

· 论著 ·

灵芝真菌免疫调节蛋白在体外对不同胃癌细胞的抑制作用

许燕^{1,2}, 胡明慧¹, 高蓓蓉¹, 周选围³ (1. 阿斯利康中国创新中心, 上海 201203; 2. 复旦大学生命科学学院, 上海 200438; 3. 上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240)

[摘要] 目的 通过体外试验测定了3种灵芝免疫调节蛋白(FIP-glu、FIP-gat和FIP-SN15)对26株人胃癌细胞抑制增殖的影响。方法 采用MTS比色法检测了3种灵芝免疫调节蛋白对26株胃癌细胞的抑制作用,计算出每种灵芝免疫调节蛋白对不同胃癌细胞50%生长抑制所需的药物浓度值(GI₅₀)。结果 灵芝免疫调节蛋白加入72 h后,发现3种真菌免疫调节蛋白分别对7株胃癌细胞株NUGC-3、GTL-16、HGC-27、IM95m、SNU-638、SNU-216和SNU-5表现出较强的抑制作用,其GI₅₀<50 μg/ml。只对2株胃癌细胞NUGC-4和OCUM-1没有抑制作用。结论 灵芝免疫调节蛋白在体外对大多数胃癌细胞株有较强的抑制作用,3种灵芝免疫调节蛋白的作用趋势相同,有进一步开发成抗胃癌药物的潜力。

[关键词] 灵芝;真菌免疫调节蛋白;胃癌细胞;细胞增殖;细胞毒性;MTS比色法

[中图分类号] R965 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2016)03-0223-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2016.03.008

Inhibition effects of fungal immunomodulatory proteins from *Ganoderma* spp. on different gastric cancer cell lines *in vitro*

XU Yan^{1,2}, HU Minghui¹, GAO Beirong¹, ZHOU Xuanwei³ (1. AstraZeneca, Asia & Emerging Markets iMed, AstraZeneca Global R&D, Shanghai 201203, China; 2. School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200438, China; 3. School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

[Abstract] **Objective** To study the cell proliferative effects of fungal immunomodulatory proteins from *Ganoderma* spp. on 26 gastric cancer cell lines *in vitro*. **Method** 26 human gastric cancer cell lines were treated with FIPs by MTS assay. The average optical density (OD) in 490 nm and inhibition rate (GI₅₀) was counted by Universal Microplate Spectrophotometer. **Results** Three FIPs showed similar profiling in 26 human gastric cancer cell lines after 72 h treatment in cell proliferation assay, which except for NUGC-4 and OCUM-1 did not showed obvious anti-proliferative effect, the other 24 human gastric cell lines showed some anti-proliferative effects, especially for 7 cell lines (NUGC-3, GTL-16, HGC-27, IM95m, SNU-638, SNU-216 and SNU-5) showing strong potency, with their GI₅₀ less than 50 μg/ml. **Conclusion** FIPs showed strong anti-proliferative effects in some human gastric cancer cell lines *in vitro*, which had potential to be further developed as anti-gastric cancer drugs.

[Key words] *Ganoderma* spp.; fungal immunomodulatory proteins (FIPs); gastric cancer cell lines; cell proliferation; cytotoxicity; MTS colorimetric assay

灵芝免疫调节蛋白属真菌免疫调节蛋白(fungal immunomodulatory proteins, FIPs)中的一种,是继灵芝多糖和三萜类化合物后从灵芝中分离得到的又一种生物活性物质。自1989年首次从赤灵芝(*Ganoderma lucidum*)子实体中分离出这种蛋白并命名为Ling Zhi-8(LZ-8或FIP-glu)后,又相继从松

杉灵芝(*G. tsugae*)、金针菇(*Flammulina velutipes*)、草菇(*Volvariella volvacea*)、紫灵芝(*G. japonicum*)、小孢灵芝(*G. microsporum*)、紫芝(*G. sinensis*)、黑灵芝(*G. astum*)^[1]、云芝(*Trametes versicolor*)^[2]中分离出多种FIPs,2013年又利用基因体外重组技术(DNA shuffling)获得了灵芝属内(赤芝与紫芝)重组^[3]、属间(赤芝、金针菇和草菇)重组^[4]的重组免疫调节蛋白分子,形成了一个新的蛋白质家族—FIPs^[5]。

灵芝免疫调节蛋白具有广泛的免疫学和生物学活性,特别是可以直接作用于癌细胞,从而表现出较强的抗癌活性。近年的研究发现大肠杆菌中表达的

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30771500)

[作者简介] 许燕,硕士研究生,研究方向:抗肿瘤药物筛选。E-mail:xyquent@163.com

[通讯作者] 周选围,副研究员,硕士生导师,研究方向:药用真菌生物技术及其应用。Tel:13524360158; E-mail:xuanweizhou@sjtu.edu.cn

rLZ-8能够直接杀伤人慢性髓系粒细胞白血病K562细胞株^[6],对人肺腺癌A549细胞株也表现出显著的抗肿瘤活性^[7]。重组免疫调节蛋白reFIP-SN15对A549细胞株和乳腺癌MDA-MB-231细胞株也有较好的抑制效果^[8]。为了探究大肠杆菌中表达的灵芝免疫调节蛋白体外是否具有抑制胃癌细胞的活性,本研究在建立了26株胃癌细胞库的基础上,选用3种大肠杆菌中表达的灵芝免疫调节蛋白对26株胃癌细胞的抑制作用进行了初步筛选,探讨了重组免疫调节蛋白在抗胃癌药物研发中的可行性和潜力。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 灵芝免疫调节蛋白 大肠杆菌中表达的赤灵芝免疫调节蛋白(FIP-glu)、黑灵芝免疫调节蛋白(FIP-gat)和属内重组突变体蛋白(FIP-SN15)^[8],这3种免疫调节蛋白均由上海交通大学农业与生物学院植物生物技术研究中心提供;阳性对照药物多西他赛(docetaxel)由阿斯利康合成。

1.1.2 胃癌细胞株 AGS、HS746T、KATOIII、NCI-N87、SNU-1、SNU-16和SNU-5细胞株购于美国菌种保藏中心;NUGC-3、NUGC-4和OCUM-1细胞株购于日本细胞库;SNU-216、SNU-484、SNU-601、SNU-620、SNU-638和SNU-668细胞株购于韩国细胞库;AZ-521、IM95m、MKN1和MKN74细胞株购于人类科学研究资源库;HGC-27、OE19和OE33细胞株购于欧洲细胞/微生物保藏中心;23132/87和GTL16细胞株由阿斯利康细胞库提供;PAMC82细胞株由北京肿瘤医院赠送。

1.1.3 培养基与试剂 RPMI 1640 (Invitrogen, 22400); DMEM (Invitrogen, 12430); 胎牛血清 (GIBCO, 16000)。支原体检测试剂盒 (Mycosensor™ PCR Assay Kit, Cat. #302108, Stratagene, La Jolla, Calif.); MTS (Promega, CellTiter 96® Aqueous One Solution Reagent)。

1.2 实验方法

1.2.1 胃癌细胞支原体检测 胃癌细胞支原体的检测参照试剂盒说明书进行。细胞用无抗生素的培养基进行培养,细胞生长至80%以上,弃去培养基,PBS洗2次,加入适量的裂解液。细胞裂解液95℃处理5 min,13 000 r/min离心5 min,保留上清液。取1~2 μl上清液作为模板进行PCR反应。反应条件:95℃预变性30 s,95℃30 s,56℃30 s,72℃30 s,进行40个循环,最后72℃延伸5 min。扩增

产物用2%的琼脂凝胶电泳检测。

1.2.2 细胞培养 将生长至70%~80%融合度的细胞培养瓶中的培养液吸去,加入1~2 ml 0.25%胰酶溶液,消化几分钟;用新鲜培养基收集细胞悬液,转移至离心管中;1 000 r/min离心3 min;弃去上清液,用新鲜的培养基将细胞重悬起来,按照细胞的生长情况确定传代比例,震荡均匀后,将培养板放入培养箱。

1.2.3 蛋白浓度的测定 按照表1制备1组蛋白质标准品。取各个稀释浓度的蛋白质标准品和待测蛋白质样品各25 μl,加入到微孔板中。在每一个孔中加入200 μl工作液,充分混合。密封微孔板,在37℃条件下孵育30 min,微孔板冷却到室温。检测样品在562 nm处的吸光度。将各个标准品和待测样品在562 nm处的吸光度减去空白品在562 nm处的平均吸光度。根据标准品绘制出的标准曲线,计算出每个检测样品的蛋白浓度。

表1 用于标准方案的稀释方法(检测范围:20~2 000 μg/ml)

瓶号	稀释液的体积 (V/μl)	BSA的体积和来源 (V/μl)	BSA终浓度 (ρ _B /μg·ml ⁻¹)
A	0	300, 原液	2 000
B	125	375, 原液	1 500
C	325	325, 原液	1 000
D	175	175, B瓶稀释液	750
E	325	325, C瓶稀释液	500
F	325	325, E瓶稀释液	250
G	325	325, F瓶稀释液	125
H	400	100, G瓶稀释液	25
I	400	0	0

1.2.4 细胞活性的检测 使用MTS比色法检测细胞活性。根据每个细胞的最佳种板密度(1 000~8 000个细胞/孔)在96孔板中铺板,每孔加入100 μl细胞悬液,37℃培养;第二天,每个细胞取一块96孔板,每孔加入20 μl MTS,于37℃孵育2 h后检测490 nm处的吸光度,记录每个细胞加药前的吸光度(T₁)。同时,以0.01、0.1、0.3、1、3、10、30、100、300、1 000 μg/ml的浓度梯度分别加入3种真菌免疫蛋白:FIP-glu、FIP-gat和FIP-SN15,并以0.001、0.01、0.03、0.1、0.3、1、3、10、30 μmol/L的浓度梯度加入阳性化合物多西他赛作为对照。于37℃孵育72 h后每孔加入20 μl MTS,37℃孵育2 h后检测490 nm处的吸光度,记录对照组和实验组的吸光度(C和T₃),然后根据公式计算3种真菌免疫蛋白以及对照阳性化合物对每个细胞作用的

GI₅₀值。计算公式:(初始原始细胞数-加药后细胞数)/(对照细胞数-初始原始细胞数)×100%^[9]。

2 结果与分析

2.1 支原体的检测和 FIPs 蛋白浓度确定 26 株胃癌细胞经过 2~3 周的传代培养后,选择处于对数生长期的细胞进行试验。支原体检测结果显示每个胃癌细胞株都无支原体污染。3 种灵芝免疫调节蛋白 FIP-gat、FIP-glu 和 FIP-SN15 蛋白浓度均在 2~5 mg/ml 之间,将每个样品稀释到 1 mg/ml 进行后续试验。

2.2 细胞毒性的检测 按照 MTS 测定方法,将胃癌细胞培养到第 2 天后,分别加入不同浓度的 3 种重组灵芝免疫调节蛋白,72 h 后用 MTS 试剂检测 26 株胃癌细胞的增殖抑制情况,结果总结于表 2。从表 2 可以看出 3 种灵芝免疫调节蛋白对 26 株胃癌细胞均有不同程度的抑制作用,即除了对 NUGC-4 和 OCUM-1 这 2 株胃癌细胞没有明显的抑制作用外,对其它 24 株胃癌细胞均表现出了一定的抑制作用。从国家规定的药效评价标准来看,合成化合物或植物提取物纯品的半数抑制浓度 IC₅₀ (即细胞 50% 被抑制时的给药浓度)小于 10 μg/ml 或粗提物的 IC₅₀ 小于 20 μg/ml,并且有细胞毒性的剂量依赖关系,其最高抑制率达到 80% 以上,则判定样品在体外对细胞有杀伤作用^[10]。从我们的试验结果和作用曲线(以 NUGC-3、GTL16、HGC-27 和 IM95m 4 株胃癌细胞为例,图 1)来看,我们试验中测定的 GI₅₀ 虽均在 20 μg/ml 以上,但具有细胞毒性的剂量依赖关系,其细胞最高抑制率也都达到 80% 以上,甚至对其细胞的杀伤效果明显。从先前的研究结果看,大多数真菌免疫调节蛋白对于 A549 细胞株和 MDA-MB-231 细胞株的抑制效果较好,其 IC₅₀ 值均在 20~25 μg/ml^[8]。因此,我们将此标准定为小于 25 μg/ml 即认为是有显著抑制作用,25~50 μg/ml 认为是有抑制作用。按照这个标准我们对这一结果进行了详细的分析(表 2)。分析显示,FIP-SN15 对 4 株胃癌细胞(NUGC-3、GTL16、HGC-27、IM95m)具有显著的抑制作用,FIP-glu 和 FIP-gat 则对 3 株胃癌细胞(NUGC-3、GTL16、HGC-27)具有显著的抑制作用,3 种灵芝免疫调节蛋白的作用趋势基本一致。除此之外,FIP-SN15 对 3 株胃癌细胞(SNU-638、SNU-216 和 SNU-5)具有抑制作用,而 FIP-glu 对 5 株胃癌细胞(IM95m、SNU-638、SNU-216、SNU-5 和 SNU-620)具有抑制作用,FIP-gat 也对 5 株胃癌细胞(IM95m、SNU-638、SNU-216、SNU-5

和 Hs746T)有抑制作用。总的来看,FIP-SN15 抑制的细胞株最少,但抑制的程度最强,而 FIP-glu 和 FIP-gat 作用的数量虽一致,但种类有差异。只有 FIP-glu 对 SNU-620 细胞株有抑制作用,FIP-gat 对 Hs746T 细胞株有抑制作用。多西他赛作为阳性对照化合物进行胃癌细胞增殖抑制的实验结果发现,该药物对 26 株胃癌细胞表现出较强的生长抑制作用,几何平均 GI₅₀ 为 1.5 nmol/L。这与文献报导的结果一致(多西他赛对 KATOIII 和 NUGC-4 细胞株抑制的 IC₅₀ 分别为 1.78 nmol/L 和 1.88 nmol/L)^[11],说明使用多西他赛筛选的胃癌抑制数据对进一步的药物筛选有较高的参考价值。

表 2 重组真菌免疫调节蛋白对胃癌细胞株 50% 生长抑制所需要的药物浓度(μg/ml)

细胞名称	FIP-SN15	FIP-glu	FIP-gat	多西他赛 (nmol/L)
NUGC-3	16	18	22	1.2
GTL16	20	22	20	1.0
HGC-27	20	21	23	1.0
IM95m	23	26	27	2.6
SNU-638	25	26	32	1.0
SNU-216	35	41	36	2.4
SNU-5	36	47	29	2.0
SNU-620	54	47	74	1.4
KATOIII	58	58	67	1.8
SNU-1	59	61	51	1.7
Hs746T	65	64	31	3.9
PAMC82	66	67	68	1.0
AZ-521	82	79	64	1.0
23132-87	88	85	102	1.9
AGS	90	91	159	1.3
MKN1	94	105	90	1.4
OE33	122	101	110	0.8
SNU-601	132	160	201	2.1
MKN74	155	384	325	5.1
SNU-484	246	262	317	1.2
NCI-N87	291	456	245	2.0
SNU-16	349	374	550	1.0
SNU-668	566	701	569	1.8
NUGC-4	802	1 000	1 000	1.9
OCUM-1	1 000	1 000	1 000	1.5

3 讨论

真菌免疫调节蛋白是具有免疫调节活性的小分子蛋白质,是一种潜在的非常有效的免疫调节类药物蛋白。灵芝免疫调节蛋白既可直接杀伤肿瘤细胞又可间接地通过免疫调节作用达到抗肿瘤作用,同时还可以通过两者结合达到共同抗肿瘤活性而备受

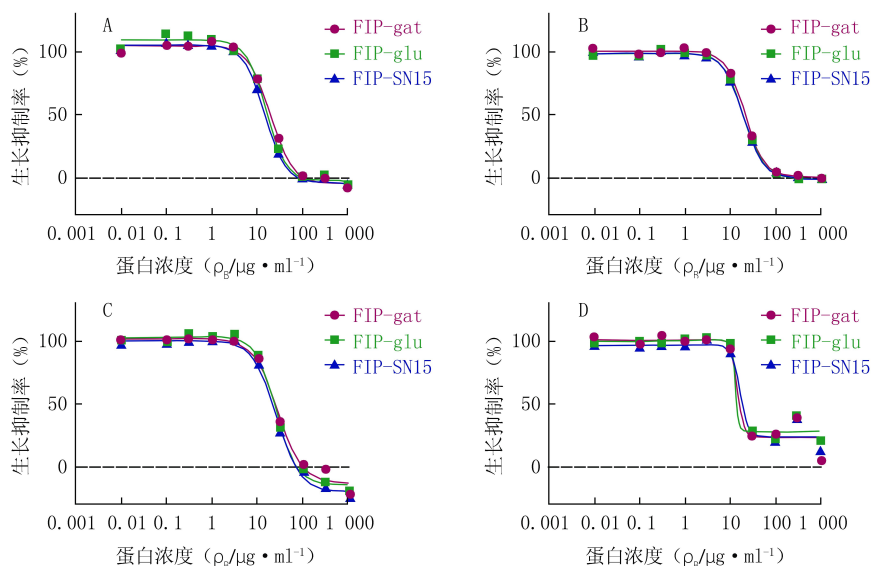


图 1 3 种灵芝免疫调节蛋白分别对 4 株胃癌细胞的作用曲线

A .NUGC-3 细胞;B .HGC-27 细胞;C .IM95m 细胞;D .GTL-16 细胞

关注^[11,12]。但是从药用灵芝中直接提取天然 FIPs, 成本昂贵、耗时、产量少,每千克子实体中只能提取毫克级蛋白,严重制约了其在临床和医药上的应用。解决此类问题的最佳方法是通过异源表达获得大量的重组真菌免疫调节蛋白。灵芝免疫调节蛋白的相对分子质量约为 13 000^[13]。其二级结构中含有 7 个 β 折叠, 2 个 α 螺旋和一个 β 转角, 位于 N 端的 α 螺旋中有 2 个氨基酸(L5/L7)对于保持活性至关重要^[14]。以前的研究显示,大肠杆菌或酵母表达的重组免疫调节蛋白能形成二级结构并且能够正确折叠和具有生物学活性,但活性低于天然提取的蛋白。Cong 等^[8]利用 DNA shuffling 技术对属内组(FIP-glu 和 FIP-gsi)和属间组(FIP-glu、FIP-fve 和 FIP-vvo)的基因在分子水平上进行重组,获得了表达量高、活性亦高的突变体 FIP-SN15(一个属内重组突变体),结构分析显示其二级结构与天然提取的免疫调节蛋白的结构类似。利用大肠杆菌表达的 FIP-glu 和 FIP-SN15 蛋白,对不同种类的肿瘤细胞株试验结果表明:FIPs 对 A549 细胞株和 MDA-MB-231 细胞株的抑制效果较好,IC₅₀ 值分别为 24.6 $\mu\text{g/ml}$ 和 23.9 $\mu\text{g/ml}$;对人结肠癌 HT-29 细胞株和人肝癌 HCC-LM3 细胞株抑制情况较差,在 25 $\mu\text{g/ml}$ 浓度以下没有追踪出 IC₅₀ 值。利用同样的蛋白 Cong 等发现 FIPs 对人星形胶质瘤 U-251 细胞株凝集活性效果明显;细胞周期分析结果显示,用浓度为 10 $\mu\text{g/ml}$ 的 FIPs 处理胶质瘤细胞 48 h 后,凋亡细胞株的比例明显升高,说明 FIPs 蛋白能够诱导 U-251 细胞凋亡。基于细胞内 DNA 含量流式分析发

现,加入 FIP-SN15 和 FIP-glu 后处于 G1 期细胞的比例分别为 70.19% 和 69.62%,显著高于阴性对照组的 53.80%,然而处于 S 期的细胞比例分别为 14.80% 和 12.51%,明显低于阴性对照组的 31.62%。由此说明,FIPs 可以通过有效诱导 U-251 细胞凋亡和抑制癌细胞从 G1 期到 S 期的转变对肿瘤细胞发挥直接作用^[8]。因此,不同 FIPs 对同一肿瘤细胞株的作用、以及同一 FIP 对不同肿瘤细胞株的作用的研究还有大量的工作要做,FIPs 的作用机制还有待于进一步深入研究。

MTS 是一种新合成的四唑类化合物,称为 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt,与通用的四唑类化合物 MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide]的作用原理相同,即被活细胞线粒体中的多种脱氢酶还原成金黄色水溶性的甲贲产物,能直接通过光谱吸收测定吸光度,进而推测活细胞数量^[15]。本实验中首次利用了 MTS 法筛选了 FIPs 对胃癌细胞增殖的抑制作用,并以多西他赛作为阳性对照,验证了该方法的准确性和可靠性,与 MTT 法相比较该方法更加敏感简便、安全可靠。在 MTS 筛选的结果中,3 株胃癌细胞 NUGC-3、GTL16、HGC-27 对 FIPs 最为敏感,其 GI₅₀ < 25 $\mu\text{g/ml}$,这为后续研究 FIPs 作用于胃癌细胞的类型提供了依据,也为后续 FIPs 对胃癌细胞作用机制的研究提供了有益的参考。

散风热,清利咽喉,罂粟壳敛肺止咳,甘草缓急和中,调和诸药,桔梗、荆芥又有利咽止咳的功效,是为佐使之用。全方药量轻微,温润和平,不寒不热,共奏宣利肺气,疏风止咳之效。

另外,中药药理研究表明,荆芥能减少炎症相关细胞因子的合成与释放,对毛细血管通透性的增加有明显的抑制作用,从而达到抗炎作用。鱼腥草其煎剂或提取物对金黄色葡萄球菌及其耐青霉素菌株、肺炎链球菌、流感杆菌等多种球菌、杆菌及病毒具有抑制或杀灭作用。甘草和桔梗具有减轻细胞损伤、缓解毒血症症状、抑制胶原合成、抗炎等作用。

小儿支气管炎临床上多用抗生素治疗,时间长,副反应多又极易耐药,常加以口服中成药缩短病程。中成药宣肺止咳合剂联合抗生素治疗小儿支气管炎的总有效率为90.3%,可明显改善支气管炎引起的咳嗽、喉间痰鸣及支气管杂音等临床症状,疗效确切,有效促进小儿支气管炎的临床症状恢复,总有效

率与不使用任何口服止咳化痰药的对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),值得大家借鉴。

【参考文献】

- [1] 万江,杨树杰,程黎,等.小儿呼吸道感染病毒检测新进展[J].临床肺科杂志,2012,17(2):321-322.
- [2] 胡亚美,江载芳.诸福堂实用儿科学[M].7版.北京:人民卫生出版社,2008:1171-1172.
- [3] 张荣艳.两种口服液治疗儿童急性支气管炎的疗效对比[J].临床肺科杂志,2013,18(9):1589-1590.
- [4] 张雅凤,林忠嗣,陈爱丰,等.中医综合疗法治疗小儿肺炎临床疗效评价[J].中医儿科杂志,2010,6(4):13-16.
- [5] 林上助.程国彰《医学心悟》治咳嗽经验探析及临床举验[J].辽宁中医药大学学报,2013,15(9):16-17.
- [6] 郭雪松,胡永峰.宣肺止咳汤治疗小儿咳嗽56例[J].中医药导报,2010,16(4):77-77.

[收稿日期] 2015-04-15 [修回日期] 2015-10-19

[本文编辑] 顾文华

(上接第226页)

【参考文献】

- [1] 苏恺琪,王雪飞,周选围.黑灵芝免疫调节蛋白基因的克隆和生物信息学分析[J].上海交通大学学报(农业科学版),2012,30(1):65-71.
- [2] Li F, Wen H, Zhang Y, et al. Purification and characterization of a novel immunomodulatory protein from the medicinal mushroom *Trametes versicolor* [J]. Sci China Life Sci, 2011, 54(4): 379-385.
- [3] Wang XF, Li QZ, Bao TW, et al. *In vitro* rapid evolution of fungal immunomodulatory proteins by DNA family shuffling [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2013, 97(6): 2455-2465.
- [4] Li QZ, Huang L, Wang XF, et al. Fungal immunomodulatory protein from *Flammulina velutipes* induces cytokine gene expression in mouse spleen cells[J]. Curr Top Nutraceut R, 2011, 9(3): 111-118.
- [5] Li QZ, Wang XF, Zhou XW. Recent status and prospects of the fungal immunomodulatory protein family [J]. Crit Rev Biotechnol, 2011, 31(4): 365-375.
- [6] 王晓林,梁重阳,李泓睿,等.灵芝免疫调节蛋白(α LZ-8)诱导K562细胞发生细胞核介导的细胞凋亡的研究[J].中国免疫学杂志,2010,26(7):616-618.
- [7] Liao CH, Hsiao YM, Lin CH, et al. Induction of premature senescence in human lung cancer by fungal immunomodulatory protein from *Ganoderma tsugae* [J]. Food Chem Toxicol, 2008, 46(5): 1851-1859.
- [8] Cong WR, Xu H, Liu Y, et al. Production and functional characterization of a novel fungal immunomodulatory protein FIP-SN shuffled from two genes of *Ganoderma* species [J]. App Microbiol Biotechnol, 2014, 98(13): 5967-5975.
- [9] 刘建文.抗肿瘤药理实验方法[M].北京:化学工业出版社,2010:29.
- [10] 司徒镇强,吴军正.细胞培养[M].北京:世界图书出版公司,1996:135.
- [11] Tanaka M, Obata T, Sasaki T. Evaluation of antitumour effects of docetaxel (Taxotere) on human gastric cancers *in vitro* and *in vivo* [J]. Eur J Cancer, 1996, 32A(2): 226-230.
- [12] Wang XF, Su KQ, Bao TW, et al. Immunomodulation effects of fungal proteins [J]. Curr Top Nutraceut R, 2012, 10(1): 1-11.
- [13] Kino K, Yamashita A, Yamaoka K, et al. Isolation and characterization of a new immunomodulatory protein, ling zhi-8 (LZ-8), from *Ganoderma lucidum* [J]. J Biol Chem, 1989, 264:472-478.
- [14] Lin WH, Huang CH, Hsu CI, et al. Dimerization of the N-terminal amphipathic alpha-helix domain of the fungal immunomodulatory protein from *Ganoderma tsugae* (Fip-gts) defined by a yeast two-hybrid system and site-directed mutagenesis [J]. J Biol Chem, 1997, 272(32): 20044-20048.
- [15] Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, et al. Novel cell proliferation and cytotoxicity assays using a tetrazolium salt that produces a comparison of multiple cytotoxicity assays 61 water-soluble formazan dye [J]. In Vitro Toxicol, 1995, 8(2): 187-190.

[收稿日期] 2015-06-26 [修回日期] 2015-10-21

[本文编辑] 顾文华