# 茶树菇活性蛋白组分的体内抗肿瘤活性研究

梁一[1]，郭莲仙[1]，孙慧[2]
（1. 广东医学院医学检验学院，广东东莞 523808）
（2. 武汉大学生命科学学院病毒学国家重点实验室，湖北武汉 430072）

**摘要：**本文基于大型真菌茶树菇活性抗肿瘤蛋白组分 Yt 的研究，旨在深入理解其如何通过调节机体免疫系统来发挥生物学功能。通过 H22 荷瘤小鼠模型，检测瘤内注射 Yt（5 mg/kg）抑制肿瘤生长活性，诱导机体产生抗体滴度，并通过再次接种肿瘤细胞检测其是否刺激机体产生免疫记忆功能，最后通过 ELISA 方法检测血清细胞因子 IL-2 和 TNF-α 的表达水平变化。实验发现，瘤内注射 Yt 可显著抑制小鼠肿瘤生长。Yt、主要蛋白组分 Yp 和小分子组分 Ys 均不会诱导机体产生大量抗体而有毒性。Yt 治疗后小鼠可获得抗肿瘤免疫记忆功能，且上调血清细胞因子 IL-2 的表达（84.6±37.6 pg/mL，$p<0.05$），TNF-α 与对照组相比无显著性差异。该数据表明茶树菇活性蛋白组分 Yt 可激活机体免疫功能，暗示了其作为肿瘤疫苗佐剂的潜力。

**关键词：**大型真菌；免疫调节；活性蛋白
**文章篇号：**1673-9078(2014)7-1-5

# *In vivo* Antitumor Activity of the Active Protein Components from *Agrocybe aegerita* on Tumor-bearing Mouse Model

**LIANG Yi [1], GUO Lian-xian[1], SUN Hui[2]**
(1.Department of Clinical Immunology, Guangdong Medical College, Dongguan 523808, China)
(2.State Key Laboratory of Virology, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

**Abstract:** The regulation effect of active antitumor protein components Yt from macrofungi *Agrocybe aegerita* on immune system were investigated in this research. The antitumor activity, the antibody titer, and the immune memory effect were detected on H22-bearing mouse model treated by intratumoral injection of Yt (5 mg/kg). The alteration expression of serum cytokines IL-2 and TNF-α was also measured by ELISA. The results showed that Yt significantly inhibited the tumor growth. The treatment of Yt, the protein component Yp, and the low weight molecules component Ys did not induce the production of high titer antibody and result in toxicity. Yt induced the long-term memory effect to protect the animals from the tumor cell challenge, up-regulated the expression of serum IL-2 (84.6±37.6 pg/mL, $p<0.05$), and did not significantly change the expression of TNF-α. All these data indicated that Yt could active the immune system, and thus can be potentially used as the immune adjuvant of tumor vaccine.

**Key words:** macrofungi; immune regulation; active proteins

大型真菌在东方因其药用价值，尤其是它的抗肿瘤活性有着两千年的闻名历史。直到上个世纪 50 年代，由于技术成熟和多糖等有效成分的分离鉴定，大型真菌的药用价值逐渐被欧美研究者所重视[1~2]。越来越多的活性成分在动物或临床试验中进行筛选和验证，发现很多具有免疫调节功能，从而使之具有独特且卓越的抗肿瘤活性。

现代医药学研究认为，多糖是大型真菌中主要的抗肿瘤活性成分[3~4]。大分子多糖可作为免疫调节剂发挥治疗作用，因此常被开发成食品补充剂（dietary supplement）或药物。在有效组分分析中，多糖常用酸、碱及高温浸提，萜类、脂类多使用有机溶剂（甲醇，乙醇等）浸提，许多活性物质如蛋白质会被变性或遗漏。且由于大型真菌基因组信息的匮乏，因此对大型真菌蛋白质活性成分的报道非常有限，仅有的蛋白质研究大多只停留在分离提纯阶段，药理活性没有得到充分研究，活性蛋白质基因，结构，抗肿瘤机理

收稿日期：2014-1-23
基金项目：国家自然科学基金项目（81102850）；广东省卫生厅基金（A2011434）；广东省教育厅育苗工程（LYM11070）；东莞市科技局项目（2011108102049）；湛江市科技攻关项目（2011C3109015）
作者简介：梁一（1981-），女，博士，讲师，研究方向：药用真菌抗肿瘤、抗病毒活性成分
通讯作者：孙慧（1974-），女，博士，教授，研究方向：药用真菌抗肿瘤、抗病毒活性成分；郭莲仙（1984-），女，博士，讲师，研究方向：食品生物技术

等研究更少。

本研究基于之前的发现：茶树菇活性组分 Yt 可显著抑制体内体外肿瘤细胞的生长，且活性与免疫调节密切相关。使用蛋白酶 K 降解其蛋白质组分将显著减低其抗肿瘤活性，因此提出，大型真菌活性蛋白是除多糖以外另一种重要的抗肿瘤活性组分[5]。本文通过小鼠肿瘤模型进一步研究 Yt 免疫调节功能，希望能为大型真菌抗肿瘤研究提供新的理论基础，并为抗肿瘤药物研发提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品制备

茶树菇 *Agrocybe aegerita* 子实体购买自福建省三明食用菌研究所。将茶树菇子实体在 60 ℃烘干，粉碎，取 15 g 干粉用 300 mL PBS 浸泡抽提 2~3 次，用四层纱布过滤，6000 r/min 离心 30 min，合并提取液，加硫酸铵至 40%饱和度，继续搅拌 20 min，10000 r/min 离心 20 min，弃沉淀，取上清；再加入磷酸铵至 80%饱和度，充分沉淀 60 min，10000 r/min 离心 20 min，取沉淀。将沉淀用 PBS 重悬，用蒸馏水充分透析后，冻干，得到的组分称为 Yt。采用日本三菱产非极性大孔吸附树脂 HP-20 分离 Yt 中蛋白组分 Yp 与色素组分 Ys[6]。Yt 以浓度 10 mg/mL，速度为 1 mL/min 上样。穿透为 Yp，使用 75~80%的乙醇洗柱子，洗脱液为 Ys。Ys 在 37 ℃温箱中放置使酒精挥发后与 Yp 一起冻干。

### 1.2 Yt 瘤内注射对 H22 荷瘤小鼠的抑制肿瘤生长实验

BALB/c 小鼠（雌雄各半，6 周龄，16~18 g）购自湖北省动物中心，并按照实验动物管理条例饲养在湖北省动物中心屏障系统中。由腹水小鼠抽取 H22 腹水，用生理盐水洗涤并重悬计数，以浓度为 $5\times10^5$ 个/mL 皮下接种 100 μL 于小鼠右前腿腋下，6~7 d 皮下有可触肿瘤块的形成说明模型构建成功。肿瘤细胞接种第四天，药物 Yt 按照 5 mg/kg 动物体重的剂量通过瘤内注射使用，隔天注射 16 次，并记录肿瘤生长情况，测量肿瘤最大直径和最小直径，按照肿瘤体积 $=1/2L_1L_2^2$（$L_1$ 为最大直径，$L_2$ 为最小直径）来计算。

### 1.3 瘤内注射 Yt 产生抗体检测

2.5 mg/kg 动物体重剂量的 Yp 和 Ys 按照 Yt 的注射方法进行，在 BALB/c 小鼠完成瘤内注射 Yt、Yp、Ys 治疗后，眼球采血，室温放置 1 h，置于 4 ℃过夜。4000 r/min 离心 10 min，取上清用 ELISA 方法检测 Yt、Yp、Ys 抗体的产生。分别将 20 μg/mL Yt、Yp、Ys 包被在 ELISA 板上，4 ℃放置过夜。甩掉上清，室温下 PBST（0.05%吐温）洗板 5 次，每次 4 min。3% BSA（溶于 PBST）每孔 200 μL 37 ℃封闭 1 h。室温下 PBST（0.05%吐温）洗板 5 次，每次 4 min。

加入检测血清。阴性对照包括：底物+终止剂；包被 Yt、Yp、Ys+二抗+底物+终止剂；包被 Yt、Yp、Ys +底物+终止剂。阳性对照为：20 μg/mL Yt 包被+倍比稀释的 AAL（*Agrocybe aegerita* lectin）-抗体（1:500，1:1000，1:2000，1:4000，1:8000，1:16000，1:32000，1:64000），实验组：倍比稀释的 Yt 治疗组动物血清（1:500，1:1000，1:2000，1:4000，1:8000，1:16000，1:32000，1:64000），倍比稀释的 Yp，Ys 治疗组动物血清（1:500，1:1000，1:2000，1:4000，1:8000，1:16000，1:32000，1:64000）。去除一抗，室温下 PBST（0.05%吐温）洗板 5 次，每次 4 min。二抗 1:40000 37 ℃温浴 1 h。室温下 PBST（0.05%吐温）洗板 5 次，每次 4 min。TMB 显色 5~20 min，0.5 mol/L 硫酸终止反应。使用酶标仪测定 450 nm 处 OD 值。

### 1.4 Yt 瘤内注射对荷 H22 的 BALB/c 小鼠的免疫记忆功能

选择 Yt 治疗后肿瘤消退的小鼠，使用周龄相同的正常小鼠作为对照，两周后原位再次接种 H22（$1\times10^6$ 个/mL），观察小鼠肿瘤生长状况。

### 1.5 小鼠血清细胞因子的表达水平检测

瘤内注射 Yt（5 mg/kg）的 BALB/c 小鼠，在注射完成后，眼球采血，室温放置 1 h，置于 4 ℃过夜。4000 r/min 离心 10 min，取上清用博士德 IL-2，TNF-α ELISA 检测试剂盒检测血清中细胞因子 IL-2，TNF-α 的含量，使用 IL-2，TNF-α 的标准品倍比稀释作出标准曲线。

### 1.6 统计学方法

应用统计软件 Sigma Stat 3.5 版本进行数据分析，首先进行标准化分析并转化以符合正态分布要求。肿瘤组织大小比较通过 one-way ANOVA 结合 Tukey post hoc tests 分析。数据均使用平均值±SD 表示，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果与讨论

### 2.1 Yt 在荷瘤小鼠模型中的抗肿瘤活性

在之前研究中，我们发现从茶树菇中提取的活性蛋白组分 Yt，无论是在肿瘤细胞系还是荷瘤小鼠模型上，都表现出显著的抗肿瘤活性，且其抗肿瘤活性与免疫系统密切相关(裸鼠模型中抗肿瘤活性部分丧失)[5]。因此希望通过进一步研究，探讨活性蛋白组分 Yt 对荷瘤小鼠的免疫调节功能。

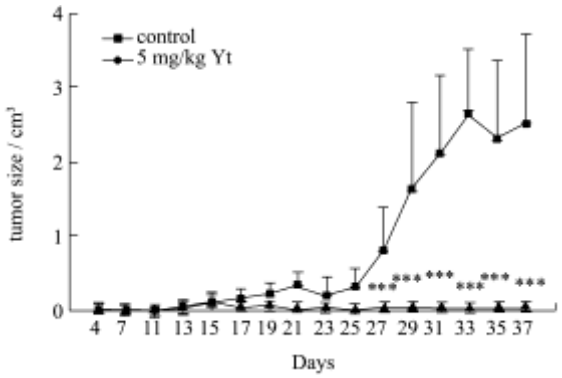



图 1 Yt 对 BALB/c 荷瘤小鼠的抑制肿瘤作用

**Fig.1 The tumor-rejected activity of Yt on the tumor-bearing mouse model**

注：Yt 处理小鼠的肿瘤大小变化。肿瘤体积=1/2$L_1L_2^2$（$L_1$ 为最大直径，$L_2$ 为最小直径），通过 one-way ANOVA 结合 Tukey post hoc tests 分析，在 27、29、31、33、35、37 处理组和对照组有显著性差异（***代表 p<0.001）。每组 10 只动物。

肿瘤大小统计数据显示（图 1），实验组与对照组小鼠肿瘤大小显著不同，小鼠肿瘤组织的生长得到明显抑制，尤其是在第 27、29、31、33、35、37 d，10 只小鼠接种位置肿瘤组织完全消退。上述数据说明 Yt 在荷 H22 的小鼠模型中表现出显著的抑制肿瘤活性，这与之前的研究结果是一致的。而 Yt 的分离组分蛋白质 Yp 和小分子组分 Ys，二者仍具显著的抗肿瘤活性，但都弱于总组分 Yt[6]，这说明 Yt 的抗肿瘤活性是通过两种组分作用的累加。

## 2.2 荷瘤小鼠瘤内注射 Yt 产生抗体检测

由于 Yt 组分主要是蛋白质 Yp 和小分子化合物 Ys[6]，蛋白质组分可能会使机体产生大量抗体从而具有毒性，因此我们使用 ELISA 方法检测 Yt 治疗小鼠（5 mg/kg）血清抗体产生情况及蛋白质组分 Yp、小分子组分 Ys（2.5 mg/kg）治疗小鼠后血清抗体产生情况，结果见表 1。以 AAL（Yt 的主要成分之一）的抗体为阳性对照，结果表明，当 AAL 抗体在低浓度下（1:64000），仍然可以检测到阳性信号。Yt 治疗组动物血清在高浓度下（1:500），信号依然很弱。其中小分子组分 Ys 治疗组小鼠血清在高浓度（1:500）下，阳性信号很弱，这与小分子物质不易引发动物机体免疫反应有关，而蛋白组分 Yp 引发机体抗体血清滴度很低，这可能与蛋白组分含量较高，高频注射产生高区带耐受有关。也说明了 Yt、Yp、Ys 瘤内注射不会因引发机体产生大量抗体而带来毒性。

表 1 ELISA 检测 Yt、Yp、Ys 治疗组小鼠相关抗体的产生

**Table 1 The detection of antibody of the Yt, Yp and Ys-treated mice by ELISA**

| OD490 | 1:500 | 1:1000 | 1:2000 | 1:4000 | 1:8000 | 1:16000 | 1:32000 | 1:64000 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Yt 包被，AAL 抗体检测 | 2.89±0.11 | 2.70±0.21 | 2.57±0.13 | 2.35±0.15 | 1.89±0.12 | 0.63±0.09 | 0.5±0.05 | 0.33±0.05 |
| Yt 包被，Yt 组血清检测 | 0.10±0.01 | 0.09±0.03 | 0.09±0.05 | 0.09±0.03 | 0.09±0.03 | 0.09±0.02 | 0.09±0.03 | 0.09±0.03 |
| Yp 包被，Yp 组血清检测 | 0.098±0.01 | 0.089±0.005 | 0.090±0.04 | 0.087±0.02 | 0.089±0.01 | 0.086±0.03 | 0.076±0.02 | 0.077±0.01 |
| Ys 包被，Ys 组血清检测 | 0.089±0.01 | 0.074±0.01 | 0.084±0.021 | 0.074±0.02 | 0.074±0.01 | 0.075±0.03 | 0.073±0.01 | 0.071±0.014 |

蛋白质/多肽由于其容易在胃肠道及血液中被降解，或者容易产生抗体，在传统观点中通常不作为药物开发的候选分子，这也是药用真菌中蛋白质活性成分被忽略的重要原因之一。然而，近些年来，越来越多的蛋白/多肽被开发成药物，蛋白/多肽药物也因其高亲和性，高特异性，低毒性的特点，逐渐成为现代医药的重要组成部分。例如，豚鼠血清来源的 L-天冬酰胺酶，由于肿瘤细胞的生长比正常细胞需要更大量的天冬酰胺，因此使用天冬酰胺酶降解天冬酰胺，从而特异性抑制肿瘤细胞的生长，L-天冬酰胺酶已成为治疗白血病的常用药物[7]。2005 年通过批准的艾塞那肽 Exenatide 是从大毒蜥唾液中提取的一种多肽类药物，用于治疗 II 型糖尿病[8]。虽然有许多蛋白/多肽从真菌中分离纯化出来，但报道具有活性的仍是少数。我们研究发现，药用真菌中蛋白/多肽组分具有很强的抗肿瘤和延长小鼠生存期的活性，且毒性较小，表明其作为抗肿瘤候选药物的潜力。

## 2.3 Yt 抗肿瘤效应的免疫记忆作用

Yt 在 BALB/c 小鼠及裸鼠模型中表现出不同的抗

肿瘤活性，且通过刺激小鼠的免疫系统来发挥活性[5]。我们进一步检测这种免疫活性是否具有记忆性。

瘤内注射 Yt（5 mg/kg）16 次，选择肿瘤消退的小鼠，两周后原位再次接种 H22（$1\times10^6$ 个/mL，为建肿瘤模型的 10 倍），同时使用相同周龄的小鼠做对照。从表 2 可以看出，对照组小鼠肿瘤正常生长，Yt 治疗且肿瘤消退的小鼠再次接种 H22 肿瘤细胞，到第三周都未见肿瘤生长。这说明 Yt 处理后小鼠的免疫反应具有记忆性，可保护小鼠不长肿瘤。

表 2 Yt 抗肿瘤效应的长时记忆作用

**Table 2 The long memory effect of Yt on mouse model**

| 动物 | 无肿瘤/总动物数（2 weeks） | 无肿瘤/总动物数（3 weeks） |
|---|---|---|
| 对照组 | 4/6 | 0/6 |
| 5 mg/kg Yt | 6/6 | 6/6 |

肿瘤治疗的临床难题之一即手术后的复发转移，因此好的治疗型肿瘤疫苗除了可消退肿瘤或抑制肿瘤转移，更重要的是具有预防保护作用[9]。很多临床试验研究发现，单独使用肿瘤细胞的免疫源性会比较弱，因为很多肿瘤抗原是机体耐受的。在 20 世纪 70 年代，人们发现注射活的 Bacille Calmette-Guerin（BCG）可以使转移性黑素瘤病人肿瘤缩小，从而推测非特异性的免疫激活可以帮助刺激肿瘤特异性免疫反应[10]。因此近年来，多使用佐剂包括 BCG，Corynebacterium Parvum，DETOX，铝盐来提高疫苗免疫激活的作用。国内研究者也有使用天然提取物作为佐剂[11]。Yt 治疗的小鼠可获得免疫记忆能力，暗示了茶树菇活性蛋白组分作为肿瘤疫苗佐剂的潜力。

## 2.4 瘤内注射 Yt 对荷瘤小鼠血清细胞因子蛋白表达水平的影响

细胞因子的表达与免疫调节及维持免疫记忆的能力有密切关系[12]，因此使用 ELISA 检测荷 H22 小鼠瘤内注射 vehicle 和 Yt（5 mg/kg）后，血清中 IL-2 和 TNF-α 的蛋白表达水平。

如图 2 所示，血清中 IL-2 表达水平在对照组小鼠中为 38.9±27.59 pg/mL，Yt 治疗组为 84.6±37.6 pg/mL，提高到对照组的 2.17 倍（$p<0.05$）。而 TNF-α 在对照组和治疗组分别为 188.4±91.3 和 200.3±52.2 pg/mL，没有显著性差异（$p>0.05$）。

大型真菌中提取的活性组分大多以免疫调节为作用方式，通过调节细胞因子的分泌来增强天然免疫系统和细胞免疫反应。例如，从 *Volvariella volcacea* 分离的蛋白 Fip-wo 可上调小鼠 IL-2、IL-4、IFN-γ 和 TNA-α 的 mRNA 表达水平[13]。从 *Grifola frondosa* 分离的低分子量蛋白组分 MLP 可诱导结肠癌小鼠脾脏 IL-12 和 IFN-γ 的表达[14]。之前的研究表明，瘤内注射 Yt 可上调 Th1 型细胞因子（IL-2，IFN-γ，TNF-α），下调 Th-2 型细胞因子（TGF-β）mRNA 的表达[5]。蛋白组分 Yp 可上调 Th2 型细胞因子 IL-10 的 mRNA 表达，与 Fip[13]、MLP[14]不同[6]；小分子量 Ys 可上调 GM-CSF 和 TGF-β 的 mRNA 表达[6]。本文发现 Yt 可上调血清 IL-2 的表达，与之前的 Yt 诱导脾脏 IL-2 的 mRNA 表达数据一致。Yp 和 Ys 分别通过调节不同的细胞因子产生来发挥抗肿瘤活性，主要由 Yp 和 Ys 组成的 Yt 则通过同时调节 Th1 型和 Th 型免疫应答来发挥功能。

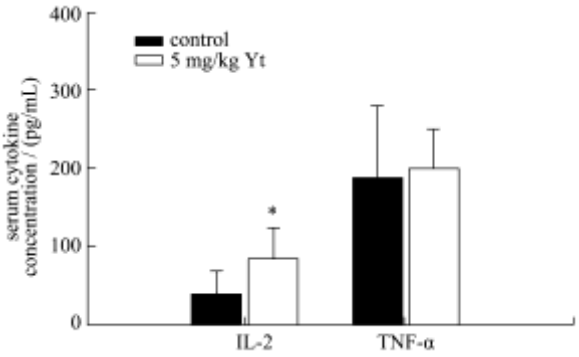



图 2 瘤内注射 Yt 对荷 H22 小鼠血清细胞因子蛋白表达水平的影响

**Fig.2 The expression of serum cytokines of H22-bearing mice treated by Yt**

注：取对照组及瘤内注射 Yt（5 mg/kg）荷瘤小鼠的血清，通过 ELISA 检测血清细胞因子 IL-2, TNF-α 的含量，使用 IL-2, TNF-α 的标准品倍比稀释作出标准曲线。*表示与对照组相比有显著差异（$p<0.05$），每组至少检测 5 只动物。

另外，有报道表明细胞因子 IL-2、GM-CSF 可以提高肿瘤疫苗的抑制肿瘤活性及免疫保护活性[15]，瘤内注射 Yt 显著抑制肿瘤生长的活性及免疫记忆功能有可能与其上调细胞因子 IL-2 有关。

## 3 结论

基于对 Yt 抗肿瘤活性的研究，说明大型真菌活性蛋白质组分是除多糖之外另一重要活性成分，值得深入研究。本文检测了 Yt 治疗荷瘤小鼠后，并不诱导机体产生大量抗体；且可诱导机体产生抗肿瘤免疫记忆功能，保护小鼠再次接种肿瘤细胞时不长肿瘤；另外 Yt 注射可上调小鼠血清细胞因子 IL-2 的表达。该数据表明，Yt 通过调节机体免疫系统功能，发挥其显著的抗肿瘤活性。进一步分离鉴定 Yt 中的有效组分，将有助于阐明 Yt 免疫调节功能，并为大型真菌有效活性

组分及应用提供理论数据。

## 参考文献


[1] BORCHERS Andrea T, KEEN Carl L, GERSHWIN M Eric. Mushrooms, tumors, and immunity: an update [J]. Experimental Biology and Medicine (Maywood), 2004, 229(5): 393-406

[2] ZAIDMAN Ben-Zion, YASSIN Majed, MAHAJNA Jamal, et al. Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 67(4): 453-468

[3] 陈健,向莹.滑子菇多糖的免疫活性及抗肿瘤作用[J].现代食品科技,2013,8:1800-1804
CHEN Jian, XIANG Ying. The immunological and antitumor activities of the polysaccharides from pholiota nameko [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 8: 1800-1804

[4] 卞冬萍,杨振泉,方维明.灰树花胞外多糖特性研究进展[J].现代食品科技,2006,22(3):247-250
BIAN Dong-ping, YANG Zhen-quan, FANG Wei-ming. Advance in the study on characteristics of extracellular polysaccharide from grifola frondosa [J]. Modern Food Science and Technology, 2006, 22(3): 247-250

[5] LIANG Yi, CHEN Yijie, LIU Honghong, et al. The tumor rejection effect of protein components from medicinal fungus [J]. Biomedicine & Preventive Nutrition, 2011,1(4): 245-254.

[6] Liang Yi, CHEN Yijie, SUN Hui. Antitumor activity of protein component fraction and small molecule component fraction from agrocybe aegerita through enhancement of different cytokine production [J]. Journal of Medicinal Food, 2014, DOI 10.1089/jmf.2013.2846

[7] ASSELIN Barbara L. The three asparaginases. comparative pharmacology and optimal use in childhood leukemia [J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 1999, 457: 621-629

[8] DRUCKER Daniel J, BUSE John B, TAYLOR Kristin, et al. Exenatide once weekly versus twice daily for the treatment of type 2 diabetes: a randomised, open-label, non-inferiority study [J]. Lancet, 2008, 372(9645): 1240-1250

[9] LI Jin-hua, KING Ada V, STICKEL Sara L, et al. Whole tumor cell vaccine with irradiated s180 cells as adjuvant [J]. Vaccine, 2009, 27(4): 558-564

[10] MORTON Donald L, EILBER Friedman R, MALMGREN Richard A, et al. Immunological factors which influence response to immunotherapy in malignant melanoma [J]. Surgery, 1970, 68(1): 158-163

[11] 徐立春,孙振华,陈志琳,等.三棱、莪术提取物修饰的肿瘤细胞疫苗的非特异性抗瘤实验研究[J].癌症,2001,20(12): 1380-82
XU Li-chun, SUN Zhen-hua, CHEN Zhi-lin, et al. The unspecific antitumor experimental study of tumor cell vaccine modified by extract from scirpus fluviatilis and curcuma zedoaria [J]. Cancer, 2001, 20(12): 1380-1382

[12] CHEN Shi-an, TSAI Ming-huan, WU Fu-tien, et al. Induction of antitumor immunity with combination of her2/neu dna vaccine and interleukin 2 gene-modified tumor vaccine [J]. Clinical Cancer Research, 2000, 6(11): 4381-4388

[13] HSU Hao-chi, HSU Chyong-ing, LIN Rong-hwa, et al. Fip-vvo, A new fungal immunomodulatory protein isolated from volvariella volvacea [J]. Biochemical Journal, 1997, 323 (2): 557-565

[14] KODAMA Noriko, MIZUNO Shigeto, NANBA Hiroaki, et al. Potential antitumor activity of a low-molecular-weight protein fraction from grifola frondosa through enhancement of cytokine production [J]. Journal of Medicinal Food, 2010,13(1): 20-30

[15] Foumier philippe, aigner maximilian, schirrmacher volker. Targeting of IL-2 and GM-CSF immunocytokines to a tumor vaccine leads to increased anti-tumor activity [J]. International Journal of Oncology, 2011, 38(6): 1719-1729