

꾸지뽕나무 배양 상황버섯 자실체 및 균사체의 면역증진 효과

홍다현 · 주인환 · 박종민 · 한수현 · 이수빈 ·곽성근¹ · 김동희*

대전대학교 한의과대학 병리학교실, 1: 홍익약초영농법인

Immune-Enhancing Effects of *Phellinus linteus* Fruit Body and Mycelium Cultured in *Cudrania tricuspidata*

Da Hyun Hong, In Hwan Joo, Jong Min Park, Su Hyun Han, Su Bin Lee, Seong Geun Gwak¹, Dong Hee Kim*

Department of Pathology, College of Korean Medicine, Daejeon University, 1: Hongik Herbal Farm Corporations

Polysaccharides produced in microorganisms and plants are known to increase the immune response in the body. We proposed analysis of beta-glucan contents of *phellinus linteus* fruit body (FB) and mycelium (MC) cultured in *cudrania tricuspidata*. Also, we examined whether fruit body and mycelium can increase the immune response in cyclophosphamide-induced immunosuppression animal models. We injected cyclophosphamide (50 mg/kg) twice to produce immunosuppression mice. Then, FB (200 mg/kg) and MC (200 mg/kg) were oral administered for 14 days. In order to confirm the immune-enhancing effect of FB and MC, we analyzed spleen weight, the number of immune cells, cytokines, and immunoglobulins levels. Cyclophosphamide decreased the weight of spleen, the number of immune cells. However, FB and MC have significantly increased the weight of spleen, the number of white blood cell, lymphocyte and monocyte. In addition, they have significantly increased immune-related cytokines (IL-2 and IFN- γ) and immunoglobulins (IgA, IgG, IgM) levels. As a results, *phellinus linteus* fruit body (FB) and mycelium (MC) cultured in *cudrania tricuspidata* can be used as effective natural materials for immune-enhancing.

keywords : *Cudrania tricuspidata*, *Phellinus linteus*, Mycelium, Immunomodulatory, Cyclophosphamide

서론

면역계는 뇌 및 내분비계와 연결된 네트워크를 바탕으로 작용하는 매우 정교한 방어 메커니즘이며, 외부로부터 유입된 항원 및 자극에 대해 반응하고 체내 비정상적인 세포 및 조직을 제거하여 체내 환경을 조절한다¹⁾. 이러한 면역시스템은 다양한 요인에 의해 영향을 받으며, 면역시스템의 발현이 증가되거나 감소되는 결과를 야기한다²⁾. 따라서 항원 및 자극에 대한 면역반응을 억제 또는 자극하여 질병을 완화시키기 위한 소재에 대한 연구는 지속적으로 진행되고 있다^{3,4)}.

최근 천연물로부터 유래된 다당체들이 합성의약품에 비해 낮은 부작용으로 면역체계를 증가시킬 수 있다는 사실이 확인되었으며, 다양한 다당체 중 베타글루칸(beta-glucan)은 박테리아, 효모, 곰팡이 및 식물에 의해 생성되는 천연 다당체로 가장 널리 알려져 있다^{5,6)}. 베타글루칸은 주로 대식세포와 수지상세포를 활성화시켜 면역반응을 증가시키며, 면역과 관련된 호중구, B 세포, T 세포 및 자연살해세포 역시 베타글루칸에 의해 활성화 되는 것으로 알려져

있다⁶⁾.

상황버섯(*Phellinus linteus*)은 진흙버섯 속의 균류를 말하며, 뽕나무에 자생하고 황색의 자실체를 갖고 있어 상황버섯이라 명명되었고 止血, 活血, 止瀉, 抗癌作用으로 子宮出血, 小便出血, 便血, 帶下, 月經閉塞, 癥瘕, 積聚, 脾虛泄瀉를 치료한다. Ikekawa T 등⁷⁾은 상황버섯의 소화기 계통 암 억제효능을 보고하였고 이를 시작으로 관련 연구들이 진행되어 상황버섯의 항암활성⁸⁻¹⁰⁾과 면역활성¹¹⁻¹⁴⁾ 등이 보고되었다. Lee BE 등¹¹⁾은 대식세포를 통한 상황버섯 균사체의 면역활성을 확인하였으며, Lim ES 등¹²⁾과 Pyo MY 등¹⁴⁾은 면역세포 및 비장세포 증식을 보고하였고 Kim H 등¹³⁾은 인간 혈액 내 cytokine 발현에 대해 보고하였다. 또한 상황버섯은 일반적으로 뽕나무에서 배양되며, Kim HJ 등¹⁵⁾과 Kim GH 등¹⁶⁾은 뽕나무와 꾸지뽕나무는 다른 약리활성을 나타낸다고 보고하였다. 하지만 꾸지뽕나무에서 인공 배양된 상황버섯의 면역증진 효능에 대한 연구결과는 보고된 바가 없었다.

이에 본 연구에서는 꾸지뽕나무(*Cudrania tricuspidata*)에서 인공 배양한 상황버섯의 자실체와 균사체의 베타글루칸 함량을 분

* Corresponding author

Dong-Hee Kim, Department of pathology, college of oriental Medicine, Daejeon University, Daejeon 300-716, Republic of Korea

E-mail : dhkim@dju.kr · Tel : +82-42-280-2623

·Received : 2019/09/10 ·Revised : 2019/10/15 ·Accepted : 2019/10/24

© The Society of Pathology in Korean Medicine, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 <http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2019.10.33.5.275>

Available online at <https://kmpath.jams.or.kr>

석하였다. 또한 면역억제제인 cyclophosphamide (CP)를 투여하여 면역력이 저하된 동물모델을 제작하고 상황버섯 자실체 및 균사체 추출물을 동물모델에 투여하여 비장무게, 면역세포, 면역글로불린, 사이토카인 등을 확인하여 면역증진에 대한 기전을 확인하고 이를 바탕으로 꾸지뽕나무에서 배양한 상황버섯 자실체 및 균사체를 활용한 건강기능식품 및 신소재 개발 가능성을 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시료제작

꾸지뽕나무 배양 상황버섯의 자실체 (fruit body 이하, FB) 및 균사체 (mycelium 이하, MC)는 충남 금산의 홍익약초영농법인에서 공급받아 사용하였다. FB와 MC 각각 30 g에 500 ml의 증류수를 넣어 100°C에서 3시간동안 추출하였다. 추출물을 여과지로 여과한 후, rotary vacuum evaporator (Buchi AG, Flawil, Switzerland)를 통해 감압농축하고 freeze dryer (ilShinbiobase, Dongducheon, Gyeonggi-do, Korea)를 사용하여 동결건조를 진행하여 각각 FB는 3.2 g, MC는 2.4 g의 분말을 얻었으며, -20°C에 보관하면서 사용하였다.

2. 베타글루칸 함량 분석

FB와 MC를 분쇄한 후, 0.1 mm filter에 통과시켜 준비하였으며, β -Glucan Assay Kit (Megazyme, Bray, Co. Wicklow, Ireland)와 micro plate reader (Molecular Devices, San José, California, U.S.A.)를 사용하여 베타글루칸 함량을 분석하였다.

3. 실험동물

실험에 사용한 5주령의 수컷 ICR mouse는 라온바이오 (Yongin, Gyeonggi-do, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 실험동물은 2주간의 안정기를 가지면서 순화를 시켰으며, 안정기 및 실험기간에 모든 실험동물에는 rodent diet (Envigo, Huntingdon, U.K.)를 자유식이 하며 물을 충분히 공급하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 22±2°C, 1일 중 12시간은 200-300 Lux로 조명하고, 12시간은 모든 빛을 차단하였다.

본 실험은 대전대학교 동물실험윤리 위원회의 승인 (승인번호 DJUAR2019-012)을 받아 동물윤리준칙에 의거하여 실험하였다.

4. 모델 제작 및 시료 투여

실험은 면역억제제를 유도하지 않은 정상군 (NC), 면역억제제를 유도하고 증류수를 투여하는 면역억제군 (CP), 면역억제 후, FB를 투여하는 실험군 (CP+FB)과 MC를 투여하는 실험군 (CP+MC)으로 분류하였으며, 각 그룹은 8수씩 무작위로 배정하였다. 1주일간의 동물적응기를 거친 후, 면역억제 동물모델 제작을 위해 면역억제제인 cyclophosphamide (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, U.S.A.)를 50 mg/kg으로 실험 시작일과 3일차에 복강 내 주사하였다. 면역억제유도가 종료된 후, 14일간 FB와 MC를 200 mg/kg으로 1일 1회, 오전 10시에 경구투여 하였다(Fig. 1).

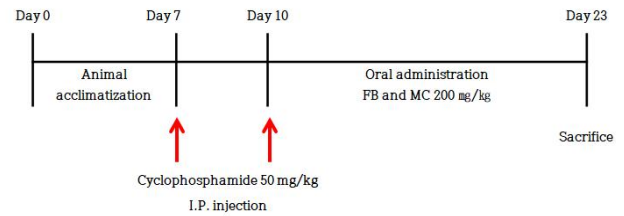


Fig. 1. The experimental scheme used in this study.

5. 실험동물 희생

Ethyl ether (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, U.S.A.)를 사용하여 마취하고 심장채혈을 통해 혈액을 EDTA tube (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, U.S.A.)와 microcentrifuge tube에 나누어 보관하였다.

6. 비장지수 분석

비장지수 분석을 위해 실험동물을 마취하기 전에 개별별 체중을 측정하였으며, 부검하여 비장조직은 적출하고 무게를 측정하였다. 그 후, 비장 무게를 실험동물의 체중으로 나누어 비장지수를 계산하였다.

6. 면역세포 분석

EDTA tube에 보관되어있는 혈액은 hematology system ADVIA 2120i (Siemens, Berlin, Germany)를 이용하여 백혈구 (white blood cell), 림프구 (lymphocyte), 단핵구 (monocyte) 수를 분석하였다.

7. 바이오마커 분석

Microcentrifuge tube에 보관되어있는 혈액을 상온에서 30분간 응고시킨 후, 3000 rpm으로 10분 동안 원심분리하여 혈청을 획득하였다. 분리한 혈청은 MILLIPLEX® Multiplex Assays kit (Millipore, Burlington, Massachusetts, U.S.A.)와 Luminex 200 System (Luminex, Austin Texas, U.S.A.)를 이용하여 면역글로불린A (immunoglobulin A; IgA), 면역글로불린G (IgG), 면역글로불린M (IgM), 인터류킨-2 (interleukin-2; IL-2), 인터페론감마 (Interferon gamma; IFN- γ) 수준을 분석하였다.

7. 통계 분석

실험 결과는 SPSS ver. 21.0을 이용하여 mean±standard error of mean으로 나타내었으며, ANOVA를 사용하여 다중 비교하였고 Tukey's HSD test를 통해 $p < 0.05$, $p < 0.01$ 및 $p < 0.001$ 수준에서 유의성을 사후 검정하였다.

결 과

1. 베타글루칸 함량

꾸지뽕나무에서 인공 배양한 상황버섯의 자실체 (FB)와 균사체 (MC)의 베타글루칸 함량을 분석한 결과, FB는 19.6±1.5 g/100 g, MC는 18.0±0.9 g/100 g으로 나타났다(Fig. 2).

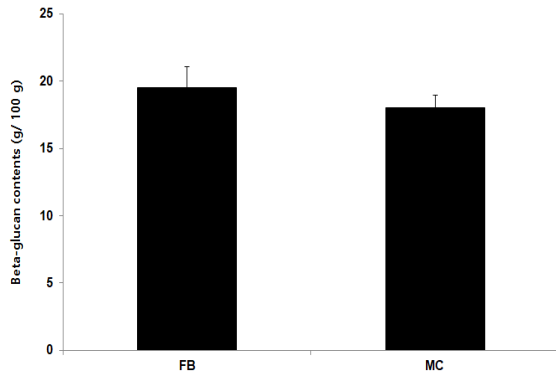


Fig. 2. Beta-glucan content of FB and MC. The data are shown as mean±standard error of mean.

2. 비장지수

비장지수를 확인한 결과, NC는 7.8±0.2 mg/g, CP는 5.2±0.4 mg/g으로 나타났으며, CP+FB는 7.5±0.3 mg/g, CP+MC는 6.7±0.2 mg/g으로 나타나, CP+FB와 CP+MC에서 CP에 비해 유의적인 증가가 나타났다(Fig. 3).

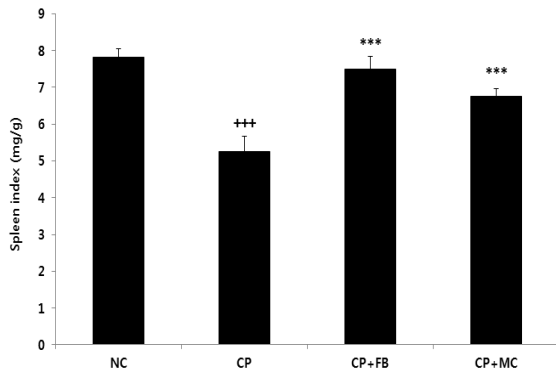


Fig. 3. Effect of FB and MC on spleen index in CP-induced immunosuppression mice. The data are shown as mean±standard error of mean(n=8/group). (+++p<0.001 compared to NC, and ***p<0.001 compared to CP). NC; non-immunosuppression mice, CP; immunosuppression mice, CP+FB; Phellinus linteus fruit body 200 mg/kg treated immunosuppression mice, CP+MC; Phellinus linteus mycelium 200 mg/kg treated immunosuppression mice.

3. 면역세포 수

백혈구 수를 확인한 결과, NC는 4.5±0.3×10³ cells/μL, CP는 2.9±0.3×10³ cells/μL으로 나타났으며, CP+FB는 3.8±0.2×10³ cells/μL, CP+MC는 4.3±0.2×10³ cells/μL으로 나타나, CP+FB와 CP+MC에서 CP에 비해 유의적인 증가가 나타났다(Fig. 4A).

그리고 림프구 수를 확인한 결과, NC는 71.2±4.0%, CP는 54.4±1.3%로 나타났으나, CP+FB는 69.0±1.7%, CP+MC는 69.7±2.7%로 나타나 CP+FB와 CP+MC에서 CP에 비해 유의적인 증가가 나타났다(Fig. 4B).

마지막으로 단핵구 수를 확인한 결과, NC는 3.7±0.4%, CP는 2.1±0.3%로 나타났으나, CP+FB는 2.8±0.1%, CP+MC는 2.5±0.3%로 나타나 CP+FB에서만 CP에 비해 유의적인 증가가 나타났다(Fig. 4C).

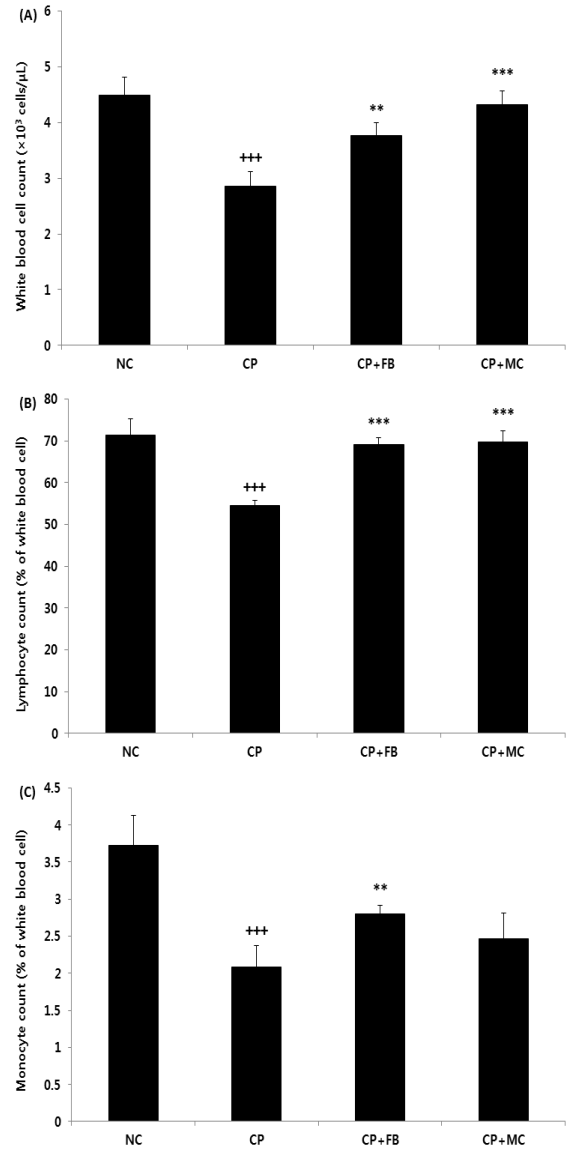


Fig. 4. Effect of FB and MC on immunocyte count in CP-induced immunosuppression mice. The data are shown as mean±standard error of mean(n=8/group). (+++p<0.001 compared to NC, and **p<0.01, ***p<0.001 compared to CP). NC; non-immunosuppression mice, CP; immunosuppression mice, CP+FB; Phellinus linteus fruit body 200 mg/kg treated immunosuppression mice, CP+MC; Phellinus linteus mycelium 200 mg/kg treated immunosuppression mice. (A); white blood cell, (B); lymphocyte, (C); monocyte.

4. 사이토카인 수준

인터류킨-2 수준을 확인한 결과, NC는 189.1±4.6 pg/mL, CP는 97.5±5.5 pg/mL으로 나타났으며, CP+FB는 128.9±6.9 pg/mL, CP+MC는 130.9±5.6 pg/mL으로 나타나, CP+FB와 CP+MC에서 CP에 비해 유의적인 증가가 나타났다(Fig. 5A).

그리고 인터페론감마 수준을 확인한 결과, NC는 266.9±22.7 pg/mL, CP는 145.9±10.6 pg/mL으로 나타났으며, CP+FB는 209.0±17.4 pg/mL, CP+MC는 183.4±13.9 pg/mL으로 나타나, CP+FB와 CP+MC에서 CP에 비해 유의적인 증가가 나타났다(Fig. 5B).

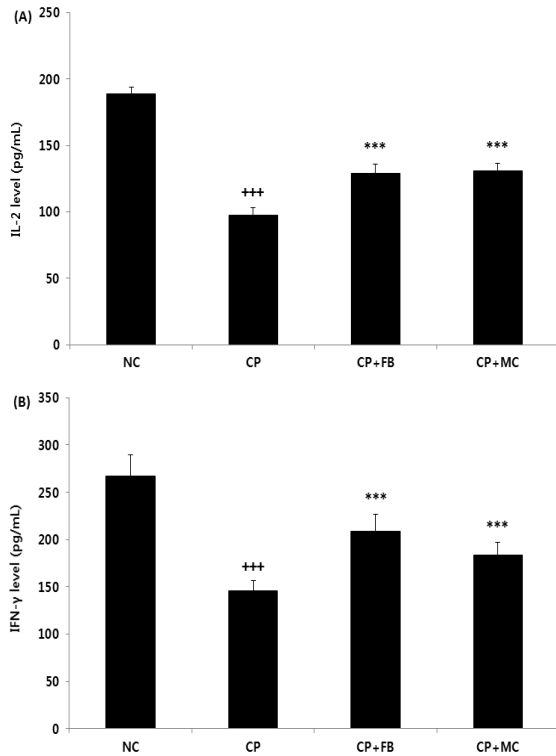


Fig. 5. Effect of FB and MC on cytokine level in CP-induced immunosuppression mice. The data are shown as mean±standard error of mean(n=8/group). (+++p<0.001 compared to NC, and ***p<0.001 compared to CP). NC; non-immunosuppression mice, CP; immunosuppression mice, CP+FB; Phellinus linteus fruit body 200 mg/kg treated immunosuppression mice, CP+MC; Phellinus linteus mycelium 200 mg/kg treated immunosuppression mice. (A); interleukin-2, (B); interferon gamma.

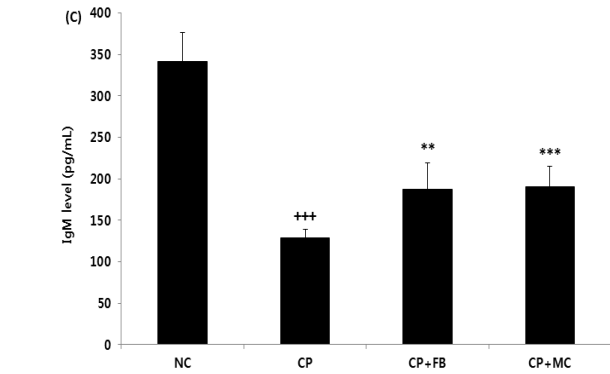
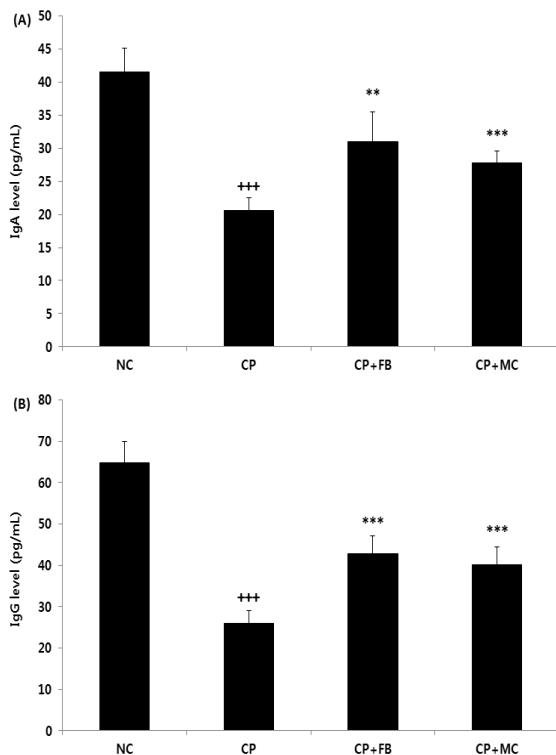


Fig. 6. Effect of FB and MC on immunoglobulin level in CP-induced immunosuppression mice. The data are shown as mean±standard error of mean(n=8/group). (+++p<0.001 compared to NC, and **p<0.01, ***p<0.001 compared to CP). NC; non-immunosuppression mice, CP; immunosuppression mice, CP+FB; Phellinus linteus fruit body 200 mg/kg treated immunosuppression mice, CP+MC; Phellinus linteus mycelium 200 mg/kg treated immunosuppression mice. (A); immunoglobulin A, (B); immunoglobulin G, (C); immunoglobulin M.

5. 면역글로불린 수준

면역글로불린A 수준을 확인한 결과, NC는 41.5 ± 3.6 pg/mL, CP는 20.6 ± 2.0 pg/mL로 나타났으며, CP+FB는 31.0 ± 4.5 pg/mL, CP+MC는 27.8 ± 1.8 pg/mL로 나타나, CP+FB와 CP+MC에서 CP에 비해 유의적인 증가가 나타났다(Fig. 6A).

그리고 면역글로불린G 수준을 확인한 결과, NC는 64.8 ± 5.0 pg/mL, CP는 26.0 ± 3.0 pg/mL로 나타났으며, CP+FB는 42.8 ± 4.3 pg/mL, CP+MC는 40.0 ± 4.5 pg/mL로 나타나, CP+FB와 CP+MC에서 CP에 비해 유의적인 증가가 나타났다(Fig. 6B).

마지막으로 면역글로불린M 수준을 확인한 결과, NC는 641.6 ± 35.0 pg/mL, CP는 128.4 ± 10.6 pg/mL로 나타났으며, CP+FB는 186.9 ± 31.7 pg/mL, CP+MC는 190.1 ± 24.5 pg/mL로 나타나, CP+FB와 CP+MC에서 CP에 비해 유의적인 증가가 나타났다(Fig. 6C).

고 찰

면역기능은 감염에 대한 방어체계를 구축하므로 건강을 유지하기 위해서는 필수적인 기능이며, 체내의 면역기능이 저하되면 다양한 감염에 대해 취약해지기 때문에 세계적으로 중요한 임상문제로 대두되고 있다^{17,18}. 이러한 문제를 해결하기 위해 면역기능을 증진시키고 부작용이 없는 천연물 소재를 발굴하고자 다양한 연구가 진행되고 있다^{18,19}. 이러한 천연물에서 유래된 생리활성물질들 중 베타글루칸은 미생물 및 바이러스 감염에 대해 방어하기 위해 체내 면역기능을 효과적으로 조절할 수 있음이 많은 연구를 통해 확인되었다²⁰.

Nitschke J등²¹의 결과에 따르면, 표고버섯의 자실체는 9.6 mg/g, 큰느타리버섯의 자실체는 13.5 mg/g의 베타글루칸을 함유하고 있었으며, Cho JH등²²의 결과에 따르면, 영지버섯은 19.2 mg/g, 상황버섯은 17.5 mg/g의 베타글루칸을 함유하는 것으로 나타났다. 이와 비교해볼 때, FB와 MC는 각각 19.6 ± 1.5 g/100 g,

18.0±0.9 g/100 g의 높은 베타글루칸 함량이 확인되었으며, FB와 MC가 체내 면역기능을 효과적으로 조절할 수 있음을 나타내고 있다(Fig. 1).

Cyclophosphamide (CP)는 DNA 알킬화제로써, 대사산물이 암세포를 사멸시키기 때문에 암 환자의 화학적 치료에 사용되는 약물이다^{23,24}. 하지만 투여량이 증가할수록 백혈구 및 림프구 감소를 통한 면역억제와 산화적 스트레스를 유도하여 암 환자의 정상적인 조직에서 심각한 부작용을 야기하며^{24,25}, 체내 가장 큰 이차 면역 기관으로 면역반응 항상성을 유지하는 데 중요한 역할을 하는 비장의 무게를 감소시킨다²⁶. 본 실험에서도 CP를 통한 면역억제군에서 비장의 무게가 감소하였으며, 면역억제 후, FB와 MC를 투여한 실험군에서는 면역억제군에 비해 비장의 무게가 각각 44.2%와 28.8% 증가하였다(Fig. 2).

또한 CP에 의한 부작용 중 하나인 면역세포 수의 감소를 확인한 결과, 면역억제군에서는 정상군에 비해 현저한 감소가 나타났으나, FB를 투여한 실험군에서 백혈구, 림프구, 단핵구 수가 면역억제군에 비해 유의적으로 증가하였으며, MC를 투여한 실험군에서는 백혈구와 림프구 수가 유의적으로 증가하였다(Fig. 3A-C). FB와 MC의 투여는 면역이 억제된 모델에서 비장의 무게와 면역세포 수를 증가시켰으며, 이는 FB와 MC 투여로 인해 면역기능이 개선되었음을 나타낸다.

림프구는 척추동물의 면역계에서 백혈구 아형으로, NK 세포 T 세포 및 B 세포가 포함되며, 이 중 T 세포는 helper T cell (Th 세포), memory t cell, natural killer T cell 등으로 분류된다^{27,28}. Th 세포는 세포 및 체액성 면역반응을 담당하는 세포군으로, Th 세포의 전구체는 항원자극에 의해 활성화되고 체내 환경에 따라 Th1과 Th2 세포로 분화된다^{28,29}. Th1 세포는 세포 매개 면역 반응의 주체인 IL-2 및 IFN- γ 를 분비하고 Th2 세포는 주로 체액성 면역반응에 의해 매개되는 IL-4, IL-6 및 IL-10을 분비한다. IL-2는 활성화된 T 세포에 의해 생성되고 T 세포의 성장, 증식 및 분화를 유도하며, IFN- γ 는 Th1 세포의 분화를 촉진하고, 주로 세포성 면역반응을 촉진한다. 또한 IL-2와 IFN- γ 는 B 세포를 자극하여 면역글로불린의 생성을 촉진하여 항체면역반응을 유도한다³⁰⁻³². CP를 통해 면역이 억제된 모델에서 IL-2와 IFN- γ 의 생성량이 감소가 다양한 연구에서 나타났으며^{28,31,33}, 이러한 결과들과 동일하게 본 실험의 면역억제군에서 IL-2와 IFN- γ 의 생성량이 감소하였으며, FB와 MC를 투여한 실험군에서 면역억제군에 비해 유의적인 증가가 나타났다(Fig. 5A, B). 또한, 항체면역반응을 유도하는 면역글로불린A, G, M의 생성량도 CP에 의해 감소되었으며, FB와 MC를 투여한 실험군에서 면역억제군에 비해 유의적인 증가가 나타났다(Fig. 6A-C).

이상의 결과들을 종합해볼 때, 꾸지뽕나무에서 인공 배양한 상황버섯의 자실체와 균사체의 투여는 cyclophosphamide로 인해 억제된 면역기능을 활성화시켰으며, 정상군에 비해 감소된 비장의 무게, 면역세포 수, 면역관련 사이토카인 및 면역글로불린의 함량을 복구하여 면역증진을 위한 소재로서의 가능성이 확인되었으며, 추후 다양한 나무에서 배양된 버섯의 효능에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론

본 연구는 cyclophosphamide를 처리하여 면역억제를 유도하고 2주간 꾸지뽕나무에서 인공 배양한 상황버섯의 자실체와 균사체를 병용 투여했을 때, 감소된 비장조직의 무게를 증가시켰고 세포성 면역반응을 담당하는 면역세포 수와 사이토카인 생성량을 유의적으로 증가시켰으며, 증가된 사이토카인들에 의해 체액성 면역반응을 담당하는 면역글로불린도 유의적으로 증가시켰다. 이러한 결과들을 통해 상황버섯의 자실체와 균사체가 면역이 억제된 동물모델에서 세포 및 체액성 면역반응을 조절시키는 것으로 검증되었다. 이 후, 인체적용시험 및 품질개선에 대한 연구가 진행된다면 면역증진에 효과적인 천연물 소재로서 활용이 가능할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2018년도 대전대학교 교내학술연구비 지원에 의한 것입니다.

References

- Geha RS, Notarangelo LD, Casanova J-L, Chapel H, Conley ME, Fischer A, et al. Primary immunodeficiency diseases: an update from the international union of immunological societies primary immunodeficiency diseases classification committee. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120:776-94.
- Sierra S, Lara-Villoslada F, Olivares M, Jiménez J, Boza J, Xaus J. Increased immune response in mice consuming rice bran oil. *European journal of nutrition*. 2005;44(8):509-16.
- Ghatak SB, Panchal SJ. Investigation of the immunomodulatory potential of oryzanol isolated from crude rice bran oil in experimental animal models. *Phytotherapy research*. 2012;26(11):1701-8.
- Kim JW, Choi JS, Seol DJ, Choung JJ, Ku SK. Immunomodulatory effects of kuseonwangdogo-based mixed herbal formula extracts on a cyclophosphamide-induced immunosuppression mouse model. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2018:2018.
- Jiang MH, Zhu L, Jiang JG. Immunoregulatory actions of polysaccharides from Chinese herbal medicine. *Expert Opin Ther Tar*. 2010;14:1367-1402.
- Kim HS, Hong JT, Kim Y, Han SB. Stimulatory effect of β -glucans on immune cells. *Immune network*. 2011 Aug 1;11(4):191-5.
- Ikekawa T, Nakanishi M, Uehara N, Chihara G, Fukuoka F. Antitumor action of some Basidiomycetes, especially

- cultured *Phellinus linteus*. *Gann* 1968;59:155-7.
8. Lu TL, Huang GJ, Lu TJ, Wu JB, Wu CH, Yang TC, Iizuka A, Chen YF. Hispolon from *Phellinus linteus* has antiproliferative effects via MDM2-recruited ERK1/2 activity in breast and bladder cancer cells. *Food and chemical toxicology*. 2009;47(8):2013-21.
 9. Sliva D, Jedinak A, Kawasaki J, Harvey K, Slivova V. *Phellinus linteus* suppresses growth, angiogenesis and invasive behaviour of breast cancer cells through the inhibition of AKT signalling. *British journal of cancer*. 2008;98(8):1348.
 10. Zhu T, Kim SH, Chen CY. A medicinal mushroom: *Phellinus linteus*. *Current medicinal chemistry*. 2008;15(13):1330-5.
 11. Lee BE, Ryu SY, Kim EH, Kim YH, Kwak KA, Song HY. Immunostimulating effect of mycelium extract of *Phellinus linteus*. *Korean Journal of Pharmacognosy*. 2012;43(2):157-67.
 12. Lim ES, Choi BR, Yoo HS, Lee YY, Seo SH, Cho JH, Lee YW, Son CK, Cho CK, Lee YG, Song KC. A Study on the Immune activity of *Phellinus linteus* Extracts. *The Journal of Korean Oriental Oncology*. 2002;8(1):93-101.
 13. Kim H, Kim YD, Eom SY, Zhang YW, Kim NS, Hahn YS, Shin KS, Song HG, Park SY, Kim JS, Kang JW. Effects of *Keumsa Sangwhang* (*Phellinus linteus*) Mushroom Extracts on the IL-12, IFN- γ and TNF- α expression in Human. *Korean J Health Promot Dis Prev*. 2006;6(4):245-9.
 14. Pyo MY, Hyun SM, Yang KS. Effects of *Phellinus linteus* extracts on the humoral immune response in normal and cyclophosphamide-treated mice. *J Appl Pharmacol*. 2001;9:194-200.
 15. Kim GH, Kim E. Antioxidative Activities and Inhibitory Effects on Lipid Accumulation of Extracts from Different Parts of *Morus alba* and *Cudrania tricuspidata*. *The Korean Journal of Food And Nutrition*. 2019;32(2):138-47.
 16. Kim GH, Kim E. Antioxidative Activities and Inhibitory Effects on Lipid Accumulation of Extracts from Different Parts of *Morus alba* and *Cudrania tricuspidata*. *The Korean Journal of Food And Nutrition*. 2019;32(2):138-47.
 17. Heroor S, Beknal AK, Mahurkar N. Immunomodulatory activity of methanolic extracts of fruits and bark of *Ficus glomerata* Roxb. in mice and on human neutrophils. *Indian journal of pharmacology*. 2013;45(2):130.
 18. Jeong DY, Yang HJ, Jeong SJ, Kim MG, Yun CY, Lee HY, Lee YH, Shin DY, Lee HS, Park YM. Immunostimulatory Effects of Blueberry Yeast Fermented Powder Against Cyclophosphamide-induced Immunosuppressed Model. *Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine*. 2019;33(1):48-55.
 19. Promphet P, Bunarsa S, Sutheerawattananonda M, Kunthalert D. Immune enhancement activities of silk lutein extract from *Bombyx mori* cocoons. *Biological research*. 2014;47(1):15.
 20. Brown GD, Gordon S. Fungal β -glucans and mammalian immunity. *Immunity*. 2003;19(3):311-5.
 21. Nitschke J, Modick H, Busch E, Von Rekowski RW, Altenbach HJ, Mülleken H. A new colorimetric method to quantify β -1, 3-1, 6-glucans in comparison with total β -1, 3-glucans in edible mushrooms. *Food chemistry*. 2011 Jul 15;127(2):791-6.
 22. Cho JH, Lee JY, Lee MJ, Oh HN, Kang DH, Jhune CS. Comparative analysis of useful β -glucan and polyphenol in the fruiting bodies of *Ganoderma* spp. *Journal of Mushroom*. 2013;11(3):164-70.
 23. Huitema AD, Smits KD, Mathôt RA, Schellens JH, Rodenhuis S, Beijnen JH. The clinical pharmacology of alkylating agents in high-dose chemotherapy. *Anti-Cancer Drugs*. 2000;11(7):515-33.
 24. Cui H, Li T, Wang L, Su Y, Xian CJ. *Dioscorea bulbifera* polysaccharide and cyclophosphamide combination enhances anti-cervical cancer effect and attenuates immunosuppression and oxidative stress in mice. *Scientific reports*. 2016;6:19185.
 25. Gladstone DE, Prestrud AA, Pradhan A, Styler MJ, Topolsky DL, Crilley PA, Hoch S, Huppert A, Brodsky I. High-dose cyclophosphamide for severe systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2002;11(7):405-10.
 26. Cesta MF. Normal structure, function, and histology of the spleen. *Toxicologic pathology*. 2006;34(5):455-65.
 27. Murphy K, Weaver C. *Janeway's immunobiology*. Garland Science; 2016 Mar 1.
 28. Huang JQ, Pang MR, Li GY, Wang N, Jin L, Zhang Y. Alleviation of cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice by naturally acetylated hemicellulose from bamboo shavings. *Food and Agricultural Immunology*. 2017;28(2):328-42.
 29. Vignali DA, Kuchroo VK. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nature immunology*. 2012;13(8):722.
 30. Decker T, Müller M, Stockinger S. The yin and yang of type I interferon activity in bacterial infection. *Nature*

- Reviews Immunology. 2005;5(9):675.
31. Yu Q, Nie SP, Wang JQ, Liu XZ, Yin PF, Huang DF, Li WJ, Gong DM, Xie MY. Chemoprotective effects of *Ganoderma atrum* polysaccharide in cyclophosphamide-induced mice. *International journal of biological macromolecules*. 2014;64:395-401.
32. Kwon HG, Hwang JS, So JS, Lim SH. Immunological homeostasis and inflammatory immune disorders. *Korean Soc Mol Cell Biol*. 2008;20(1):48-69.
33. Wang H, Wang M, Chen J, Tang Y, Dou J, Yu J, Xi T, Zhou C. A polysaccharide from *Strongylocentrotus nudus* eggs protects against myelosuppression and immunosuppression in cyclophosphamide-treated mice. *International immunopharmacology*. 2011;11(11):1946-53.