

신령버섯(*Agaricus blazei* Murill) 균사체내의 다당체의 면역활성효과

김무성¹ · 조홍범^{2*}

¹(주)마크로케어, ²서경대학교 생물공학과

신령버섯(*Agaricus blazei* Murill)의 액체 배양으로 다당체의 균사체외 분비를 유도하였으며, 버섯 균사체의 세포내 다당체와 세포외 분비 다당체의 면역증진활성을 *in vitro* 시험으로 비교하였다. 부분 정제된 세포내 다당체와 세포외 다당체의 총당 함량은 각각 85.6%와 95.3%였으며, β -glucan 함량은 각각 67.9%와 88.1%로 측정되었다. 면역활성 실험에는 시료의 당 함량을 동일하게 맞추어 사용하였다. *In vitro*에서 균사체내의 다당체는 대식세포주인 RAW 264.7을 활성화시켜 nitric oxide (NO) 생성을 농도 의존적으로 증가시켰으며, 각각 최대 53.9%, 53.1%의 비슷한 증가활성을 나타내었다. 또 균사체내의 다당체는 모두 RAW 264.7을 활성화시켜 염증성 cytokine-류인 interleukin (IL)-1 β , IL-6, tumor necrosis factor (TNF)- α 의 생성을 증가시켰으며, 이때 3종의 cytokine 모두에서, 세포내 다당체에 비해 세포외 다당체를 처리했을 때 저농도에서 높은 증가율을 나타내었다. 두 다당체는 *in vitro* 상에서 비장세포를 증식시키는 효과를 나타내었으며, 세포내 다당체가 농도 의존적으로 증식효과를 보인 반면 세포외 다당체는 저농도에서 증식이 높았고, 250 μ g/ml 농도 이상에서는 더 높아지지 않았다. 두 다당체 모두 암세포인 B16F0 melanoma에 대한 직접적인 세포독성 효과는 나타내지 않았다. 신령버섯 균사체 배양으로 생성된 세포내의 다당체는 *in vitro*에서 모두 면역활성을 증가시키는 것으로 나타났으며 전반적으로 그 활성은 세포내 다당체보다 세포외 다당체가 우수한 것으로 판단되었다.

Key words □ *Agaricus blazei* Murill, immune enhancing, intracellular and extracellular polysaccharide, mycelial culture

신령버섯은 브라질에서 자생하는 주름버섯목 주름버섯과의 버섯으로서 항암효과 등이 우수한 것으로 알려지면서 한국, 일본, 중국 등지에서 인공 재배되고 있다. 담자균류의 항암 또는 면역활성 성분에 대한 연구는 Roland 등(15)이 calvacin 단백질을 분리하면서 시작되어, Fitzpatrick와 DiCarlo (3)가 효모에서 유래한 복합다당류인 zymosan의 면역기능을 확인하고 Gregory 등(4)이 여러 균주의 자실체와 균사 배양물에서 항암기능을 확인하는 등 이들이 생성하는 단백질 및 다당류에 대한 많은 연구가 이루어져 왔다. β -Glucan 등 담자균 유래의 다당류들은 생체의 저하된 면역기능을 회복 또는 증강시키고 특별한 부작용이 거의 없는 것으로 알려져 항암 보조치료제 등으로 많이 개발되고 있으나, 다당체들의 구성이나 구조, 작용기작 등과 생리학적 특성은 아직 밝혀지지 않은 부분이 많다. 최근 면역활성 다당류의 구조가 밝혀지고 있으며, 항종양 활성과 감염방어 효과, 항보체 효과, 대식세포 활성화 등 면역계에 대한 조절 활성과 소염, 혈당강화 활성 등도 다당류 성분의 화학구조 및 3차 구조에 관련이 있는 것으로 알려졌고, 특히 분자량, side chain, 3차 구조에 따라서 그 생리활성이 달라질 수 있다고 연구되었다(1, 13).

담자균류 다당체의 구조나 조성은 자실체와 균사체 배양물간에 크게 차이날 수 있으며, 균사체 배양물에 있어서도 균주의 종

류와 배양방법, 세포내외 다당체 여부에 따라 달라질 수 있어 (14, 17) 이들에 대한 여러 방면에서의 특성 규명이 필요하다.

신령버섯은 자실체와 함께 균사체 배양물이 건강식품 등에 사용되고 있는 바, 본 연구에서는 신령버섯의 균사체 배양물에 있어서 세포외로 분비되는 다당류와 세포내에 함유된 다당류 각각의 면역활성을 비교측정함으로써 버섯 다당류의 제조에 따른 특성을 확인코자 하였다.

재료 및 방법

시료 제조

신령버섯(*Agaricus blazei* Murill) 균주는 (주)마크로케어에서 제공받아 사용하였으며, Potato Dextrose agar 배지에서 25°C, 10일간 배양한 후 4°C에 보관하면서 사용하였다. 다당체 생성을 위한 균주의 배양은 5 L jar fermentor (Kobitech)를 사용하였으며, 기본 배지로 glucose 3% (w/v), yeast extract 0.5% (w/v), malt extract 0.5% (w/v), KH₂PO₄ 0.1% (w/v), MgSO₄ · 7H₂O 0.05% (w/v)를 사용하고 배양 70시간에 glucose 2% (w/v), yeast extract 0.1% (w/v), malt extract 0.1% (w/v)를 추가하는 fed batch type으로 배양하였다. 배양조건은 초기 pH 5.0, 온도 28°C, 통기 0.75 vvm, 교반 300 rpm으로 7일간 배양하였다.

시료 제조를 위해 배양 후 배양액과 균사체를 원심분리(4,000×g, Unicen M, Herolab)하였으며 침전된 균사체에 배양액과 동량

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-2-940-7187, Fax: 82-2-919-0345
E-mail: hbcho@skuniv.ac.kr

의 물을 가하여 재차 원심분리하였다. 세포의 다당체로서, 원심분리한 상등액은 모아서 한외여과(Millipore, M.W. cut off 100,000)하여 다당체를 농축한 후 2배수의 ethanol을 가하여 다당체를 침전시켰으며, 이를 3회 반복하고 침전물을 회수한 후 동결건조하여 사용하였다. 세포내 다당체로서는 회수한 균사체에 증류수를 10배 가하고 110°C에서 1.5시간 추출한 후 원심분리하여 상등액을 회수하고, 상기 세포의 다당체와 동일하게 한외여과 및 ethanol 침전하여 건조된 것을 사용하였다.

다당체 분석

다당체의 총당 분석은 phenol-sulfuric acid법(2)을 사용하였고 β -glucan의 측정방법은 Megazyme 사(Wicklow, Ireland)의 'Mushroom and Yeast Beta-Glucan Assay' (12)에 따라 수행하였으며, 단백질량은 Lowry법(9)에 의해 측정하였다.

Nitric Oxide (NO) 생성 실험

마우스 대식세포인 RAW 264.7은 5% fetal bovine serum-Dulbecco's modified Eagle's medium에 streptomycin 100 μ g/ml와 penicillin 100 U/ml를 첨가하여 배양하였다. 약 2×10^5 개의 RAW 264.7을 48 well plate의 각 well에 분주하였다. 각 well에 시료를 4, 20, 100, 500 μ g/ml의 농도로 첨가하고 37°C, 5% CO₂의 배양기에서 24시간 동안 배양한 후 상층액을 수거하여 NO₂⁻의 양을 Nitrite assay (5)로 측정하였다. 즉, 96 well plate에 상층액 100 μ l와 동량의 Griess reagent [1% sulfanilamide, 5% phosphoric acid and 0.1% 1-(N-naphthyl)ethylenediamine, Sigma]를 첨가한 뒤 15분 동안 실온에서 반응시켰으며 흡광도는 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 측정하였다. NO₂⁻의 농도는 sodium nitrite를 표준용액으로 하여 계산하였다. 양성 대조군으로는 lipopolysaccharide (LPS, *E. coli* O111:B4, Sigma)를 5 μ g/ml의 농도로 첨가하여 사용하였다.

Cytokine의 생성 실험

RAW 264.7를 상기와 동일한 방법으로 48 well plate에 2×10^5 cell/well로 분주하였다. 다음에 시료를 4, 20, 100, 500 μ g/ml의 농도로 well에 첨가한 후 37°C, 5% CO₂의 배양기에서 24시간 동안 배양 후 상층액으로 분리된 interleukin (IL)-1 β , IL-6, tumor necrosis factor (TNF)- α 의 양을 ELISA를 이용하여 측정하였다.

비장세포의 증식에 미치는 영향

BALB/c 마우스(SLC Inc., Shizuoka, Japan)의 비장을 무균적으로 단일세포를 만든 뒤 적혈구를 Tris-buffered NH₄Cl을 이용하여 용혈시키고, 이를 2회 세척한 후 10% FBS-RPMI 배지에 현탁하였다. 소량의 세포 현탁액을 trypan blue로 염색하여 세포의 숫자 및 생존율을 측정하였으며 95% 이상의 생존율을 나타내는 것만을 이용하였다. 비장세포는 well 당 5×10^5 개의 세포가 들어가도록 96 well plate에 분주하였으며 여기에 시료를 10, 50, 100, 250, 500 μ g/ml의 농도로 첨가하였다. 37°C, 5% CO₂의 배양기에서 3일간 배양한 뒤 XTT 시약(Roche)을 50 μ l씩 넣고

37°C에서 4시간 반응시키고 microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

암세포에 대한 독성 실험

암세포인 B16F0 melanoma 세포주를 1×10^6 /ml의 농도로 actinomycin D (1 μ g/ml)가 함유된 10% FBS-RPMI 배지에 현탁한 후 37°C, 5% CO₂의 배양기에서 3시간 동안 배양하였다. 이후 5×10^4 cell/well의 농도로 96 well plate에 분주하고 여기에 시료를 10, 50, 100, 500 μ g/ml의 농도로 넣어 24시간 동안 37°C, 5% CO₂의 배양기에서 배양하고 다음에 50 μ l의 XTT 시약을 넣고 18시간 동안 추가 배양하였다. 이후 microplate reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계처리

실험 결과는 Means \pm SD (standard deviation)으로 표시하였고, 유의성 차이는 Student's t-test를 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

균사체 배양 및 다당체의 생성

기본적으로 설정된 배지 조성 및 배양 조건에 따라 배양기간 동안의 신령버섯(*A. blazei*) 균사체와 다당체 생성, glucose의 소비 경향을 파악하였다. 우선 균사체의 생성량은 배양기간 동안 균일한 증가를 보였으며, 세포의 다당체는 60시간 이후 생성량이 증가함을 알 수 있었다. 잔존 glucose도 60시간까지 2~3%의 농도를 유지하다가 60~100시간 사이에 2% 정도의 소비가 이루어졌다. 세포의 다당류 생성을 증가시키기 위하여 초기 glucose의 농도를 3%로 줄이고, glucose의 소비량이 급증하는 70시간 시점에 2%의 glucose를 추가로 접종하는 semi-fed batch 방법을 사용하였으며 세포의 다당체의 생산이 약 4.0 g/L 정도가 되는 결과를 얻었다. 배양 결과는 Fig. 1에 요약하였다.

세포내의 다당체의 구성

균사체에서 분리된 세포내의 다당체의 구성으로서 총당, β -glucan, 단백질 함량을 측정된 결과는 Table 1과 같다. 총당의 함량은 세포의 다당체가 세포내 다당체 보다 9.7% 정도 높았으며, β -glucan의 함량은 20.2% 높았다. 단백질의 양은 세포내 다당체에서 9.2% 더 높았다. 이는 세포내 다당은 세포벽의 구성분과 결합된 복합당 또는 단백질당의 형태를 가지며, 세포의 다당은 세포벽에서 분리되는 균일한 조성의 당성분이 주성분이기 때문일 것으로 추정된다.

담자균 면역활성 성분은 단백질 또는 단백질당일 경우도 있으나, 대부분 glucan 또는 복합 다당체의 형태인 것을 감안하여 본 실험에는 시료의 당 함량을 동일하게 맞추어 사용하였다.

NO 생성에 미치는 효과

NO는 혈관확장, 신경전달, 혈소판응집억제, 염증반응의 매개 등 매우 다양한 기능을 갖고 있으며, 또한 체내로 침입한 미생물

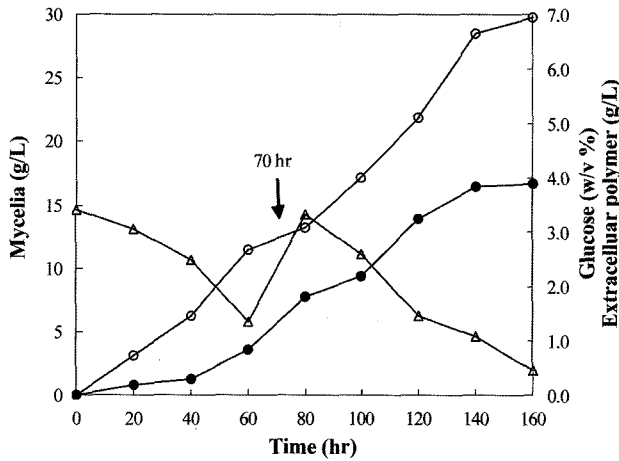


Fig. 1. Profiles of mycelial growth, polymer production and glucose consumption by fed batch cultivation of *A. blazei*. Cultivation was started with 3% of glucose, and added with 2% of Glucose at about 70 hr for efficient production of extracellular polymer. ○, mycelia; ●, extracellular polymer; △, residual glucose.

Table 1. Analysis of intracellular and extracellular polymer from *A. blazei*.

Component	Contents (%)	
	Intracellular	Extracellular
Total carbohydrate	85.6	95.3
β-Glucan	67.9	88.1
Protein	11.2	2.0

Total carbohydrate was analyzed by phenol-sulfuric acid method, β-glucan was analyzed by 'Mushroom and Yeast Beta-Glucan Assay' of Megazyme Inc. and protein content was estimated by Lowry method.

및 암세포에 대한 직접적인 살상기능을 갖고 있는 것으로도 알려져 있다(6, 8). NO에 의해 IL-2, IL-3 등의 cytokine 분비는 억제되며, TNF-α, IL-1 등의 생성은 촉진되는데, 이러한 작용에 의해 T 림파구 및 NK 세포 등의 기능이 조절된다는 등 NO가 생체 내에서 면역조절물질로서 작용한다는 것이 밝혀짐으로써 한층 그 중요성이 부각되었다(11).

NO는 주로 대식세포가 활성화되어 생성되는 바, 본 연구에서는 다당류에 의해 대식세포를 활성화하여 NO를 생성케하는지 조사하였다. Figure 2에 나타난 바와 같이 세포내의 다당체 모두 농도 의존적으로 대식세포를 활성화시켜 NO의 양이 증가됨을 알 수 있었다. 양성대조군인 LPS를 첨가한 상태에서는 배양 24 시간에 43.2 μM의 nitrite를 생성하였으며, 세포내의 다당체 처리군은 모두 100 μg/ml 농도에서 LPS와 유사한 정도의 nitrite를 생성하였고, 500 μg/ml 농도에서는 세포내의 다당체 각각 53.9 μM, 53.19 μM의 nitrite를 생성하였다. 세포내의 다당체 모두 유사한 정도로 대식세포를 활성화시키는 것을 확인하였다.

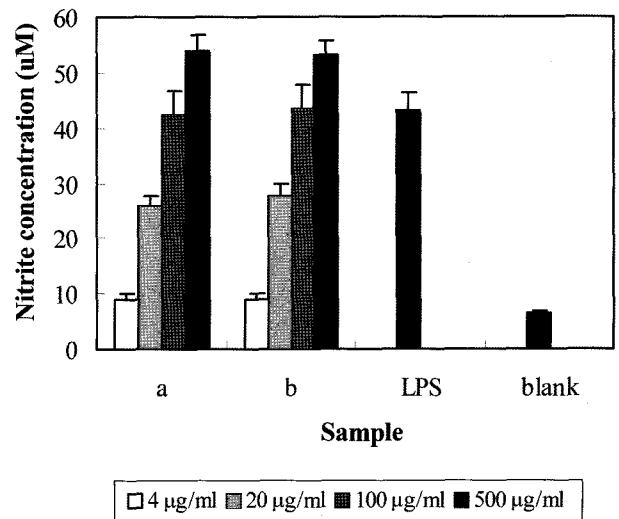


Fig. 2. Effect of intracellular and extracellular polysaccharides from *A. blazei* mycelia on the production of nitric oxide in RAW 264.7 cells. RAW264.7 cells were cultivated for 24 hr in the presence of various concentrations of polysaccharide. a, intracellular polysaccharide; b, extracellular polysaccharide. LPS (5 μg/ml) was used as positive control. Each value is expressed as Mean±SD in triplicate experiments.

염증성 cytokines의 생성에 미치는 영향

대식세포는 활성화되면 염증성 cytokine인 IL-1β, IL-6, TNF-α 등을 분비한다. 이들은 모두 매우 다양한 기능들을 갖고 있으나, 특히 IL-1β는 T 림파구의 증식을 유도하는 한편 암세포의 증식은 억제하는 활성을 갖고 있으며, IL-6는 B 림파구의 항체생성 세포인 plasma cell 분화를 유도하는 활성이 있으며, TNF-α는 암세포의 살상 및 암 전이의 억제작용이 있다는 것이 밝혀졌다(7, 10, 16). 따라서 이들 물질의 생성을 촉진하는 물질은 면역반응을 조절하는 작용과 함께 항암 기능까지도 가질 수 있을 것으로 추정할 수 있다.

이들 cytokines 생성에 미치는 효과를 측정하여, Fig. 3, 4, 5와 같은 결과를 얻었다. Figure 3에 나타난 바와 같이 세포내 다당체의 경우는 4 μg/ml의 낮은 농도에서 거의 IL-1β의 생성이 유도되지 않았으나 20 μg/ml의 농도에서는 82.8 pg/ml의 IL-1β가 생성되었고, 이후 다당체의 농도 증가에 따라 IL-1β의 생성 증가를 나타내었다. 한편 세포외 다당체는 세포내 다당체에서 활성이 없었던 4 μg/ml의 낮은 농도에서도 105.5 pg/ml의 IL-1β를 생성하였고 이후의 최대 농도에서도 세포내 다당체에 비해 20% 정도 생성 증가를 나타내었다. 즉 세포내의 다당체 모두 IL-1β의 분비를 촉진시키는 활성이 있으나, 이때 세포내 다당체보다는 세포외 다당체가 다소 강한 활성을 갖고 있음을 알 수 있었다. 또 다른 cytokine인 IL-6 (Fig. 4), TNF-α (Fig. 5)의 경우에서도 IL-1β에서의 결과와 유사하게 처리한 다당체의 농도 증가에 따라 각각의 cytokines 생성량이 증가하였으며 이때 세포내 다당체보다는 세포외 다당체가 특히 저농도에서 다소 강한 활성을 갖고 있는 것으로 나타났다.

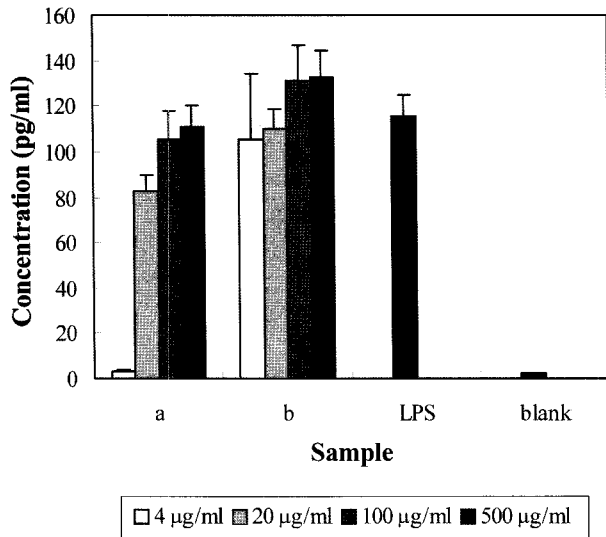


Fig. 3. Effect of intracellular and extracellular polysaccharides from *A. blazei* mycelia on the production of IL-1 β in RAW 264.7 cells. RAW264.7 cells were cultivated for 24 hr in the presence of various concentrations of polysaccharide. a, intracellular polysaccharide; b, extracellular polysaccharide. LPS (5 μ g/ml) was used as positive control. Each value is expressed as Mean \pm SD in triplicate experiments.

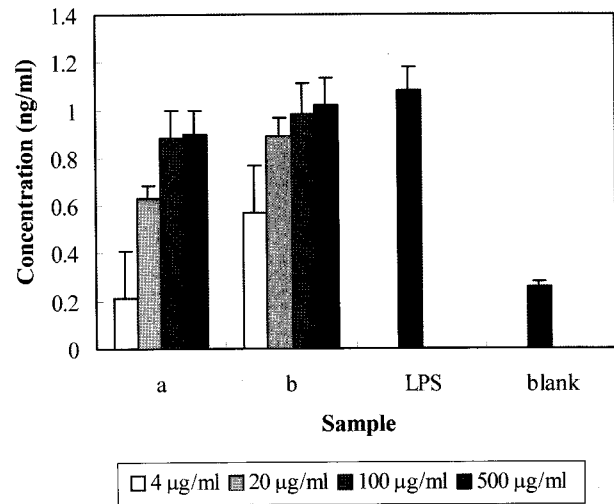


Fig. 5. Effect of intracellular and extracellular polysaccharides from mushroom *A. blazei* on the production of TNF- α in RAW 264.7 cells. RAW264.7 cells were cultivated for 24 hr in the presence of various concentrations of polysaccharide. a, intracellular polysaccharide; b, extracellular polysaccharide. LPS (5 μ g/ml) was used as positive control. Each value is expressed as Mean \pm SD in triplicate experiments.

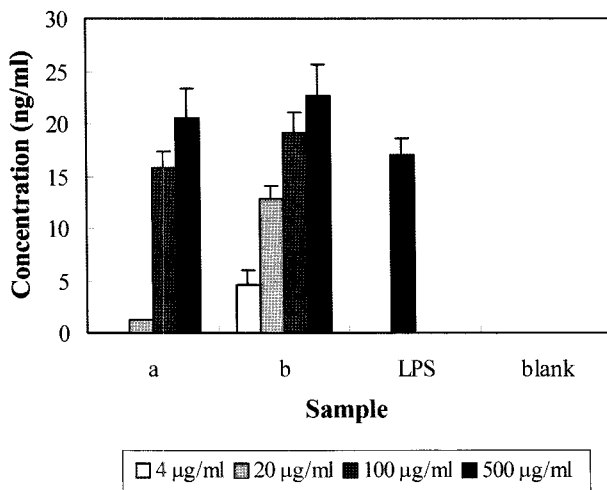


Fig. 4. Effect of intracellular and extracellular polysaccharides from *A. blazei* mycelia on the production of IL-6 in RAW 264.7 cells. RAW264.7 cells were cultivated for 24 hr in the presence of various concentrations of polysaccharide. a, intracellular polysaccharide; b, extracellular polysaccharide. LPS (5 μ g/ml) was used as positive control. Each value is expressed as Mean \pm SD in triplicate experiments.

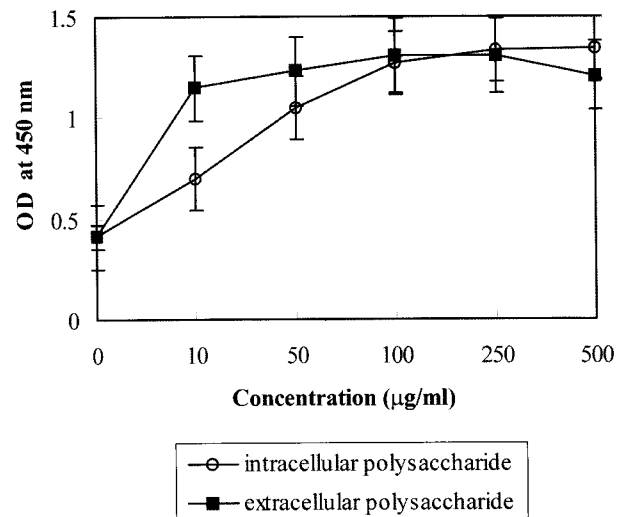


Fig. 6. Effect of intracellular and extracellular polysaccharides from mushroom *A. blazei* on the proliferation of splenocytes. The splenocytes from BALB/c mouse were cultivated for 24 hr in the presence of various concentrations of intracellular and extracellular polysaccharide. Each value is expressed as Mean \pm SD in triplicate experiments.

비장세포의 증식효과

비장은 중요한 제2차 면역기관으로서 이곳에는 수많은 적혈구 외에도 T 임파구, B 임파구, 대식세포, 수지상세포 등이 분포하고 있으며 항체의 생성은 물론 T 임파구의 활성이 일어나는 기관이다. 세포내의 다당체가 *in vitro* 상에서 이들 비장세포를 증

식시킴으로써 면역을 활성화시킬 수 있는지 알아보기 위하여 본 실험을 행하였다. Figure 6에 나타난 결과에서 보아 알 수 있듯이 세포내 다당체는 농도 의존적으로 비장세포를 증식시켰으며, 세포외 다당체도 250 μ g/ml의 농도까지는 세포를 증식시켰으나 이후의 농도에서는 큰 차이가 없었다. 이러한 비장세포의 증식은

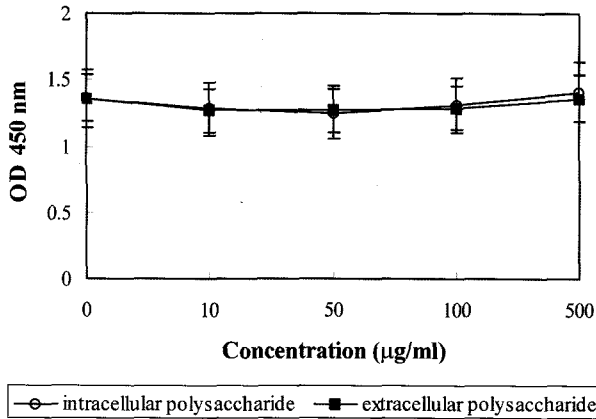


Fig. 7. Effect of intracellular and extracellular polysaccharides from *A. blazei* mycelia on B16F0 melanoma. The tumor cell B16F0 melanoma were cultivated for 24 hr in the presence of various concentrations of intracellular and extracellular polysaccharide. Each value is expressed as Mean±SD in triplicate experiments.

두 가지 측면에서 고려해볼 수 있는데, 첫째 다당체가 직접 비장 세포에 작용하여 세포내로 signal을 보내어 세포의 성장을 유도 하는 기전과, 둘째로 직접적으로 세포의 증식이 일어난 것보다는 대식세포 등의 활성화를 통해 분비된 cytokines에 의해 활성화된 임파구들이 반응을 보이는 것으로 추정될 수 있다. 본 연구에서 나타난 바와 같이 대식세포에 대한 다당체의 활성으로 보아 간접적인 활성화의 가능성이 더 높다고 할 수 있으나 향후 보다 정확하게 그 기작이 연구되어야 할 것이다.

암세포에 대한 시험관내에서의 세포독성효과

비장세포에 대해서 세포증식 효과를 나타내었던 세포내의 다당체가 암세포에 직접적으로 영향을 주는 세포독성 효과가 있는 지를 알아보기 위하여 암세포주(B16F0 melanoma)를 이용하여 측정하였다. Figure 7에 나타난 바와 같이 이들 시료를 처리한 최고농도인 500 µg/ml의 농도에서도 암세포에 대해서 세포독성이 나타나지 않았다. 따라서 이들 다당체가 생체내에서 항암작용을 나타낸다면 그것은 암세포에 대한 직접적인 작용에 의해서가 아니라 면역계를 활성화시킴으로써 항암작용을 나타낼 것으로 추정할 수 있으며, 직접적으로 세포 독성이 나타나지 않은 실험 결과는, 이들 다당체의 제조시 한외여과 및 가열 처리 등에 의해 저분자 또는 단백질 성분보다는 고분자 다당류 성분이 주로 회수되고 주성분으로 작용한 것으로 추정된다.

본 연구에서 액체배양에 의해 생성되어 분리된 신크린(A. blazei) 균사체내의 다당체는 *in vitro*에서 모두 면역활성을 증가시키는 것으로 나타났으나, 전반적으로는 세포내 다당체보다 세포외 다당체가 다소 우수한 활성을 갖는 것으로 나타났다. 이는 시료 제조시에 시료의 당 함량을 동일하게 조정하여 사용하였지만 β-glucan의 함량은 약 10% 정도 세포외 다당체가 많다고 볼 수 있어, 면역활성의 주성분이 β-glucan류일 경우는 세포내 다당체의 복합 당성분의 면역 활성이 세포외 다당체의 당 성분보다

약하게 나타나는 것으로 추정할 수 있다. 그러나 10%의 차이를 감안하더라도 전체적인 cytokine류의 생성 증가 차이는 보다 큰 것이어서, 세포내의 다당체의 구성 및 구조적인 차이에 의해서도 활성의 차이를 나타낼 수 있을 것으로 판단되었다. 향후 보다 효율적인 면역 다당체의 제조를 위해서는 세포내외 다당체의 구조에 대한 비교 분석과 함께 *in vivo* 실험에 의한 효과 규명이 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Bohn, J.A. and J.N. BeMiller. 1995. (13)-β-D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydr. Polymers* 28, 3-14.
2. Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-356.
3. Fitzpatrick, F.W. and J.F. DiCarlo. 1964. Zymosan, pp. 233-262. *In Annals of the New York Academy of Sciences* 118.
4. Gregory, F.J., E.M. Healy, H.P.K. Agerborg, Jr., and G.H. Warren. 1966. Studies on antitumor substances produced by Basidiomycetes. *Mycologia* 58, 80-90.
5. Kroncke, K.D., V. Kolb-Bachofen, B. Berschick, V. Burkart, and H. Kolb. 1991. Activated macrophages kill pancreatic syngeneic islet cells via arginine-dependent nitric oxide generation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175, 752-758.
6. Lorsbach, R.B., W.J. Murphy, C.J. Lowenstein, S.H. Snyder, and S.W. Russel. 1993. Expression of the nitric oxide synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell killing. *J. Biol. Chem.* 268, 1908-1913.
7. Lovett, D., B. Kozan, M. Hadam, M. Resch, and D. Gemsa. 1986. Macrophage cytotoxicity: Interleukin 1 as a mediator of tumor cytostasis. *J. Immunol.* 136, 340-347.
8. Lowenstein, C.J. and S.H. Snyder. 1992. Nitric oxide, novel biological messenger, *Cell* 70, 705-707.
9. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1954. Protein measurement with the Folin-phenol reagents. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
10. Mano-Hirano, Y., N. Sato, Y. Sawasaki, K. Haranaka, N. Satomi, H. Nariuchi, and T. Goto. 1987. Inhibition of tumor-induced migration of bovine capillary endothelial cells by mouse and rabbit tumor necrosis factor. *J. Natl. Cancer Inst.* 78, 115-120.
11. Marcinkiewicz, J. and B.M. Chain. 1993. Different regulation of cytokine production by nitric oxide. *Immunol.* 80, 146-150.
12. Megazyme International Ireland Ltd. 2002(10). Mushroom and yeast β-glucan: Assay procedure.
13. Ohno, N., Y. Emori, T. Yadomae, K. Saito, A. Masuda, and S. Oikawa. 1990. Reactivity of Limulus amoebocyte lysate towards (1 → 3)-beta-D-glucans. *Carbohydr. Res.* 25, 311-318.
14. Peng, Y., L. Zhang, F. Zeng, and Y. Xu. 2003. Structure and anti-tumor activity of extracellular polysaccharides from mycelium. *Carbohydr. Polymers* 54, 297-303.
15. Roland, J.F., Z.F. Chmielewicz, B.A. Weiner, A.M. Gross, O.P. Boening, J.V. Luck, T.J. Bardos, H. Christine Reilly, K. Sugiura, C. Chester Stock, E.H. Lucas, R.U. Byerrum, and J.A. Stevens. 1960. Calvacin, a new antitumor agent. *Science* 132, 1897.
16. Shalaby, M.R., M.A. Palladino, Jr., S.E. Hirabayashi, T.E. Ees-salu, G.D. Lewis, H.M. Shepard, and B.B. Aggarwal. 1987.

Receptor binding and activation of polymorphonuclear neutrophils by tumor necrosis factor- α . *J. Leukoc. Biol.* 41, 196-204.

of *Cordyceps militaris*. *J. Ethnopharm.* 555-561.

17. Won, S.Y. and E.H. Park. 2005. Anti-inflammatory and related pharmacological activities of cultured mycelia and fruiting bodies

(Received October 30, 2007/Accepted November 12, 2007)

ABSTRACT : Immune Enhancing Effects of Intracellular and Extracellular Polysaccharides Extracted from Mycelial Cultivate of *Agaricus blazei* Murill

Moo-Sung Kim¹ and Hong-Bum Cho^{2*} (¹R&D Center, Macrocare Tech., Ltd, Ochang 363-883, Korea, ²Department of Biotechnology, Seokyeong University, Seoul 136-704, Korea)

This study was performed to compare *in vitro* immune enhancing effects of polysaccharides extracted from cultivated mycelia of *Agaricus blazei* Murill. Carbohydrate contents of semi-purified polysaccharides were 85.6% and 95.3%, while β -glucan contents were 67.9% and 88.1% for intracellular and extracellular polysaccharide, respectively. Samples were adjusted to the same in their carbohydrate contents before efficacy tests. Both intracellular and extracellular polysaccharide increased nitric oxide (NO) synthesis of macrophage RAW 264.7 in dose dependent manner, and the maximum increase rate was 53.9 and 53.1% in intracellular and extracellular polysaccharide, respectively. The polysaccharides also increased synthesis of cytokines such as interleukin (IL)-1 β , IL-6 and tumor necrosis factor (TNF)- α in RAW 264.7. For all the 3 cytokines, the increase rate of synthesis was much higher in extracellular polysaccharide compared to intracellular polysaccharide, especially at low concentration. Both polysaccharides increased the proliferation of splenocytes *in vitro*, intracellular polysaccharide showed increase in dose dependent manner while extracellular polysaccharide showed increase until medium concentration (250 μ g/ml). They did not show direct cytotoxicity against cancer cells such as B16F0 melanoma. As results, it was regarded that the both intracellular and extracellular polysaccharide from *A. blazei* showed immune enhancing effects *in vitro*, but the activity is higher in extracellular polysaccharide compared to intracellular polysaccharide.