

복령 균핵의 알칼리추출물에서 정제한 면역활성 증강물질의 작용과 화학구성

이상달 · 조수목 · 박정식 · 한상배¹ · 전영진¹ · 김환목¹ · 김광포*

농촌진흥청 농업과학기술원 응용미생물과
¹생명공학연구소 유전자원센터

Chemical Composition and Biological Activities of Immunostimulants Purified from Alkali Extract of *Poria cocos* Sclerotium

Sang Dal Rhee, Soo Muk Cho, Jeong Sik Park, Sang Bae Han¹,
Young Jin Jeon¹, Hwan Mook Kim¹ and Gwang Po Kim*

Division of Applied Microbiology, National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA,
Suwon 441-707, Korea

¹Genetic Resources Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Taejeon 305-333, Korea

ABSTRACTS: An one percent sodium carbonate extract prepared from sclerotia of *Poria cocos* activated the proliferation of the T lymphocytes as measured by mixed lymphocyte responses (MLR). The active fraction, PCSC22, was isolated from an one percent sodium carbonate extract by a combination of fractionation procedures, including ethanol precipitation and chromatographies on column of DEAE-cellulose and Sephadex G-50. Carbohydrate and peptide contained in PCSC22 were 78 : 22% in ratio. On employing gel filtration high performance liquid chromatography, PCSC22 exhibited a homogeneous peak with an average molecular weight of 8 kDa. The sugar moiety of PCSC22 was composed with mannose (92%), galactose (6.2%) and arabinose (1.3%), which might be indicated as heteromannan. Fifteen amino acids were found in peptide moiety of the polysaccharide and aspartic acid, serine, and valine were major components. PCSC22 activated the primary proliferation of T lymphocytes measured by mixed lymphocyte responses, the antibody production of the B lymphocytes and the secretion of nitric oxide from macrophage cell line, RAW264.7.

KEYWORDS: Immunostimulation, Polysaccharides, *Poria cocos*, Sclerotium

면역계의 활성을 증강시키는 물질들은 여러 동물과 식물에서 발견되고 있는데, 이들은 항암제로써 또는 질병에 대한 저항성을 증가시키는 물질로써 이용되어 왔다. 그 중 표고버섯(*Lentinus edodes*, Tsukagoshi, 1988), 구름버섯(*Coriolus versicolor*, Ng 등, 1993; Wang 등, 1996), 영지버섯(*Ganoderma lucidum*, Miyazaki and Nishizima, 1981) 등 여러 담자균류에서 발견된 물질들은 항암활성이 아주 뛰어나며 그 대부분은 $\beta(1, 3)$ -Glucan인 것으로 밝혀졌다(Kraus and Franz, 1991). 이러한 다당체들은 대부분 암세포에 대한 직접적인 세포독성은 없고 B 림파구의 활성화(Song 등, 1995; Kim 등, 1996), 자연살해세포(Natural killer cell)의 활성증강(Renzo 등, 1991), macrophage의 활성화(Liu 등, 1993; Kurashige 등, 1997), cytokine의 분비(Sakurai 등, 1997) 등 숙주의 전반적인 면역기능을 강화시켜 숙주매개항암효과(Host mediated antitumor activity)를 나타내는 것으로 알려져 있다.

복령(*Poria cocos* fr. Wolf)은 한방에서 옛부터 사용되어 온 생약의 하나로 옛 중국의 문헌이나 동의보감에 이뇨작용, 진정작용, 심장수축강화작용이 있다고 기술되어 있다. 현대에 이르러 생쥐의 복강에 이식된 sarcoma-180 암세포에 대

해 항종양 작용이 있는 β -glucan인 pachyman과 pachyaran (Chihara 등, 1970)이 자실체에서, Ehrlich sarcoma 등에 대하여 항종양 활성을 나타내는 분자량 500 kDa의 단백다당체가 복령의 균사배양체에서 분리되었다(Kanayama 등, 1986b). Yu 등(1996)은 복령균핵을 50% hot ethanol로 추출하여 얻은 추출물이 tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-1, IL-6 등을 활성화 시키고 transforming growth factor- β (TGF- β)의 분비를 저해한다는 보고를 한 바 있다. 국내에서는 이 등(1982)이 Gram(+) 균에 대하여 항균력이 있다고 보고하였고, 이 등(1990)은 sarcoma 180이 이식된 생쥐에 복령의 열수추출액을 복강에 투여한 결과 생쥐의 생존율이 50% 이상 높아진다는 보고를 한 바 있다.

본 연구에서는 복령의 균핵에서 생쥐의 면역활성을 증강시키는 다당체를 추출·정제하여 특성을 연구하여 이물질이 이제까지 보고된 물질과는 다른 구성성분을 지니고 있고 B 림파구, T 림파구 및 macrophage의 면역기능을 증강시키는 효과가 있기에 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

*Corresponding author

공시재료인 복령(복령 1호, ASI13007)의 균핵은 충남 농촌진흥원에서 제공받았고 면역활성증강 시험에 사용된 실험동물은 생명공학연구소(KRIBB)에서 분양받았다. 동물세포의 배양에 필요한 배지는 Gibco 사의 제품을 사용하였다. 모든 동물세포는 10% fetal bovine serum(FBS)과 50 μM β-mercaptoethanol이 포함된 RPMI1640 배지에서 배양되었다. 다당류의 정제에 사용된 수지들은 Pharmacia 사의 제품을, 그 외 시약들은 Sigma 제품을 사용하였다.

시료의 추출 및 정제

복령의 균핵을 Fig. 1과 같은 과정으로 처리하여 추출물을 얻었다. 각각의 추출물은 75% 에탄올로 침전시킨 후 증류수에 녹여 투석한 다음 동결·건조하여 공시시료로 사용하였다. 면역활성이 있는 추출물은 먼저 DEAE-셀룰로오스 크로마토그래피로 1차 정제하였다. 초기의 용출액은 5 mM phosphate 완충액(pH 6.8)을 사용하였고 그 다음 0.1 M, 0.2 M, 0.5 M 농도의 NaCl을 써서 수지에 결합된 물질들을 단계적으로 용출하였다. 이 때 사용된 컬럼의 크기는 φ45×200 mm이고 유속은 40 ml/hr 이었다. 1차 정제된 분획들 중 면역활성이 높은 것은 Sephadex G-50 gel filtration 크로마토그래피로 2차 정제하였다. 용매는 2차 증류수를 사용하였고, 컬럼의 크기는 φ28×1200 mm이고 유속은 15 ml/hr 이었다.

탄수화물 및 단백질의 정량

탄수화물의 정량은 phenol-sulphuric acid 방법(Dubois 등, 1956)을 사용하여 490 nm에서의 흡광도를 측정하였으며 표준물질로는 D-glucose를 사용하였다. 단백질 정량은 Bradford 방법(Bradford, 1976)에 따라 Bio-Rad protein assay kit (California, U.S.A.)를 사용하여 595 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 bovine serum albumin(BSA)을 사용하

였다.

다당체를 구성하는 당과 아미노산 분석 및 분자량 측정

다당체의 당분석에는 sugar alditol acetate 방법(Sawardecker 등, 1965)을 사용하였다. 다당류를 2 N trifluoro acetic acid (TFA)를 써서 단당으로 가수분해한 후 sodium borohydride, pyridium, acetic anhydride를 써서 아세틸유도체를 만들었다. 아세틸유도체를 클로로포름에 녹인 후 Hewlett Packard 사의 5890 series II* 가스 크로마토그래피(column; Supelco-2380 capillary column, carrier 가스; 헬륨)로 분석하였다.

아미노산 구성분석에는 Cho 등(1995)에 의해 기술된 방법을 사용하였다. 시료를 6 N HCl로 110°C에서 24시간 동안 가수분해한 후 phenylisothiocyanide로 phenylthiocarbamoyl 유도체를 만들었다. 이 유도체들의 양은 Pico-Tag HPLC column(φ3.9×150 mm)(Waters, U.S.A.)를 이용하여 측정하였다.

분자량 측정에는 Tosho 사의 TSK-GMPW_{XL} gel permeation column(φ7.8×300 mm)을 이용하여 GP-HPLC으로 분자량을 결정하였다. 다당체의 검출에는 RI 검출기(Waters 410)를 사용하였고 표준물질로 dextran을 사용하였다.

다당체의 면역증강활성검정

T 임파구에 대한 활성은 혼합임파구 반응으로 측정하였다. MHC 형이 다른 두 종류의 생쥐(BDF1(H-2d)과 B6C3F1(H-2k))로부터 무균적으로 비장세포를 분리하고 각각의 세포를 2.5×10⁶ cells/ml 농도로 희석한 후 96 well 세포배양기에 0.1 ml/well 씩 주입하여 섞었다. 그 다음 각 well에 여러 농도로 희석한 시료들을 직접 처리한 후 세포용액을 37°C, 5% CO₂ 환경에서 3일간 배양하면서 배양이 끝나기 18시간 전에 방사성 동위원소로 표지된 [³H]-Thymidine을 1 μCi/well의 농도로 처리하여 세포내의 DNA에 표지된 동위원소의 양을 scintillation counter로 측정하여 면역세포 성장의 척도로 삼았다(Sprent 등, 1992).

B 임파구 활성은 *in vitro* polyclonal activation 시험으로 측정하였다. 생쥐의 비장세포를 5×10⁶ cells/ml 농도로 0.5 ml 씩 48 well 세포배양기에 분주하였다. 시료를 처리한 세포용액을 10% O₂, 7% CO₂ 83% N₂의 비율로 조성된 공기를 4~7 psi의 압력으로 불어넣은 대기환경 조건에서 3일간 배양한 다음 세포를 다시 회수하였다(Mishell and Dutton, 1967). 회수된 세포용액 200 μl에 면양적혈구(SRBC) 40 μl와 8 μl의 보체(complement)를 혼합하여 37°C로 조성된 수조에서 1시간 동안 배양한 후 원심분리하여 얻은 상등액 내의 헤모글로빈의 양을 ELISA reader (Spectra MAX340, Molecular Devices, U.S.A.)로 540 nm에서 측정하여 용혈되는 적혈구량을 표시하였다(Han 등, 1996). B 임파구세포를 활성화하는 표준물질로 lipopolysaccharide(LPS)를 사용하였다.

Macrophage 활성화에 미치는 영향은 활성화 된 macrophage 세포에서 분비되는 일산화 질소의 양으로 측정하였다. 생쥐

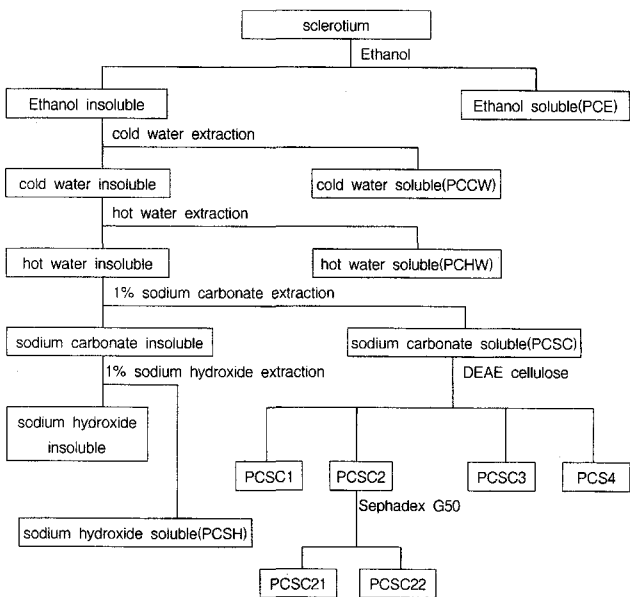


Fig. 1. Flow chart for fractionation of polysaccharide from the sclerotium of *Poria cocos*.

의 macrophage에서 유래한 세포주인 RAW264.7 세포주를 96 well 세포배양용기에 5×10^5 cells/ml로 희석하여 0.1 ml 분주한 후 버섯 추출물을 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양기간 동안 macrophage에서 분비된 일산화질소의 양을 세포배양액과 1% sulfanilamide와 0.1% N-(1-naphthylene) diamine dihydrochloride가 포함된 Griess 용액을 micro-titration plate에 동량씩 섞은 후 ELISA reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다(Grisham 등, 1996). 이 때 일산화질소의 표준물질로는 질산나트륨을 사용하였다.

결과 및 고찰

먼저 복령의 균핵을 Fig. 1과 같은 일련의 과정을 거쳐 에탄올(PCE), 냉수(PCCW), 열수(PCHW), 탄산나트륨(PCSC), 수산화나트륨(PCSH) 등 모두 5종의 추출물을 얻었다. 추출물들의 면역증강활성을 측정하기 위하여 각각의 추출물들을 phosphate buffered saline(PBS)에 녹인 다음 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 최종농도가 되도록 생쥐의 비장세포배양액에 직접 처리하여 T 임파구의 성장에 대한 영향을 나타내는 혼합임파구 반응을 측정하였을 때, 5종의 추출물 모두 생쥐의 혼합임파구 반응을 증강시켰다. 추출물들의 면역증강활성은 낮은 농도(1 $\mu\text{g/ml}$)와 높은 농도(100 $\mu\text{g/ml}$)에서는 서로 간에 큰 차이를 나타내지 않아 10 $\mu\text{g/ml}$ 처리구에서 혼합임파구 반응을 서로 비교하였다. 이 때 탄산나트륨 추출물(PCSC) 처리구는 대조구에 비해 혼합임파구 반응을 3.4배 이상, 다른 추출물 처리구들은 1-1.8배 정도의 증강활성을 보였다 (data not shown). 면역증강활성이 제일 높게 나타난 탄산나

트륨추출물을 DEAE 셀룰로오스 크로마토그래피(pH 6.8)로 정제시, DEAE 이온교환수지에 결합하지 않는 첫 번째 분획(PCSC1)은 단백질이 거의 존재하지 않는 순수 탄수화물이 주성이었다. 한편, DEAE 이온교환수지에 결합한 물질들을 0.1, 0.2, 0.5 M 농도의 NaCl로 단계적으로 용출시켰을 때, 각 분획들(PCSC2, 3, 4)의 단백질 함량은 NaCl의 농도가 높을수록 많아지는 경향을 나타내었고 이 분획들의 면역증강활성을 혼합임파구 반응으로 다시 검정해본 결과 0.1 M NaCl로 용출된 PCSC2 분획의 면역활성증강 효과가 높게 나타났다. 얻어진 PCSC2를 gel filtration-HPLC를 수행하여 분석한 결과 분자량이 비교적 넓은 범위에 분포하고 있었고 평균분자량은 약 10 kDa 이었다. 이 결과를 토대로 PCSC 2를 Sephadex G 50 수지를 사용하여 2차 정제하여 다시 두 개의 분획(PCSC21 과 PCSC22)을 얻었다(Fig. 2). 이들 중 PCSC22의 함량이 많았으며 두 분획들 간의 면역증강활성은 비슷하여 물질의 크기가 물질의 활성에는 큰 영향을 주지 않는다는 것을 알 수 있었다(Table 1).

Table 1. Mixed lymphocyte responses of active polysaccharide fractions from *Poria cocos*

Treatment and concentration($\mu\text{g/ml}$)	Mixed lymphocyte responses(DPM/well) ¹	% of Control
Control	22698.3 \pm 2325.3	
PCSC	1	19271.0 \pm 1957.2
	10	26746.0 \pm 1151.7
	100	40057.5 \pm 3034.7
PCSC2	1	28999.8 \pm 1713.9
	10	38852.2 \pm 1742.4
	100	51188.5 \pm 1603.2
PCSC 21	1	42988.0 \pm 6603.8
	10	53805.7 \pm 1743.9
	100	54269.2 \pm 3789.2
PCSC 22	1	40380.2 \pm 4734.6
	10	50946.2 \pm 3696.6
	100	56943.7 \pm 6163.3

¹value represent the mean \pm SD of quadruplicated determinants
*P<0.05 or **P<0.01 as determined in t-test compared to control

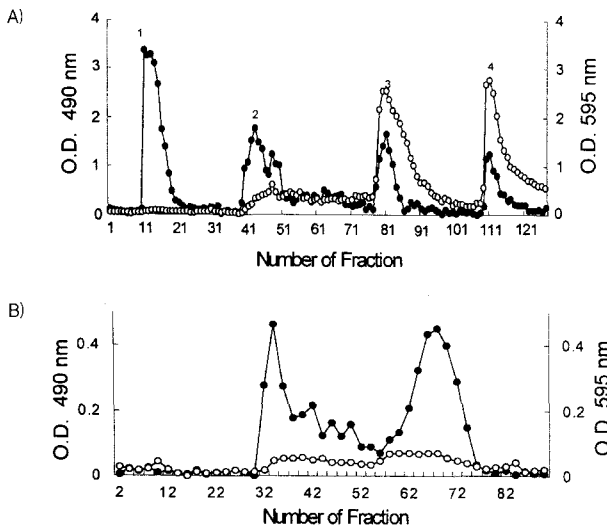


Fig. 2. Purification of immunostimulating polysaccharide from 1% sodium carbonate extract of sclerotium of *Poria cocos*.
A) Elution profile of DEAE-cellulose column chromatography(pH 6.8) of 1% sodium carbonate extracts. Peak 1: PCSC1, Peak 2: PCSC2, Peak 3: PCSC3, Peak 4: PCSC4
B) Elution profile of Sephadex G50 gel filtration chromatography of PCSC2
-●-: sugars(O.D. 490 nm), -○-: proteins(O.D. 595 nm)

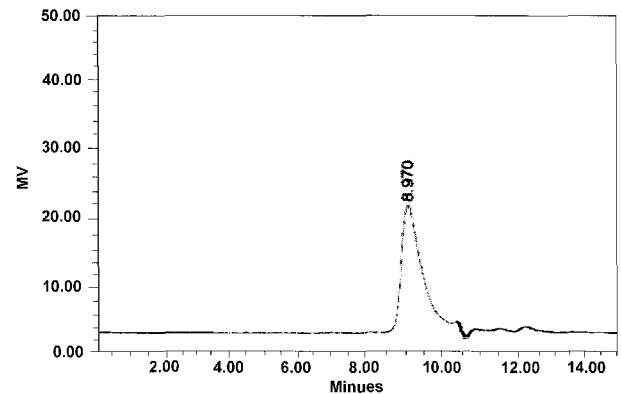


Fig. 3. Gel permeation chromatogram of HPLC of PCSC22.

Table 2. Some properties of active polysaccharides purified from sclerotia of *Poria cocos*

Polysaccharides	Component ratio(%)		Component of Sugars(%)						Average molecular weight(Da)
	Protein	Total sugar	Man	Ara	Fuc	Gal	Glc	Rha	
PCSC	49.2	51.8	33.8	trace	trace	15.0	30.1	21.4	-
PCSC2	23.7	76.3	71.4	trace	8.4	trace	21.9	2.5	10,000
PCSC21	24.0	76.0	90.9	-	-	-	9.1	trace	30,000
PCSC22	21.9	78.1	91.6	1.3	trace	6.2	trace	-	8,000

Man; mannose, Ara; arabinose, Fuc; fucose, Gal; galactose, Glu; glucose, Rha; rhamnose

Table 3. Amino acids composition of PCSC22

Amino acid	Contents(%)
Aspartate	19.4
Glutamate	7.2
Serine	15.0
Glycine	7.6
Threonin	7.1
Alanine	10.9
Proline	6.3
Tyrosine	1.2
Valine	13.3
Methionin	2.0
Cysteine	2.9
Isoleucine	3.4
Leucine	4.2
Phenylalanine	2.6
Lysine	2.3

한편 PCSC22의 여러 가지 화학적 특성을 조사하였다. PCSC22는 gel filtration HPLC peak 양상으로 볼 때 비교적 균일한 크기를 가진 물질들로 이루어져 있다는 것을 알 수 있었으며(Fig. 3), 이 때 dextran을 표준물질로 사용하여 측정된 PCSC22의 분자량은 약 8 kDa으로 다당류로서는 분자량이 작았다. 활성다당의 구성성분은 당이 78.2%, 단백질이 21.8%로 이루어진 단백질다당체 이었다. 단백질다당체의 당 부분을 이루는 당들은 mannose가 90% 이상 함유되어 있었고, galactose(6.2%)와 arabinose(1.3%) 등이 소량 포함되어 있는 heteromannan 이었다(Table 2). 단백질다당체의 단백질 부분을 이루는 아미노산의 종류는 모두 15종이었으며, 그 중 aspartic acid가 19.4%로 가장 많았고, 그 다음은 serine과 valine의 순으로 이들 3종의 아미노산이 전체의 47.7%를 차지하였다(Table 3). Chihara 등(1970)은 복령의 자실체에서 분리한 항암물질이 (1, 3)- β -글루칸이라고 보고하였으며, Kanayama 등(1986a)은 복령 균사체의 강알칼리(1 N KOH) 추출액에서 정제한 항암성분은 분자량 약 500 kDa의 단백질다당체로써 β -글루칸으로 glucose가 주성분이며, 아미노산은 glutamic acid와 aspartic acid가 주성분을 이루고 있다고 보고하였다. 본 연구에서 복령 균핵의 약알칼리 추출물로부터 분리된 면역활성 증강물질은 단백질다당체로서 이전의 물질과는 달리 mannose가 주성분인 mannan이었고, 아미노산 구성에서도 상이하였다. Kanayama 등이 균사배양체에서

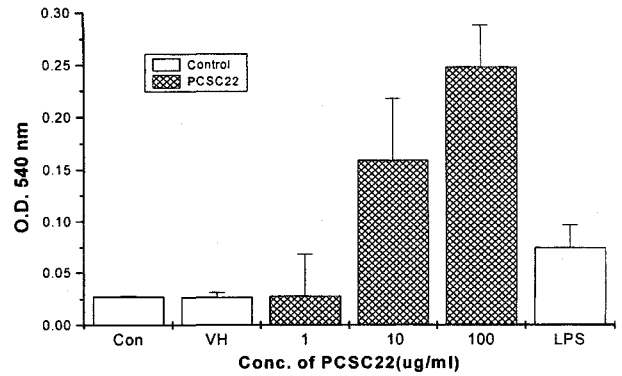


Fig. 4. The effects of PCSC22 on the antibody production activities of B lymphocytes. Con: Control, VH: Vehicle(Saline), LPS: lipopolysaccharide(6.5 µg/ml)

분리한 항암물질과 본 실험에서 얻은 물질의 구성성분이 다른 것은 추출방법에서의 차이 때문이 아니라 균사체와 균핵간, 또는 배양조건에 따른 구성성분의 차이 때문에 나타난 것으로 생각된다.

정제된 PCSC22가 T 임파구 이외의 면역계를 이루는 다른 요소들의 활성화에 미치는 영향을 조사하였다. 먼저 B 임파구의 항체형성능에 대한 영향을 *in vitro* polyclonal activation 시험으로 조사한 결과 PCSC22는 1 µg/ml의 농도로 처리하였을 때에는 B 임파구의 항체형성능에 영향을 주지 못하였으나, 10 µg/ml 이상의 농도처리구에서는 B 임파구의 활성을 높이는 작용을 가진 것으로 알려진 LPS(6.5 µg/ml) 처리구 보다 높은 증강활성을 나타내었다(Fig. 4). 이 결과로 PCSC22가 T 임파구가 주요 역할을 담당하는 세포매개성 면역(cell mediated immunity) 뿐만 아니라 B 임파구가 역할을 하는 체액성면역(humoral immunity)도 함께 증강시킨다는 것을 알 수 있었다. Macrophage의 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 생쥐의 macrophage 세포주인 RAW264.7의 배양액에 다당체를 직접 처리하여 일산화질소의 세포외로의 분비정도를 측정하였다. 다당체를 처리하지 않은 대조구에서는 소량의 일산화질소만이 분비되었으나 10 µg/ml 이상의 다당체 처리구에서 대조구에 비해 15배 이상으로 다량의 일산화질소가 분비되는 것으로 보아 PCSC22는 macrophage를 활성화시키는 효과도 가지고 있다는 것을 알 수 있었다(Fig. 5). Macrophage가 활성화되면서 분비하는 일산화질소는 숙주의 특이적 면역반응의 마지막 단계로써, 또는 항원에 대한 비 특이적 면역반응으로써 여러 가지 세균, 바이러스, 기

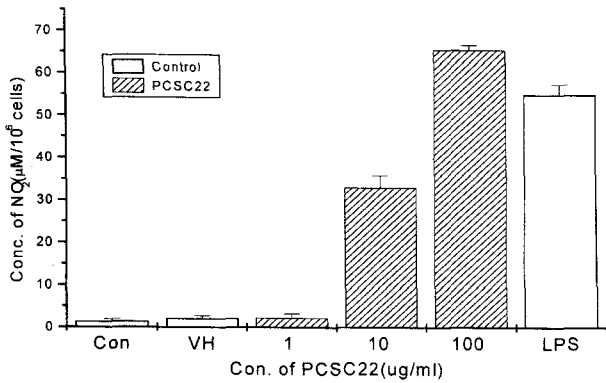


Fig. 5. The effects of PCSC22 on nitric oxide secretion from mouse macrophage cell line RAW264.7. Con: Control, VH: Vehicle(Saline), LPS: lipopolysacchride(1 µg/ml)

생충들과 암세포에 대한 세포독성을 나타내는데 중요한 매개체 역할을 하고 있는 물질로 알려져 있다(Schmidt and Walter, 1994).

따라서 본 시험에서 얻어진 물질은 지금까지 다른 버섯들에서 추출된 여러 다당류들과 마찬가지로 숙주의 전체적인 면역기능을 증강시키는 물질로 항암보조제로써 활용될 수 있을 것으로 예상된다.

적 요

복령 균핵을 여러단계로 추출하여 얻은 다당류들의 면역증강활성을 생쥐 비장세포에서 혼합임파구 반응으로 측정하였다. 이들 중 탄산나트륨 추출물의 활성이 가장 높았고 이를 DEAE-셀룰로오스와 Sephadex G-50 크로마토그래피로 면역활성증강물질을 정제하여 PCSC22를 얻었다. PCSC22는 탄수화물과 단백질이 약 78:22의 비율로 이루어진 단백다당체이었고 GP-HPLC로 측정된 평균분자량은 약 8 kDa 이었다. PCSC22 분획은 단당들의 구성성분들 중 mannose(92%)가 가장 많고 galactose(6.2%)와 약간의 arabinose(1.3%)도 함유하고 있는 heteromannan 이었다. 단백질 부분은 총 15종의 아미노산으로 구성되어 있었고 그 중 aspartic acid, serine, valine 등의 합이 약 47%로 주요 성분이었다. PCSC22는 B 임파구의 항체형성능력과 macrophage의 일산화질소 분비능력을 함께 증강시켰다.

감사의 글

이 연구는 농촌진흥청이 지원하는 박사 후 연구과정 중에 연구된 것임. 복령의 균핵을 제공해 주신 충남농촌진흥원 이희덕 박사님께 감사드립니다.

참고문헌

이국성, 이민웅, 이지열. 1982. 복령의 항균력에 관한 연구. 한국균학회지 **10**: 27-31.

- 이복임, 홍인표, 김동원, 이민웅. 1990. 복령 및 인삼추출물이 sarcoma 180 mouse의 혈액상에 미치는 영향. 한국균학회지 **18**: 218-224.
- 조수목, 이재훈, 한상배, 김환목, 유승현, 유익동. 1995. *Formitella fraxinea*로부터 분리한 면역활성다당류-중성염용액 추출 다당류의 특성. 한국균학회지 **23**: 332-339.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Chihara, G., Hamura, J., Maeda, Y., Arai, Y. and Fukumoto, F. 1970. Antitumor polysaccharide derived chemically from natural glucan(pachyman). *Nature* **225**: 943-944.
- Dubois, M., Gills, K. A., Hamilton, J. K., Robers, P. A., and Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**: 350-356.
- Grisham, M. B., Johnson, G. G., Lancaster, J. R. Jr. 1996. Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluid. *Methods Enzymol.* **268**: 237-246.
- Han S. B., Oh, G. T., Yun, Y. P., Min, B. K., Hyun, B. H., and Kim, H. M. 1996. Rapid determination of *in vivo* and *in vitro* antibody responses by suspension hemolytic assay. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **36**: 33-40.
- Kanayama, H., Togami, M., Adachi, N., Fukai, Y., and Okumoto, T. 1986a. Studies on the antitumor active polysaccharide from the mycelia of *Poria cocos*, Wolf III: Fractionation and purification of antitumor polysaccharide H11. *Yakugaku Sashhi* **106**: 199-205.
- Kanayama, H., Togami, M., Adachi, N., Fukai, Y., and Okumoto, T. 1986b. Studies on the antitumor active polysaccharide from the mycelia of *Poria cocos*, Wolf III: Antitumor activity against mouse tumor. *Yakugaku Sashhi* **106**: 307-312.
- Kim, H. M., Han, S. B., Oh, G. T., Kim, Y. H., Hong, D. H., Hong, N. D., and Yoo, I. D. 1996. Stimulation of humoral and cell mediated immunity by polysaccharidea from mushroom *Phellinus linteus*. *Int. J. Immunopharmacol.* **18**(5): 295-303.
- Kraus, J. and Franz, G. 1991. $\beta(1, 3)$ -Glucan: Antitumor activity and Immunomodulation, In *Fungal Cell Wall and Immune Response*(eds Latge, J.P., and Boucias). pp. 431-444 Springer-Verlag, Berlin.
- Kurashige, S., Akuzawa, Y., and Endo, F. 1997. Effects of *Lentinus edodes*, *Grifola frondosa* and *Pleurotus ostreatus* administration on cancer outbreak, and activities of macrophages and lymphocytes in mice treated with a carcinogen, B-butyl-N-butanolnitrosoamine. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **19**(2): 175-183.
- Liu, W. K., Ng, T. B., Sze, S. F., and Tsui, K. W. 1993. Activation of peritoneal macrophages by polysaccharopeptide from the mushroom, *Coriolus versicolor*. *Immunopharmacology* **26**(2): 139-146.
- Mishell, R. I., and Dutton, R. W. 1967. Immunization of dissociated spleen cell cultures from normal mice. *J. Exp. Med.* **217**: 423-433.

- Miyazaki, T., and Nishizima, M. 1981. Studies on fungal polysaccharide XXVII, Structural examination of a water soluble antitumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum*. *Chem. Pharm. Bull.* **29**(12): 3611-3516.
- Ng, T. B. 1998. A review of research on the protein bound polysaccharide (polysaccharopeptide, PSP) from the mushroom *Coriolus versicolor* (Basidiomycetes, Polyporaceae). *Gen. Pharmacol.* **30**(1): 1-4.
- Renzo, L. D., Yefenof, E., and Klein, E. 1991. The function of human NK cells in enhanced by β -glucan, a ligand of CR 3(CD11b/CD18). *Eur. J. Immunol.* **21**: 1755-1758.
- Sawardeker, J. S., Sloneker, J. H., and Jeanes, A. 1965. Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetate. *Anal. Chem.* **37**: 1602.
- Schmidt, H. H. H. W., and Walter, U. 1994. NO at work. *Cell* **78**: 919-925.
- Seng, K. S., Cho, S. M., Lee, J. H., Kim, H. M., Han, S. B., Ko, K. S., and Yoo, I. D., 1995. B-lymphocyte stimulating polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. *Chem. Pharm. Bull.* **43**(12): 2105-2108.
- Sprent, J. 1992. Mixed lymphocyte reaction(MLR). In *Encyclopedia of Immunology*(eds Roitt, I. M. and Delves, P. J.). pp. 1079-1082 Academic Press. San Diego.
- Tsukagoshi, S. 1988. Lentinan-A new polysaccharide for the treatment of cancer. *Drugs of Today* **24**: 91-95.
- Wang, H. X., Ng, T. B., Liu, W. K., Ooi, V. E., and Chang, S. T. 1996. Polysaccharide-peptide complexes from the cultured mycelia of the mushroom *Coriolus versicolor* and their culture medium activate mouse lymphocytes and macrophages. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **28**(5): 601-607.
- Yu, S. J., and Tseng, J. 1996. Fu-ling, a chinese herbal drug, modulates cytokine secretion by human peripheral blood monocytes. *Int. J. Immunopharmacol.* **18**(1): 37-44