

Saccharomyces cerevisiae 변이주 세포벽 유래의 베타글루칸의 면역활성 및 Cisplatin과의 병용에 의한 항암 상승작용

#김완재 · #윤택준* · 김동우** · 문원국** · †이광호

건국대학교 의료생명대학 생명공학과,
*유한대학 식품영양과, ** (주)네추럴에프엔피

Immunostimulating Activity of Beta-Glucan Isolated from the Cell Wall of Mutant *Saccharomyces cerevisiae*, and Its Anti-Tumor Application in Combination with Cisplatin

#Wan-Jae Kim, #Taek-Joon Yoon*, Dong-Woo Kim**, Won-Kook Moon** and †Kwang-Ho Lee

Dept. of Biotechnology, Konkuk University, Chungju 380-701, Korea

*Dept. of Food & Nutrition, Yuhan University, Bucheon 442-749, Korea

**Natural F&P Co., Ltd, Seoul 138-200, Korea.

Abstract

Cisplatin(*cis*-diamminedichloroplatinum) is one of the most effective anti-cancer drugs being clinically used in the treatment of solid tumors. Despite its therapeutic benefits, its use in clinical practice is often limited because of dose related toxicity. It is known that yeast cell wall beta-glucans possess immuno-modulating properties, which allows for their application in antitumor therapy. IS2 is a kind of beta-glucan derived from the cell wall of mutated *Saccharomyces cerevisiae*, which exhibits anti-cancer activity *in vitro* and *in vivo*. The present study explored the possibility of combination therapy of IS2 with cisplatin. In experimental metastasis of colon26-M3.1 cells, prophylactic intravenous administration of IS-2 in combination with cisplatin effectively inhibited tumor metastasis compared with cisplatin alone or IS-2 treatment *in vivo*. IS-2 effectively enhanced Th1 type cytokines including IFN- γ , IL-2, IL-12 and GM-CSF. Simultaneously, this combined treatment inhibited production of Th2 type cytokines compared with control. These results suggested that IS-2 can be applied in combination therapy with anti-cancer drugs to minimize their side effects.

Key words: beta-glucan, cisplatin, *Saccharomyces cerevisiae*, anti-cancer.

서론

베타글루칸은 버섯, 곡물 및 효모 등에서 추출할 수 있으며, 면역력을 증강시키는 동시에 내성이 없는 천연 면역조절제와 항암 및 항산화에 대한 생리활성 등에 대해 보고되어 있다(Song & Moon 2006; Kogan 등 2008; Chan 등 2009). 특히 효모 유래의 베타글루칸의 효능을 향상시키기 위한 일환으로 효모에 인위적 돌연변이를 유발하여 세포벽에 변이를 유도

하는 연구가 이루어졌고, 변이로 부터 얻어진 베타글루칸의 면역 및 항암에 관한 활성이 우수함이 밝혀졌다(Park 등 2003; Song & Moon 2006; Yoon 등 2008).

현재 항암 치료의 대부분은 항암제의 투여에 의존하고 있으나, 대부분 합성화학약품을 사용하여 조혈기능 및 면역기능 이상 등의 부작용을 나타내고 있어 암세포 선택적인 치료제의 개발이 시급한 실정이다(Jeong 등 2009). 따라서 베타글루칸의 항암활성에 주목하여, 기존의 항암 치료인 면역요법,

These authors equally contributed to this work.

* Corresponding author: Kwang-Ho Lee, Dept. of Biotechnology, Konkuk University, Chungju 380-701, Korea. Tel: +82-43-840-3613, Fax: +82-43-851-5235, E-mail: kwangho@kku.ac.kr

약물요법 그리고 방사선 요법 등에 베타글루칸을 병용하여 부작용 등의 한계를 개선하기 위한 연구가 진행되고 있다. 그러한 연구의 결과로 베타글루칸은 cyclophosphamide, adriamycin, cisplatin 등의 항암제가 가지는 genotoxicity를 감소시키며(Tohamy 등 2003), 항종양단일항체(anti-tumor monoclonal antibody)를 이용한 항암 치료의 효율 향상 등의 연구가 보고되고 있다(Liu 등 2009).

Cisplatin(*cis*-diamminedichloroplatinum)은 고환암, 식도암, 난소암, 방광암, 뇌종양 등 다양한 암질환에 탁월한 항암활성을 나타내에도 불구하고, 부작용으로 신장독성(nephrotoxicity), 오심, 구토, 내이신경독성이 있어 사용에 제약을 받고 있다(Tsang 등 2009). 이러한 cisplatin의 부작용 완화와 암세포 특이적 효과의 증대를 위하여 화합물 및 천연물 유래물질 등의 병용 처리가 이루어지고 있으며(Kim 등 2003; Ko 등 2009), 베타글루칸과 관련해서는 버섯 유래의 베타글루칸의 첨가가 cisplatin의 골수기능저하(myelosuppression)와 신장독성을 감소시키는 것이 *in vivo*에서 확인되었다(Masuda 등 2009).

Cytokine은 면역 및 종양생성에 밀접하게 관련된 세포분비 물질으로써, Th1 type의 경우에는 세포성 면역반응을 증강시켜 암세포에 대한 항암작용을 나타내며(Wang 등 1997), Th2 type의 cytokine의 경우에는 알레르기 관련 면역반응에 관련되고 세포성 면역반응을 저해하는 것으로 알려져 있다(Hatanaka 등 2000). 따라서, 암세포에 대한 면역반응을 조절하는 기본적인 기전과 조절요소를 이용하여 숙주의 항암면역능력을 높여 주기 위해 이러한 cytokine의 조절이 필요하다(Romagnani 1991; Lin & Karin 2007).

이번 연구에서는 항암제 사용에 있어서의 부작용을 완화하고 암세포 특이적인 항암활성을 높이기 위하여, 선행연구에서 활성이 확인된 효모변이주 유래의 베타글루칸과 cisplatin의 단독 및 병용 처리시의 면역관련 cytokine의 변화와 종양 전이 억제 등에 관하여 조사함으로써 부작용을 감소시키는 항암치료 보조제로서의 가능성을 평가하였다.

재료 및 방법

1. 세포주 및 실험동물

종양 전이 억제능을 평가하기 위해서 마우스 폐암 세포주인 colon26-M3.1 세포주가 사용되었으며, 배양조건은 열처리로 비활성화한 FBS 6%, 비필수 아미노산, penicillin 100 U/ml 그리고 streptomycin 100 µg/ml가 첨가된 EMEM 배지에서 37°C, 5% CO₂의 배양조건을 유지하였다.

실험동물은 6주령의 암컷 BALB/c mouse를 (주)나라바이오텍으로부터 구입하여, 건국대학교 동물사육실내의 SPF실에서 1주일간 적응시킨 후에 사용하였다.

2. 효모의 변이유도와 세포벽 유래의 베타글루칸(IS-2) 추출

효모의 변이의 유도과 선별은 Carlton 등(1981)과 Park 등(2003)의 방법을 응용하여 사용하였다. *S. cerevisiae* 균주를 YDP 배지에 접종하여 대수기 중기까지 배양시킨 후 700 rpm 15분간 원심분리하고 1~2 × 10⁸ cell/ml가 되도록 희석하여 3회 멸균수로 세척하고 돌연변이원인 NTG(N-methyl-N'-nitro-guanidine, Sigma, USA)를 이용하여 생존율이 0.1%가 되도록 변이를 유발하였다. 변이된 효모를 수집하여 멸균수로 세척 후에 600 µg/ml zymosan(Sigma, USA)이 첨가된 YDP 배지에 30°C에서 3시간 배양하고 원심분리하여 수집하였다.

세포벽으로 부터 베타글루칸의 추출은 Kelly & Edmund(2001)의 방법을 응용하여 이용하였다. 배양된 효모는 원심분리(7,000 rpm, 15분)하여 수집, 멸균수로 세척 및 재수집하였다. 재수집된 효모를 3% NaOH에 75°C에서 3시간 처리한 후, 실온에 하루 동안 방치하였다. HCl로 pH 4.5로 조절된 용액에서 75°C에서 1시간 처리 후, 200 rpm에서 15분간 원심하여 고형분을 회수하고 3회 멸균수로 세척 후에 에탄올로 2회 세척하여 건조시켰다. 수집한 고형분은 glucanex 200G(Novozymes, Switzerland)로 30°C에서 10시간 처리하여 녹인 후, 90°C에서 10분간 열처리함으로써 효소를 비활성화 하였다. 수용성과 불용성 베타글루칸의 분리는 원심분리와 filter (0.2~0.45 µm)를 이용하였고, 감압 동결건조하여 보관하였다. 또한, wild type 효모 유래 베타글루칸(WT)도 동일한 과정으로 추출하였다.

3. IS-2 및 Cisplatin 처리에 의한 암전이 억제능 검사

BALB/c mouse에 colon26-M3.1 세포주를 마우스 당 3 × 10⁴ cells를 정맥주사로 주입하였고, 암 접종 하루 후에 농도별로 베타글루칸 및 cisplatin을 단독 또는 병용 처리하였다. 암세포 주사 후에 2주 경과 후, 폐를 적출하여 Bouin's solution에 전이된 종양을 고정하였으며, 현미경으로 colony의 수를 확인하였다.

4. 마우스 비장세포의 분리 및 배양

마우스를 경추탈골법으로 희생시킨 후에 비장을 무균적으로 적출하여 10% FBS와 항생제(100 U/ml of penicillin, 100 µg/ml of streptomycin)가 함유된 RPMI-1640 배양액으로 세척 후에 분쇄하여 세포를 유리시켰다. 분리된 세포액은 lysing buffer(BD Biosciences, USA)를 이용하여 적혈구를 제거한 후에 혈구계수기를 이용하여 세포수를 측정하였다. 세포농도 1 × 10⁶ cells/ml로 분산시키고, 96-well plate에 100 µl씩 분주한 후에 WT, IS-2 그리고 cisplatin을 농도별로 단독 혹은 병용 처리하여 24시간 배양하였다.

5. Cytokine의 측정

IS-2와 WT 그리고 cisplatin을 단독 혹은 병용 처리한 마우스 비장세포 배양액 내의 cytokine(IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, GM-CSF, IFN- γ)의 농도는 ELISA kit(Pharmingen Co., USA)를 이용하여 측정하였으며, 회사의 실험 방법에 준하였다.

6. 통계처리

모든 실험결과의 측정치는 mean \pm S.E로 나타내었고, 각 평균치간 차이에 대한 유의성은 GraphPad Prism(version 2.0, USA)를 이용하여 Student's *t*-test와 one way analysis of variance (ANOVA)로 분석하였다. 사후검정으로 Tukey test를 5% 유의 수준으로 시행하였다.

결과 및 고찰

1. IS-2의 투여가 담암 마우스 비장세포 Cytokine 생성에 미치는 영향

베타글루칸의 면역활성은 다양한 연구를 통해 알려져 왔고, IS-2와 WT의 면역활성 비교는 선행연구에서 *in vivo*에서의 면역활성능을 조사하여 IS-2가 WT보다 우수한 면역활성 증가 및 종양 전이 억제 효과를 보이는 것이 확인되었다(Park

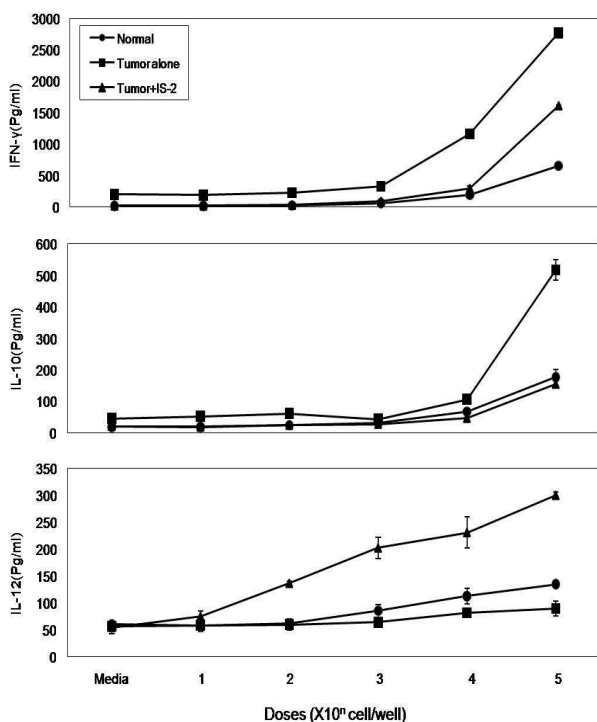


Fig. 1. Production of cytokines from splenocytes of tumor-bearing mice treated with IS-2. Data are expressed as means \pm SEM.

등 2003; Yoon 등 2008).

이번 연구에서는 IS-2 단독 투여 후, 담암 마우스의 비장세포를 F/T lysates로 재자극하여 대표적인 면역조절 관련 cytokine인 IFN- γ , IL-10 그리고 IL-12의 변화를 관찰하였다. Fig. 1에서와 같이 Th1 type cytokine인 IFN- γ 와 IL-12의 생산을 증가시켰으며, Th2 type cytokine인 IL-10의 생산의 억제가 관찰되었다.

IFN- γ 는 자연살해세포(NK)에서도 분비되며, 면역활성을 높이고 신장암, 대장암, 담낭암 등을 효과적으로 줄이는 것으로 알려져 있다(Kovacs 2000). 또한 IL-12는 NK 세포와 T 세포를 자극하여 INF- γ 를 생성시켜 종양의 성장과 전이를 억제한다(Lasek 등 2003; Lin & Karin 2007). IL-10은 주로 Th1 type cytokine 합성 저해인자로, IFN- γ 와 상반된 역할을 보이는 cytokine으로 macrophage의 항원제시 반응을 저해시킨다(Fiorentino 등 1991; Lin & Karin 2007). 따라서, 이번 실험결과에서 면역관련 cytokine의 생성과 억제에 IS-2가 효과적으로 작용하여 면역력을 증강시키는 것이 확인되었다.

2. 베타글루칸과 Cisplatin 처리가 암세포 전이에 미치는 영향

고용량의 항암 화학요법은 암 증식 억제에 효과적이거나 면역계의 심각한 손상을 초래하는 부작용이 있다. 따라서 이번 실험에서는 cisplatin의 암세포 전이가 최대로 발생하는 농도를 파악하기 위해 BALB/c mouse에 colon26-M3.1 lung carcinoma를 정맥주사하여 농도별(5~80 μ g)로 cisplatin을 단독처리하고 암세포 전이의 양상을 조사하였다. 그 결과, 5~20 μ g 농도에서 전이정도가 증가하여 20 μ g에서 가장 높은 암전이가 관찰되었으며, 고농도인 80 μ g에서는 암 전이가 억제되었다(Fig. 2). 따라서 적은 용량으로 cisplatin의 부작용을 줄이고 항암능력을 극대화하기 위해, 가장 높은 암 전이를 보인 20 μ g 농도를 기준으로 IS-2와 WT를 병용 처리하여 암 전이 억제능을 측정하였다.

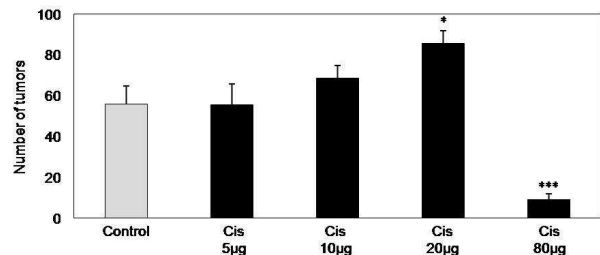


Fig. 2. Effect of cisplatin concentration on tumor metastasis. Control: non-treatment and Cis: Cisplatin. Data are expressed as means \pm SEM. Significant differences between control and Cis treated groups are indicate by * p <0.05 and *** p <0.001.

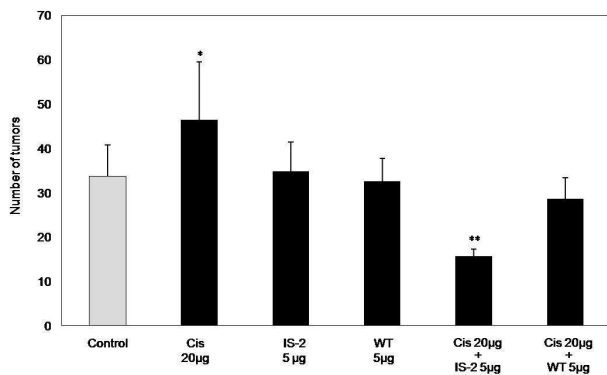


Fig. 3. Synergic effect of IS-2 on anti-metastatic activity in tumor inoculated mouse treated with cisplatin. Control: non-treated, Cis: Cisplatin, IS-2: beta-glucan from mutated yeast and WT: beta-glucan from wild type yeast. Data are expressed as means±SEM. Significant differences between control and each treated groups are indicate by * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

Fig. 3에서 보이는 바와 같이 IS-2 및 WT의 단독처리가 cisplatin의 단독처리보다 암 전이를 유의적($p < 0.01$)으로 억제하였고, 각각의 베타글루칸과 cisplatin의 병용 처리가 단독

처리보다 높은 암전이 억제능을 나타내었다. 특히, IS-2와 cisplatin의 병용 처리가 WT과의 처리에 비해서도 높은 전이 억제 활성을 보였다.

3. IS-2와 Cisplatin의 병용 처리가 마우스의 비장세포의 Cytokine 분비에 미치는 영향

항암 면역능력을 높여 주기 위해 cytokine의 조절이 중요하다. IL-2는 T세포의 증식을 유도할 뿐만 아니라 NK 세포의 형성 및 B 세포의 항체생성을 증가시켜 종양 전이 억제에 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Dauphinee 등 1981; Andersen 등 2003). 그리고, GM-CSF는 myeloid계 백혈구 증식 인자로 기능을 하는 면역조절물질이다(Perales 등 2008). IL-4는 Th2 세포의 분화를 유도하며, B 세포에 의한 IgE 생산자극, 그리고 INF- γ 의존적으로 macrophage의 기능을 억제시킨다(Romagnani 1991; Urosevic & Dummer 2003). 따라서 Th2 type cytokine의 이러한 특성은 면역 억제에 의한 항암작용의 저해를 야기한다(Romagnani 1991; Yao 등 2005).

BALB/c 마우스에 colon26-M3.1 carcinoma를 이식하고 IS-2와 cisplatin을 단독 혹은 병용투여 후, 마우스로부터 비장 세포를 분리하고 살아있는 암세포(1×10^3 cells/well)로 재자극 후에 생산된 cytokine의 양식을 Fig. 4에 제시하였다. Th1

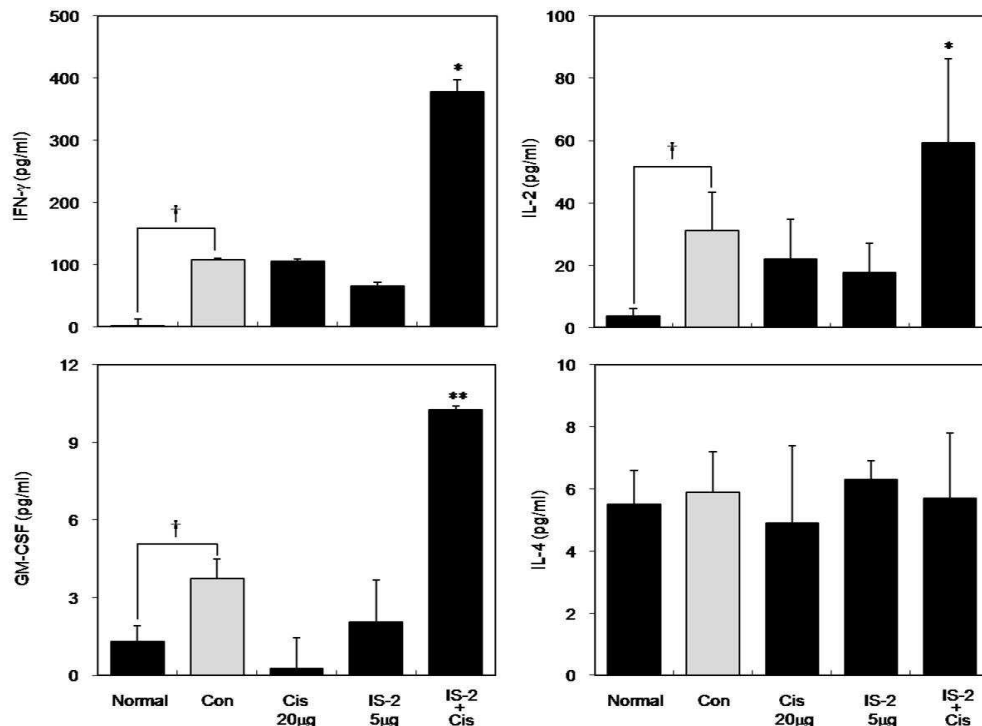


Fig. 4. Effect of combination treatment by IS-2 and cisplatin on cytokines production from splenocytes. Data are expressed as means±SEM. Significance difference between normal and control was determined by Student's *t*-test ($\dagger < 0.001$). Significance difference between control and each treatment was determined by * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

type cytokine인 INF- γ , IL-2는 tumor control 군에 비하여 cisplatin 혹은 IS-2를 단독처리할 경우에 유의한 차이를 보이지 않았으나, cisplatin과 IS-2를 병용 처리한 결과에서는 tumor control에 비하여 cytokine의 생산량이 유의적으로($p < 0.05$) 높았다. 또한, GM-CSF의 경우, cisplatin 단독 처리 시에 억제되었던 생산량이 IS-2 병용 처리 시에 크게 증가하였다. 따라서 IS-2는 cisplatin과 병용 처리할 경우, 항암효능에 필수적인 Th1 type cytokine의 생산을 효과적으로 증진시킨다고 볼 수 있다. GM-CSF는 dendritic cell의 성숙을 유도하고 항원제시능을 증진시키는 cytokine으로서, 항원에 대한 세포성 면역 증강효과를 유도하는 것으로 보고되고 있다 (Westermann 등 2001). 한편, Th2 type cytokine인 IL-4의 경우에는 처리군 간에 큰 차이를 보이지 않았다. 결론적으로 IS-2의 처리는 항원제시세포의 분화를 촉진하는 GM-CSF의 생산유도능과 함께, 종양에 대하여 살해능을 가진 effector cytotoxic T lymphocyte의 유도에 직접 관여하는 INF- γ 및 IL-2의 생산활성을 증진시킴으로써 암에 대한 치료효과를 증진시키는 보조제(adjutant)로서의 활성이 있는 것으로 보인다.

결론

암은 현대 사회에서 가장 높은 사망률을 내는 질병으로 끊임없이 관련 연구가 이루어지고 있다. 그러나 기존의 항암제의 사용에는 부작용이 있어, 그 사용에 제약을 받고 있다. 따라서 이번 연구에서는 이러한 부작용을 줄이고 항암효과를 증대시키기 위한 일환으로, 면역 증강에 탁월한 활성을 보이는 변이 효모 유래의 베타글루칸인 IS-2와 대표적인 항암제인 cisplatin의 병용 처리에 의한 cytokine의 변화와 종양 전이 억제력을 조사하여 항암제 사용시의 보조제로써의 가능성을 확인해 보았다.

그 결과, IS-2는 면역을 증강하는 Th1 type cytokine인 INF- γ , IL-2 및 IL-12, 분비를 증가시키는 반면, 면역 억제를 보이는 Th2 type의 cytokine인 IL-4 및 IL-10 분비는 억제하였다. 또한, 백혈구 증식을 돕는 GM-CSF와 같은 cytokine의 분비도 증가시켰다. 종양세포 전이 억제를 확인한 실험에서는 cisplatin과 IS-2의 병용 처리가 가장 높은 전이 억제력을 나타내었다.

이러한 결과를 종합해 볼 때, 변이를 유발한 *S. cerevisiae* 균주의 세포벽에서 추출한 베타글루칸인 IS-2는 Th1과 Th2 Type cytokines의 분비를 조절하여 소량의 cisplatin 투여로도 항암효과를 증강시키며, 이러한 IS-2의 특성은 cisplatin 투여에 의한 부작용을 완화하고 항암효능을 증강시킬 수 있는 보조제로써의 충분한 개발 가능성을 시사해준다.

감사의 글

본 연구는 2005~2007년도 충청북도 첨단산업 연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것이며 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

- Andersen MH, Gehl J, Reker S, Pedersen LØ, Becker JC, Geertsen P, Straten P. 2003. Dynamic changes of specific T cell responses to melanoma correlate with IL-2 administration. *Semin Cancer Biol* 13:449-459
- Carlton BC, Brown BJ, Gene mutation. 1981. Manual of Methods for General Bacteriology. pp.222-242. American Society for Microbiology
- Chan GCF, Chan WK, Sze DM. 2009. The effect of β -glucan on human immune and cancer cells. *J Hematol Oncol* 2:1-11
- Dauphinée MJ, Kipper SB, Wofsy D, Talal N. 1981. Interleukin 2 deficiency is a common feature of autoimmune mice. *J Immunol* 127:2483-2487
- Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, O'Garra A. 1991. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 146:3444-3451
- Hatanaka H, Abe Y, Kamiya T, Morino F, Nagata J, Tokunaga T, Oshika Y, Suemizu H, Kijima H, Tsuchida T, Yamazaki H, Inoue H, Nakamura M, Ueyama Y. 2000. Clinical implications of interleukin (IL)-10 induced by non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 11:815-819
- Jeong JH, Lee JM, Lee CH, Cho JH, Jang JB, Lee KS. 2009. Anti-tumor metastatic effect and activation of innate immunity by extracy of *Mori radice cortex*. *J Orient Obstet Gynecol* 22:31-40
- Kelly G, Edmund G. 2001. Process for glucan preparation and therapeutic uses of glucan. US Patent 6,242,594
- Kim DG, Kim KJ, Ju SM, Kim YI, Choi HS, Keum KS, Kim WS, Gao YA, Jeon BH. 2003. Protective effect of Ganopoly and Ganopoly/C+ on nephrotoxicity induced by cisplatin in rat. *Korean J Orient Physiol Pathol* 17:316-325
- Ko JC, Su YJ, Lin ST, Jhan JY, Ciou SC, Cheng CM, Chiu YF, Kuo YH, Tsai MS, Lin YW. 2009. Emodin enhances cisplatin-induced cytotoxicity via down-regulation of ERCC1 and inactivation of ERK1/2. *Lung Cancer* in press
- Kogan G, Pajtinka M, Babincova M, Miadokova E, Rauko P,

- Slamenova D, Korolenko TA. 2008. Yeast cell wall polysaccharides as antioxidants and antimutagens: Can they fight cancer? *Neoplasma* 55:387-393
- Kovacs E. 2000. Serum level IL-12 and the production of IFN-gamma, IL-2 and IL-4 by peripheral blood mononuclear cell (PBMC) in cancer patients treated with *Cicum album* extract. *Biomed Pharmacother* 54:305-310
- Lasek W, Feleszko W, Golab J, Stokłosa T, Marczak M, Dabrowska A, Malejczyk M, Jakóbiński M. 1997. Antitumor effects of the combination immunotherapy with interleukin-12 and tumor necrosis factor alpha in mice. *Cancer Immunol Immunother* 2:100-108
- Lin WW, Karin M. 2007. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest* 117:1175-1183
- Liu J, Gunn L, Hansen R, Yan J. 2009. Combined yeast-derived beta-glucan with anti-tumor monoclonal antibody for cancer immunotherapy. *Exp Mol Pathol* 86:208-214
- Masuda Y, Inoue M, Miyata A, Mizuno S, Nanba H. 2009. Maitake beta-glucan enhances therapeutic effect and reduces myelosuppression and nephrotoxicity of cisplatin in mice. *Int Immunopharmacol* 9:620-626
- Park JH, Kang MS, Kim HI, Chung BH, Lee KH, Moon WK. 2003. Study on immuno-stimulating activity of β -glucan isolated from the cell wall of yeast mutant *Saccharomyces cerevisiae* IS2. *Korean J Food Sci Technol* 35:483-492
- Romagnani S. 1991. Type 1 T helper and type 2 T helper cells: functions, regulation and role in protection and disease. *Int J Clin Lab Res* 21:152-158
- Song HS, Moon KY. 2006 *In vitro* antioxidant activity profiles of β -glucan isolated from yeast *Saccharomyces cerevisiae* and mutant *Saccharomyces cerevisiae* IS2. *Food Sci Biotechnol* 15:437-440
- Tohamy AA, El-Ghor AA, El-Nahas SM, Noshay MM. 2003. Beta-glucan inhibits the genotoxicity of cyclophosphamide, adriamycin and cisplatin. *Mutat Res* 10:45-53
- Tsang RY, Al-Fayea T, Au HJ. 2009. Cisplatin overdose: toxicities and management. *Drug Saf* 32:1109-1122
- Urosevic M, Dummer R. 2003. HLA-G and IL-10 expression in human cancer-different stories with the same message. *Semin Cancer Biol* 13:337-342
- Wang SY, Hsu ML, Hsu HC, Tzeng CH, Lee SS, Shiao MS, Ho CK. 1997. The anti-tumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes. *Int J Cancer* 70:699-705
- Westermann J, Reich G, Kopp J, Haus U, Dörken B, Pezzutto A. 2001 Granulocyte/macrophage-colony-stimulating-factor plus interleukin-2 plus interferon alpha in the treatment of metastatic renal cell carcinoma: a pilot study. *Cancer Immunol Immunother* 49:613-620
- Yao D, Zhang X, Wei H, Tian Z. 2005. Antisense-induced blockade of GATA-3 expression could inhibit Th2 excursion of tumor cells *in vitro* and *in vivo*. *Cell Mol Immunol* 2:189-196
- Yoon TJ, Kim TJ, Lee H, Shin KS, Yun YP, Moon WK, Kim DW, Lee KH. 2008. Anti-tumor metastatic activity of β -glucan purified from mutated *Saccharomyces cerevisiae*. *Int immunopharmacol* 8:36-42

(2010년 1월 24일 접수; 2010년 4월 5일 채택)