

낙엽송층버섯으로부터 Ergosterol 유도체의 분리 및 RAW 264.7 세포주의 Nitric Oxide 생성 저해활성

장현진 · 양기숙[#]

숙명여자대학교 약학대학

(Received October 27, 2006; Revised November 27, 2006)

Inhibition of Nitric Oxide Synthesis by Ergosterol Derivative from *Phellinus pini* in LPS-Activated RAW 264.7 Cells

Hyun-Jin Jang and Ki-Sook Yang[#]

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

Abstract — *Phellinus pini* (Hymenochaetaceae) has been used for the immunomodulating activity, hypolipidemic effect, gastric cancer, non-insulin dependant diabetes, diarrhea, and menstrual irregularity. From the screening of each fraction for the inhibitory activity of NO production in lipopolysaccharide (LPS) activated RAW 264.7 cells, methanol extract of *Phellinus pini* and hexane soluble fraction exhibited inhibition of NO production compared with LPS control without toxicity. The hexane soluble fraction showed dose dependent inhibition of NO production. According to activity guided fractionation, the active hexane fr. was repeatedly chromatographed over silica gel, ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one was isolated. The compound inhibited NOS activation (IC₅₀ : 29.7 uM) and NO production of activated macrophage at 30 uM.

Keywords □ *Phellinus pini*, ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one, nitric oxide, RAW 264.7 cells

낙엽송층버섯 *Phellinus pini* (Brot ex Fr.) Ames은 담자균아문 (Basidiomycotina), 민주름버섯목(Aphylophorales), 소나무비늘버섯과(Hymenochaetaceae)¹⁾에 속하며, 침엽수 특히 가문비나무, 낙엽송, 소나무 등의 생목위에 기생하는 다년생의 버섯으로 송상황(松桑黃)버섯이라 부르기도 한다. 균주는 white rot fungus라 부르기도 하는데 숙주나무의 lignin을 파괴하는 것으로 목재의 품질을 저하시키나, 중간대사물질이 다른 곰팡이에 대해 억제작용이 있어 목재산업에서 많이 사용되고 펄프를 효율적으로 제조하는데 이용되고 있다.²⁾ 낙엽송층버섯의 성분으로는 ergosterol, vanillic acid, p-hydroxybenzoic acid 등 버섯의 일반적인 성분³⁾ 이외에 2,4,6-triphenylhex-1-ene, 2-farnesyl-5-methylbenzoquinone, 8-methyl-13-phenyltri-deca-4,6,8,10,12-pentaene-3-one, 4-vinylphenol and 4-vinyl resorcinol 등 각종 나무에 병을 일으키는 곰팡이를 억제하는 성분이 알려져 있고,⁴⁾

버섯의 자실체를 유도하는 성분으로 알려진 N-(2'-hydroxynonacosanoyl)-D-erythro-1,3,4-trihydroxy-2-amino-octadecane과 N-(2'-hydroxytriacontanoyl)-D-erythro-1,3,4-trihydroxy-2-amino-octadecane이 보고되었다.⁵⁾ 약리작용으로는 항암작용,⁶⁾ 면역증강 작용,⁷⁾ 혈중지질감소효과⁸⁾ 등에 대한 연구가 있으나 아직 미흡하다.

대식세포는 생체내에서 감염, 염증 등의 자극에 의하여 L-arginine을 NOS에 의해 대사하여 NO를 생성하여 중앙세포를 죽이거나 미생물에 의한 감염을 방어하여 생체를 지키는 중요한 역할을 하고 있다. 그러나 NO가 필요이상으로 생성되면 속크에 의한 혈관확장, 염증반응으로 유발되는 조직손상, 돌연변이, 신경조직의 손상 등을 일으켜 생체에 유해한 작용을 나타낸다.⁹⁻¹²⁾

낙엽송층버섯의 항염활성을 규명하고자 NO생성에 미치는 작용을 측정하고 그 활성성분을 분리한 결과를 보고하고자 한다.

실험 방법

실험재료

낙엽송층버섯은 2003년 12월 서울시 소재 백제건재약업사에

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-710-9578 (팩스) 02-710-9871
(E-mail) ksyang@sookmyung.ac.kr

서 구입하였고 표본(SMP0505)은 숙명여자대학교 생약표본실에 보관하였다.

기기 및 시약

박층크로마토그래피는 pre-coated TLC plate silicagel 60F254 (Merck, Art. 5554), 컬럼크로마토그래피용 담체로는 Kieselgel 60(70-230 mesh, Merck)을 사용하였다. NMR spectrum은 Bruker, Advance 500 spectrometer, GC-MS는 JEOL, JMS-AX505WA, HP5890 Series II를 사용하여 측정하였다.

세포배양과 시료처리

RAW 264.7 세포를 10% FBS DMEM으로 1.5×10^5 cells/ml로 하여 48 well plate에 분주하여 24시간 동안 부착시키고 새로운 1% FBS DMEM으로 교환한 다음 LPS를 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 가하였다. 시료는 최종농도 0.1% DMSO 용액이 되도록 LPS와 동시에 배양액에 0~30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 가한 다음 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 18시간 배양하여 각 well의 배양액으로 유리된 NO의 생성 정도를 측정하였다. 기질저해를 평가하기 위하여 위와 같은 방법으로 LPS를 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 넣고 20시간 배양한 후에 상등액을 제거하고 PBS로 세척한 후에 DMEM으로 교환하였다. 시료를 0~40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 가하고 20시간 배양하여 유리된 NO의 생성 정도를 측정하였다.

Nitrite assay

NO 합성의 지표로 nitrite(NO₂) 생성량을 측정하였다. 96 well에 세포배양한 배지 상등액 100 μl 를 넣고 Griess reagent A 75 μl , B 75 μl 를 첨가하여 37°C에서 5분간 배양 시킨 후 570 nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정한다. 검량선 작성을 위해 sodium nitrite(NaNO₂)를 표준품으로 하여 비교하였다.¹³⁾

MTT assay

48 well plate의 각 세포를 PBS로 두 번 세척한 후 MTT의 농도가 0.5 mg/ml이 되도록 10% FBS DMEM에 녹여 200 μl 씩을 가한다. 이 때 대사활동을 하고 있는 세포의 경우 NADH와 NADPH의 작용으로 인한 환원반응으로 MTT(tetrazolium salt, 황색)가 formazan crystal(보라색)로 변하게 된다. 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 배양한 후 solubilization 용액을 200 μl 씩 넣어 밤새 실온에 놓아 용해한다. 결정이 완전히 용해되면 대조과장을 650 nm로 하고 측정과장을 570 nm로 하여 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

추출 및 분리

낙엽송층버섯 자실체를 음건한 후 조말로 하여 5 kg을 취하여, 메탄올로 가열 추출한 후 60°C 이하에서 감압 농축하였다. 농축

된 액을 동결 건조하여 메탄올 추출물 297 g을 얻었다. 그 후 메탄올 추출물을 열수에 녹여 물 가용부분 70 g과 물 불용부분 220 g으로 나누었다. 물 불용부분은 다시 헥산으로 추출하여 헥산 분획 24.2 g을 얻었다. 헥산 분획 12 g을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(hexane : EtOAc, 10 : 1→5 : 1)를 실시하여 활성분획 Fr.H-5(420 mg), Fr.H-8(550 mg)을 얻고 계속해서 Fr.H-5(420 mg)를 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(CH₂Cl₂ : MeOH, 50 : 1)를 실시하여 Fr.H-5-4(80 mg)을 얻었고, 다시 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(benzene : acetone, 30 : 1)를 실시하여 화합물 1(40 mg)을 얻었다.

화합물 1 - Yellow plates C₂₈H₄₀O, EI-MS: *m/z* 392[M]⁺, 337[M-CH₃]⁺, 267[M-C₉H₁₇]⁺; ¹H-NMR(600 MHz, CDCl₃) δ 0.76(3H, d, *J*=6.8 Hz, CH₃-26) 0.77(3H, d, *J*=6.8 Hz, CH₃-27), 0.86(3H, d, *J*=6.8 Hz, CH₃-28), 0.89(3H, s, CH₃-18), 0.92(3H, s, CH₃-19), 0.99(3H, d, *J*=6.7 Hz, CH₃-21), 5.13(1H, d, *J*=8.2 Hz, *J*=15.3 Hz, H-23), 5.19(1H, d, *J*=7.5 Hz, *J*=15.3 Hz, H-22) 5.66(1H, s, H-4), 5.95(1H, d, *J*=9.5 Hz, H-6), 6.54(1H, d, *J*=9.5 Hz, H-7); ¹³C-NMR(600 MHz, CDCl₃) δ 35.53(C-1), 34.08(C-2), 199.51(C-3), 122.93(C-4), 156.17(C-5), 124.40(C-6), 134.00(C-7), 156.08(C-8), 44.25(C-9), 36.70(C-10), 18.94(C-11), 34.08(C-12), 43.93(C-13), 164.38(C-14), 25.33(C-15), 27.69(C-16), 55.63(C-17), 18.91(C-18), 16.60(C-19), 39.26(C-20), 21.19(C-21), 132.47(C-22), 134.96(C-23), 42.82(C-24), 33.04(C-25), 19.96(C-26), 19.62(C-27), 17.61(C-28).

통계학적 분석

모든 실험결과는 mean \pm S.D로 나타내었으며 자료분석은 Student's *t*-test를 이용하여 유의성을 검정하였다.

실험결과 및 고찰

낙엽송층버섯이 LPS에 의해 활성화된 RAW 264.7 세포로부터 NO생성 저해활성에 미치는 작용을 실험한 결과, 메탄올 추출물이 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 75%의 저해활성을 보였다. 메탄올 추출물에 대하여 용매 분획을 실시하고, 메탄올 추출물과 각 분획을 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 NO 생성저해효과를 측정하였다. 비극성인 헥산분획이 NO생성을 저해하는 효과가 가장 우수하였고, 극성인 물 분획은 반대로 NO생성을 촉진하는 결과를 얻었다(Fig. 3). NO생성 저해효과를 보이는 화합물을 단리하기 위하여 헥산 분획으로부터 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 화합물 1을 분리하였다(Fig. 1). EI-MS와 ¹³C-NMR로부터 화합물 1은 C₂₈H₄₀O(M⁺: 392.3)의 분자식과 분자량을 갖는 화합물로 밝혀졌다. 이 화합물은 ¹H-, ¹³C-, ¹H-¹H COSY, HSQC와 HMBC를

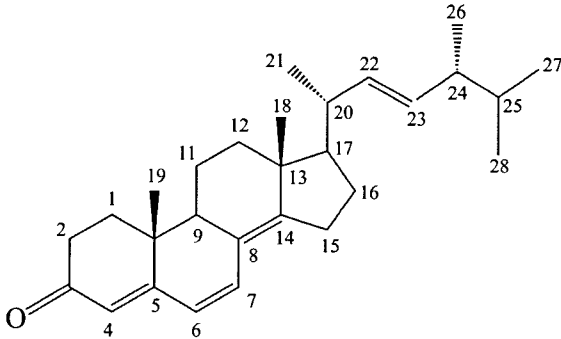


Fig. 1 - Structure of ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one.

포함하는 NMR 분석을 통하여 화합물 1은 ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one으로 그 구조를 규명할 수 있었으며 이미 보고 된 문헌의 기기분석 data와 일치하였다.^{14,15)}

Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one은 주로 곰팡이나 버섯에 들어있는 ergosterol유도체 성분으로, 저령(*Polyporus umbellatus*), 접시꼴겉이버섯(*Leccinum extremiorientale*), 눈꽃동충하초(*Paecilomyces* sp.), 잎새버섯(*Grifola frondosa*), 은행잎우단버섯(*Paxillus panuoides*), 능이버섯(*Sarcodon aspratun*),¹⁶⁻²²⁾ 영지(*Ganoderma lucidum*)²³⁾ 등 다양한 버섯에 분포하고 있다. 이 성분은 강한 형광을 띠는 성질을 이용하여 곡물이나 담배잎이 곰팡이에 감염되었는지 알아보는 지표로 보고 되기도 하였고 저령을 확인하는 지표물질로 이용되었다.²⁴⁾ 약리작용으로는 세포독성으로 인한 항암작용,²⁵⁻²⁷⁾ 이노작용,²⁸⁾ 면역조절작용,²⁹⁾ COX1, COX2 억제효과 및 항산화작용³⁰⁾ 등이 보고 되었다.

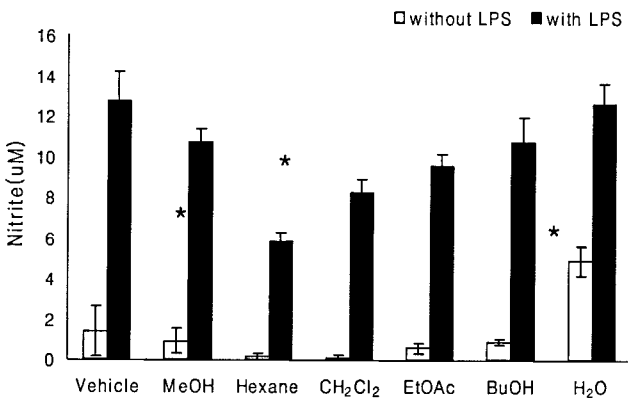


Fig. 2 - Effect of fractions from *Phellinus pini* MeOH extract on NO production. RAW 264.7 cells (1.5×10^5 cells/ml) were incubated for 24 hrs in DMEM containing 10% FBS and were treated for 18 hrs with *Phellinus pini* MeOH extract and its fractions (10 μ g/ml) with or without LPS (1 μ g/ml). NO released into the cell culture medium was measured by the Griess reagent in the nitrite form. Each data value is presented as mean \pm S.D. of three experiments. Significantly different from LPS control (*; $p < 0.01$) as determined by the Student's t-test.

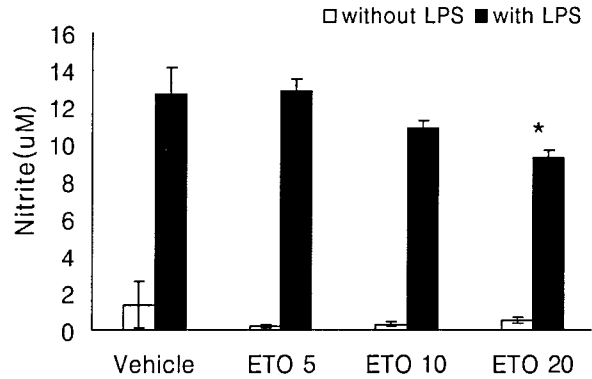


Fig. 3 - Effect of ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one on NO production. RAW 264.7 cells (1.5×10^5 cells/ml) were incubated for 24 hrs in DMEM containing 10% FBS and were treated for 18 hrs with ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one (ETO 5, 10, 20 μ M) with or without LPS (1 μ g/ml). NO released into the cell culture medium was measured by the Griess reagent in the nitrite form. Each data value is presented as mean \pm S.D. of three experiments. Significantly different from LPS control (*; $p < 0.01$) as determined by the Student's t-test.

분획과 화합물 1의 LPS에 의해 유도된 NO생성 저해활성

각 분획(10 μ g/ml)의 단독 투여와 LPS와 병용 투여에 의해 활성화된 RAW 264.7 세포의 배양액 중에 존재하는 nitrite(NO₂)의 양을 Griess 시약을 사용하여 측정하였다. 각 분획을 단독 처리했을 때의 nitrite(NO₂)의 양은 물분획에서 유의성있는 증가를 보였으며 다른 분획에서는 변화가 없거나 배양액과 유사한 정도의 변화를 나타내었다. 각 분획과 LPS를 동시에 처리했을 때, 물분획을 제외한 모든 분획에서 저해활성을 나타냈으며 헥산분획에서 가장 강한 저해활성이 관찰되었다(Fig. 2).

헥산분획에서 분리된 화합물 1은 단독 투여에 의한 NO생성은

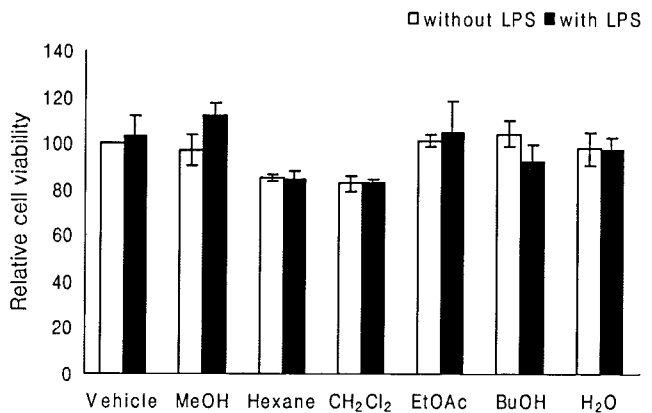


Fig. 4 - Effect of fractions (10 μ g/ml) from *Phellinus pini* MeOH extract on NO production by LPS induced RAW 264.7 cells with or without LPS (1 μ g/ml). The viability of the cells was measured by MTT assay. Results were expressed as % of negative control. Each data value is presented as mean \pm S.D. of three experiments.

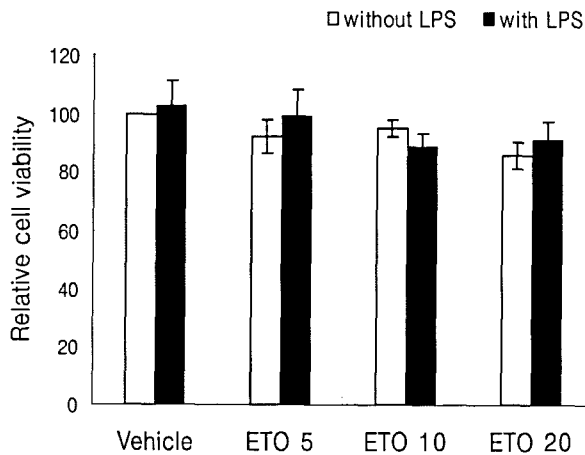


Fig. 5 – Effect of ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one (ETO 5, 10, 20 μ M) on the viability of RAW 264.7 cells with or without LPS (1 μ g/ml). The viability of the cells was measured by MTT assay. Results were expressed as % of negative control. Each data value is presented as mean \pm S.D. of three experiments.

대조군에 비해 차이가 없었으나, LPS와 동시에 처리했을 때는 농도 의존적인 저해 활성이 관찰되었으며 화합물 1의 IC_{50} 값은 29.7 μ M로 나타났다(Fig. 3). 또한 이들은 대조군에 비해 세포의 생존율에 큰 차이를 보이지 않았으므로 세포의 생존에는 영향을 미치지 않고 NO생성을 저해함을 알 수 있었다(Fig. 4, Fig. 5).

화합물 1의 iNOS 유도 후 단계에 대한 저해활성

NO 생성 저해 기작을 알아보기 위해 먼저 효소에 대한 분리된 화합물의 영향을 알아보았다. LPS로 활성화 된 iNOS는 수

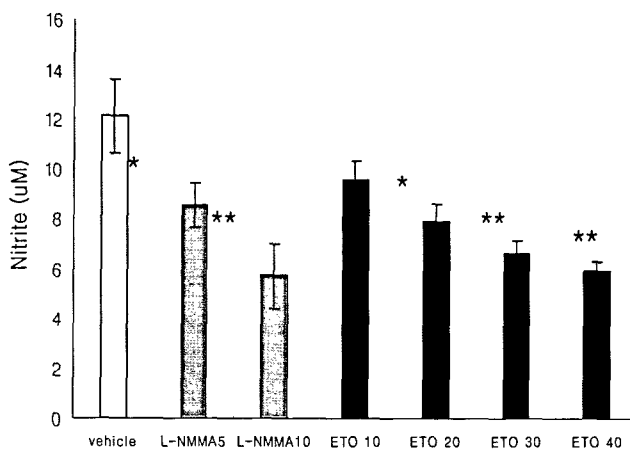


Fig. 6 – Effect of ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one (ETO 10, 20, 30, 40 μ M) on nitrite production. RAW 264.7 cells were incubated with effectors for 20 hrs after LPS-activation for 20 hrs. LPS (1 μ g/ml), L-NMMA (5, 10 μ g/ml). Each data value is presented as mean \pm S.D. of three experiments. Significantly different from LPS control (*; $p < 0.01$, **; $p < 0.001$) as determined by the Student's t-test.

시간에서 수일 동안 활성을 유지한다. 그러므로 LPS(1 μ g/ml)로 RAW 264.7 세포를 20시간 동안 완전히 활성화시킨 후에 배양액 중의 LPS를 완전히 제거한 후에 새로운 배지로 교환하고 분리된 화합물을 처리하였다. 20시간 후에 배양액 중에 생성된 nitrite량을 Griess 반응으로 측정하여 세포내에 존재하는 iNOS에 대한 NO생성저해를 조사하였다. 양성대조군으로 L-arginine과의 기질경쟁에 의해 iNOS에 대해 저해활성을 나타내는 L-NMMA를 사용하였다. 동일하게 처리한 양성대조군 L-NMMA 10 μ g/ml에서 43%의 저해활성을 나타내었고, 화합물 1은 iNOS의 유도가 완료된 후에 NO생성을 유의성있게 저해하였으며 30 μ M 이상의 농도에서 L-NMMA 10 μ g/ml과 유사한 정도의 저해활성을 보였다(Fig. 6). 따라서 낙엽송층버섯으로부터 분리한 화합물 1은 iNOS 유도 전후 단계에서 모두 NO생성 저해효과를 나타내었다.

결론

낙엽송층버섯의 NO 생성 저해작용을 확인한 결과, 핵산분획물로부터 농도 의존적인 저해 활성이 관찰되었다. 이 활성 분획물로부터 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 에르고스테롤 유도체인, ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one을 단리하였다. 이 화합물은 iNOS의 활성화를 억제하며, IC_{50} 값은 29.7 μ M이었고, 세포생존율에는 영향이 미치지 않았다. 또한 iNOS 유도가 완료된 후 기질에 작용하여 NO를 생성하는 단계에서 NO생성 저해효과를 나타내었다.

감사의 말씀

본 연구는 과학기술부/한국과학재단우수연구센터 육성사업의 지원(S-2006-02-4)에 의하여 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

문헌

- 1) 박완희, 이호득 : 한국약용버섯도감, 교학사, 서울 p. 562 (1999).
- 2) You, J. X., Ye, H. L., Tong, G. L. and Fang, G. G. : Effect of white rot fungi *Phellinus pini* pretreatment on the kraft pulping of Populus. *Zhongguo Zaozhi* **23**, 12 (2004).
- 3) Epimenko, O. M. and Ageenkova, L. V. : Chemical composition of the wood-rotting fungus *Phellinus pini* var. *abietis*. *Kormovye Belki Fiziol. Akt Veshchestva Zhivotnovod* **107** (1965).
- 4) Ayer, W. A., Muir D. J. and Chakravarty, P. : Phenolic and other metabolites of *Phellinus pini*, a fungus pathogenic to pine. *Phytochem.* **42**, 1321 (1996).
- 5) Lourenco, A., Lobo, A. M., Rodriguez, B. and Jimeno, M. L. :

- Ceramides from the fungus *Phellinus pini*. *Phytochem.* **43**, 617 (1996).
- 6) Ikegawa, T., Nakanishi, M., Uehara, N., Chihara, G. and Fukuoka, F. : Antitumor action of some Basidiomycetes, especially *Phellinus linteus*. *Gann* **59**, 155 (1968).
 - 7) Jeong, S. C., Cho, S. P., Yang, B. K., Jeong, Y. T., Ra, K. S and Song, C. H. : Immunomodulating activity of the exopolymer from submerged mycelial culture of *Phellinus pini*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **14**, 15 (2004).
 - 8) Yang, B. K., Park, J. B. and Song, C. H. : Hypolipidemic effect of exo-polymer produced in submerged mycelial culture of five different mushroom. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **12**, 957 (2002).
 - 9) Knowles, R. G. and Moncada, S. : Nitric oxide as a signal in blood vessels. *TIBS* **17**, 399 (1992).
 - 10) Nathan, C. : Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* **6**, 3051 (1992).
 - 11) Stuehr, D., Cho, H. J., Kwon, N. S., Weise, M. and Nathan, C. F. : Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD-and FMN-containing flavoprotein. *Proc. Natl. Sci. USA* **88**, 7773 (1991).
 - 12) McCartney, F. N., Allen, J. B., Mizel, D. E., Albina, J. E., Xie, Q. W., Nathan, C. F. and Wahl, S. M. : Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* **178**, 749 (1993).
 - 13) Feilisch, M. and Stamler, J. : Methods in nitric oxide research. John Wiley and Sons, 492 (1995).
 - 14) Fujimoto, H. H., Nakamura, E. K., Okuyama, E. M. and Ishibashi, M. : Six immunosuppressive features from an ascomycetes, *Zopfiella longicaudata*, found in a screening study monitored by immunomodulatory activity. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **52**, 1005 (2004).
 - 15) Yuan, A., Yamamoto, K., Bi, K., Zhang, P., Liu, P. and Kano, Y. : Studies on the marker compound for standardization of traditional Chinese medicine *Polyporus sclerotium*. *Yakugaku Zasshi* **123**, 53 (2003).
 - 16) Yuan, A., Yamamoto, K., Bi, K., Zhang, P., Liu, P. and Kano, Y. : Studies on the marker compound for standardization of traditional Chinese medicine *Polyporus sclerotium*. *Yakugaku Zasshi* **123**, 53 (2003).
 - 17) Gao, J. M., Shen, J., Zhang, A. L., Zhu, W., Zhang, X. and Liu, J. K. : Chemical constituents of the fungus *Leccinum extremiorientale*. *Youji Huaxue* **23**, 853 (2003).
 - 18) Mata, R., Gamboa, A., Macias, M., Santillan, S., Ulloa, M. and Gonzalez, M. : Effect of selected phytotoxins from *Guanomyces polythrix* on the calmodulin-dependent activity of the enzymes cAMP phosphodiesterase and NAD-kinase. *J. Agricultural and Food Chemistry* **51**, 4559 (2003).
 - 19) Kwon, H. C., Zee, S. D., Cho, S. Y., Choi, S. U and Lee, K. R. : Cytotoxic ergosterols from *Paecliomycetes* sp. J300. *Archives of Pharmacal Research* **25**, 851 (2002).
 - 20) Zhang, Y. J., Mills, G. L. and Nair, M. G. : Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant compounds from the mycelia of the edible mushroom *Grifola frondosa*. *J. Agricultural and Food Chemistry* **50**, 7581 (2002).
 - 21) Gao, J. M., Zhang, A. L., Wang, C. Y. and Liu, J. K. : Constituents from basidiomycetes *Paxillus panuoides*. *Xibei Zhiwu Xuebao* **22**, 391 (2002).
 - 22) Huang, Y., Dong, Z. J. and Liu, J. K. : Chemical constituents from the basidiocarp of *Sarcodon aspratium*. *Yunnan Zhiwu Yanjiu* **24**, 125 (2002).
 - 23) Gonzalez, A. G., Leon, F., Rivera, A., Munoz, C. M. and Bermejo, J. : Lanostanoid triterpenes from *Ganoderma lucidum*. *J. Natural Products* **62**, 1700 (1999).
 - 24) Yuan, A., Yamamoto, K., Bi, K., Zhang, P., Liu, P. and Kano, Y. : Studies on the marker compound for standardization of traditional Chinese medicine *Polyporus sclerotium*. *Yakugaku Zasshi* **123**, 53 (2003).
 - 25) Liu, H. B., Cui, C. B., Gu, Q. Q., Cai, B., Zhao, Q. C. and Guan, H. S. : Chemical constituents of *Pterocarpa tonkinesis* and their antitumor activities *in vitro*. *Zhongguo Yaoxue Zazhi* **40**, 414 (2005).
 - 26) Lee, W. Y., Park, Y. K., Ahn, J. K., Park, S. Y. and Lee, H. J. : Cytotoxic activity of ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one from the sclerotia of *Polyporus umbellatus*. *Bull. of the Kor. Chem. Soc.* **26**, 1464 (2005).
 - 27) Kwon, H. C., Zee, S. D., Cho, S. Y., Choi, S. U. and Lee, K. R. : Cytotoxic ergosterols from *Paecliomycetes* sp. J300. *Archives of Pharmacal Research* **25**, 851 (2002).
 - 28) Yuan, D., Mori, J., Komatsu, K. I., Makino, T. and Kano, Y. : An anti-aldosteronic diuretic component (drain dampness) in *Polyporus sclerotium*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **27**, 867 (2004).
 - 29) Fujimoto, H. H., Nakamura, E. K., Okuyama, E. M. and Ishibashi, M. : Six immunosuppressive features from an ascomycete, *Zopfiella longicaudata*, found in a screening study monitored by immunomodulatory activity. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **52**, 1005 (2004).
 - 30) Zhang, Y. J., Mills, G. L. and Nair, M. G. : Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant compounds from the mycelia of the edible mushroom *Grifola frondosa*. *J. Agricultural and Food Chemistry* **50**, 7581 (2002).