

상황버섯 (*Phellinus linteus*) 자실체 분비물의 면역활성 및 항암효과

¹한국화학시험연구원, ²단국대학교 미생물학과, ³신흥대학 임상병리과, ⁴국립암센터

맹은호¹ · 이연태² · 조규봉³ · 홍승희⁴

Immunomodulating and Antitumor Activities of Exo-secretion from *Phellinus linteus*

Eun-Ho Maeng¹, Yun-Tai Lee², Kyu-Bong Cho³ and Seung-Hee Hong⁴

¹Korea Testing and Research Institute for Chemical Industry, ²Department of Microbiology, Dankook University, ³Department of Clinical Pathology, Shinbeung College, ⁴National Cancer Center

ABSTRACT

Background: The chemical characteristics of the exo-secretion from *Phellinus linteus* (referred to as exo-secretion) including the compositions of amino acids and monosaccharides were investigated. In addition, cytotoxicity of the exo-secretion on 5 tumor cell lines derived from human cancers and its antitumor activity against ascitic sarcoma-180 cells were examined. **Methods:** The antitumor activity of exo-secretion from *Phellinus linteus* was determined by measuring parameters including tumor weight, life span of mice, chemotatic activity of leukocytes, counts of immune cells, and activity of cytokines. **Results:** The exo-secretion from *Phellinus linteus* showed no direct cytotoxicity to the five tumor cell lines tested, but it had a strong antitumor activity against sarcoma-180 cells in ICR mice as measured by tumor weight and life span of mice. The exo-secretion stimulated the chemotaxis of leukocytes and production of immune cells and cytokines. **Conclusion:** These results suggest that the exo-secretion from *Phellinus linteus* do not act as a direct cytotoxic substance to cancer cells but as an immunomodulator. (**Immune Network 2002;2(2):115-124**)

Key Words: *Phellinus linteus*, antitumor, cytotoxicity, cytokines, immunomodulator

서 론

본 실험에 사용한 상황버섯(*Phellinus linteus*)은 소나무 비늘버섯과(*Hymenochaetaceae*)의 목질진흙버섯속(*Phellinus linteus*)(1)에 속하는 흰색 부후균이다. 이 버섯은 문헌에 따라 차이는 있으나 중국에서는 상이, 상신이라고도 하여 주로 뽕나무와 활엽수의 줄기에 자생하는 것으로 알려져 있다. 고서 봉황록에 '늙은 뽕나무에 달린 황색버섯은 죽은 사람을 살리는 불로초이다.'라고 쓰여져 있는 버섯의 황제이다.

상황버섯은 뽕나무의 그루터기에 자생하는 노란색의 버섯으로 그 모양은 초기에는 노란 진흙덩이가 뭉친 것 같은 형태로 유지되다가 다 자란 후의 모습은 나무그루

터기에 헛바닥을 내민 모습이어서 수설(樹舌)이라고도 한다. 헛바닥 같은 형태의 윗부분이 진흙과 같은 색깔을 나타내기도 하고 감나무의 표피와 같이 검게 갈라진 모습 등으로 나타나기도 한다. 헛바닥 같은 모습의 아래 부분은 노란 웅단 같은 형태의 아름다운 노란 덩어리로 윗 부분은 검은색 또는 진흙색이다.

미루나무, 오리나무, 백양나무, 밤나무 등 다른 활엽수에서도 야생되며 또한 상황버섯(*Phellinus linteus*)은 3~4년 동안 영년으로 성장되어 갓의 두께가 두꺼운 것일수록 가치가 크다. 이와 같은 상황버섯은 여러가지 종류가 있으며 그중에서 중국이나 일본에서 *Phellinus igniarius* (말뚝 진흙버섯)와 *Phellinus linteus* (목질 진흙버섯)의 두 종류가 가장 많이 알려져 있고 약효도 높이가 평가되어 있다. 이들에 대한 종류별 특징, 약효 분류 및 형태 등에 대해서는 체계적으로 통일되어 있지 않아 나라에 따라 견해 차이가 있으며 *Phellinus igniarius*는 여러가지 학명으로 불리고 있다.

책임저자 : 맹은호, 한국화학시험연구원

☎ 415-871, 경기도 김포시 월곶면 고막리 7-6번지
Tel: 031-999-3181, Fax: 031-999-3001
E-mail: mvirus@kotric.or.kr

이 버섯은 동의보감, 본초강목, 중약대사전 등 한방에서는 자궁출혈 및 대하, 월경불순, 장출혈, 오장 및 위장 기능 활성화, 해독작용 그리고 관절염 등에 귀하게 사용되어 온 약재이다. 뿐만 아니라 *Phellinus linteus* (상황버섯 또는 목질 진흙버섯)의 자실체 열수 추출물은 소화기계통의 암에 대한 저지효과(2)와 간암 환자 절제 수술 후 화학요법 병용에 의한 면역기능 향진이 있는 것으로 나타나 많은 연구가 진행되어 왔으며, 군사체 배양 추출물로부터 면역활성(3) 및 항암활성(4)도 입증되었다. 상황버섯에서 추출된 다당체의 항종양작용에 대한 기작은 확실히 밝혀지지 않았으나, 이들은 주로 대식세포 활성화와 보체계를 포함한 면역체계를 활성화시켜 항종양 효과를 나타내는 것으로 보고되고 있다(5). 특히, Okuda 등(6)은 항종양작용과 혈청의 용혈작용간에 밀접한 관계가 있음을 입증하여 보체계 성분의 활성화가 항종양 작용에 관여함을 관찰하였다.

이와 같이 상황버섯의 자실체와 군사체 배양액에서 추출된 다당체의 항종양 및 면역기능 향진효과에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 또한 최근에는 표고, 팽이, 양송이, 뽕나무버섯 등 다수의 버섯 배양 시 분비되는 분비물(Exo-secretion)에 존재하는 다당체가 항바이러스 및 면역 증강 효과가 있다는 것이 보고되었다. 그러나 상황버섯이 배양 시 분비하는 분비물의 다당체에 대한 연구는 매우 미약한 실정이다.

따라서 본 연구는 상황버섯의 분비물에 대한 항암효과 및 면역활성을 관찰하고자 마우스(ICR계)의 피하 및 복강에 sarcoma-180 복수암 세포를 이식시키고, 상황버섯의 분비물을 경구 투여한 후, 생존일수, 고형암 저지율, 백혈구의 화학주성능, 면역세포의 증식여부, cytokine 생성 및 암세포에 대한 세포독성능을 관찰하고자 수행하였다.

재료 및 방법

상황버섯 종균 및 자실체 배양. 본 실험에 사용한 버섯 균주(*Phellinus linteus*)는 연암대학의 이대진 교수로부터 분양 받았으며 종균은 PDA (Potato dextrose agar, Difco) 배지상에 접종하여 계대배양하면서 보관하였고, 실험에 사용하기 위해서는 PDB (Potato dextrose broth, Difco) 배지에 접종하여 26°C, 상대습도 90% 이상에서 18일간 배양하였다.

내열성 포트에 뽕나무 톱밥 1000 g과 미강(5%)을 혼합한 후 121°C에서 90분간 멸균하였다. 이것을 방냉실에서 냉각 후 PDB에서 배양한 균주를 멸균된 톱밥 배지에 접종하였다. 접종한 것을 25°C 배양실에서 약 3~4주 배양하였다.

톱밥 배지 위에 군사체가 황갈색을 나타내며 충분히 활착하였을 때 이 군사체를 새로운 뽕나무 톱밥 배지에

접종하여 29~30°C 배양실에서 배양하였다. 약 2~3주 동안 온도(25°C)와 습도(90% 이상)를 유지시켜 주면 원기가 형성되기 시작하는데, 처음에 생성된 자실체는 제거하고 2차적으로 생성된 자실체를 충분히 환기시키며 1년 이상 키웠다. 이렇게 자실체를 배양하는 도중에 자실체 표면에 분비되는 갈색의 액을 멸균된 용기에 모아 동결 건조시킨 것을 상황버섯의 분비물로 삼아 냉각기에 보관하면서 실험에 사용하였다.

당 조성 분석. 재배 시 생성되는 상황버섯 분비물을 HP-20 resin으로 채워진 칼럼을 통과시켜 다당체 성분을 분획하였다. 분획 후 여액을 모아 증류수 속에서 48시간 투석한 후, 투석내 액을 동결건조하여 분비물의 다당류를 얻었다.

Rhamnose, arabinose 및 xylose 분석의 전처리는 1 mg/ml 농도로 용해시킨 다음 100µg을 건조하여 2 M trifluoroacetic acid (TFA)에 용해시킨 후 100°C에서 4시간 가열하여 완전 가수분해하였다. 가수분해 후 trifluoroacetic acid를 감압 증발하여 건조시킨 후 다시 증류수 100µl에 용해시킨 다음 30µl를 분석하였다. 또한 그의 단당성분 분석을 위해서는 1 mg/ml 농도로 용해시킨 다음 100µg을 건조하여 amino sugar는 6N HCl로 2시간, neutral sugar는 2M TFA로 4시간 가열하여 가수분해하였다. 가수분해 후 trifluoroacetic acid를 감압 증발하여 건조시킨 후 증류수 100µl에 용해시킨 다음 10µl를 HPLC로 분석하였다.

단백다당류의 아미노산. 동결 건조한 단백다당류 1 g을 시험관에 넣고 6N HCl 5 ml을 가하고 산화방지를 위하여 질소가스를 5분간 불어준 뒤 마개를 꼭 닫고 110°C heating block에서 24시간 가수분해시켰다. 가수분해 후 방냉하고 시료 100µl를 취해서 heating block에서 HCl를 제거하였다. 이 과정을 2회 반복하였으며, 이 때 희석을 위하여 완충용액을 사용하였다. 희석 완충용액으로 정확히 희석한 후 0.2µm filter로 처리한 후 시료를 준비하였다.

기기분석조건 Ninhydrin분석법-Hydro lysate program (Total amino acid)으로 Cation separation column (150×4 mm)을 사용하였다.

세포독성시험. 상황버섯 분비물에 대한 세포독성시험은 Sulforhodamine-B (SRB) assay법(7)을 사용하였다.

사람 폐암 세포주인 A549, 자궁암 세포주인 SK-OV-3, 피부암 세포주인 SK-MEL-2, 결장암 세포주인 HCT 15 그리고 중추신경계 세포주인 XF 498 등에 대한 세포독성을 측정하였다.

즉 trypsin-EDTA용액으로 처리한 세포부유물에 무균적으로 첨가하여 측정하였다. 먼저 A549와 HCT15는 5.0×10^3 cells/ml, SK-MEL-2와 XF498은 1.0×10^4 cells/ml, SK-OV-3은 2.0×10^4 cells/ml이 되도록 조정하여 150µl

씩을 96-well flat-bottom microplate (Falcon)에 분주하였다. 분주된 세포들을 37°C, 5% CO₂ 배양기 내에서 24시간 배양하여 바닥면에 부착시킨 후 aspirator로 배지를 제거하였다. 신선한 배지에 상황버섯 분비물을 6가지 농도 (0.003, 0.03, 0.3, 3.0, 30.0, 300.0 µg/ml)의 log-dose로 희석하여 암세포가 들어 있는 well에 각각 100 µl씩 3배수로 넣어주고 48시간 배양하였다. 시험액을 가하기 전에 0.22 µm filter로 여과하여 시험액의 무균상태를 유지하였다. 시험액과 함께 48시간 배양이 끝난 후, 각 well의 배지를 제거하고 10% trichloroacetic acid (TCA)를 well 당 20 µl씩 위에서 천천히 가해 주고 TCA가 바닥에 가라앉도록 잠시 기다린 후 조심스럽게 4°C에서 1시간 동안 방치하여 세포들을 plate의 바닥면에 고정시켰다.

세포의 고정이 끝난 후 plate를 증류수로 5~6회 세척하여 남아 있는 TCA액을 완전히 제거하고 실온에서 남은 물기가 없도록 건조시켰다. 완전히 건조된 plate는 well 당 250 µl의 1% acetic acid 용액에 0.4% SRB를 녹인 염색 용액 100 µl을 첨가하여 30분간 세포를 염색하고 다시 1% acetic acid 용액으로 5~6회 세척하여 세포에 결합하지 않은 SRB를 제거하였다.

염색된 세포 plate들은 다시 실온에서 건조시킨 후 대조군의 흡광도(optical density) 값이 520 nm에서 0.8~1.0 A (흡광도) 값이 되도록 100 µl의 10 mM Tris base [tris (hydroxymethyl) aminomethane] 용액으로 SRB dye을 잘 용해한 다음 MR 700 micro reader (Dynatech, LAB, 미국)로 520 nm에서 흡광도를 측정하여 IC₅₀ 값을 구하였다.

다형핵백혈구의 화학주성능.

실험동물: 본 실험에 사용한 마우스는 한국화학연구소 안전성연구센터에서 3~4주령, 체중 21±2 g의 마우스 (International Cancer Research, U.S.A)를 구입하여 각 실험군마다 각각 동수(15마리)를 사용하였으며, 실험 당일 까지 고형사료(항생제 무첨가, 삼양사료 Co.)와 물을 충분히 공급하고 실온 23±2°C, 상대습도 55±3%를 유지하며 1~2주일간 동물실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

복수암 세포주: 본 실험에 사용한 암세포주는 마우스복수암세포(Sarcoma-180)로 가톨릭 의과대학 미생물교실에서 분양받아 사용하였다.

분양받은 복수암 세포(Sarcoma-180)를 무균적으로 채취한 후 원심분리기(Hanil, union55R, 한국)를 이용하여 세포배양액[RPMI; Roswell Park Memorial Institute, 1640 (Ca²⁺, Mg²⁺ free, GIBCOBRL Cat. No. 31800-022, 미국)]으로 1500 rpm에서 15분간 2회 원심세척한 후 1×10⁶ cells/ml의 세포농도로 조정하여 0.2 ml씩 마우스 복강에 15일 간격으로 계대 이식하여 사용하였다.

마우스의 복강에서 얻은 sarcoma-180 복수암 세포를 세포배양액(RPMI 1640)으로 1500 rpm에서 15분간 2회

원심세척 후 5.0×10⁶ cells/mouse로 조정하여 마우스의 서혜부에 피하 주사하였고, 5.0×10⁵ cells/mouse로 조정하여 마우스의 복강에 주사하였다.

분비물 제조 및 투여방법: 본 실험에 사용한 상황버섯 (*Phellinus linteus*) 분비물은 동결 건조시킨 후 생리식염수로 용해하여(125 mg/kg) membrane filter (0.45 µm)로 여과한 다음 사용하였다.

마우스(ICR계) 암컷 15수씩 고형암과 복수암 유발 마우스에 상황버섯 분비물을 투여한 시험군과 대조군으로 나누어 시험하였으며, 시험군은 분리된 각 군에 상황버섯 분비물을 생리식염수에 용해하여 125 mg/kg을 경구로 7일간 전투여한 뒤 암세포 이식 후 23일 동안 경구투여하였다. 대조군은 동량의 생리식염수를 같은 시간에 같은 양으로 경구투여하였다.

백혈구의 분리: 백혈구의 분리 및 유주능의 실험은 이 등(8)의 방법을 사용하였다.

각 군의 마우스에서 10 ml의 혈액(Heparin 10 units/ml)을 무균적으로 채혈하였고, 채혈된 혈액을 50 ml 시험관에 미리 분주해 둔 동량의 dextran (3%, M.W. 266,000, SIGMA) 위에 첨가한 후, 37°C에서 1시간 방치하였다. Pasteur pipette으로 상층액을 회수하여 2000 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 침전된 백혈구에 5 ml의 냉각된 3차 증류수를 가하고, 30초간 hypotonic shock를 주어 적혈구를 파괴시킨 후, 1.8% saline 5 ml와 세포배양액(RPMI 1640) 10 ml을 넣어 주었다. 2000 rpm에서 20분간 원심하여 상층액을 버리고 가라앉은 백혈구에 RPMI 1640을 첨가해 백혈구 부유액을 만들었다. 이 부유액을 Cate 등(9)의 방법에 따라 hemacytometer로 세포수를 계수하여 세포의 농도를 1×10⁶ cells/ml이 되도록 조정한 후, 실험에 사용하였다.

화학주성인자: 본 실험에 사용한 화학주성인자(chemotactic factor)는 다음과 같은 방법으로 제조하여 사용하였다. MacConkey agar에서 배양한 *Escherichia coli* (ATCC 25922)를 세포배양액(RPMI 1640)에 접종하여 37°C에서 48시간 배양한 후, 5000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 상층액을 membrane (0.45 µm, Gelman) filter로 여과하여 -20°C에 보관하였다가 실험할 때 마다 세포배양액(RPMI 1640)을 첨가해 1:4로 희석하여 화학주성인자로 사용하였다.

화학주성능 분석: 백혈구의 화학주성능을 측정하기 위해 Boyden의 것을 변형 개조한 modified boyden chamber (B 312, Synderman)와 nucleopore filter (pore size 3.0 µm, diameter 13 mm, polycarbonate filter, Corning, 미국)를 사용하였다.

백혈구의 화학주성능은 김 등(10)의 방법, 염색 및 결과 관찰은 이 등(11)의 방법에 따라 실시하였다. 고형암과 복수암 유발 마우스의 백혈구 화학주성능은 student's

t-test에 의해 비교검정하였다.

항암효과시험. 평균무게 21±2 g의 3~4주령 된 마우스 15마리를 23±2°C, 상대습도 55±3%의 동물실험실에서 1주일간 안정화시켰다.

동물실 환경에 순화된 마우스에 동결 건조된 상황버섯 분비물을 생리식염수에 용해시켜 1일 125 mg/kg을 경구로 1주일간 투여하였다.

또한 마우스의 복강에서 7일간 배양된 sarcoma-180 복수암 세포는 세포배양액(RPMI1640)을 첨가한 후 원심분리하여 세포침전물을 분리하였다. 분리된 세포침전물은 다시 세포배양액(RPMI1640)에 부유시켜 sarcoma-180 세포를 세척하였다. 동일한 방법으로 2회 세척한 후 hemocytometer로 계수하여 5.0×10⁵ cells/ mouse을 0.2 ml씩 복강 내에 이식하였다. 이식 후에도 동일한 양의 상황버섯 분비물을 같은 방법으로 투여하며 대조군과 비교하였다. 평균생존일수(Mean survival time, MST)와 생존일수연장률(Increase life span, ILS)은 아래 식을 이용하여 판정하였다.

생존일수연장률(ILS, %)

$$= \frac{\text{피검체투여군의 평균생존일수}}{\text{비투여군의 평균생존일수}} \times 100$$

또한 고형암 발생을 위하여 5.0×10⁶ cells/mouse을 0.2 ml씩 마우스의 오른쪽 서혜부에 피하 이식하였다. 이식 후 복수암과 동일하게 상황버섯 분비물을 투여하며 23 일 경과 후 발생한 고형암을 적출하여 중량을 측정하고 아래 식에 의하여 종양증식 억제율을 구하여 이를 항암 효과의 지표로 하였다.

종양증식억제율(IR, %)

$$= (1 - \frac{\text{피검체투여군의 평균종양중량}}{\text{비투여군의 평균종양중량}}) \times 100$$

면역세포의 증식시험. 고형암과 복수암 유발 마우스에 상황버섯 분비물의 투여 방법과 투여 기간은 항암효과 시험과 동일하게 실시한 후 전혈을 채혈하여 항응고제가 처리된 EDTA tube 5개에 각각 100µl씩 넣고, 단클론 항체(Rat Anti-Mouse CD3ε, Rat Anti-Mouse CD4/L3T4, Rat Anti-Mouse CD8/Lyt-2, Rat Anti-Mouse CD19, Rat Anti-Mouse CD45/LCA, Mouse (C3H×Balb/c) Anti-Mouse NK1.1 (Southern Biotechnology Associates Inc, 미국)들은 4µl씩 가하였다. 이들을 4°C에서 30분 동안 방치한 뒤 적혈구를 용혈시키기 위하여 lysis solution (50% diethy-

와 1 : 10 v/v으로 혼합한 용액)을 2 ml 가하여 10분 동안 실온에서 방치하였다. 이것을 1300 rpm에서 5분간 원심분리하고 Phosphate Buffer Saline (0.5% FBS Serum, 이하 PBS로 약함) 2 ml를 가하여 1300 rpm에서 5분간 2회 원심분리하고 PBS로 재부유시켜 flow cytometry tube에 sampling하여 유세포 측정기(Flow Cytometry, Becton Dickinson, 미국)로 측정하였다.

Cytokines 생성능 분석. 마우스 혈액 중 cytokines의 측정은 마우스로부터 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후 ELISA Kit [Cytoscreen™ Mouse IL-2, Cytoscreen™ Mouse IL-4, Cytoscreen™ Mouse IL-6, Cytoscreen™ Mouse TNF-α (BioSource Interational, Inc.)를 이용하여 sandwich ELISA 방법으로 실시하였다.

결 과

당 조성 및 아미노산 분석. 당조성과 아미노산 구성의 분석에서 상황버섯 분비물은 9종의 단당과 15종의 아미노산으로 구성되어 있었다. 단당 중에서 mannose가 26.71%로 가장 높았으며, 아미노산 중에서는 aspartic acid가 49.1 mg/kg으로 가장 높게 확인되었다(Table I, II).

세포독성시험. 상황버섯 분비물이 사람 암세포주에 대

Table II. Amino acid composition of the exo-secretion from *Phellinus linteus*

Amino acid	Exo-secretion
	mg/kg
Asp	49.1
Thr	25.6
Ser	22.0
Glu	43.3
Pro	11.3
Gly	10.1
Ala	12.3
Val	24.6
Met	3.58
Ile	17.3
Tyr	7.84
Phe	17.7
His	11.4
Lys	14.8
Arg	15.8

Table I. Monosaccharide composition of the exo-secretion from *Phellinus linteus*

Component	Fuc	Gal	Glc	Man	Rha	Ara	Xyl	GalN	GlcN
%	4.45	7.08	24.89	26.71	9.93	3.77	11.88	2.17	9.12

lene glycol과 15% formaldehyde가 혼합된 용액을 증류수

해 직접적인 세포독성이 있는지를 관찰하기 위해 폐암

세포주인 A549, 난소암 세포주인 SK-OV-3, 피부암 세포주인 SK-MEL-2, 결장암 세포주인 HCT 15 그리고 중추신경계 세포주인 XF498을 이용하여 상황버섯 분비물의 각 농도별로 SRB assay를 실시하여 Table III과 같은 결과를 얻었다.

즉, A549세포주의 경우 상황버섯 분비물의 농도가 0.003µg/ml일 때 생존율이 99.9%, 30.0µg/ml일 경우 94.1%로 거의 차이가 없는 것으로 나타났다. SK-OV-3 세포주는 103.2~94.2%, SK-MEL-2세포주는 99.4~98.7%, XF498 세포주는 101.6~93.9% 그리고 HCT 15 세포주는 101.2~97.3%로 나타났으며 IC₅₀ 값이 5종의 세포에 대하여 300µg/ml 이상으로 직접적인 세포독성은 거의 없는 것으로 나타났다.

백혈구 유주능. 고형암과 복수암 유발 마우스에 상황버섯 분비물을 투여한 시험군과 대조군으로부터 얻은 백혈구의 화학주성능을 modified boyden chamber를 이용하여 3회에 걸쳐 측정된 결과 Table IV와 같다.

즉, 고형암 유발 마우스에 상황버섯 분비물을 투여한

Table III. Inhibition concentration of the exo-secretion from *Phellinus linteus*, doxorubicin and cisplatin against different tumor cells

Sample	Inhibition concentration (µg/ml, IC ₅₀)				
	A549	SK-OV-3	SK-MEL-2	XF498	HCT15
Exo-secretion	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300
Doxorubicin	0.02	0.08	0.02	0.06	0.03
Cisplatin	0.71	1.31	1.76	0.77	1.06

The method is Sulforhodamine-B (SRB) assay for tumor cell cytotoxicity test (IC₅₀ value)

Table IV. Effect of the exo-secretion from *Phellinus linteus* on chemotactic activity of peripheral leukocytes in ICR mice bearing tumors with or without treatment of the exo-secretion

Treatment	No. of migrated Leukocytes
Solid tumor-bearing mice	
Control	61.2±6.4
Exo-secretion	82.5±5.7*
Ascitic tumor-bearing mice	
Control	32.0±4.2
Exo-secretion	99.9±6.9*

*Values represent the mean±standard deviation of fifteen mice per group, values within column with no common superscripts differ significantly (P < 0.025)

시험군의 평균치는 82.5±5.7개로 대조군의 61.2±6.4개에 비해 약간 증가하였으나, 복수암 유발 마우스에 상황버섯 분비물을 투여한 군의 평균치는 99.9±6.9개로 대조군의 32±4.2개보다 유의성있게 증가하였다.

항암효과. 복수암 유발 마우스에 상황버섯 분비물을 투여한 시험군의 평균생존일수(MST)는 29.8일로 대조군의 25.3일보다 길게 나타나 평균생존 연장률이 117.8%이었다. 또한 상황버섯 분비물을 투여한 시험군 중에서 30일 이상 생존한 마우스는 40%이었다(Table V).

상황버섯 분비물이 종양증식에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 체중 21±1 g의 마우스의 서혜부에 sarcoma-180 복수암세포 0.2 ml (5×10⁵ cells/mouse)를 접종하고 상황버섯 분비물을 매일 경구 투여한 다음 23일이 경과한 후 마우스 근육에 생긴 종양을 절취하여 그 무게를 측정된 결과 Table VI과 같다. 즉 상황버섯 분비물을 투여한 시험군의 종양의 평균무게는 0.64±0.13 g으로 대조군의 1.75±0.15 g에 비하여 종양저지율이 63.4%로 나타났다.

면역세포의 증식. 상황버섯 분비물을 투여한 시험군과 대조군의 복수암 및 고형암이 유발된 마우스의 혈액에 대하여 유세포 측정기(flow cytometry)를 이용하여 NK cells 및 면역세포의 증식여부를 측정하였다. 고형암과

Table V. Antitumor activity of the exo-secretion from *Phellinus linteus* against sarcoma-180 cells transplanted in the abdomen of ICR mice

Treatment	Dose (mg/kg)	MST (day) ^a	ILS (%) ^b	30 days survivors
Control	125	25.3	0	0/10
Exo-secretion	125	29.8	117.8	4/10

^aMST; mean survival time, ^bILS; increase life span

Table VI. Antitumor activity of the exo-secretion from *Phellinus linteus* against sarcoma-180 cells transplanted in the inguinal region of ICR mice

Treatment	No. of mice tested	Average weight of tumor mass (g)	Inhibition ratio (%)
Control	15	1.75±0.15	0
Exo-secretion	15	0.64±0.13*	63.4

*Values represent the mean±standard deviation of fifteen mice per group, values within column with no common superscripts differ significantly (P < 0.025)

복수암 유발 마우스에 상황버섯 분비물을 투여한 시험

Table VII. Effect of the exo-secretion from *Pleurothallis distans* on the distribution of immune cells in ICR mice transplanted with sarcoma-180 cells into the abdominal region

Treatment	Concentration (pg/ml)				
	% total cells				
	IL-2	IL-4	IL-6	TNF- α	
EB19 (B cell)	EB3 (T cell)	EB4 (Th cell)	EB8 (Tc cell)	NK cell	
Solid tumor-bearing mice					
Control	1.5 \pm 0.5	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	16.3 \pm 1.4	81.7 \pm 0.5
Exo-secretion	2.8 \pm 1.5*	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	33.3 \pm 2.6*	19.0 \pm 0.5*
Ascitic tumor-bearing mice					
Control	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	17.7 \pm 1.6*	45.3 \pm 3.1*
Exo-secretion	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	17.7 \pm 1.6*	45.3 \pm 3.1*

*Values represent the mean \pm standard deviation of fifteen mice per group, values within column with no common superscripts differ significantly (P<0.025)

군이 대조군보다 B cells, T cells, Th cells, Tc cells이 유의성 있는 증가를 보였으며, NK cells도 약간 증가하였다 (Table VII, VIII).

Cytokine 생성능. 상황버섯 분비물을 투여한 시험군과 대조군의 복수암 및 고형암이 유발된 마우스의 cytokine 즉 IL-2, IL-4, IL-6, TNF- α 의 생성능을 알아보기 위하여 ELISA Kit을 이용하여 sandwich ELISA 방법으로 분석한 결과 고형암과 복수암 유발 마우스에서 상황버섯 분비물을 투여한 시험군과 대조군에서 IL-2 와 IL-4는 발현되지 않았지만, IL-6는 고형암 유발 마우스에서 시험군이 33.3 \pm 2.6 pg/ml, 대조군이 16.3 \pm 1.4 pg/ml로 나타났으며, 복수암 유발 마우스에서는 시험군이 17.7 \pm 1.6 pg/ml, 대조군이 8.5 \pm 0.98 pg/ml로 나타나 대조군보다는 2배 정도 발현되어 유의성있게 증가되었다. 또한 TNF- α 는 고형암 유발 마우스에서 시험군이 98.4 \pm 8.9 pg/ml, 대조군 84.7 \pm 8.5 pg/ml로 나타났으며, 복수암 유발 마우스에서는 시험군이 45.3 \pm 3.1 pg/ml, 대조군이 33.8 \pm 2.8 pg/ml로 나타나 대조군보다는 약간 증가하였다(Table IX).

고 찰

수천년 동안 버섯은 식용뿐만 아니라 약용으로 사용되어 왔다. 이는 버섯이 풍부한 영양분과 건강에 유용한 성분을 함유하고 있기 때문이다. 버섯의 약용성분에 대한 가장 오래된 기록은 B.C. 3000년에 인도의 의학보고서이다.

일부 버섯은 항바이러스, 항균, 항염, 혈당과 콜레스테롤 감소, 혈압 강하와 면역증강 및 항암효과 등의 약리작용을 나타낸다. 이러한 약리작용을 나타내는 성분은 주로 다당체와 다당체-단백질 복합체이다. 버섯에는 이러한 여러 종류의 다당체가 존재하며, 면역계의 조절에 중요한 역할을 한다.

따라서 본 연구는 sarcoma-180 복수암 세포를 마우스

에 상황버섯 분비물을 경구 투여하여 면역세포의 증가 여부와 cytokine의 생성능 및 복수암과 고형암에 대한 항암효과를 조사하였다.

대조군과 상황버섯 분비물을 처리한 시험군으로 각각의 백혈구 세포수를 측정하여 평균치를 측정한 결과 서혜부에 종양을 유발시키고 상황버섯 분비물로 처리한 시험군은 대조군에 비해 58.4%가 감소하였으며, 복수암을 유발시킨 후 상황버섯 분비물로 처리한 시험군은 대조군에 비해 22.9%가 감소하였다. 이러한 결과는 종양유발에 대한 방어기작으로 면역활성 lymphocyte가 상대적으로 증가하였기 때문이라고 생각된다.

한편 혈액세포는 간세포(stem cell)에서 분화되고 성숙되는데 이중에서 백혈구계가 면역반응에 관여하고 혈관계를 순환하며 체내에 침입한 이물질을 탐식하여 처리하는 탐식세포의 역할을 한다. 탐식세포로는 혈관순환 백혈구와 조직 내에 고착된 대식세포가 있다. 이와 같은 다양한 백혈구는 생체 내에 존재하면서 직접, 간접으로 각종 형태의 면역반응에 참여하여 생체를 이물질의 공격으로부터 보호한다(12). 이러한 백혈구의 활성을 알아보고자 sarcoma-180 복수암 세포를 마우스의 서혜부와 복강에 종양을 유발시키고 상황버섯 분비물을 마우스에 경구투여한 후, 백혈구의 화학주성능(chemotaxis)을 측정하였다. 그 결과 서혜부에 종양을 유발시킨 시험군은 76.3 \pm 4.9 g이었으며, 대조군은 61.2 \pm 6.4 g로 나타났다. 또한 복수암을 유발시킨 시험군은 99.9 \pm 6.9 g이었으며 대조군은 32.0 \pm 4.2 g로 백혈구수가 유의성있게 증가하였다.

한편 조 등(13)의 경우도 상황버섯 자실체 열수 추출물을 투여하여 백혈구의 화학주성능을 관찰한 결과 서혜부와 복강에 종양을 유발시킨 마우스에서 시험군은 대조군에 비해 우수한 화학주성능을 나타냈다. 따라서 상황버섯의 자실체 열수 추출물 및 분비물은 생체 방어

능력 즉 면역능력을 증강시킴으로써 암세포의 성장억제 및 각종 병균에 대한 방어작용이 활발해지고, 생체에서 백혈구 유주능을 자극 또는 활성화시킴을 알 수 있다.

많은 버섯에는 다양한 종류의 면역활성 물질뿐만 아니라 항종양물질도 존재하는 것으로 알려져 있다. 이러한 물질에는 표고버섯의 *lentinus*, 운지버섯의 PSK, 치마버섯의 *schizophyllan* 등이 있다. 이들 다당체와 다당체-단백질 복합체들은 종양세포에 작용하여 종양세포를 직접 파괴하지 않고 다양한 면역체계를 활성화시켜 항종양작용을 하는 것으로 알려져 있다.

또한 상황버섯 분비물의 성분을 분석한 결과 다당체-단백질 복합체로 구성되어 있으며 이러한 다당체단백질 역시 직접적으로는 종양세포를 파괴하지 않을 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서는 현재 임상치료에 사용하는 두 종류의 항암제와 상황버섯 분비물의 세포독성능을 비교하기 위하여 사람 폐암 세포주(A549), 난소암 세포주(SK-OV-3), 피부암 세포주(SK-MEL-2), 결장암 세포주(HCT 15) 그리고 중추신경계 세포주(XF 498)을 이용하여 *in vitro*에서 시험한 결과 항암제인 doxorubicin과 cisplatin의 5종류의 암세포주에 대한 IC₅₀ 값이 0.02~1.76µg/ml로 나타나 강한 세포독성능을 발휘하였으나, 상황버섯 분비물은 IC₅₀ 값이 300µg/ml 이상으로 나타나 세포독성을 나타내지 않았다. 이와 같은 다당체 및 다당체-단백질 복합체들의 항종양활성은 숙주의 면역체계의 자극에 의하여 유도됨을 알 수 있으며 이러한 기작은 아직 확실히 밝혀지지 않았지만 helper T세포의 자극에 의한 숙주면역계의 활성화와 보체-마크로파지에 의한 비특이적인 면역반응 등에 의한 것으로 생각된다.

버섯으로부터 추출한 다당체들이나 다당체-단백질 복합체들이 면역조절제로 작용하여 항암작용을 나타낼 것으로 추측되어 왔고, 실제로 다양한 버섯의 다당체들의 항암효과가 집중적으로 연구되어 왔다. 그 결과 *lentinan* (*Lentinus edodes*), *pachymaran* (*Poriacocos*), *schizophyllan* (*Shizophyllum commune*) 등과 같은 버섯추출물들이 비특이적으로 면역반응을 증가시키는 것으로 밝혀졌다(14,15). 즉, 숙주의 면역체계를 활성화시킴으로써 항종양 효과를 발휘하는 것으로 보고되었다(16). 그러나 버섯의 다당체들이 어떻게 항암효과를 보이는지의 정확한 기작은 완전히 밝혀지지 않았으며, 항암작용은 체액성 면역반응 및 세포성 면역반응과 관련된 다양한 방법으로 이루어질 것으로 추측되고 있다. 실제로 cytotoxic T lymphocyte (CTL), helper T lymphocyte, B lymphocyte, activated macrophage, NK cell, lymphocyte-activated killer cell (LAK) 등이 암세포로부터 숙주를 방어하는 데 관련되어 있다는 것이 밝혀졌다.

Lentinan 등이 마우스에 이식된 sarcoma-180 복수암 세포의 성장을 억제시키는 것으로 알려졌으며(17), *Tricho-*

*ma mangolicum*으로부터 분리한 TML-1과 TML-2 렉틴이 P815 암세포주의 성장을 억제하며 동시에 마우스에 이식한 sarcoma-180 복수암 세포주의 성장도 억제하는 것으로 보고되었다. 또한 *Phellinus linteus* (PL)로부터 분리한 다당체가 *in vivo*와 *in vitro*에서 다양한 면역반응을 활성화시키는 것으로 보고되었다. 즉 mixed lymphocyte 반응이나 T lymphocyte의 분화를 촉진시킴으로써 T lymphocyte의 면역반응을 활성화시키며, natural killer cell에 의한 비특이적인 면역반응도 증가시키며, B lymphocyte를 비특이적으로 활성화시킴으로써 체액성 면역반응에도 관여하는 것으로 나타났다(12).

이와 같이 다당체에 의한 항암효과와 그 작용기작을 규명하기 위하여 주로 다당체를 처리한 면역세포들이 분비하는 다양한 cytokine의 발현 양상을 조사함으로써 그 작용기작을 연구하는 데 이용하고 있다. 매우 많은 cytokine들과 cytokine receptor들이 사람을 비롯한 동물들에게 발현되어 면역반응을 조절하고 있는 것으로 보고되고 있지만, 모든 cytokine들이 다당체와 같은 항암효과를 보이는 물질들에 의하여 활성화되는 것은 아니다(18). 하지만 버섯으로부터 추출된 다당체들에 의한 cytokine들의 발현과 항암작용에 관련된 많은 연구가 진행되고 이미 알려진 것들도 있다. 예를 들면 *Lentinus edodes* (LE)로부터 추출한 다당체-단백질 복합체를 마우스의 비장 단핵세포와 사람의 말초혈액 단핵구에 처리하면 IL-2와 TNF- α 의 발현이 전사단계(transcription level)와 해독단계(translation level)에서 증가하는 것으로 보고되었다. 이러한 결과로서 LE의 다당체-단백질 복합체가 Th 면역반응을 유도하는 것을 알 수 있다. 또한 항암작용을 나타내는 polysaccharide-protein complex (PSPC)와 *lentinan*에 의하여 유도되는 cytokine들이 밝혀졌다. 이들에 의하여 유도되는 cytokine들은 IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , M-CSF들이다(19).

IL-1은 B lymphocyte, T lymphocyte, monocyte 등 다양한 세포에 작용하는 cytokine으로서 TNF- α 의 생성 등과 연관되어 있으며, PSPC나 *lentinan*에 의한 항암효과는 이러한 cytokine의 발현과 밀접하게 연관되어 있는 것을 알 수 있다. IL-6의 표적세포는 광범위하여 multifunctional lymphokine이라고 부른다. 따라서 면역 및 염증반응에 미치는 영향도 광범위하다. IL-6는 T세포, B세포, 단핵구, 섬유아세포, 각질세포, 내피세포와 종양세포에 의해서 생산된다. IL-6는 다음과 같은 여러 기능을 가지고 있다. 즉 B세포 분화유도, 급성기 반응단백유도, 골수종 하이브리도마/형질세포종 세포의 증식촉진, IL-2생산과 IL-2수용체 발현유도, 세포독성 T세포분화, 골수성 백혈병 세포주와 유방암 세포주 증식억제, 거핵세포의 성숙촉진, 사구체 간질세포 증식작용 및 PC12세포의 신경세포로의 분화작용이 있으며, 최근 다음과 같은 질환에 즉,

다발성 골수종, 형질세포종, 류마티드 관절염, 간질 세포증식성 사구체신염, 심장 점액종, Castleman씨 병, Lennert씨 T세포림프종, 알코올성 간경변, 그리고 AIDS환자에서 IL-6가 과생산된다고 하며, IL-6는 조직 손상과 감염을 알리는 신호로서 작용한다는 보고가 있다. 또한 IL-6는 발열물질로도 작용한다. Tumor necrosis factor (TNF)에는 TNF- α (cachectin)와 TNF- β (lymphotoxin)가 있는데 TNF- α 는 단핵구, 대식세포, 비만세포, 림프구 및 NK 세포를 비롯한 많은 세포에 의해서 생산되고 TNF- α 는 비만세포 림포카인이라고도 하며 TNF- β 는 T세포에서 생산된다. TNF는 림프세포에 증폭효과가 있다. TNF는 면역반응세포 즉 호산구 Killer (K) 세포, NK세포를 활성화하고, 림프구에 작용하여 MHC 발현과 항원제시능력을 증가시키며, 뇌에 작용하여 뇌하수체호르몬을 조절하며, 조직세포에 있어서는 MHC 유도 시에 IFN과 협동한다. TNF- α 와 TNF- β 의 생산은 IL-2에 의해서 촉진되며, IL-2와 IFN은 TNF생산에 있어 상승적으로 작용하여 그 생산을 증가시킨다. 즉 TNF, IL-2 및 IFN- γ 는 세포상호작용과 자가면역병리에 중요한 역할을 한다. 이와 같은 작용은 종양 및 병원미생물에 대한 방어작용을 하며 또한, TNF는 유해한 작용 즉 과중성 혈관내 응고, 세균감염시 순환성 쇼크나 광범위한 조직괴사를 일으킨다. TNF는 대식세포로부터 IL-1과 IL-6 생산을 유도하는 강력한 유도력을 가지고 있기 때문에 TNF의 염증작용이 증폭된다.

상황버섯 분비물을 sarcoma-180 복수암 세포가 이식된 마우스에 처리하였을 때 발현되는 cytokine을 조사한 결과 IL-2와 IL-4는 발현되지 않았고 IL-6와 TNF- α 가 발현되었다. 이와 같은 결과로서 상황버섯 분비물에 의한 sarcoma-180 복수암 세포의 항암효과가 앞에서 언급한 바와 같이 숙주의 면역반응을 활성화시킴으로 이루어짐을 추측할 수 있다.

TNF- α 는 대표적인 항암작용을 나타내는 cytokine으로 알려져 있다. 그러므로 TNF- α 발현의 증가는 항암작용의 지표로 이용되며, TNF- α 는 T lymphocyte와 상호작용하여 T lymphocyte의 활성화와 성장 등을 조절한다. 또한 TNF- α 는 암세포의 세포용해를 유도함으로써 직접적으로 항암작용을 나타내기도 한다.

IL-6는 림프계 세포와 비림프계 세포에 포함되는 세포들로부터 분비되는 다양한 활성을 갖는 cytokine으로서 면역반응을 조절하는 데 중요한 역할을 하는 것으로 이미 알려져 있다. IL-6의 대표적인 기능은 B lymphocyte를 분화시켜 항체를 생성하도록 유도한다. 그러나 IL-6는 IL-2수용체를 유도하거나 IL-2의 생성을 유도함으로써 lymphocyte의 활성화에도 관여하는 것으로 알려져 있다.

모든 cytokine들이 다당체에 의하여 항상 발현되지 않는다고 알려진 바와 같이(18) 상황버섯 분비물을 이용한

실험에서도 IL-2, IL-4가 발현되지 않는 것도 동일한 경우라고 추측된다. 그러나 대표적인 항암작용을 나타내는 TNF- α 와 면역반응의 주된 역할을 하는 IL-6의 발현이 증가한다는 결과는 상황버섯 분비물의 항암효과가 이들의 cytokine들에 의한 숙주의 면역반응의 활성화에 의한 것으로 생각된다.

현재까지 암을 퇴치하기 위한 노력들은 다방면에 걸쳐 이루어지고 있으나 아직도 암을 치료할 수 있는 가장 이상적인 방법은 제시되지 않고 있다. 현재 진행되고 있는 암치료는 외과적 수술(surgery), 방사선치료(radiation therapy) 및 화학요법(chemotherapy)이 있으며 최근에는 면역요법(immunotherapy)이 관심을 끌고 있다. 화학요법의 경우 지금까지 많은 연구가 진행되어 왔으나 대부분의 약물은 그 효과에 상응하는 여러 가지 부작용을 일으키고 있다. 따라서 부작용이 적고 항암력이 뛰어난 약물을 개발하기 위하여 천연물로부터 항종양성 생리활성물질을 찾는 연구가 진행되고 있다. 1940년대부터 화학요법제 개념이 암치료에 도입되었고, 1960년대에 이르러 점차 암에 대한 지식이 쌓여감에 따라 암치료에 크게 기여하고 있다. 그러나 현재까지 개발된 항암제는 대개 강한 독성을 보이고 있으며, 특히 조혈 및 면역기능 장애 등 심각한 부작용을 나타낸다. 게다가 이들 항암제에 대한 암세포의 내성이 생겨 치료에 한계를 보이고 있는 것도 문제점이다. 그러므로 보다 부작용이 적으면서도 좋은 효과를 발현하는 암치료제의 개발이 절실히 요구된다. 한편, 암 발생 원인과 발생 기작을 해명하여 암을 예방, 치료하고자 하는 많은 연구가 진행되어왔고 면역학 분야의 발전으로 인하여 암백신(20), 면역요법(21), 생물학적 제제(22) 등이 암예방 및 치료에 대한 근본적인 가능성을 제시하고 있음에도 불구하고 아직까지 만족할 만한 치료제가 개발되지 않고 있다. 이러한 관점에서 담자균류의 다당류에 의한 항암효과는 암세포를 직접 파괴하며 세포독성을 나타내는 화학요법제와는 달리 정상 세포에 영향을 나타내지 않으며 면역증강 또는 면역회복을 강화함으로써 항암력을 발휘하기 때문에 최근 암뿐만 아니라 일반 질병에서도 면역활성을 유도한 면역요법의 중요성이 커지고 있다. 따라서 담자균류의 다당체 및 단백다당체에 관한 연구가 지속적으로 이루어져야 한다고 생각한다.

참 고 문 헌

1. Chung KS, Kim SS, Aim HS, Kim KY, Han MW: Effect of Kp, an antitumor protein-polysaccharide from mycelial culture of *Phellinus linteus* on the humoral immune response of tumor-bearing ICR mice to sheep red blood cells. Arch Pharm Res 16;336-338, 1993
2. Ikegawa T, Nakanish M, Vehara N, Chihara G, Fukuoka F: Antitumor action of some basidiomycetes especially *Phellinus linteus*. Gann 59;155, 1968

3. Lee JH, Cho SM, Song KS, Han SB, Kim HM, Hong ND, Yoo ID: Immunostimulating activity and characterization of polysaccharide from mycelium of *Phebellinus linteus*. J Microbiology and Biotechnology 6;213-218, 1996
4. 정경수, 김신숙, 김희수, 한민우, 김병각: *Phebellinus linteus* 균사 배양물로부터 분리한 단백다당체 Kp의 항암활성. 약학회지 38;158-165, 1994
5. Suzuki I, Hashimoto K, Oikawa S, Sato K, Osawa M, Yadomae T: Antitumor and immunostimulating activities of β -glucan obtained from liquid cultured *Grifora frondosa*. Chem Pharm Bull 37;410-413, 1989
6. Okuda T, Yoshioka Y, Ikekawa T, Chihara G, Nishioka K: Anti-complementary activity of antitumor polysaccharide Nature 238;290-291, 1973
7. Rubinstein LV, Paull KD, Shoemaker RH, Simon RM, Skehan P, Boyd MR: Correlation of screening data generated with a tetrazolium assay (MTT) versus a protein assay (SRB) against a broad panel of human tumor cell lines. Proceeding of the American Association for Cancer Research 30;2418, 1989
8. 이연태, 이종훈: 장티푸스 환자의 다형핵 백혈구에 대한 chemotaxis에 미치는 영향. 대한면역학회지 1;1, 1979
9. Cate KL, CE Ray, Quei PG: Modifier Boyden chamber method of measuring PMNs chemotaxis, pp67-71 In: Leukocyte chemotaxis, edited by Gallin JI, Quei PG. Raven press New York 429, 1978
10. 김교성, 이연태: 표고버섯 추출물이 다형핵 백혈구의 화학주성능에 미치는 영향. 단국대학교 석사학위논문 1980
11. 이미숙, 정규선, 이연태: 영지추출물이 백혈구의 chemotaxis에 미치는 영향. 대한면역학회지 10;167, 1988
12. Kim HM, Han SB, OH GT, Kim YH, Hong DH, Hong ND, Yoo ID: Stimulation of Humoral and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom *phellinus linteus*. Int J Immunopharmac 5;295-303, 1996
13. 조홍식, 이연태: 복강암세포(Sarcoma -180)를 이식한 마우스에서 상항버섯(*Phebellinus linteus*) 추출물이 백혈구 화학주성에 미치는 영향. 단국대학교 석사학위논문 1997
14. Hamuro J, Chihara G: Lentinan, a T-cell oriented immunopotentiator. In Immune Modulation Agents and their Mechanisms (eds Fenichel, R. L. and Chirigos, M. A.). Marcel Dekker. New York 409-436, 1984
15. Matsuo T, Arika T, Mitani M, Komatsu N: Pharmacological and toxicological of a new antitumor polysaccharide, Schizophyllan. Arzneim Forsch/Druq Res 32;647-656, 1982
16. Wallace PK, Morahan PS: Role of macrophages in the immunotherapy of lewis lung peritoneal carcinomatosis. J Leukoc Biol 56;41-51, 1994
17. Ohmori H, Takai T, Tanigawa T, Honma Y: Establishment of an enzyme release assay for cytotoxic T lymphocyte activity. J Immunol Meth 147;119-124, 1992
18. Hirose K, Claus DCZ, Oppenheim JJ, Matsushima K: Induction of gene expression and production of immunomodulating cytokines by PSK in human peripheral blood mononuclear cells. Lymphokine Res 4;475, 1990
19. Liu J, Li F, Kong J Lin, Y Gao: Induction of immunomodulating cytokines by a new polysaccharidepeptide complex from culture mycelia of *Lentinus edodes*. Immunopharmacology 40;187-198, 1998
20. Hellman K, Phil D, Carten SK: Fundamental of Cancer Chemotherapy. McGraw Hill Book Co New York 64, 1987
21. Giampietri A: Drug-medicatedin crease of tumor immunogenicity in vivo for a new approach to experimental cancer immunotherapy. Cancer Res 41;681, 1981
22. Budd GT, Osgood B Barna, B Boyett, JH Finke, J Mden-drop, SV, Murth S, Nobak C, Sergi J, Tubbs R, Bukoski

RM: Phase I Clinical trial of Interleukin 2 and alpha interferon. Toxicity and immunologic effects *Cancer Res* 49:6432, 1989