

[文章编号] 1000 - 4718(2008)03 - 0494 - 04

# 蝉拟青霉多糖免疫调节和抗肿瘤活性的实验研究\*

金丽琴<sup>1</sup>, 熊中奎<sup>2</sup>, 吕建新<sup>3△</sup>(温州医学院<sup>1</sup>基础医学院生物化学教研室,<sup>2</sup>药学院,<sup>3</sup>检验医学院,浙江温州 325035)

**[摘要]** 目的: 研究蝉拟青霉总多糖(PcPSt)及其组分 PcPSAc 的免疫调节和抗肿瘤活性。方法: 将实验动物分为 5 组: 正常对照组、肿瘤对照组、PcPSt 组、环磷酰胺(Cy)组和 PcPSt + Cy 组, 除正常对照组外其余各组均复制荷瘤小鼠模型, 每日分别向 5 组小鼠腹腔注射生理盐水(NS)、NS、PcPSt、Cy 和 PcPSt + Cy, 10 d 后, 观察各组白细胞、脾指数、瘤重和抑瘤率等指标的变化。以 cell counting kit 8(CCK-8)为指标, 以脂多糖(LPS)为阳性对照, 观察 PcPSAc 对体外培养的小鼠脾细胞增殖活性影响。以 LPS 为阳性对照, 观察不同浓度 PcPSAc 刺激体外培养小鼠腹腔巨噬细胞(PMΦ)产生一氧化氮(NO)的作用。结果: PcPSt 能增加荷瘤小鼠白细胞数量, 缓解 Cy 所致荷瘤小鼠白细胞数的降低, 提高荷瘤小鼠的脾指数, 联用小剂量 Cy 时明显增强其抑制肿瘤作用。PcPSAc 在 600 mg/L 和 300 mg/L 浓度时能提高体外培养小鼠脾细胞的增殖活性。PcPSAc 在 15 - 300 mg/L 浓度范围内均能刺激体外培养小鼠 PMΦ 产生 NO, 其中以 300 mg/L PcPSAc 作用最强。结论: 体内试验和体外试验表明蝉拟青霉多糖具有促进免疫功能和抗肿瘤的作用。

[关键词] 拟青霉; 多糖类; 免疫力; 抗肿瘤活性

[中图分类号] R392.32/Q949.32 - 33

[文献标识码] A

## Experimental studies on immunomodulatory and antitumor activity of polysaccharide from *Paecilomyces cicadidae*

JIN Li - qin<sup>1</sup>, XIONG Zhong - kui<sup>2</sup>, LÜ Jian - xin<sup>3</sup>(<sup>1</sup>Section of Biochemistry, School of Preclinical Medicine, <sup>2</sup>School of Pharmacy, <sup>3</sup>School of Laboratory Medicine, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China. E - mail: ljx@wzmc.net)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To study the immunomodulatory and antitumor activity of both total polysaccharide from *Paecilomyces cicadidae* (PcPSt) and its fraction PcPSAc. **METHODS:** Five groups of mice which were composed of normal control, tumor control, group treated by PcPSt, treated by cyclophosphamide (Cy) and treated by both PcPSt and Cy were administrated by injecting to abdominis cavitas with normal saline (NS), NS, PcPSt, Cy, PcPSt + Cy correspondingly and respectively for 10 days after they had been injected B16 cell line except normal control. The white blood cells (WBC) were counted, spleen index and weight of tumor were statistically analysed. The cell counting kit 8 (CCK-8) was used to analyze proliferative activity of the cultured splenocytes. Nitric oxide (NO) kit was used to detect NO content of supernatant in each microplate. **RESULTS:** PcPSt increased WBC and relieved the decrease of WBC caused by Cy in tumor-bearing mice. PcPSt increased the spleen index of tumor-bearing mice and cooperated with Cy to promote antitumor activity. PcPSAc at concentrations of 600 mg/L and 300 mg/L enhanced the proliferative activity of cultured splenocytes. Appropriate doses (15 - 300 mg/L) of PcPSAc promoted the secretion of NO, the effect of 300 mg/L of PcPSAc was the strongest. **CONCLUSION:** *Paecilomyces cicadidae* polysaccharide can promote immunomodulatory and antitumor activity *in vivo* and *in vitro* experiments.

[KEY WORDS] *Paecilomyces*; Polysaccharides; Immunity; Antitumor activity

蝉拟青霉 [*Paecilomyces cicadidae* (Miquel.) Samson] 为麦角菌科拟青霉属真菌<sup>[1]</sup>, 与冬虫夏草的无性型 - 中国拟青霉 (*Paecilomyces sinensis* sp. nov) 同属。有研究表明, 蝉拟青霉具有镇痛、镇静、解热作用, 且毒性低<sup>[2,3]</sup>, 能提高正常及环磷酰胺所致免疫抑制大鼠腹腔巨噬细胞 (peritoneal macrophage,

PMΦ) 和肺泡巨噬细胞 (alveolar macrophage, AMΦ) 内有关酶的活性, 增强 PMΦ 和 AMΦ 摄取中性红能力, 表明能激活巨噬细胞<sup>[4-6]</sup>。蝉拟青霉总多糖 [total polysaccharide from *Paecilomyces cicadidae* (Miquel.) Samson, PcPSt] 能促进造血和免疫功能, 减少老龄大鼠体内脂质过氧化物含量, 与抗衰老有

[收稿日期] 2006 - 09 - 26 [修回日期] 2007 - 01 - 10

\* [基金项目] 浙江省教育厅科研基金资助项目 (No. 20020471); 温州市“551”人才基金资助项目

△通讯作者 Tel: 0577 - 86689805; E - mail: ljx@wzmc.net

关<sup>[7-9]</sup>。由于多糖对机体的免疫调节作用不仅具有剂量效应,而且有组份效应关系。因此,本实验通过观察 PcPSt 对荷瘤小鼠及环磷酰胺免疫抑制荷瘤小鼠的白细胞数、脾指数、瘤重和抑瘤率等的影响,观察单一多糖活性组分 PcPSAc 对体外培养小鼠脾细胞增殖活性、PMΦ 产生一氧化氮(nitric oxide, NO)的影响,探讨其免疫调节和抗肿瘤活性。

## 材 料 和 方 法

### 1 蝉拟青霉菌丝体

由浙江省科学院亚热带作物研究所陈祝安研究员提供。

### 2 蝉拟青霉总多糖的制备及单一组分的分离纯化

采用优化后的酶提取法工艺,即向蝉拟青霉的水浸出液中加入 1% 木瓜蛋白酶,于 50 ℃、pH 7 条件下提取 2.5 h,提取蝉拟青霉总多糖(PcPSt)的得率为 7.12%。PcPSt 经 DEAE-纤维素-52 离子交换柱层析分离得 5 个组份,依次是 PcPSA、PcPSB、PcPSC、PcPSD 和 PcPSE。经体外培养的小鼠脾细胞增殖活性试验筛选到活性组份 PcPSA。对 PcPSA 再次经过 3 次 Sephadex G 100 凝胶过滤柱层析纯化和 1 次 DEAE-纤维素-52 离子交换柱层析,所得样品 PcPSAc,经 HPLC 鉴定纯度为 100%,故认为其为均一多糖。PcPSAc 的理化性质是:溶解度为 397.83 g·L<sup>-1</sup>(25 ℃),具有吸湿性。苯酚硫酸反应阳性,Fehling 反应、茚三酮试验、双缩脲反应和淀粉试验均呈阴性。PcPSAc 溶液的稳定性  $\log C' = -2.584 \times 10^{-4}t + 6.996 \times 10^{-4}$ ,  $r^2 = 0.966$  (60 ℃)。PcPSAc 的分子量为 1.85 × 10<sup>4</sup>D,由甘露糖和半乳糖(3.998:3)组成。高碘酸氧化试验,平均每分子糖基消耗 0.42 分子 NaIO<sub>4</sub>,反应产生 0.028 分子的甲酸。紫外扫描,在 260 nm 和 280 nm 处均无吸收;红外光谱显示 PcPSAc 具有糖类的特征性光谱。

### 3 药品试剂

RPMI-1640 培养基(Sigma-Aldrich, Inc)。脂多糖:1 mg(Sigma-Aldrich, Inc)。Cell Counting Kit-8(CCK-8)(Dojindo)。NO 测定试剂盒(酶法)(南京建成生物工程研究所)。氯化钠注射液(NS, 10 mL:90 mg)(扬州中宝制药有限公司)。注射用环磷酰胺(Cy)(批号 0401121,江苏恒瑞医药股份有限公司)。PcPSt 注射液:2 g/L,本实验室配制。

### 4 仪器

Forma II 饱和蒸汽二氧化碳培养箱, Thermo Electron;酶标仪, Universal Dialab;CX31RBSF 型显微镜, Olympus;Nikon Eclipse TS100 倒置显微镜, Nikon; Air Tech 超净工作台, 苏净集团安泰公司。

### 5 细胞株

小鼠黑色素瘤细胞(B16)购自中国科学院上海细胞研究所。

### 6 实验动物

ICR 小鼠,清洁级动物,雄性,6-8 周,(20 ± 2) g,温州医学院实验动物中心提供。饲养于空调温室内,温度(20 ± 1) ℃,湿度 40% - 50%,光照 12 h·d<sup>-1</sup>,颗粒饲料喂养,自由饮水。

### 7 荷瘤小鼠体内抗肿瘤活性实验<sup>[10]</sup>

将 50 只 ICR 小鼠随机分为 5 组,即正常对照组、肿瘤对照组、PcPSt 组、Cy 组、PcPSt + Cy 组。除第 1 组外,其它组小鼠背部皮下注射 B16 细胞悬液(2 × 10<sup>10</sup> cells/L, 0.2 mL),复制荷瘤小鼠模型。接种肿瘤细胞 24 h 后,各组小鼠分别进行以下处理:正常对照组:200 μL NS, ip, qd × 10 d;肿瘤对照组:200 μL NS, ip, qd × 10 d;PcPSt 组:200 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> PcPSt, ip, qd × 10 d;Cy 组:20 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> Cy, ip, qd × 10 d;PcPSt + Cy 组:200 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> PcPSt + 20 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> Cy, ip, qd × 10 d。末次给药 24 h 后,称小鼠体重,自眼眶取血 20 μL 加至 380 μL 白细胞稀释液中,镜下计数白细胞。颈锥脱臼法处死小鼠,解剖取出小鼠的脾脏和肿瘤,分别称重,计算脾指数和抑瘤率。

### 8 小鼠脾细胞增殖活性实验<sup>[11]</sup>

颈锥脱臼法处死 ICR 小鼠,制备脾细胞悬液并调整细胞浓度为 1 × 10<sup>10</sup> cells/L。取 96 孔培养板,每孔加脾细胞悬液 100 μL,共计 21 孔,分为 7 组,每组 3 孔。阴性对照组加入 100 μL 培养基;阳性对照组加入 100 μL LPS 溶液使终浓度为 15 mg/L;实验组加入 PcPSAc 溶液使终浓度分别为 600、300、150、30、15 mg/L,终体积 200 μL。将培养板置于 37 ℃ 含 5% CO<sub>2</sub> 的饱和水蒸汽二氧化碳培养箱中培养 48 h。按照试剂盒说明书检测每孔细胞 CCK-8 值。在酶标仪上 450 nm 处读取 A 值,以 A 值表示脾细胞增殖活性。

### 9 小鼠 PMΦ 的培养处理与 NO 含量检测<sup>[4,12]</sup>

将 ICR 小鼠颈锥脱臼法处死制备 PMΦ 悬液,并调整细胞浓度为 2.0 × 10<sup>8</sup> cells/L。取 96 孔培养板,每孔加细胞悬液 100 μL,共计 18 孔。将 18 孔细胞悬液分为 6 组,每组 3 孔。阴性对照组加入 100 μL 培养液;阳性对照组加入 100 μL LPS 使终浓度为 15 mg/L;实验组加 PcPSAc 使终浓度分别为 15、30、150、300 mg/L,终体积 200 μL。将培养板置于 37 ℃ 含 5% CO<sub>2</sub> 的饱和水蒸汽二氧化碳培养箱中培养 24 h。按照试剂盒说明书于 550 nm 处检测每孔细胞上清液的 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 含量。

### 10 统计学处理

数据用均值 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,使用 SPSS 13.0 统计软件。对均数的比较,荷瘤小鼠体内抗肿

瘤活性试验中肿瘤对照组与空白对照组之间比较采用独立样本 Student's *t* test, 其它组之间比较采用 LSD 法; 小鼠脾细胞增殖试验和小鼠 PMΦ 中 NO 测定试验中各组之间比较采用 Dunnett's *t* test。

## 结 果

### 1 PcPSt 对荷瘤小鼠体内免疫调节和抗肿瘤活性的影响

**1.1 PcPSt 对荷瘤小鼠白细胞数的影响** 如表 1 所示, 肿瘤对照组荷瘤小鼠的白细胞数与正常对照组相比较, 无显著差异 ( $P > 0.05$ )。与肿瘤对照组相比, PcPSt 组荷瘤小鼠白细胞数明显增加 ( $P < 0.05$ ), Cy 组荷瘤小鼠白细胞数显著降低 ( $P < 0.01$ ), PcPSt + Cy 组白细胞数明显低于肿瘤对照组 ( $P < 0.05$ ), 但显著多于 Cy 组 ( $P < 0.05$ )。

表 1 PcPSt 和/或 Cy 对荷瘤小鼠白细胞数的影响

Tab 1 Effects of PcPSt and/or Cy on the number of WBC in tumor-bearing mice ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

Group	Dose ( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )	WBC ( $\times 10^9$ cells/L)
Normal control	-	7.13 $\pm$ 1.98
Tumor control	-	6.49 $\pm$ 1.66
PcPSt treatment	200	8.57 $\pm$ 3.67*
Cy treatment	20	1.89 $\pm$ 1.19**
PcPSt + Cy treatment	200 + 20	3.93 $\pm$ 1.07 <sup>Δ</sup>

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs tumor control; <sup>Δ</sup> $P < 0.05$  vs Cy treatment.

**1.2 PcPSt 对荷瘤小鼠脾指数的影响** 如表 2 所示, 肿瘤对照组的荷瘤小鼠脾指数与正常对照组相比较, 无显著差异 ( $P > 0.05$ )。与肿瘤对照组相比, Cy 组、PcPSt + Cy 组脾指数的差异无显著, PcPSt 组脾指数显著高于肿瘤对照组 ( $P < 0.01$ )。PcPSt + Cy 组脾指数显著高于 Cy 组 ( $P < 0.05$ )。

表 2 PcPSt 和 Cy 对荷瘤小鼠脾指数的影响

Tab 2 Effects of PcPSt and Cy on spleen index of tumor-bearing mice ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

Group	Dose ( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )	Spleen index ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )
Normal control	-	2.43 $\pm$ 0.49
Tumor control	-	2.36 $\pm$ 0.79
PcPSt treatment	200	4.44 $\pm$ 1.02**
Cy treatment	20	2.08 $\pm$ 1.47
PcPSt + Cy treatment	200 + 20	2.93 $\pm$ 0.88 <sup>Δ</sup>

Spleen index = (weight of spleen / weight of mouse)  $\times$  100%.

\*\*  $P < 0.01$  vs tumor control; <sup>Δ</sup> $P < 0.05$  vs Cy treatment.

**1.3 PcPSt 对荷瘤小鼠的瘤重和抑瘤率的影响** 如表 3 所示, 单独使用 PcPSt 对荷瘤小鼠的肿瘤作用不明

显, 抑瘤率仅为 8.28%; 20  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  的 Cy 抑瘤率为 33.93%, 与肿瘤对照组相比差异不显著 ( $P > 0.05$ ); 当同时使用 Cy 和 PcPSt 时, 抑瘤率增加至 57.11%, 与肿瘤对照组相比有显著差异 ( $P < 0.01$ )。

表 3 PcPSt 和/或 Cy 对荷瘤小鼠瘤重和抑瘤率的影响

Tab 3 Effects of PcPSt and/or Cy on weight of tumor and inhibitory rate in tumor-bearing mice ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

Group	Dose ( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )	Weight of tumor (mg)	Inhibitory rate
Normal control	-	-	-
Tumor control	-	164.64 $\pm$ 78.14	-
PcPSt treatment	200	151.00 $\pm$ 78.38	8.28%
Cy treatment	20	108.78 $\pm$ 59.68	33.93%
PcPSt + Cy treatment	200 + 20	70.62 $\pm$ 38.48**	57.11%

Inhibitory rate =  $(1 - \text{Wt}/\text{Wc}) \times 100\%$ ; Wt: average weight of tumors in experimental groups; Wc: average weight of tumors in tumor control groups. \*\*  $P < 0.01$  vs tumor control.

### 2 PcPSAc 对小鼠脾细胞增殖活性的影响

如图 1 所示, 各实验组脾细胞增殖活性与 LPS 组相比较, 均有显著差异 (均为  $P < 0.01$ )。在 PcPSAc 的不同浓度 (600、300、150、30 和 15  $\text{mg}/\text{L}$ ) 中, 600  $\text{mg}/\text{L}$  PcPSAc 和 300  $\text{mg}/\text{L}$  PcPSAc 与对照组相比较显著差异 ( $P < 0.05$ )。

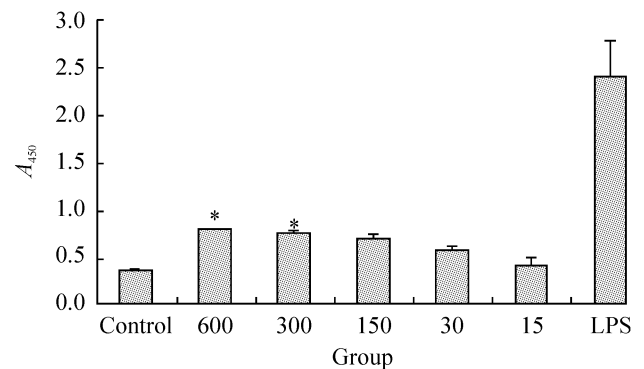


Fig 1 Effects of PcPSAc on proliferative activity of splenocytes of mice *in vitro*.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$  vs control.

图 1 PcPSAc 对体外培养小鼠脾细胞增殖活性的影响

### 3 PcPSAc 对小鼠 PMΦ 生成 NO 的影响

如图 2 所示, 不同浓度 (300、150、30 和 15  $\text{mg}/\text{L}$ ) 的 PcPSAc 组小鼠 PMΦ 产生  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  的水平与对照组相比较, 均有显著差异 (均  $P < 0.01$ ), 且随着 PcPSAc 浓度的增加  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  也增多。

## 讨 论

本实验结果提示 PcPSt 能升高白细胞数、保护和促进机体免疫系统中的重要免疫器官 - 脾脏的免疫功能, 从而拮抗 Cy 引起的免疫抑制作用。本实验

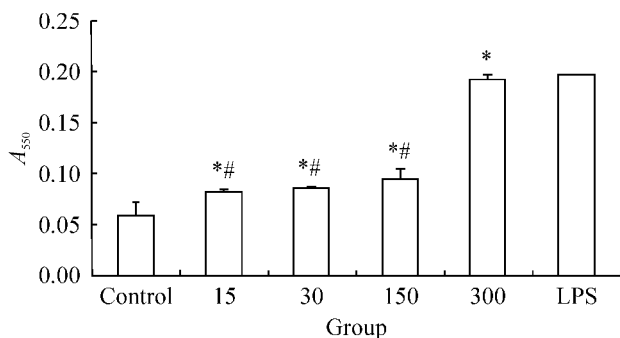


Fig 2 Effect of PcPSAc on NO production in PMΦ of mice *in vitro*.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ . \*  $P < 0.01$  vs control; #  $P < 0.01$  vs LPS.

## 图2 PcPSAc 对体外培养的小鼠 PMΦ 产生 NO 的影响

PcPSt 对荷瘤小鼠体内抗肿瘤影响也显示:单独使用 PcPSt 时并无抗肿瘤作用,当联合使用 Cy 时,显著增强 Cy 的抗肿瘤作用。表明 PcPSt 能拮抗 Cy 所致的免疫抑制,并能增强 Cy 的疗效,减轻 Cy 的部分不良反应。在动物试验之前的体外抗肿瘤试验中,蝉拟青霉多糖也无直接的抑制小鼠黑色素瘤细胞 B16 的作用,本实验与动物体外试验结果一致。因此认为, PcPSt 可作为一种新的生物反应调节剂,在肿瘤生物治疗中可与环磷酰胺之类的化疗药同时使用,以阻遏肿瘤患者在放疗、化疗中免疫功能的进一步下降,但还有待进一步深入研究。

CCK-8 检测常用于简便而准确的细胞增殖分析。本实验结果显示 PcPSAc 具有刺激和促进体外培养小鼠脾细胞增殖的作用,表明脾细胞能被 PcPSAc 所活化。在 PcPSAc 的不同浓度(600、300、150、30 和 15 mg/L)中,随着浓度的增加,脾细胞增殖也加快,其中 600 mg/L PcPSAc 作用最大,表明 PcPSAc 对体外培养小鼠脾细胞的促增殖活性具有浓度依赖关系,推测 PcPSAc 对机体的免疫调节也具有浓度依赖效应。

PMΦ 是 1 种具有多种功能的免疫细胞。NO 作为 PMΦ 重要的效应分子能增强其溶菌和吞噬活性,具有抗微生物和抗肿瘤的作用。NO 的合成主要通过 MΦ 表达诱导型一氧化氮合酶(inducible NOS, iNOS)催化 L-精氨酸实现。研究表明许多多糖能刺激 MΦ 产生 NO。从桑黄、黄芪、仙人掌中分离的多糖能诱导巨噬细胞 iNOS 的表达,促进 NO 的合成<sup>[13,14]</sup>。Gi 等<sup>[15]</sup>研究发现,分离于 *Phellinus linteus* 的酸性多糖通过蛋白酪氨酸激酶(protein tyrosine kinase)和蛋白激酶 C(protein kinase C)途径,激活巨噬细胞诱导 iNOS mRNA 的表达和 NO 的产生,从而表现出杀伤肿瘤细胞的活性。本实验结果表明, PcPSAc 对体外培养小鼠 PMΦ 均有刺激 NO 生成的作用,由于 300 mg/L PcPSAc 作用最强,说明 PcPSAc

对 PMΦ 产生 NO 具有浓度剂量依赖性。

由于总多糖中成分复杂,因此对总多糖进行了分离、筛选,得到有效活性组分,并将其进一步提取、纯化,以获得单一的纯度为 100% 的多糖组分 PcPSAc,来观察其免疫调节作用和抗肿瘤活性。

## [参 考 文 献]

- [1] 江苏新医学院编. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社,1986. 2557-2558.
- [2] 冯立才. 上海天马山蝉花的初步研究[J]. 上海应用技术学院学报,2002,2(2):125-127.
- [3] 刘广玉,胡菽英. 天然蝉花与人工培养品的镇静镇痛作用的比较[J]. 现代应用药学,1991,8(2):5-8.
- [4] 陈秀芳,金丽琴,吕建新,等. 蝉拟青霉对腹腔及肺巨噬细胞的激活作用[J]. 中国病理生理杂志,2002,18(6):694-697.
- [5] 金丽琴,吕建新,袁 谦,等. 蝉拟青霉对大鼠免疫功能及血液生化指标的影响[J]. 温州医学院学报,2001,31(6):344-346.
- [6] 陈秀芳,金丽琴,吕建新,等. 蝉拟青霉减轻环磷酰胺所致免疫抑制效应的实验研究[J]. 温州医学院学报,2002,32(6):351-353.
- [7] 杨介钻,金丽琴,吕建新,等. 蝉拟青霉多糖抗衰老作用的实验研究[J]. 中国老年学杂志,2004,24(4):343-344.
- [8] 金丽琴,吕建新,杨介钻,等. 蝉拟青霉总多糖对免疫抑制大鼠组织器官免疫功能调节的实验研究[J]. 中国病理生理杂志,2006,22(5):881-884.
- [9] 金丽琴,吕建新,杨介钻,等. 蝉拟青霉总多糖对老龄大鼠巨噬细胞激活作用[J]. 中国病理生理杂志,2006,22(1):116-119.
- [10] 王 勇,王宗伟,黄兆胜,等. 芦荟多糖对肿瘤化疗的增效和减毒作用研究[J]. 中药新药与临床药理,2002,13(2):89-91.
- [11] 薛庆善 主编. 体外培养的原理与技术[M]. 北京:科学出版社,2001. 453-454.
- [12] 许 波,杨 军. NO 与巨噬细胞抗肿瘤细胞毒效应关系[J]. 重庆医学,2003,32(3):277-279.
- [13] Gi YK, Gap SC, Sang HL, et al. Acidic polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* enhances through the up-regulation of nitric oxide and tumor necrosis factor- $\alpha$  from peritoneal macrophages [J]. J Ethnopharmacol, 2004,95(1):69-76.
- [14] Kun YL, Young JJ. Macrophage activation by polysaccharide isolated from *Astragalus membranaceus* [J]. Int Immunopharmacol, 2005,5(7-8):1225-1233.
- [15] Gi YK, Yang HO, Yeong MP, et al. Acidic polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* induces nitric oxide-mediated tumoricidal activity of macrophages through protein tyrosine kinase and protein kinase C [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003,309(2):399-407.