoblast 형성 자극 효과가 가장 뛰어난 PPLP가 항암실험에서 강력한 항암작용을 보임으로써 flow cytometry를 이용한 lymphoblast 생성 자극 효과 검색을 항암 면역활성 성분 검색의 유용한 수단으로 이용할 수 있음을 알게 되었다.

PPLP의 *in vitro* 암세포 저해 효과 – Table III에 나타낸 바와 같이 PPLP는 sarcoma 180 암세포에 대해 뚜렷한 저해 효과를 발휘하였다. 즉 24 시간 배양 후 대조군에서의 sarcoma 180 생존율이 98.4%임에 반해 PPLP 1000 µg/ml 처리군에서는 2.7%에 불과하여 거의 모든 암세포가 사멸되었음을 알 수 있었다. 한편 L1210 세포는 PPLP의 저해작용에 대해 sarcoma 180 보다 감수성이 낮았다(Table III).

그러나 전향에 기술한 바와 같이 PPLP의 lymphoblast 생성 자극 효과는 100 µg/ml 또는 25 µg/ml

Table III – Cytotoxicity of PPLP on mouse sarcoma S180 cells and mouse leukemia L1210 cells

PPLP ^a (µg/ml)	sarcoma 180		L1210	
	24 hr	48 hr	24 hr	48 hr
0	98.4 ^b	97.4	95.9	97.6
250	88.5	85.0	91.0	81.2
500	82.7	84.2	89.5	87.7
1000	2.7	1.3	71.4	80.0

^a PPLP is the protein-polysaccharide fraction separated from the carpophores of *Lycoperdon pedicellatum*.

^b The number represents the % viability of the tumor cells cultured for 24 hr or 48 hr in the presence or absence of PPLP. The viability was flow cytometrically analyzed using PI exclusion method.

농도에서 명확히 관찰된 반면 sarcoma 180에 대한 저해효과는 500 µg/ml 이하에서 매우 미약했다는 점과, *in vivo* 항암실험에서의 시료 투여 용량은 1일 30 mg/kg으로서 체중 1 g 당 30 µg에 불과했다는 점, 그리고 시료 투여가 대부분 암세포 이식 전에 이루어져서 투여된 시료가 체내에서 대사되거나 배설되었으리라는 점 등을 감안하면, PPLP가 ICR 마우스에서 sarcoma 180 복수암에 대해 보여준 항암효과(Table II)는 PPLP의 직접 저해작용에 기인했을 가능성은 낮다고 볼 수 있다.

감사의 말씀

본 연구의 일부는 충남대학교 약학대학 의약품개발연구소 연구비 지원으로 이루어졌기에 감사 드립니다. 또

한 연구에 많은 도움을 준 의약품개발연구소 이임선 박사과 본 연구실의 이지선 석사, 오정연 석사에게 감사합니다.

결 론

한국산 야생 담자균류 9종의 단백다당체를 분리하고 유세포분석기법을 이용하여 면역활성을 검색한 결과 *Lycoperdon pedicellatum*(긴꼬리말불버섯)의 단백다당체 분획 PPLP가 BALB/c 마우스 비장 백혈구에 대하여 강력한 lymphoblast 생성 자극 효과를 나타내었다. 또한 PPLP는 ICR 마우스의 복강에 이식된 sarcoma 180 복수암에 대해 30 mg/kg의 용량에서 97.6% ($p < 0.01$)의 강력한 항암 효과를 발휘하였고, 복강유입 세포(PEC)도 대조군에 비해 3배 이상 증가시켰으며, sarcoma 180 암세포에 대해 뚜렷한 직접 저해 작용을 발휘함으로써 항암면역요법제로의 개발 가능성이 제시되었다.

문 헌

- 1) Hersh, E. M. and Taylor, C. W. : Immunotherapy by active immunization: Use of nonspecific stimulants and immunomodulators. pp. 613-626. In "Biologic Therapy of Cancer" by DeVita, Jr., V. T., Hellman, S., and Rosenberg, S. A. (Eds.). J. P. Lippincott, Philadelphia (1991).
- 2) Hobbs, C. : Medicinal Mushrooms. Interweave Press, Loveland, Colorado pp. 252 (1995).
- 3) Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y. Y., Arai, Y. and Fukuoka, F. : Fraction of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes* (an edible mushroom). *Cancer Res.*, **30**, 2776 (1970).
- 4) Jeannin, J. F., Lagadec, P., Pelletier, H., Reisser, D., Olsson, N. O., Chihara, G., and Martin, F. : Regression induced by lentinan, of peritoneal carcinomas in a model of colon cancer in rat. *Int. J. Immunopharmacol.*, **10**, 855 (1988).
- 5) Tsukagoshi, S. and Ohashi, F. : Protein bound polysaccharide preparation, PS-K, effective against mouse sarcoma 180 and rat ascites hepatoma by oral use. *Gann.* **65**, 557 (1974).
- 6) Tsukagoshi, S. Hashimoto, Y., Fujii, G., Kobayashi, H. Nomoto, K. and Orita, K. : Krestin (PSK). *Cancer Treat. Rev.* **11**, 131 (1984).
- 7) Moon, C.-K., Lee, S.-H., Mock, M.-S., and Kim, D.-O. : Antitumor Activity of the Polysaccharide-Fraction (Copolang) from *Coriolus versicolor* and its Effects on the Immune Function. *Yakhak Hoeji* **31**, 126 (1987).
- 8) Jo, S.-K., Kim, S.-H., and Yoon, T.-K. : Effects of Copolang on Murine Immune Function and Antitumor Activity. *J. Kor. Cancer Assoc.* **19**, 95 (1987).
- 9) Komatsu, N., Okubo, S., Likumoto, S., Kimura, K., Saito, G. and Sasaki, S., Host-mediated antitumor action of schizophyllan, a glucan produced by *Schizophyllum commune*. *Gann*, **60**, 137 (1969).
- 10) Okamura, K., Suzuki, M., Chihara, T., Fujiwara, A., Fukuda, T., Goto, S., Ichinohe, K., Jimi, S., Kasamatsu, T., Kawai, N. : Clinical evaluation of schizophyllan combined with irradiation in patients with cervical cancer. A randomized controlled study. *Cancer* **58**, 865 (1986).
- 11) Ikegawa, T., Nakanishi, Y., Uehara, N., Chigara, G. and Fukoka, F., Antitumor action of some basidiomycetes, especailly *Phellinus linteus*, *Gann*, **59**, 155 (1968).
- 12) Chung, K. S. , Kim, S. S., Kim, H. S., Han, M. W. and Kim, B. K. : Antitumor activity of Kp, a protein-polysaccharide from the mycelial culture of *Phellinus linteus*. *Yakhak Hoeji* **38**, 158 (1994).
- 13) Song, K. S., Cho, S. M., Lee, J. H., Kim, H. M., Han, S. B., Ko, K. S., and Yoo, I. D. : B-Lymphocyte-Stimulating Polysaccharide from Mushroom *Phellinus linteus*. *Chem. Pharm. Bull.* **43**, 2105 (1995).
- 14) Chung, K. S., Kim, S. S., Kim, H. S., Kim, K. Y., Han, M. W., and Kim, B. K. : Effect of Kp, an antitumor Protein-polysaccharide from mycelial culture of *Phellinus linteus* on the humoral immune response of tumor-bearing ICR mice to sheep red blood cells. *Arch. Pharm. Res.* **16**, 336 (1993).
- 15) Ohno, N., Suzuki, Y., Sato, K., Oikawa, S. and Yadomae T. : Effect of Grifolan on the ascites form of Sacoma 180. *Chem. Pharm. Bull.* **35**, 2576 (1987).
- 16) Adach, K., Nanba, H., and Kuroda, H. : Potentiation of host-mediated antitumor activity in mice by β -Glucan obtained from *Grifola frondosa* (Maitake) *Chem. Pharm. Bull.* **35**, 262 (1987).

- 17) Ohno, N., Suzuki, I, Oikawa, S., Sato, K., Miyazaki, T., and Yadomae, T. : Antitumor activity and structural characterization of glucans extracted from cultured fruit bodies of *Grifola frondosa*. *Chem. Pharm. Bull.* **32**, 1142 (1984).
- 18) 이태수, 이지열 : 한국 기록종 버섯 재정리 목록, pp. 87. 임업연구원, 서울 (2000).
- 19) Chung, K. S., Kim, S. B. and Chung, S. H., Immunoactivities of the Protein-polysacchrides of the Tips of the Growing Carpophores of *Ganoderma lucidum*. *Yakhak Hoeji*, **41**, 105 (1997).
- 20) Chung, K. S. and Oh, J. Y. : Protective effect of GLB-A, an acidic protein-polysaccharide fractions of *Ganoderma lucidum*, against UV irradiation. *J. Pharm. Sci. (C.N.U.)*, **13**, 1 (1997).
- 21) Oh, J. Y., Cho, K. J., Chung, S. H., Kim, J. H., Lillehoj, H. S. and Chung, K. S. : Activation of Macrophages by GLB, a Protein-polysaccharide of the Growing Tips of *Ganoderma lucidum*. *Yakhak Hoeji*, **42**, 302 (1998).
- 22) Oh, J. Y. and Chung, K. S. : Flow Cytometrical Analysis of the Antitumor and Immunomodulatory Activities of GLB-A and GLB-B, the Protein-polysaccharide Fractions of the Growing Tips of *Ganoderma lucidum*. *Yakhak Hoeji*, **42**, 487 (1998).
- 23) Kim, S. S. and Kim, Y. S. : "Korean Mushrooms", Yupoong Pub., Seoul (1990).
- 24) Lee, J. Y. : "Colored Korean Mushrooms", Academy Pub., Seoul (1993).
- 25) Park, W. H. : "Colored Illustrations of Korean Fungi", Kyo-Hak Pub., Seoul (1991).
- 26) Gerhardt, E. : "BLV Handbuch, Pilze", BLV Verlagsgesellschaft mbH, Munchen (1995).
- 27) Imazeki, R., Otani, Y. and Hongo, T. : "Japanese Mushrooms", Yama-Kei Pub., Tokyo (1988).
- 28) Park, W.-H. and Lee, H.-D. : *Illustrated Book of Korean Medicinal Mushrooms*. Kyo-Hak Pub., Seoul (1999).
- 29) Lincoff, G. H. : *The Audubon Society Field Guide to North American Mushrooms*. Alfred A. Knopf, New York (1992).
- 30) Ormerod, M. G. (ed.), "Flow cytometry : A Practical Approach", pp. 75~76, IRL press, Oxford (1990).
- 31) Darzynkiewicz, Z., Li, X. and Gong, J. : Assay of Cell Viability Discrimination of Cells Dying by Apoptosis. In *Methods in Cell Biology* (Vol. 41 Part A): *Flow Cytometry* by Darzynkiewicz, Z., Robinson, J. P., and Crissman, H. A. (Eds.). Academic Press, San Diego (1994).
- 32) 上野三郎 : 日本 特許出願公開 昭 53-109927 (1978).