

캄보디아인 상황버섯의 항암 및 면역조절작용에 대한 연구

이효정 · 이효정 · 박정민 · 송규용 · 강경선¹ · 김성훈*

경희대학교 동서의학대학원, 1: 서울대학교 수의과대학

Study on Antitumor and Immunomodulatory Effects of Cambodian Phellinus linteus

Hyo Jeong Lee, Hyo Jung Lee, Jung Min Park, Gyu Yong Song, Kyung Sun Kang¹, Sung Hoon Kim*

Graduate School of East-West Medical Science, Kyunghee University, 1: Department of Veterinary Public Health, College of Veterinary Medicine and School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University

Phellinus linteus from Cambodia was confirmed to have a homologous DNA sequence to Phellinus linteus. Antitumor and immunomodulatory activities were evaluated with aqueous extract of Cambodian Phellinus linteus(CPL). CPL didn't show any significant cytotoxicity on HT1080, Sarcoma 180 and B16BL6, whereas it inhibited the relaxation of DNA topoisomerase I from the concentration of 250ug/ml. In the pulmonary colonization assay it inhibited pulmonary metastasis by B16BL6 in C57BL6 mice to 36%, 36.9% and 55.5% at various doses of 2 mg, 20 mg and 50 mg. From FACS analysis with splenocytes pretreated with CPL, it significantly increased lymphoblast and induced production of IL-2. These results indicate Cambodian Phellinus linteus has antitumor and immunomodulatory activities still suggesting more study on its mechanism and effective compound in detail.

Key words : Antitumor, immunomodulatory, Phellinus linteus.

서론

상황버섯은 소나무 비늘버섯과에 속하는 버섯이며, 진흙버섯(Phellinus)에 속하는 흰색 부후균이다. 이 버섯은 뽕나무와 활엽수 줄기에 자생하며, 보통 명은 목질진흙버섯(Phellinus linteus)이라고 하며, 중국, 캄보디아, 한국, 일본 등에서 자생 또는 재배하고 있다¹⁾. 옛 문헌에 소개된 상황버섯의 효능으로는 허²⁾는 동의보감(東醫寶鑑)에서 桑木耳(상목이)라하며 “性은 平微甘하고 微毒하며 主腸風, 瀉血 및 婦人腹痛, 崩漏, 下赤白 등을 치료하며 一名 桑黃이라고도 불리운다”라 하였으며, 李는 본초강목(本草綱目)에서 木耳(목이), 상이(桑耳), 상황(桑黃), 상신(桑臣), 桑上寄生(상상기생), 桑樛(상누), 桑鵝(상계), 桑蛾(상아) 등으로 언급되었으며, 효능은 기미가 甘平有毒(감평유독)하여 黑桑黃(흑상황)은 “婦人崩漏 下赤白汁 血病 癥瘕 疝積聚 陰痛 陰陽寒熱 無子 月經不調” 등을, 金桑黃(금상황)은 “癖飲 積聚 腹痛 金瘡 女人崩漏帶下 月閉 血凝 產後血凝 男子 疝瘕 止血 衄 腸風瀉血 婦人心腹痛 利五臟 宣腸胃氣 排毒氣” 등을 다스리는 효능이 있다고 하여 상황이 어혈, 혈병, 종양 등의 치료에 관여함을 시사하

고 있다. 최근의 상황버섯에 대한 연구로 일본 국립 암 연구 센터의 화학 연구실장이던 치하라 박사 팀은 sarcoma 180 고형 암에 대해서 종양 저지율 96.7%, 종양 완전퇴축 7/8 이라는 결과를 보고한 이래, 한 등³⁾은 국산 상황의 항암 및 항전이 효과를, 김 등⁴⁾은 국산 상황 다당체의 면역조절작용을, 송 등⁵⁾은 상황 다당체의 B세포 자극효과를 보고하는 등, 상황버섯에서 추출한 다당체들이나 배양된 균사체를 이용한 다양한 면역 및 항암효과 연구가 주로 이루어졌다. 상황의 단백질 다당체 항암 유효성분은 주로 아라비노스 7%, 실로오스 2.8%, 글루코스 21.1%, 갈락토오스 24.1%, 만노오스 44.2% 등의 구성된다고 보고되었지만, 대체로 상황에 대한 연구는 주로 한국에서 국산 상황을 중심으로 이루어졌지만 최근 캄보디아인 상황의 민간에서의 항암효과가 보고되면서 이의 실험적 연구의 필요성이 제기되었다. 이에 본인은 민간에서 암등에 활용되고 있다는 보고를 바탕으로 캄보디아인 상황버섯의 물층과 다당체를 시료로 면역세포에 대한 작용을 평가하기 위하여 FACS 분석법에 의해 lymphoblast, CD25(IL-2R a-chain), CD4(T helper cell), CD8(T suppressor cell)에 대한 영향을 분석하였고, 항암실험으로 암세포에 대한 세포독성, DNA topoisomerase I 활성 억제작용, B16BL6 암주에 대한 부착작용, 폐암전이 억제작용, 혈관형성저해작용 등을 평가하였던 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

* 교신저자 : 김성훈, 경기도 용인시 기흥읍 서전리, 경희대학교 동서의학대학원
E-mail : sungkim7@khu.ac.kr Tel : 031-201-2179

· 접수: 2002/02/09 · 수정: 2002/03/19 · 채택 : 2002/03/30

재료 및 방법

1. 재료

(주)라이프 트래킹에서 공급한 캄보디아산 상황버섯을 이용하여 물 추출물과 다당체를 만들어 실험에 사용하였다.

2. 시료의 확인 및 제조

캄보디아산 상황을 (주)마이크로바이오텍에 의뢰하여 DNA 검사를 하였더니 DNA염기서열이 미국국립생물정보센터(NCBI)의 유전자 674개중 1개만 달리 99%의 homology를 가지는 것으로 나타났다. 이 캄보디아산 상황(1kg)을 배양액 전체 용적의 2배의 증류수로 3시간 열탕 추출하여 추출액을 획득하였고 이를 배양여액과 함께 합하여 40℃에서 원래용적의 1/10로 감압 농축하여 동결건조한 후 17.75g(yield: 1.78%)의 분말을 얻어 상황 물층 시료로 사용하였으며 17.75g의 1/2의 양을 상황 다당체 분리에 이용하였다. 획득한 상황 물층 분말을 증류수 100ml에 녹인 후 3 배량의 증류 에탄올(95%)을 가해 단백 다당류를 침전시켰다. 침전을 완결시키기 위해서 4℃에 하룻밤 방치 후 완결된 침전을 4℃에서 5000rpm으로 30분간 원심 분리하였다. 얻어진 조다당류 침전물을 소량의 증류수에 재 용해시킨 후 불용성 성분을 다시 원심 분리하여 제거하고 용성분획(상등액)만을 취하여 투석막(분자량 8000미만 제거)에 넣고 증류수를 1일에 3-5씩 계속 교체하며 4℃에서 4-7일간 투석을 시행하였다. 다시 원심 분리하여 침전을 제거한 후 상등액을 -60℃에서 냉동 건조하여 건조 분말 0.521g(yield: 0.104%)을 획득하여 이를 상황 다당체 시료로 사용하였다.

3. 세포암주 및 배양

실험에 사용된 암주는 HT-1080, B16-BL6 mouse melanoma 및 mouse Sarcoma(S-180)이다. 세포주는 7.5%의 FBS가 함유된 RPMI-1640 혹은 MEM 배지를 사용하여 배양하였다.

4. 세포독성 측정

상황의 물층과 다당체를 MTT를 이용하여 세포 독성을 측정하였다. 종양세포로는 S-180, B16-BL6, HT-1080 세포를 사용하였으며 10% FBS가 첨가된 RPMI 1640과 MEM로 5% CO₂, 37℃의 조건에서 배양하며 사용하였다. In vitro 세포독성 효과를 조사하기 위하여 1×10⁴ cells과 약제를 섞어 well당 100 ul씩 96 well plate에 분주하였다. 이를 물층은 48시간 다당체는 24시간 배양한 후 배양액을 모두 버리고 MTT(5 mg/ml) 10 ul씩 넣고 4시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 plate를 PBS로 세척한 후 DMSO 100 ul를 넣고 상온에서 20분 방치한 후 ELISA 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. DNA topoisomerase I assay

실험에 사용된 DNA topoisomerase I은 calf thymus에서 유래된 것이며, supercoiled pBR322 DNA는 E.coli C 600의 것을 사용하였다. 또한 DNA topoisomerase I의 IC₅₀값을 결정하기 위해

relaxation assay를 실시하였으며 Topo I의 활성은 Liu와 Miller의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 35mM Tris-HCl(pH 8.0), 72mM KCl, 5mM MgCl₂, 5mM dithiothreitol(DTT), 5mM spermidine, 0.01% bovine album serum(BSA)를 함유하는 용액에 0.5μg pBR 322 supercoiled DNA와 효소만 가하여 총 반응액을 20μl가 되게 한 것을 대조군으로 하고, 0.5μg pBR 322 DNA와 효소, 시료를 가하여 총 반응액을 20μl되게 한 것을 시험군으로 하여 이들을 37℃에서 30분간 배양하였다. 반응은 2% SDS (sodium dodecyl sulfate), 20% glycerol 및 0.05% bromophenol blue를 포함하는 반응종결액 5μl를 첨가하여 반응을 종결시키고 이를 TBE running buffer(50mM Tris base, 50mM boric acid, 2.5mM EDTA)에 전기영동을 한 후 agarose gel에 0.5μg/ml의 ethidium bromide용액에서 1시간동안 염색, 자외선하에서 사진을 찍었다. 비교물질로는 camptothecin(CPT)을 사용한다.

6. 폐장전이 측정

각 시료의 종양전이 억제효과는 B16-BL6 melanoma 세포주를 이용하는 실험전이 종양모델을 사용하였다. 본 실험을 위한 마우스는 C57BL/6 마우스를 사용하였고 종양의 이식은 7X10⁴의 세포를 마우스 미정맥에 주사함으로 수행하였다. 다당체의 농도는 (1 mg, 5 mg, 10 mg/mouse)로 물층의 농도는(2 mg, 20 mg, 50 mg/mouse)로 하여 경구 투여 하였다. 약제에 의한 종양의 전이 억제능은 종양접종 14일 후에 마우스를 희생시키고 폐를 적출하여 폐에 전이된 종양의 군집수를 육안으로 조사하였다. 약제의 투여는 종양접종시 당일과 걸쳐 총 3회 경구투여 하였고 대조군과 비교하여 약제에 의한 종양의 억제비율을 구하였다.

7. 세포부착저지 측정

0.1% gelatin을 96 well plate에 100 ul씩 분주하여 coating한다. 이를 4℃에서 12시간 이상 방치한 후 PBS로 3회 세척하여 사용하였다. BSA(10 mg/ml)를 100 ul씩 각 well에 분주하여 37℃ 배양기에서 1시간 동안 방치한 후 PBS로 동일한 방법으로 세척하였다. 실험하고자 하는 약제와 B16-BL6 세포를 배양하여 수확한 후 5×10⁴ cells/well로 섞어서 각 well에 분주한 후 37℃ 배양기에서 1시간 반 동안 배양하였다. 배양 후 약제와 배지를 모두 제거하고 PBS로 세척한 후 serum free 배지를 100 ul씩 첨가한 후 MTT 방법으로 흡광도를 측정하였다.

8. FACS에 의한 유세포 분석

1) 비장 백혈구 현탁액 조제

BALB/C를 cervical dislocation으로 처사시킨 후 비장을 적출하고 비장현탁액을 제조한다. 세포 처리 및 형광염색용 완충액으로는 Ca²⁺과 Mg²⁺이 들어 있지 않은 Satining buffer를 사용한다. 적출한 비장을 100 mesh (sigma,U.S.A)에 올려놓고 주사기 피스톤 뒷부분으로 가볍게 문질러 조직을 분쇄한다. 15ml conical tube(Becton dickinson,U.S.A)에 옮겨 약 5분간 방치하여 조직덩어리를 침전시킨 후 상층액을 취해 2회 세척하고 0.83 % NH₄Cl 용액을 넣고 5분간 incubation시켜 적혈구를 용혈시킨

다. 다시 2회 세척하고 RPMI1640-2%FBS (sigma, U.S.A)로 1×10^6 cells/ml가 되도록 희석하였다.

2) 세포 배양 및 약물 처리

비장 백혈구 현탁액을 24-well culture plate(Becton Dickinson, U.S.A)에 1ml씩 가하고 2시간 후 complete RPMI 배지에 용해시킨 다당체와 물층의 시료를 100ul씩 가하여 5% CO₂ incubator 에서 37℃ 에서 24시간 배양하였다.

3) 면역 형광염색 (immunofluorescence staining)과 flow cytometer를 이용한 분석

면역 형광염색은 전과정을 0-4℃에서 실시하였고, 배양한 비장 세포를 회수하여 PBS로 3회 세척한 후 5ml FACS tube (Becton Dickinson,U.S.A)에 0.3ml의 staining buffer를 넣고 vortex한 후 원심분리(1300rpm,5min)한다. 각각의 단일 항체를 가지고 lymphoblast실험과 IL-2Ra-chain의 CD25, helper T cell의 CD4분자를 분석하고, cytotoxic T cell의 CD8분자를 분석하기로 한다. 각각의 1차항체 Culture sup.을 100ul 씩을 5ml FACS tube에 넣고 vortex한 후 40분간 ice에서 반응시켰다. 사용한 1차 항체는 3회 세척 후, fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-rat Ig F(ab)2 fragment 1:100(Tago,U.S.A) 희석액 50ul를 가하고 40분간 반응시켜 후 300회 세척 후 0.3ml staining buffer를 넣고 vortex한 후 FACScan(Becton dickinson, U.S.A)으로 분석하였다. 염색이 완료된 세포들을 0.3ml의 staining buffer에 부유시켜 FACS tcan(Becton dickinson,U.S.A)를 이용하여 분석한다. 시료당 5,000개의 세포에 대하여 list mode로 자료를 취합하였으며 Consort 30 프로그램을 이용, 분석한다. data의 분석은 forward scatter(FSC)와 side scatter(SSC)의 dual parameter를 이용한 dot plot 위에서 전체 비장 세포와 small lymphocyte 영역 및 lymphoblast 영역을 구분하여 그 중의 B cell, CD4⁺, T cell 비율(gated,%)을 산출한다.

9. 내피세포 세포증식 억제 측정

본 실험에 사용된 세포는 HUVEC(Human Umbilical Vein Endothelial cell)세포를 선택하였고 M199+bFGF 2ng+20%FBS media에서 배양하였다. 24 well plate에 HUVEC 세포를 8×10^3 /100ul이 되도록 조정 후 plating하고, 24시간 배양 후, 여러농도의 약재를 첨가하고 20분간 배양시켰다. 그 후 혈관내피세포의 성장인자인 bFGF를 최종농도가 5ng/ml가 되도록 조정하여 첨가하고 48시간 배양하였다. 약재에 의한 혈관내피세포의 증식 억제효과는 bFGF를 처리하지 않은 대조군의 HUVEC의 증식능과 비교하여 조사하였고 세포수는 tryphane blue 염색법에 의하여 직접 확인하였다.

10. Tube formation assay

Matrigel 200 ul를 24 well plate에 첨가후 표면에 coating하여 37℃ 30 min 배양하고, 시료를 0.5ml/well 농도로 섞어 matrigel 위에 첨가후 5-10분간 실온에서 배양하였다. HUVEC cell을 4×10^4 cell/well/500ul 농도로 배지에 첨가하고, 37℃ 12시간 배양한 후 사진 촬영을 하였다.

실험결과

1. 세포독성

B16BL6, HT-1080, S-180 암주에 대한 세포독성의 측정에서 상황버섯 다당체는 HT1080의 전이성 암주에 보다 효과적이었고, 상황버섯 물층은 S-180 암주에 대해 세포독성 효과를 보였지만 대체로 직접적인 세포독성은 현저하지 않은 것으로 나타났다(Fig 1).

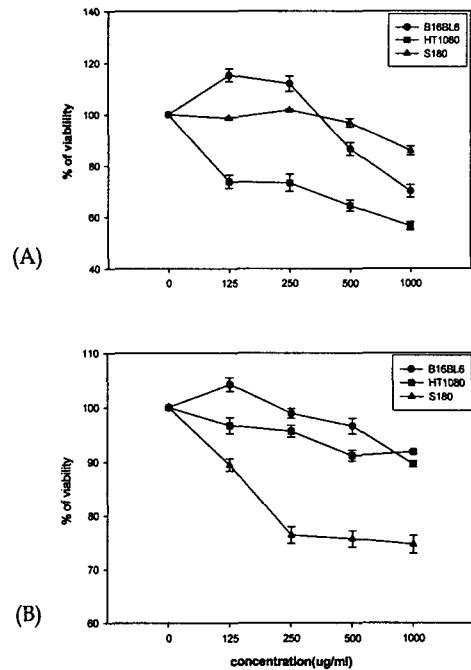


Fig. 1. Cytotoxic effect of Polysaccharide of Phellinus linteus(A) and water extract of Phellinus linteus(B) on tumor cell line.

2. DNA topoisomerase I에 미치는 효과

Fig. 2에서 보는바와 같이 DNA만을 처리한 실험군은 supercoiled form으로 나타났고, DNA에 topo-I을 처리한 대조군은 relaxed form으로 전환되었다. 상황의 다당체와 물층을 처리한 군(250, 500, 1000ug/ml)에서 농도의존적으로 topo-I의 활성을 억제하였다.



Fig 2. Polysaccharide and water extract of Phellinus linteus inhibit DNA topoisomerase. 1.(1 lane:DNA only, 2 lane: DNA+ Topo 0.5 unit, 3 lane:DNA+ Topo 1 unit, lane 4,5,6: water extract 250 ug, 500 ug, 1000 ug, lane 7,8,9 :polysaccharide 250 ug, 500 ug, 1000 ug.

3. 폐암전이 억제에 미치는 효과

B16BL6암주의 전이에 의한 폐장 colony수 관찰에서는 대조군은 174.2±14.8개 이었는데 비해서 상황 물층 50, 20, 2mg 농도의존적으로 Table.1에서 보는 바와 같이 유의성(P<0.05)있는 폐암전이 억제효과를 보였다.

Table 1. Inhibitory effect of water extract of phellinus linteus of lung colony in C57BL/C injected I.V. with B16BL6 cells.

Dosage. (mg/mouse)	Colony number	Inibitory	Rate(%)
0	174.2±14.8		0
2	111.5±3.5	36	
20	110±5.0	36.9	
50	77.6±3.9	55.5	

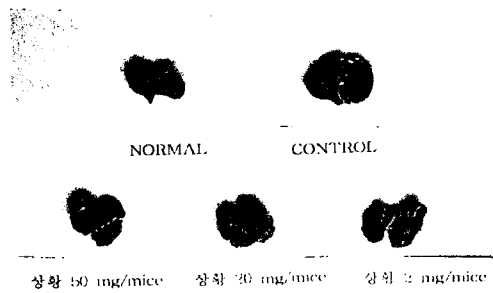


Fig. 3. Inhibitory effect of water extract of phellinus linteus of lung colonies in C57BL/C injected I.V. with B16BL6 cells.

4. 세포부착 저지효과

B16BL6세포에 대한 부착저지실험에서 대조군에 비해 62.25, 125, 250, 500, 1000 ug/ml에서 물층과 다당체에서 세포부착저지효과는 약한 것으로 나타났다.

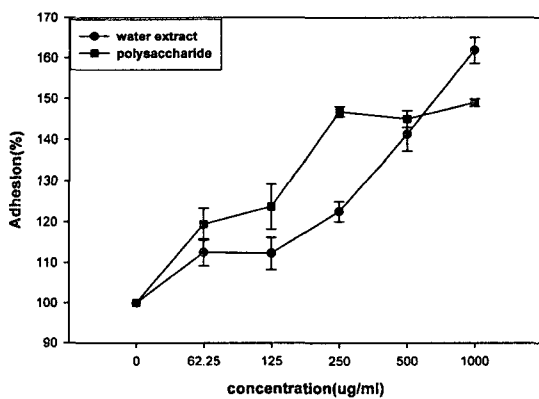


Fig. 4. Effect of water extract of Phellinus linteus on the adhesive capability of B16BL6 cells.

5. 면역조절 작용에 미치는 영향

상황버섯의 다당체와 물층의 면역세포에 대한 작용을 평가하기 위하여 FACS 분석법에 의해 lymphoblast, CD25(IL-2R a-chain), CD4(T helper cell), CD8(T suppressor cell)에 대한 영향을 분석하였다. lymphoblast 생성능 실험에서는 물층과 다당

체를 25, 50, 100, 200ug/ml로 하여 histogram을 분석 하였는데, 농도의존적으로 대조군에 비해 유의성(p<0.0001)증가됨을 나타내었다.(Table 2). CD25생성능 실험도 대조군에 비해 두배정도 증가되지만(Table 3), CD4/CD8 비율은 대조군에 비해 유의적인 차이가 없었다. (Table 4).

Table 2. The Effect of Polysaccharide of Phellinus linteus(PSP) and water extract of Phellinus linteus(WEP) on Lymphoblast in the spleens of BALB/c

% Lymphoblast						
Control	ConA12.5ug	ConA6.25ug	PSP 25ug	PSP 50ug	PSP 100ug	PSP 200ug
10.13±0.23 ^{a)}	82.86±0.11*	82.86±3.84*	12.00±0.14*	12.59±0.13*	14.22±0.24*	14.31±0.33*

% Lymphoblast						
Control	ConA6.25ug	ConA5.2.5ug	WEP25ug	WEP50ug	WEP100ug	WEP200ug
10.13±0.23 ^{a)}	82.86±3.84*	82.26±0.11*	11.76±0.30*	11.65±0.04*	12.10±0.37*	11.90±0.31*

a) mean±SE, * p<0.0001

Table 3. The Effect of Polysaccharide of Phellinus linteus(PSP) and Water extract of Phellinus linteus(WEP) on the production of cytokine(CD25) in the spleens of BALB/c

% production of cytokine(CD25)			
Control	ConA 5ug	PSP 50ug	PSP 100ug
4.95±0.20 ^{a)}	70.22±1.95*	9.80±0.23*	9.67±0.17*

% production of cytokine(CD25)			
Control	ConA 5ug	WEP 50ug	WEP 100ug
4.95±0.20 ^{a)}	70.22±1.95*	8.46±0.18*	9.30±0.26*

a) mean±SE, * p<0.001

Table 4. The Effect of Polysaccharide of Phellinus linteus(PSP) and Water extract of Phellinus linteus(WEP) on CD4/CD8 cells in the spleens of BALB/c

	Control	PSP 50ug	PSP 100ug
% CD4	23.52±0.57 ^{a)}	21.63±0.21*	22.18±0.35
% CD8	8.89±0.17	7.95±0.47	8.91±0.28
CD4/CD8	2.65±0.12	2.74±0.14	2.50±0.12

	Control	WEP 50ug	WEP 100ug
% CD4	23.52±0.57 ^{a)}	24.22±0.32*	23.82±0.30
% CD8	8.89±0.17	8.64±0.14	9.36±0.09
CD4/CD8	2.65±0.12	2.81±0.08	2.55±0.06

a) mean±SE, * p<0.05

6. 혈관 내피세포의 증식에 미치는 영향

HUVEC 내피세포의 증식억제효과에서는 다당체가 물층보다 30% 혈관내피세포 증식을 억제하였다. 다당체와 물층은 농도의존적으로 내피세포의 증식 억제를 나타내었으며 다당체는 500ug/ml에서부터는 30%, 1000ug/ml 농도에서 52% 증식 억제를 나타내었다. 물층도 1000ug/ml에서 20%의 증식억제를 나타내었다(Fig. 5).

7. 혈관형성 억제효과

HUVEC 내피세포의 신생혈관 형성 억제효과에서 대조군에서는 6시간이 경과 되면서 세포들이 분화하기 시작 하였으며, 12 시간에는 tube를 형성하기 시작하였다. 물층과 다당체 125, 250, 1000ug/ml에서 모두 대조군에 비하여 농도의존적으로 혈관망형성이 저조한 소견을 보였다.

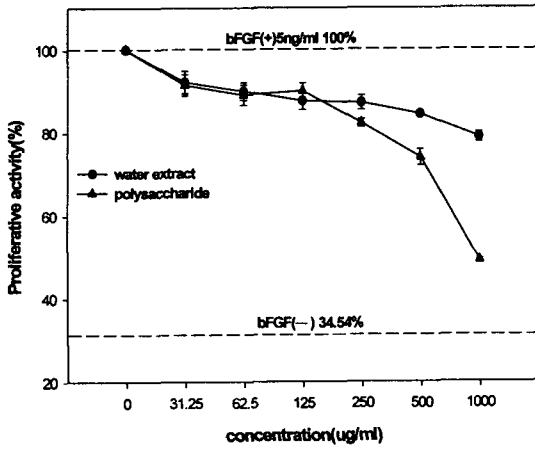


Fig 5. Inhibition effects of the water extract of *Phellinus linteus* and its polysaccharide fractions on proliferation of HUVEC cells

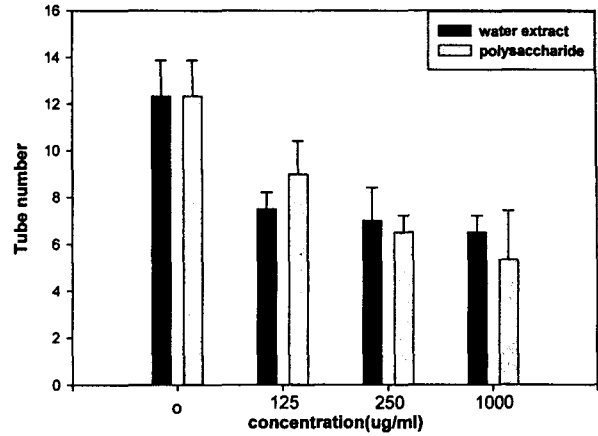


Fig 7. Effect of the Polysaccharide of *Phellinus linteus*(PSP) and water extract of *Phellinus linteus*(WEP) on capillary tube formation of HUVEC cells.

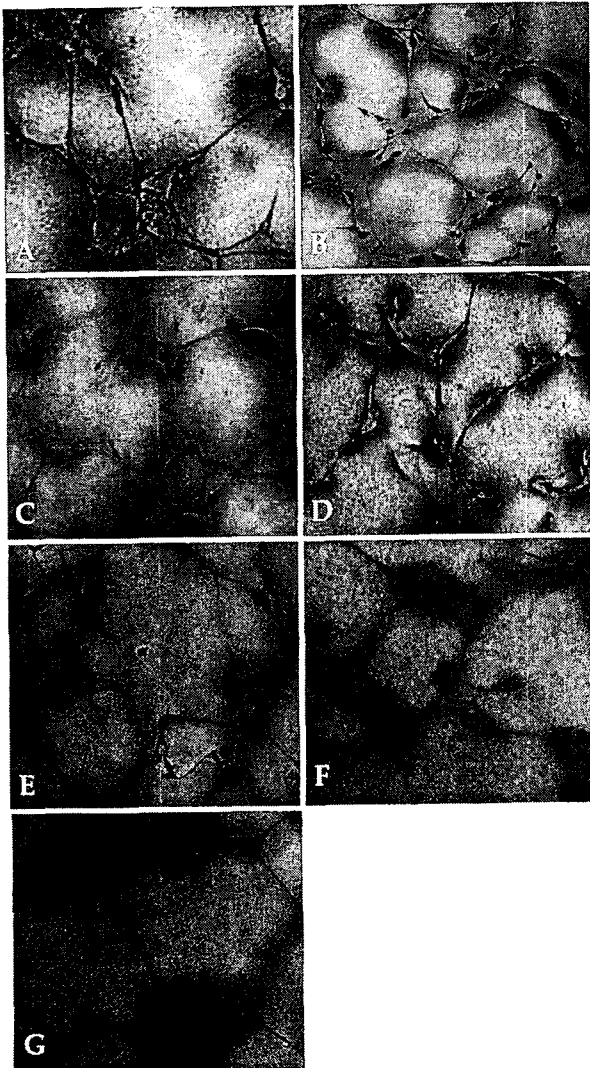


Fig 6. HUVEC morphology on Matrigel. (A) HUVECs formed capillary-like structures on Matrigel within 12h. (B) water extract 125ug/ml (C)water extract 250ug/ml(D) water extract 1000ug/ml. (E)polysaccharide 125ug/ml (F)polysaccharide 250ug/ml (G)polysaccharide 1000ug/ml. *Phellinus linteus* blocked the formation of these tube structures. A,B,C,D,E,F,G X100.

결론

캄보디아산 상황버섯 물추출물과 다당체의 항암 및 면역활성을 실험적으로 연구하였던 바, B16BL6, HT-1080, S180 암주에 대한 세포독성은 상황버섯 다당체와 물추출 모두 약하였고, B16BL6세포에 대한 부착저지는 효과가 없었다. HUVEC 내피세포의 증식 억제에서는 다당체가 물추출보다 유효하게 혈관내피세포 증식을 억제하였고, B16BL6 암주의 전이에 의한 폐장전이를 대조군에 비해 억제하는 효과를 보였으며, DNA topo-I에 대해 250ug/ml부터 농도 의존적으로 유효하게 억제하는 효과를 보였다. 또한 FACS에 의한 면역유형분석에서도 상황 물추출과 다당체가 lymphoblast 증식을 대조군에 비해 농도 의존적으로 유의성 있게 증가시켰고, CD25도 대조군의 두배 정도로 증가되었다. 이상의 결과로 보아 캄보디아산 상황버섯이 암의 전이 예방, 혈관형성 저해 및 면역조절 효과에 관여하는 것으로 보이지만 앞으로 유효물질 분리 및 작용기전 연구가 수반되어야 할 것으로 사려된다.

감사의 글

본 연구는 과학재단 특정기초연구비(No.2000-2-20500-010)의 지원에 의해 이루어졌습니다.

참고문헌

1. 박완희,이호득:한국약용버섯도감,교학사, 558, 1999.
2. 허준:동의보감,남산당,719, 1993,
3. 李時珍:본초강목,고문사, 980, 1975.
4. Han Sang-Bae, Lee Chang-Woo,Jeon Yong-Jin : The inhibitory effect of polysaccharides isolated from *Phellinus linteus* on tumor growth and metastasis. *Immunopharmacology*

- 41,157-164., 1999.
5. 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 Immunopharmacol.*18(5):295-303, 1996.
 6. Lee JH, Cho SM, Song KS, Hong ND, Yoo ID: Characterization of carbohydrate-peptide linkage of acidic heteroglycopeptide with immuno-stimulating activity from mycelium of *Phellinus linteus*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*44(5):1093-5, 1996.
 7. Song KS, Cho SM, Lee JH, Kim HM, Han SB, Ko KS, Yoo ID.: B-lymphocyte-stimulating polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 43(12):2105-8, 1995.
 8. Okada M, Ogasawara A, Sekine K, Seno C, Nishikawa K.: Antiangiogenic and antimetastatic effects of toremifene citrate. *Gan To Kagaku Ryoho* 28(8):1099-104, 1991.
 9. Antony S, Kuttan R, Kuttan G.: Effect of *viscum album* in the inhibition of lung metastasis in mice induced by B16F10 melanoma cells. *J Exp Clin Cancer Res* 16(2):159-62, 1997.
 10. Yan L, Yee JA, Li D, McGuire MH, Thompson LU.: Dietary flaxseed supplementation and experimental metastasis of melanoma cells in mice. *Cancer Letter* 124(2):181-6, 1998.
 11. Dong-Hyun Kim, Byung-Keun Yang, Sang-Chul Jeong, Jun-Bo Park, Sung-Pill Cho, Surajit Das, Jong-Won Yun, Chi-Hyun Song: Production of a hypoglycemic, extracellular polysaccharide from the submerged culture of the mushroom, *Phellinus linteus*. *Biotechnology Letters* 23:513-517, 2001.