



## 기와총버섯 추출물의 항비만활성, 항암활성 및 단회경구독성시험

강은희<sup>1</sup> · 이인경<sup>2</sup> · 황미현<sup>1</sup> · 최재영<sup>1</sup> · 창즐치양<sup>1</sup> · 이만휘<sup>1</sup> · 윤봉식<sup>2</sup> · 강성철<sup>3</sup> · 김길수<sup>1</sup> · 박승춘<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>경북대학교 수의과대학, <sup>2</sup>생명공학연구원, <sup>3</sup>협화외과대학

## Anti-Obesity Activity, Anti-Cancer Activity and Single Oral Dose Toxicity of *Inonotus xeranticus* Extracts

Eun-Hee Kang<sup>1</sup>, In-Kyoung Lee<sup>2</sup>, Mi-Hyun Hwang<sup>1</sup>, Jae-Young Choi<sup>1</sup>, Zhi-Qiang Chang<sup>1</sup>, Man-Hee Rhee<sup>1</sup>,  
Bong-Sik Yun<sup>2</sup>, Cheng-Zhe Jiang<sup>3</sup>, Kil-Soo Kim<sup>1</sup>, Man-Hee Rhee<sup>1</sup> and Seung-Chun Park<sup>1</sup>

<sup>1</sup>College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701

<sup>2</sup>Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon 305-806, Korea

<sup>3</sup>Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100021, China

Received July 2, 2007; Accepted August 28, 2007

In this study, we investigated the *in vitro* anti-obesity, anti-cancer activity and single oral dose toxicity of *Inonotus xeranticus* extracted by methanol (INXM) or ethyl acetate (INXE). In order to investigate anti-obesity effect of *Inonotus xeranticus* extracts, the 3T3-L1 cells were treated with these extracts at various concentrations (1, 10, 100 and 300 µg/ml). It was observed that 3T3-L1 cells treated with 100 µg/ml of *Inonotus obliquus* ethyl acetate extract (INOE), INXM and INXE, in the absence of differentiation cocktail (0.5 mM isobutylmethylxanthine (IBMX) 1 µM dexamethasone, 1 µg/ml insulin), differentiated at a rate of 78.5, 80.9, and 76.4% respectively. Differentiation rates of 86.6% and 83.4% were observed in 3T3-L1 cells which were treated with differentiation cocktail at 100 µg/ml of INXM and INXE, respectively. The anti-cancer effect of *Inonotus xeranticus* extracts was investigated using a method of sulforhodamine B in sarcoma 180 cell line. The cells were treated with these extracts (1, 10, 100 and 300 µg/ml) for 48 hours. The growth of cells which were treated with 300 µg/ml of INXM was inhibited by 80.1%. The growth of sarcoma 180 cells which were treated with 100 and 300 µg/ml of INXE was inhibited by 74.7% and 64.5%, respectively. In single oral dose toxicity study, no differences were observed between control and treated groups in clinical signs, body weight gains, and feed and water consumptions. The results indicated that *Inonotus xeranticus* extracts did not show any toxic effects at 2,000 mg/kg in mice, and the LD<sub>50</sub> of these extracts was found to be higher than 2,000 mg/kg in this experiment. From the above results, *Inonotus xeranticus* methanol and ethyl acetate extracts might have useful clinical applications in the management of cancer and obesity and may also be useful as a medicinal food.

**Key words:** *Inonotus xeranticus*, Single-dose toxicity, 3T3-L1, Anti-cancer, Anti-obesity.

### 서 론

약용버섯자원에서 생리활성을 갖는 고부가가치 물질을 개발하는 일은 국가적으로 경쟁력을 갖는 분야임에는 틀

림없는 사실이다. 생리활성물질이란 생체의 기능을 증진 시키거나 혹은 억제시키는 물질을 말한다. 즉, 생체 내에서 기능 조절에 관여하는 내인성 물질의 결핍 혹은 과도한 분비로 인해 비정상적인 병태 생리를 보일 때 체내 항상성을 유지 시킬 수 있는 물질이다. 이러한 생리활성물질의 원천은 동식물과 같은 천연물, 미생물 및 동식물 세포주의 대사산물, 혹은 화학 합성에 의해서도 얻을 수 있다. 이러한 자원 중에서도 안전성이 확보된 식물자원 혹

Correspondence to: Seung-Chun Park, College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea  
E-mail: parksch@knu.ac.kr

은 약용버섯으로부터 신기능성 생리활성물질 탐색에 관한 연구는 세계적으로 바이오 분야의 한 추세이다.

식물자원에서 생리활성물질에 관한 탐색 연구는 선진국을 중심으로 세계 각국에서 활발하게 이루어지고 있고 국내에서도 자생하는 채소나 약용식물 등에서 생리활성물질에 관한 많은 연구가 진행되고 있으며 오래 전부터 질병의 치료와 예방에 효능이 있다고 알려진 약용버섯류에서 추출된 생리활성물질 중 효능이 검증된 것은 의약품 및 건강보조식품으로 판매되고 있다(Kim and Nam, 2004; Park *et al.*, 2004; Ko *et al.*, 2004; Kang and Kwon, 2003; Kwoen *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2006; Byun, 2005; Koh and Lee, 2005).

국내에서 많이 사용되고 연구가 많이 된 차가버섯 (*Inonotus obliquus*)과 같은 종에 속하는 기와층버섯 (*Inonotus xeranticus*)에 대한 연구는 아직 많이 이루어지지 않았으며, 차가버섯과 마찬가지로 기능성식품의 응용 가능성이 높다고 할 수 있는 종으로 생각된다. 지금까지 기와층버섯(*Inonotus xeranticus*)에 대한 생리활성연구는 주로 활성산소제거효과(Lee *et al.*, 2006)와 항산화작용이 있는 것으로 알려져 있지만 다른 생리활성에 대한 보고는 많이 되어 있지 않다.

따라서 본 연구에서는 기와층버섯의 에틸아세테이트추출물(INXE)과 메탄올추출물(INXM)을 이용하여 새로운 생리활성인 세포분화능과 항암 활성여부를 구명하고자 하였으며 이와 더불어 추출물에 대한 안전성을 보기 위한 단회 급성독성시험도 함께 수행하였다. 대조물질로는 항산화활성 및 유전독성억제효과(Ham *et al.*, 2003), 항돌연변이효과(Ham *et al.*, 2003a), 항산화효과(Song *et al.*, 2004), 그리고 항암효과(Hwang *et al.*, 2003; Nakata *et al.*, 2007)가 알려져 있는 차가버섯(*Inonotus obliquus*)의 에틸아세테이트추출물(INOE)을 사용하였다.

## 재료 및 방법

**재료 및 시료의 조제.** 기와층버섯의 추출물인 INXM과 INXE는 한국생명공학연구원에서 제공받아 시험에 사용하였으며 대조물질로는 생리활성이 잘 알려진 차가버섯의 에틸아세테이트추출물(ethyl acetate extract of *Inonotus obliquus*, INOE)을 사용하였다. 즉 기와층버섯을 음건 세절한 후 메탄올에 2일 침지하여 메탄올 추출물을 제조하였다. 메탄올 추출물을 감압건조하고 여기에 증류수와 헥산(hexane)을 부가하여 추출한 후, 지방산 및 지용성물질을 포함한 헥산층을 제거하였다. 헥산층을 제거하고 남은 여액에 에틸아세테이트를 가하여 2회 추출하여 에틸아세테이트추출물을 제조하였다. 또한 대조물질로 사용한 차

가버섯의 에틸아세테이트추출물도 상기와 동일한 과정에 의하여 제조하였다. 각각의 추출물은 최종적으로 수분의 제거를 위하여 동결건조하였으며, 세포분화능과 항암활성을 구명하기 위해서 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 용해시켜 실험에 사용하였다. 급성경구독성실험을 위해서는 각각의 추출물을 부형제(0.5% Carboxymethylcellulose : Ethyl alcohol : Tween 80(8 : 1 : 1))에 균질하게 현탁시킨 것을 실험동물에 경구투여하였다.

**세포분화능시험.** 시험에 사용한 전지방세포는 마우스 유래의 섬유아세포인 3T3-L1 세포주(KCLB No. 10092.1)를 사용하였다. 3T3-L1 세포를 24 well plate에  $5 \times 10^3$  cells/ml로 분주하여 10% 우혈청을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에 배양하였다. 세포가 confluent되고나서 2일 후(day 0)에 10% fetal bovine serum(FBS)을 첨가한 DMEM 배지에 세포분화유도물질인 0.5 mM isobutylmethylxanthine(IBMx), 1  $\mu$ M dexamethasone, 1  $\mu$ g/ml insulin을 첨가하여 2일 동안 배양하였다. 그 후 10% FBS와 1  $\mu$ g/ml insulin을 첨가한 DMEM 배지에 2일 더 배양한 후 8일째까지 10% FBS/DMEM으로 배양하였다. 버섯 추출물인 INOE, INXE 그리고 INXM을 1, 10, 100 그리고 300  $\mu$ g/ml 농도로 조절한 후 분화 전 과정동안 배지에 첨가하였다. 첨가 후 배양 8일째에 세포를 phosphate-buffered saline(PBS)로 두 번 세척하고, 실온에서 2시간 동안 0.6% Oil Red O solution으로 염색하였다. 그런 다음 증류수로 세척한 후 이소프로판올로 용출시켜 540 nm에서 optical density (OD)를 측정하였다. 3T3-L1에 대한 시험물질의 효능을 평가하기 위한 분화율의 측정은 시험물질을 처리한 well의 흡광도를 시험물질을 처리하지 않은 음성대조군 well의 흡광도로 나누어 %로 나타내었다.

**항암활성시험.** 차가버섯과 기와층버섯 추출물의 항암 활성효능을 알아보기 위하여 Sarcoma 180 세포주(KCLB No. 40066)를 사용하였다. 세포의 배양 및 유지를 위한 배지는 RPMI 1640을 이용하였으며, fetal bovine serum (FBS) 10%를 첨가하고, penicillin과 streptomycin을 100 units/ml와 100  $\mu$ g/ml의 농도가 되게 배양액에 첨가하였다. 항암활성은 sulforhodamine B(Kim *et al.*, 1996) 방법으로 측정하였다. 즉, 종양세포수가 각 well당 1 만개가 되도록 96-well plate에 접종한 후 24시간 동안 배양하고 INOE과 INXE 및 INXM을 1, 10, 100 그리고 300  $\mu$ g/ml 농도로 첨가하여 48시간 동안 추가 배양하였다. 배양이 종료된 후 50% trichloroacetic acid(TCA)를 추가하여 4에서 2시간 동안 고정을 실시하였고, 증류수에 5회 수세

하여 고정액을 제거하였다. 0.4% sulforhodamine B를 이용하여 30분 동안 실온에서 염색을 실시한 후 1% 초산으로 5회 세척하고 Tris base(10 mM, pH 10.5)로 생존한 종양세포에만 염색된 염색액을 녹여서 microplate reader(VERSAmax™, Molecular Devices, USA)를 이용하여 540 nm에서 그 흡광도를 측정하였다. Sarcoma 180에 대한 시험물질의 효과를 평가하기 위하여 세포수의 측정은 시험물질을 처리한 well의 흡광도를 시험물질을 처리하지 않은 음성대조군 well의 흡광도로 나누어 %로 나타내었다.

#### 단회경구독성시험.

**실험동물 및 사육환경:** 차가버섯과 기와층버섯 추출물에 대한 단회경구독성시험은 안전성시험 및 기능성식품의 연구개발에 진행에 중요한 자료이므로 연구초기에 실시하였다. 실험동물은 ICR계 마우스(효창사이언스, 대구)이며 온도  $23 \pm 1$ , 습도  $55 \pm 5\%$ , 배기 10~18회/hr, 형광등 명암 12 hr cycle, 조도 300~500 Lux의 사육환경에서 사육하였다. 사료는 슈퍼피드(주)의 실험동물용 사료를 구입하여 실험동물에 자유로이 공급하였으며, 음수는 자유롭게 섭취시켰다.

**투여용량의 설정:** 식용으로 사용되는 시험물질(INOE, INXM 그리고 INXE)의 저독성을 고려하여 단회경구투여 한계용량인 2,000 mg/kg(Yamanaka *et al.*, 1990; OECD 2000)의 용량을 사용하였다. 시험군은 대조군과 투여군으로 암컷과 수컷 각 5마리로 정하였으며 시험물질을 투여하기 직전 실험동물의 체중 범위는 수컷  $34 \pm 0.35$  g, 암컷  $29 \pm 1.2$  g으로 연령은 5주령이었다.

**시험물질의 조제 및 투여:** INOE, INXM 그리고 INXE을 부형제(0.5% Carboxymethylcellulose : Ethyl alcohol : Tween 80(8 : 1 : 1))에 균질하게 현탁시켜, 12시간 절식 후 2,000 mg/kg로 실험동물에 1회 경구투여하였다. 대조

군에는 0.5% Carboxymethylcellulose : Ethyl alcohol : Tween 80(8 : 1 : 1)를 투여하였다.

**관찰 및 검사항목:** 임상증상 관찰은 모든 실험동물에 대하여 투여당일은 투여 후 6시간 동안 매 시간마다 관찰하였으며, 투여 다음날부터 14일까지는 1일 1회씩 동물의 일반상태의 변화, 중독증상의 발현 및 사망유무를 관찰하였다. 또한 시험에 사용된 모든 실험동물에 대하여 시험물질 투여일, 투여 후 4일, 7일, 14일째에 체중을 측정하였다. 시험 종료 후 실험동물을 에테르 마취하여 복대동맥 절단방법으로 치사 시킨 다음 외관 및 내부 장기의 이상 유무를 육안적으로 관찰하였다.

**통계학적 분석:** 시험결과는 평균값과 표준편차로 표기하였으며, 통계학적 분석은 통계처리 computer program인 SPSS를 이용하였으며, 대조군과 시험군간의 체중변화, 사료와 음수 섭취량에 대해서 일원배치분산분석(one-way analysis of variance, ANOVA)을 실시하였으며 통계학적 유의성이 관찰되는 항목은 post-hoc test로 Duncan's multiple comparison test를 실시하였다. 이때 통계학적 유의 수준을  $P < 0.05$ 로 설정하였다. 비모수인 경우 분산에 대하여 Kruskal-Wallis nonparametric analysis를 실시하였다.

**Table 2.** Differentiation level of 3T3-L1 cell treated with INOE, INXM, INXE except for 0.5 mM isobutylmethylxanthine (IBMX), 1  $\mu$ M dexamethasone, 1  $\mu$ g/ml insulin (% of control<sup>a</sup>)

	1 $\mu$ g/ml	10 $\mu$ g/ml	100 $\mu$ g/ml	300 $\mu$ g/ml
INOE <sup>b</sup>	94.5 $\pm$ 5.8	91.1 $\pm$ 19.0	78.5 $\pm$ 30.8	108.9 $\pm$ 32.2
INXM <sup>c</sup>	94.6 $\pm$ 16.6	82.4 $\pm$ 5.4	80.9 $\pm$ 17.3	85.4 $\pm$ 16.6
INXE <sup>d</sup>	98.7 $\pm$ 15.9	84.6 $\pm$ 12.4	76.4 $\pm$ 14.6	95.8 $\pm$ 20.8

Values are presented as means  $\pm$  SD (n = 3).

<sup>a</sup>Control, 1% DMSO.

<sup>b</sup>INOE, ethyl acetate extract of *Inonotus obliquus*.

<sup>c</sup>INXM, methanol extract of *Inonotus xeranticus*.

<sup>d</sup>INXE, ethyl acetate extract of *Inonotus xeranticus*.

**Table 1.** Experimental design used in this study

Sex	Groups	No. of animals	Dose (mg/kg)
Male	Control <sup>a</sup>	5	0
	INOE <sup>b</sup>	5	2,000
	INXM <sup>c</sup>	5	2,000
	INXE <sup>d</sup>	5	2,000
Female	Control	5	0
	INOE	5	2,000
	INXM	5	2,000
	INXE	5	2,000

<sup>a</sup>Control, 0.5% Carboxymethylcellulose : Ethyl alcohol : Tween 80 (8 : 1 : 1).

<sup>b</sup>INOE, ethyl acetate extract of *Inonotus obliquus*.

<sup>c</sup>INXM, methanol extract of *Inonotus xeranticus*.

<sup>d</sup>INXE, ethyl acetate extract of *Inonotus xeranticus*.

**Table 3.** Differentiation level of 3T3-L1 cell treated with INOE, INXM, INXE in the presence of 0.5 mM isobutylmethylxanthine (IBMX), 1  $\mu$ M dexamethasone, 1  $\mu$ g/ml insulin (% of control<sup>a</sup>)

	1 $\mu$ g/ml	10 $\mu$ g/ml	100 $\mu$ g/ml	300 $\mu$ g/ml
INOE <sup>b</sup>	88.8 $\pm$ 11.0	85.0 $\pm$ 11.0	72.0 $\pm$ 29.9	98.1 $\pm$ 18.5
INXM <sup>c</sup>	87.9 $\pm$ 5.0	81.0 $\pm$ 7.1	86.6 $\pm$ 9.7*	95.2 $\pm$ 10.2
INXE <sup>d</sup>	100.6 $\pm$ 10.1	90.2 $\pm$ 6.4	83.4 $\pm$ 12.0*	101.3 $\pm$ 9.8

Values are presented as means  $\pm$  SD (n = 3).

<sup>a</sup>Control, 1% DMSO.

<sup>b</sup>INOE, ethyl acetate extract of *Inonotus obliquus*.

<sup>c</sup>INXM, methanol extract of *Inonotus xeranticus*.

<sup>d</sup>INXE, ethyl acetate extract of *Inonotus xeranticus*.

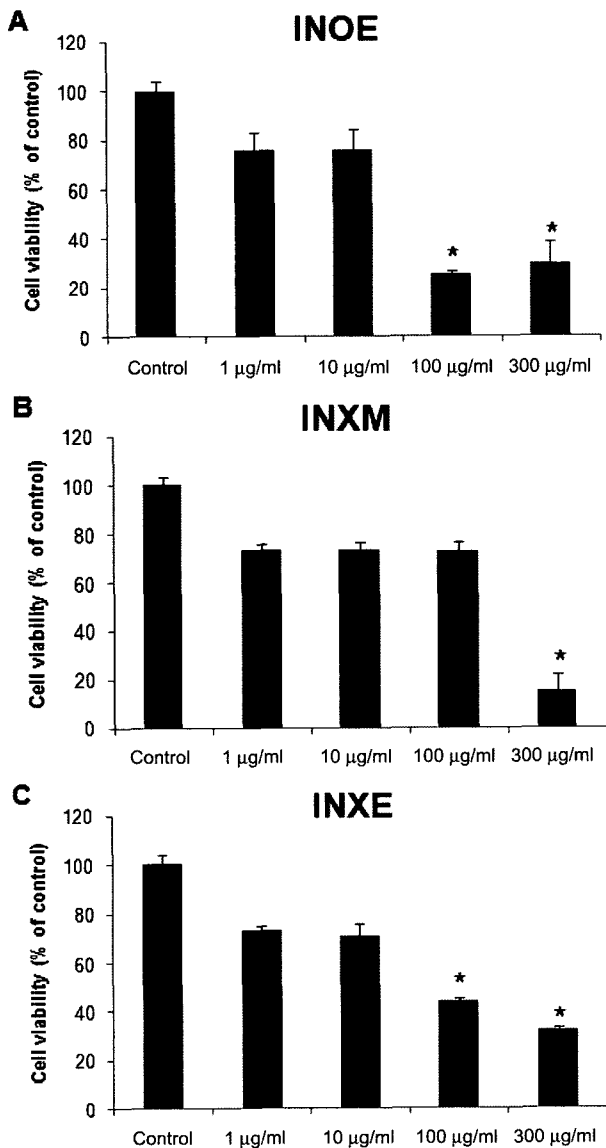
\*Significant difference at  $P < 0.05$  level compared with the control.

결 과

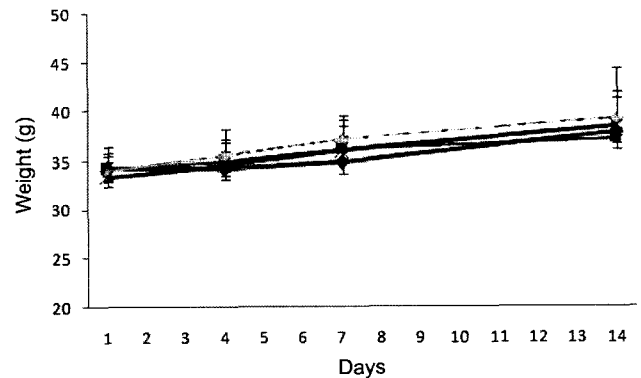
**세포분화능 시험.** Table 2와 Table 3은 각각 버섯 추출물인 INOE, INXM 그리고 INXE의 전지방세포분화억제능을 구명하고자 분화유도물질인 0.5 mM IBMX, 1 μM dexamethasone 그리고 1 μg/ml insulin을 처리하지 않은 상태에서 버섯추출물만 단독으로 처리하였을 때와 분화유도물질인 0.5 mM IBMX, 1 μM dexamethasone

그리고 1 μg/ml insulin의 존재 하에서 INOE, INXM 그리고 INXE를 처리하였을 때의 전지방세포 분화억제 정도를 측정된 결과이다. 분화유도물질이 존재하지 않았을 경우와 존재하였을 경우 버섯추출물을 처리하였을 때 대조군과 비교해 모두 분화가 억제되는 경향이 나타나 있으며, INOE, INXM 그리고 INXE를 100 μg/ml을 처리 시 전지방세포의 지방세포로의 분화율이 대조군(100%)와 비교해 각각 78.5, 80.9, 76.4%의 감소된 지방세포로의 분화를 나타내었고 10 μg/ml, 1 μg/ml에서는 억제율이 감소하는 경향을 보였다. Table 3에서 보면, 분화물질을 병용처리 시 INXM 100 μg/ml와 INXE 100 μg/ml 처리군에서 86.6과 83.4%로 대조군과 비교해 통계학적으로 유의성 있는 세포분화 억제가 관찰되었다( $P < 0.05$ ).

**항암활성시험.** Sarcoma 180세포에 버섯추출물 INOE, INXM, 그리고 INXE을 DMSO에 녹여 1~300 μg/ml의 용량으로 처리한 결과 INOE는 300 μg/ml에서는 용매 대조군에 비해 63.4%로, 100 μg/ml에서는 79.4%로 통계적으로 유의성 있는 암세포 성장억제가 관찰되었고( $P < 0.05$ ), 1 μg/ml과 10 μg/ml에서는 유의성 있는 암세포 성장억제가 관찰되지 않았다(Fig. 1A). INXM은 300 μg/ml에서는 80.1%로 통계적으로 유의성 있는 암세포 성장억제가 나타났지만( $P < 0.05$ ) 1 μg/ml, 10 μg/ml 그리고 100 μg/ml에서는 유의성 있는 성장억제가 관찰되지 않았다(Fig. 1B). INXE은 300 μg/ml 에서는 74.7%, 100 μg/ml에서는 64.5%, 10 μg/ml에서는 12.7%로 농도 의존적인 암세포 성장억제 경향이 나타났고, 300 μg/ml과 100 μg/ml은 통계적으로 유의성 있는 암세포 성장억제가 관찰



**Fig. 1.** Cell viability of sarcoma 180 treated with INOE, INXM, INXE (% of control). A, viability of sarcoma 180 treated with ethyl acetate extract of *Inonotus obliquus*; B, viability of sarcoma 180 treated with methanol extract of *Inonotus xeranticus*; C, viability of sarcoma 180 treated with ethyl acetate extract of *Inonotus xeranticus*. \*Significant difference at  $P < 0.05$  level compared with the control (n = 3).



**Fig. 2.** Body weight changes in male mice administered orally with INOE, INXM, INXE. Control; 0.5% Carboxymethylcellulose : Ethyl alcohol : Tween 80 (8 : 1 : 1); INOE, ethyl acetate extract of *Inonotus obliquus*; INXM, methanol extract of *Inonotus xeranticus*; INXE, ethyl acetate extract of *Inonotus xeranticus*. -◇-, Control; -■-, INOE; -▲-, INXM; -×-, INXE.

**Table 4.** Mortality and LD<sub>50</sub> values in male and female mice treated orally with INOE, INXM, INXE

Groups		Days after treatment														Final mortality	LD <sub>50</sub> (mg/kg)	
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13			14
Male	Control <sup>a</sup>	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5 (0%)	> 2000
	INOE <sup>b</sup>	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5 (0%)	
	INXM <sup>c</sup>	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5 (0%)	
	INXE <sup>d</sup>	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5 (0%)	
Female	Control	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5 (0%)	> 2000
	INOE	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5 (0%)	
	INXM	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5 (0%)	
	INXE	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5 (0%)	

Values are expressed as number of dead animals/total animals (n = 5) (percentages).

<sup>a</sup>Control, 0.5% Carboxymethylcellulose : Ethyl alcohol : Tween 80 (8 : 1 : 1).

<sup>b</sup>INOE, ethyl acetate extract of *Inonotus obliquus*.

<sup>c</sup>INXM, methanol extract of *Inonotus xeranticus*.

<sup>d</sup>INXE, ethyl acetate extract of *Inonotus xeranticus*.

**Table 5.** Clinical signs in male and female mice administered orally with INOE, INXM, INXE

Groups	Clinical signs	Hours after treatment						Days after treatment																
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14			
Male	Control <sup>a</sup>	NAD <sup>e</sup>	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	INOE <sup>b</sup>	NAD	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	INXM <sup>c</sup>	NAD	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	INXE <sup>d</sup>	NAD	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
Female	Control	NAD	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	INOE	NAD	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	INXM	NAD	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	INXE	NAD	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5

Values are expressed as animal numbers.

<sup>a</sup>Control, 0.5% Carboxymethylcellulose : Ethyl alcohol : Tween 80 (8 : 1 : 1).

<sup>b</sup>INOE, ethyl acetate extract of *Inonotus obliquus*.

<sup>c</sup>INXM, methanol extract of *Inonotus xeranticus*.

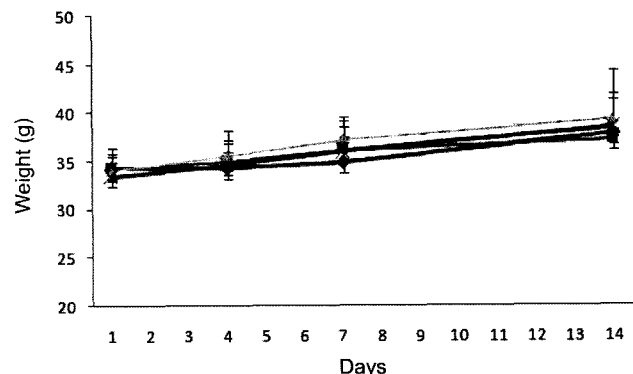
<sup>d</sup>INXE, ethyl acetate extract of *Inonotus xeranticus*.

<sup>e</sup>NAD, no abnormality detected.

되었다( $P < 0.05$ )(Fig. 1C).

**LD<sub>50</sub>와 임상증상.** INOE와 INXM 그리고 INXE을 마우스에 경구투여 시 모든 시험군에서 시험기간 동안 시험물질에 기인한 사망은 관찰되지 않았으며(Table 4), 시험물질에 의한 독성증상과 특이할 만한 임상증상도 나타나지 않았다(Table 5). 이상의 결과를 종합하여 보면, INOE와 INXM 그리고 INXE를 마우스에 단회 경구투여 하였을 때의 LD<sub>50</sub>치는 암·수 모두에서 2,000 mg/kg 이상이였다.

**체중변화 및 부검소견.** 시험기간 동안 기와층버섯 메탄올 추출물 투여 암컷군에서 체중감소가 관찰되었으나 통계적인 유의성은 관찰되지 않았다(Fig. 3). 시험 종료 후 생존동물의 부검 시 INOE, INXM, 그리고 INXE 투여군과 대조군 모두 내부 장기의 육안적 이상소견이 관찰되지 않았다(Table 6).



**Fig. 3.** Body weight changes in female mice administered orally with INOE, INXM, INXE. Control, 0.5% Carboxymethylcellulose : Ethyl alcohol : Tween 80 (8 : 1 : 1); INOE, ethyl acetate extract of *Inonotus obliquus*; INXM, methanol extract of *Inonotus xeranticus*; INXE, ethyl acetate extract of *Inonotus xeranticus*. -◆-, Control; -■-, INOE; -▲-, INXM; -×-, INXE.

**Table 6.** Gross findings of necropsy in male and female mice administered orally with INOE, INXM, INXE

	Groups	Observation	Frequency
Male	Control <sup>a</sup>	N.G.L. <sup>e</sup>	5/5
	INOE <sup>b</sup>	N.G.L.	5/5
	INXM <sup>c</sup>	N.G.L.	5/5
	INXE <sup>d</sup>	N.G.L.	5/5
Female	Control	N.G.L.	5/5
	INOE	N.G.L.	5/5
	INXM	N.G.L.	5/5
	INXE	N.G.L.	5/5

Values are expressed as animal numbers.

<sup>a</sup>Control, 0.5% Carboxymethylcellulose : Ethyl alcohol : Tween 80 (8 : 1 : 1).

<sup>b</sup>INOE, ethyl acetate extract of *Inonotus obliquus*.

<sup>c</sup>INXM, methanol extract of *Inonotus xeranticus*.

<sup>d</sup>INXE, ethyl acetate extract of *Inonotus xeranticus*.

<sup>e</sup>N.G.L., no gross lesion.

## 고 찰

생활수준의 향상과 식생활의 변화로 인해 고칼로리 음식의 과다한 섭취, 운동부족, 환경오염, 산업사회의 고도화에 따른 과다한 스트레스 및 의학 발달에 따른 고령화 현상 등으로 인해 질병양상도 점점 생활습관 위주로 서구화되고 있다. 그에 따라 건강식품에 대한 사람들의 관심이 높아지고 질병예방과 질병치료의 효능을 가지는 식품에 관한 연구가 많이 진행되어 있다. 그 중 버섯은 주위에서 손쉽게 구할 수 있고, 예로부터 질병치료에 널리 이용되어 왔으며 여러 연구를 통해 탁월한 항암작용과 항염증 작용 그리고 항산화 작용이 있다고 알려져 있다(Chen *et al.*, 2007; Kobori *et al.*, 2007; Sarangi *et al.*, 2006). 이 중에서 특히 비만과 암은 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다.

식생활의 변화로 대장암과 유방암 등의 암 발생이 증가하고 있고, 비만이 건강을 위협하는 심각한 사회 문제가 되고 있다. 따라서 비만은 암 발생의 차원에서 관리되어야 한다는 지적이 있다. 비만은 식도암·대장·직장암 간암 등에 연결고리 작용하고 과체중엔 대장암 유발 대장용종 발생을 급증하는 것으로 보고되어 있다. 그러므로 지방세포 자체가 '암세포 공장' 기능 가능성이 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 정확한 생물학적기전에 대해서는 알려져 있지 않다. 지금까지 보고된 연구결과를 갖고 추정하면, 비만은 성호르몬(estrogen, progesterone, androgens), insulin 그리고 IGF-1의 변화를 야기한다. 그 결과 유방암, 자궁내막암 그리고 결장암의 발생을 촉진한다. 이 결과로부터 혈장에 있는 성호르몬 결합 글로블린과 운반 단백질이 이러한 암의 발생에 관련이 있는 것으로 보고되

었다(Yainio *et al.*, 2002; Kaaks *et al.*, 2002; Key *et al.*, 2003). 따라서 지방세포로의 분화를 억제하고 암세포를 억제하는 천연물질을 탐색할 경우 기능성물질로 응용이 가능할 것으로 생각된다. 그러므로 본 연구에서는 최근 기와층버섯 추출물의 신규물질인 천연 화합물이 자유라디칼 소거 작용에 따른 항산화 활성이 우수한 것으로 보고된(Lee *et al.*, 2006) 것을 바탕으로 기와층버섯 추출물의 항산화 활성 외의 유용한 생리활성을 탐색하기 위해 항암활성과 지방세포분화억제 효능을 조사하였고 기능성 식품으로의 가능성을 알아보기 위하여 단회경구독성시험을 실시하였다.

비만은 암발생 이외에도 당뇨병, 고지혈증, 고혈압 및 관상 동맥질환 등과 밀접한 연관성이 있고, 비만인 사람은 이러한 질병의 유병률 및 사망률이 높다. 비만 치료를 위한 에너지 섭취 제한은 기초대사량의 감소와 체지방 감소 등의 문제점이 발생하기 때문에 정상적인 식사를 하면서 비만 증상을 완화시키는 방법이 매우 중요하다고 할 수 있다. 본 연구에서 사용한 3T3-L1 섬유아세포는 분화물질인 isobutylmethylxanthine, dexamethasone, insulin의 존재 하에 glucose를 흡수하여 지방세포로 분화한다(Huo *et al.*, 2003; Bagchi *et al.*, 2002). 본 연구에서는 기와층버섯의 메탄올 추출물과 에틸아세테이트 추출물에 지방세포 분화 억제 물질이 함유되어 있는지를 조사하기 위하여 3T3-L1 섬유아세포에 분화유도물질인 0.5 mM IBMX, 1 μM dexamethasone 그리고 1 μg/ml insulin 없는 상태에서 버섯추출물만 단독으로 처리하였을 때(Table 2)와 분화유도물질인 0.5 mM IBMX, 1 μM dexamethasone 그리고 1 μg/ml insulin 존재 하에서 INOE, INXM 그리고 INXE를 처리하였을 때(Table 3)의 지방세포로의 분화 억제정도를 감소된 중성지방 함량으로 결정하였다. 분화 억제 물질의 존재 여부는 중성지방 생성량이 대조군인 DMSO를 처리한 것보다 감소된 경우에 기와층버섯 추출물에 분화억제 물질이 함유되어 있다고 간주하였다. 분화유도물질이 존재하지 않았을 경우와 존재하였을 경우 버섯추출물을 처리하였을 때 대조군과 비교해 모두 분화가 억제되는 경향이 나타나 있으며, INOE, INXM 그리고 INXE를 100 μg/ml을 처리 시 전지방세포의 지방세포로의 분화율이 대조군(100%)와 비교해 각각 78.5%, 80.9% 그리고 76.4%로 지방세포로의 분화가 억제되었고 10 μg/ml과 1 μg/ml에서는 억제율이 감소하는 경향을 보였다. Table 3에서 보면, 분화물질을 병용처리 시 INXM 100 μg/ml과 INXE 100 μg/ml 처리군에서 86.6%과 83.4%로 대조군과 비교해 통계학적으로 유의성 있는 세포분화 억제가 관찰되었다( $P < 0.05$ ). 그러나 분화유도물질이 존재하지 않았을 경우와 존재하였을 경우 버섯추출물을 처

리하였을 때 300 µg/ml에서는 농도의존적인 분화억제가 나타나지 않았다. 이와 유사한 결과로 Takaku *et al.* (1997)는 마황 중에 함유되어 있는 norpseudoephedrine 이 지방합성을 촉진하며 norephedrine은 저농도에서는 지방분해를 촉진하고 고농도에서는 지방분해를 억제하는 작용이 있음을 보고하였다. 또한 동의보감 당뇨처방에 사용되는 한약재에서 인슐린성 물질을 탐색하여 발표한 논문에서도 저농도에서 3T3-L1 섬유아세포의 분화를 억제하고 고농도에서는 분화를 활성화 시키거나 반대로 저농도에서는 분화를 증가시키고 고농도에서는 분화를 억제시키는 물질들이 확인되었다(Ju and Ko, 2002). Ko *et al.* (2002)에서 엄나무의 수피 추출물은 분화유도물질이 첨가되지 않은 경우 1 µg/ml와 10 µg/ml의 농도에서는 각각 유의성 있게 3T3-L1 전지방세포의 분화를 촉진시켰지만, 분화유도물질을 첨가하였을 때는 1 µg/ml에서는 유의성 있게 전지방세포의 분화를 촉진하였지만 10 µg/ml에서는 분화에 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다. 위를 바탕으로 보면 버섯 추출물과 분화유도물질 사이의 상호작용으로 일정 농도이상에서는 세포분화를 활성화시키는 것으로 사료되고 기와충버섯 추출물이 세포막의 인슐린 수용체를 조절하는 과정에서 농도 의존적으로 영향을 주고 있다고 추측되며 추후 더 연구 검토되어야 할 것으로 생각되었다. 이상의 결과로부터 생체에 기와충버섯 추출물을 투여 시 지방세포생성 억제에 다른 다른 체지방 감소효과가 있을 것으로 사료되었다.

현재까지 기와충버섯 추출물에 대한 3T3-L1 cell에 대한 효능은 보고된 바 없지만 Choi *et al.*(2001)에 따르면 *Lentinus tuber-regium*(유용버섯)을 SD-rats에 투여하였을 때 항 비만효과가 관찰되었고, Jeon *et al.*(2004)에서 버섯의 열수추출물을 첨가한 발효우유를 streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats와 Zucker diabetic fatty (ZDF) rats에 투여하였을 때 혈당과 중성지방 감소효과가 보고되었다. 따라서 이를 바탕으로 유추시 기와충버섯 추출물에도 유사한 항 비만 작용이 있을 것으로 사료되었다. 본 연구에서 실시한 이들 추출물을 단회경구독성투여시 14일 동안 체중변화를 관찰한 결과 유의성은 인정되지 않았으나 기와충버섯의 메탄올추출물 투여시 암컷군에서 체중감소의 경향이 인정되었다(Fig. 3). 따라서 항비만 기능성식품의 개발에 유용한 정보를 얻어 향후 항비만효과에 대한 확인 실험을 실시할 예정이다.

비만과 더불어 주된 사망 원인이 되는 질병인 암에 대한 기와충버섯 추출물의 항암효과를 *in vitro*에서 탐색하기 위해 sarcoma 180 cell을 이용하여 sulforhodamine B으로 기와충버섯 추출물의 항암효과를 측정하였다. Fig. 1(A)에서 보여주는 것처럼 차가버섯의 추출물인 INOE는

대조군과 비교시 300 µg/ml에서는 63.4% 그리고 100 µg/ml에서는 79.4%로 암세포 성장억제가 관찰되었고 ( $P < 0.05$ ), 100 µg/ml이 300 µg/ml 보다 억제율이 더 좋은 것으로 나타났으나 통계적인 유의성은 관찰 할 수가 없었다. 이러한 현상에 대한 이유는 본 연구에서는 확실하게 알 수 없으므로 추후에 많은 농도로 세분화하여 항암활성에 대한 연구가 필요한 것으로 생각되었다. 한편, 저농도인 1 µg/ml과 10 µg/ml에서는 유의성 있는 암세포 성장억제가 관찰되지 않았다. 기와충버섯 추출물인 INXM은 300 µg/ml의 고농도에서는 80.1%의 암세포 성장억제가 나타났지만( $P < 0.05$ ) 저농도인 100 µg/ml 이하의 농도에서는 성장억제가 관찰되지 않았다(Fig. 1B). 그러나 INXE은 300 µg/ml에서는 74.7%, 100 µg/ml에서는 64.5%, 10 µg/ml에서는 12.7%로 농도 의존적인 암세포 성장억제 경향이 나타났다( $P < 0.05$ )(Fig. 1C). 이의 결과로부터 항암효과를 나타내는 성분은 메탄올추출물보다는 에틸아세테이트추출물이 더 높은 농도로 존재한다는 사실을 암시한다. Cha *et al.*(2004)에 따르면 차가버섯의 열수추출물을 암세포에 처리 시 HCT-15 종양세포에 대해서는 0.16, 0.4, 0.8, 1.6 그리고 4.0 mg/ml 농도에서 각각 83, 68, 42, 41 그리고 30%의 생존율을 나타내었고 AGS 종양세포에 대해서는 98, 86, 73, 47 그리고 32%의 생존율을 나타내었다. Ham *et al.*(2003b)에 따르면 A549 cell에서 차가버섯의 에틸아세테이트 분획물을 1 mg/ml 처리 시 90.8%의 억제효과를 나타내었고, AGS 세포의 경우 94.3% 그리고 MCF-7 cell에 대해서는 83.5%의 억제효과를 나타내었다. 본 연구에서도 대조물질인 차가버섯의 에틸아세테이트 층을 sarcoma 180 cell에 100 µg/ml 처리 시 79.4%의 암세포 억제는 앞에서 보고한 내용과 유사한 결과로 해석되었다. 본 연구에서 기와충버섯추출물은 유의성 있게 암세포 성장을 억제하는 것으로 볼 수 있었으며 항암치료를 위한 보조 기능성식품으로서의 가능성이 기대된다.

오랫동안 사용하여 온 약용식물의 경우에도 용매 추출을 하였을 경우 독성이 나타날 수 있으므로 식품으로 개발하기 전에 독성에 대한 안전성을 확인하는 것이 lead optimization toxicology 관점에서 유리하다. 따라서 본 연구에서는 최고 투여용량인 2,000 mg/kg으로 마우스에 대해 단회경구독성을 실시하였다. 그 결과 INOE와 INXM 그리고 INXE를 투여한 모든 시험군에서 시험기간 동안 시험물질에 기인한 사망은 관찰되지 않았으며(Table 4), 시험물질에 의한 독성증상과 특이할 만한 임상증상도 나타나지 않았다(Table 5). 이상의 실험 결과를 보면 기와충버섯 추출물은 단회경구독성시험 결과 LD<sub>50</sub>는 최소한 2,000 mg/kg 이상인 것으로 보인다. 하지만 식품으로 적

용 시에는 단회섭취보다는 장기적인 꾸준한 섭취가 이루어지기 때문에 아급성 및 만성 독성 검사가 필요한 것으로 생각된다.

결론적으로 본 실험에서 기와층버섯 추출물과 차가버섯 추출물은 ICR 계통의 마우스에서 단회경구투여시 2,000 mg/kg 이하의 용량에서 어떠한 독성 영향도 유발하지 않았으며, 본 시험 조건하에서의 LD<sub>50</sub>는 최소한 2,000 mg/kg 이상이라는 것으로 나타났다. 또한 기와층버섯 추출물과 차가버섯 추출물은 *in vitro*에서 비만억제 작용 및 항암 작용이 있는 것으로 나타나 기능성식품 소재 개발에 응용이 가능할 것으로 기대된다.

### 감사의 글

본 연구는 2007년도 농진청 바이오그린 21 사업과 산자부 지역전략산업진흥사업 기술지원사업에 의하여 지원되었으며, 창출치양은 2007년도 BK21 사업에 의하여 지원으로 수행되었으며 감사드립니다.

### 참고문헌

- Bagchi, A., Fridman, A., Holder, D.J., Doebber, T.W., Berger, J., Elbrecht, A., Moller, D.E. and Zhang, B.B. (2002). Gene expression profile of adipocyte differentiation and its regulation by peroxisome proliferation-activated receptor-gamma agonists. *Endocrinology*, **143**, 2106-2118.
- Bianchini, F., Kaaks, R. and Vainio, H. (2002). Overweight, obesity, and cancer risk. *Lancet Oncol.*, **3**, 565-574.
- Byun, B.H. (2005). Effects of *Inonotus obliquus* ethanol extract on cytokine expression in raw 267.4 cell. *Kor. J. Herbology*, **20**, 55-60.
- Cha, J.Y., Jeon, B.S., Moon, J.C., Yoo, J.H. and Cho, Y.S. (2004). Cytotoxic effect of *Inonotus obliquus* composition in HCT-15 human colon cancer cells and AGS Gastric cancer cells. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.*, **33**, 633-640.
- Chen, K.C., Peng, C.C., Peng, R.Y., Su, C.H., Chiang, H.S., Yan, J.H. and Hsieh-Li, H.M. (2007). Unique formosan mushroom antrodia camphorata differentially inhibits androgen-responsive LNCaP and -independent PC-3 prostate cancer cells. *Nutr Cancer*, **57**, 111-121.
- Choi, J.H., Park, S.H., Kim, D.I., Kim, J.M., Kim, C.M. and Kim, G.P. (2001). Effects of edible *Lentinus tuber-regium* on the obesity and lipid metabolism of SD rats. *Kor. J. Mycol.*, **2**, 47-51.
- Ham, S.S., Oh, S.W., Kim, Y.K., Shin, K.S., Chang, H.Y. and Chung, G.H. (2003a). Antioxidant and genotoxic inhibition activity of ethanol extract from the *Inonotus obliquus*. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.*, **32**, 1071-1075.
- Ham, S.S., Oh, S.W., Kim, Y.K., Shin, K.S., Chang, H.Y. and Chung, G.H. (2003b). Antimutagenic and cytotoxic effects of ethanol extract from the *Inonotus obliquus*. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.*, **32**, 1088-1094.
- Huo, H., Guo, X., Hong, S., Jiang, M., Liu, X. and Liao, K. (2003). Lipid rafts/caveolae are essential for insulin-like growth factor-1 receptor signaling during 3T3-L1 preadipocyte differentiation induction. *J. Biol. Chem.*, **278**, 11561-11569.
- Hwang, Y.J., Noh, G.W. and Kim, S.H. (2003). Effect of *Inonotus obliquus* extracts on proliferation and Caspase-3 activity in human gastro-intestinal cancer cell lines. *Kor. Nutr. Sci.*, **36**, 18-23.
- Jeon, B.S., Park, J.W., Kim, B.K., Kim, H.K., Jung, T.S., Hahm, J.R., Kim, D.R., Cho, Y.S. and Cha, J.Y. (2005). Fermented mushroom milk-supplemented dietary fibre prevents the onset of obesity and hypertriglyceridaemia in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. *Diabetes Obes. Metab.*, **7**, 709-715.
- Ju, Y.S. and Ko, B.S. (2002). Natural products, organic chemistry: Screening of insulin-like substances from traditional herbs of diabetes prescription in donguibogam. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.*, **45**, 42-46.
- Kaaks, E., Lukanova, A. and Kurzer, M.S. (2002). Obesity, endogenous hormones, and endometrial cancer risk: A synthetic review. *Cancer Epidemiol. Biomarkers*, **11**, 1531-1543.
- Kang, K.J. and Kwon, S.Y. (2003). Effects of wax gourd extracts of adipocyte differentiation and uncoupling protein genes (ucps) expression in 3T3-L1 preadipocytes. *Nutritional Sciences*, **6**, 148-154.
- Key, T.G., Appleby, P.N. and Reeves, G.K. (2003). Body mass index, serum sex hormones, and breast cancer risk in postmenopausal women. *J. Natl. Cancer Inst.*, **95**, 1218-1226.
- Kim, H.M., Han, S.B., Kim, M.S., Kang, J.S., Oh, G.T. and Hong, D.H. (1996). Efficient fixation procedure of human leukemia cells in sulforhodamine B cytotoxicity assay. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **36**, 163-169.
- Kim, I.H. and Nam, T.J. (2004). The effects of polymannuronates on leptin in 3T3-L1 adipocytes. *J. Kor. Fish. Soc.*, **37**, 372-379.
- Ko, B.S., Kim, H.K. and Park, S.M. (2002). Natural Products, Organic Chemistry: Insulin Sensitizing And Insulin-like Effects of Water Extracts from *Kalopanax pictus* NAKAI in 3T3-L1 Adipocyte. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.*, **45**, 42-46.
- Ko, B.S., Park, S.K., Choi, S.B., Jun, D.W., Jang, J.S. and Park, S.M. (2004). Hypoglycemic effects of crude extracts of *Prunus mume*. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.*, **33**, 951-957.
- Kobori, M., Yoshida, M., Ohnishi-Kameyama, M. and Shimoto, H. (2007). Ergosterol peroxide from an edible mushroom suppresses inflammatory responses in RAW264.7 macrophages and growth of HT29 colon adenocarcinoma cells. *Br. J. Pharmacol.*, **150**, 209-219.
- Koh, J.B. and Lee, C.U. (2005). Effect of *Pleurotus eryngii* on lipid metabolism in rats fed high fat diet. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.*, **34**, 626-631.
- Kwoen, D.J., Youn, S.J., Cho, J.G., Choi, U.K. and Kang, S.C. (2006). Antioxidant activities and biological properties of *Phellinus linteus* extracts according to different extraction methods. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.*, **49**, 91-96.



- Lee, I.K., Jung, J.Y., Seok, S.J., Kim, W.G. and Yun, B.S. (2006). Free radical scavengers from the medicinal mushroom *Inonotus xeranticus* and their proposed biogenesis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **16**, 5621–5624.
- Nakata, T., Yamada, T., Taji, S., Ohishi, H., Wada, S.I., Tokuda, H., Sakuma, K. and Tanaka, R. (2007). Structure determination of inonotsuoxides A and B and *in vivo* anti-tumor promoting activity of inotodiol from the sclerotia of *Inonotus obliquus*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **15**, 257–264.
- OECD (2000): Guidelines for the testing of Chemicals Revised Draft Guideline 423: Acute oral toxicity.
- Park, S.M., Jun, D.W., Park, C.H., Jang, J.S., Park, S.K., Ko, B.S., Kim, B.J. and Choi, S.B. (2004). Hypoglycemic effects of crude extracts of moutan radices cortex. *Kor. J. Food Sci. Technol.*, **36**, 472–477.
- Sarangi, I., Ghosh, D., Bhutia, S.K., Mallick, S.K. and Maiti, T.K. (2006). Anti-tumor and immunomodulating effects of *Pleurotus ostreatus* mycelia-derived proteoglycans. *Int. Immunopharmacol.*, **6**, 1287–1297.
- Song, H.S., Lee, Y.J., Kim, S.K., Moon, W.K., Kim, D.W., Kim, Y.S. and Moon, K.Y. (2004). Downregulatory effect of AGI-1120 ( $\alpha$ -glucosidase inhibitor) and Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) on cellular NF- $\kappa$ B activation and their antioxidant activity. *Kor. J. Pharmacogn.*, **35**, 92–97.
- Takaku, T., Jiang, M., Okuda, H. and Maeda, N. (1997). Isolation of Insulin like substance from *Ephedra sinica* STAFF. *J. Traditional. Med.*, **14**, 358–359.
- Yamanaka, S., Hashimoto, M., Tobe, M., Kobayashi, K., Sekizawa, J. and Nishimura, M. (1990). A simple method for screening assessment of acute toxicity of chemicals. *Arch. Toxicol.*, **64**, 262–268.
- Yu, H.E., Cho, S.M., Seo, G.S., Lee, B.S., Lee, D.H. and Lee, J.S. (2006). Screening of bioactive compounds from mushroom *Pholiota* sp. *Kor. J. Mycol.*, **34**, 15–21.