

- [34] Ma X W, He F Y, Liang W Q, *et al.* The comparison of five ointment formulations of acyclovir on release rate and percutaneous rate *in vitro* [J]. *Chin J Hosp Pharm* (中国医院药学杂志), 1999, 19(5): 259-261.
- [35] Magnusson B M, Runn P, Karlsson K. Terpenes and ethanol enhance the transdermal permeation of the tripeptide thyrotropin-releasing hormone in human epidermas [J]. *Int J Pharm*, 1997, 157(1): 113-121.
- [36] Megumi K, Fumiko I. Evaluation of skin damage of cyclic-monoterpenes, percutaneous absorption enhancers, by using cultured human skin cells [J]. *Biol Pharm Bull*, 1993, 16(9): 912.
- [37] Zhang Z P, Cai K R, Wu T, *et al.* Electron microscopic observation of menthol enhancing percutaneous absorption upon pimecrolimus through fetus skin and the study on its mechanism [J]. *Chin J Anat* (解剖学杂志), 1994, 17(1): 11.
- [38] Zheng L Y, Hng Q N. Effect of penetration enhancers on the thermal transition of hydrated callus lipid in the study of differential scanning calorimetry [J]. *J Chin Pharm Univ* (中国药科大学学报), 1994, 25(2): 92-94.
- [39] Zhang Z Y, Ping Q N, Abullah D. Studies on the mechanism of *Eucalyptus* oil enhancing percutaneous absorption [J]. *J Chin Pharm Univ* (中国药科大学学报), 1998, 29(1): 31-35.
- [40] Naik A, Pechtold L, Potts R O. Mechanism of oleic acid-induced skin penetration enhancement *in vivo* in humans [J]. *J Controlled Release*, 1995, 37(3): 229-306.
- [41] Jin H H, Han H L, Zheng G H, *et al.* Mechanism of skin penetration enhancing effect by the lepalolone [J]. *J Med Sci Yanbian Univ* (延边大学医学学报), 2001, 24(1): 25-29.
- [42] Abdullah D, Ping Q N, Liu G J. Enhancing effect of *Eucalyptus* oil, and its  $\beta$ -cyclodextrin complex on the permeation of 5-fluorouracil through excised rat skin [J]. *J Chin Pharm Univ* (中国药科大学学报), 1996, 27(2): 77-82.

## 灰树花活性多糖的研究进展

茅仁刚<sup>1</sup>, 林东昊<sup>1</sup>, 洪筱坤<sup>2</sup>, 王智华<sup>2</sup>, 蓝德刚<sup>2</sup>

(1. 上海师范大学 上海新康制药厂, 上海 200234; 2. 上海中医药大学 上海天地合生物医药科技有限公司, 上海 200025)

**摘要:** 灰树花多糖是灰树花的主要活性成分, 具有广泛的生理活性, 如增强免疫功能、抗肿瘤、抗 HIV 等作用。主要对灰树花活性多糖的化学成分和药理作用研究进展进行综述。

**关键词:** 灰树花; 多糖; 化学成分; 药理作用

中图分类号: R284.18

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2003)02-附 2-04

### Advances in study on active polysaccharide of *Grifola frondosa*

MAO Ren-gang<sup>1</sup>, LIN Dong-hao<sup>1</sup>, HONG Xiao-kun<sup>2</sup>, WANG Zhi-hua<sup>2</sup>, LAN De-gang<sup>2</sup>

(1. Shanghai Xinkang Pharmaceutical Factory, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China; 2. Shanghai Tiandihet Biomedicinal Science and Technology Co., Ltd., Shanghai University of TCM, Shanghai 200025, China)

**Key words** *Grifola frondosa* (Fr.) S. F. Gray; polysaccharide; chemical constituents; pharmacological effect

灰树花 *Grifola frondosa* (Fr.) S. F. Gray 又名栗蘑、贝叶多孔菌, 日本称之为“舞茸”; 分类学上属担子菌纲, 多孔菌科, 是一种药、食兼用的珍稀食用菌。其口味鲜美, 营养丰富, 含有众多活性物质, 灰树花多糖就是最主要的一类活性成分。作为一种生物反应调节剂 (BRM), 灰树花多糖具有增强免疫功能、抑制肿瘤、抗 HIV 病毒、稳定血压、降低血糖、改善脂肪代谢等广泛的生理活性。

#### 1 灰树花多糖组份的化学研究

灰树花多糖是富含  $\beta$ -1, 6 及  $\beta$ -1, 3-糖苷键的真菌多糖, 生理活性显著, 自 20 世纪 80 年代始国内外学者对其进行了大量研究, 从灰树花子实体和菌丝体中提取了几十种活性多糖, 其中包括 D 组分、MD 组分、grifolan X 组分、MT-2 和 LELFD 等具有显著生理活性的组分。

在众多的研究中, Nanba 等<sup>[1,2]</sup>从灰树花中提取到的纯化灰树花多糖 D 组分和 MD 组分是成功的典范。D 组分为灰树花子实体的酸不溶、碱溶性热水提取物, 相对分子质量约为  $1.4 \times 10^6$ , 是一种由高度分支化的  $\beta$ -1, 3-支链的  $\beta$ -1, 6-葡聚糖和  $\beta$ -1, 6-支链的  $\beta$ -1, 3-葡聚糖组成的蛋白聚糖, 蛋白含量约为 30%, 提取率约为 0.4%, D 组分进一步分离可以得到 E、F 等组分。MD 组分相对分子质量约为  $4 \times 10^6$ , 蛋白含量小于 20%, 来自于灰树花子实体或菌丝体, 是在改进 D 组分提取工艺基础上进一步纯化的产物, 与 D 组分具有相同的  $\beta$  葡聚糖结构。

灰树花多糖 MT-2 组分<sup>[3]</sup>即 E 组分, 也是一种酸不溶性、碱溶性多糖, 是 MT-1 即 D 组分经 Sepharose CL-4B 柱和 DEAE-Sepharose CL-6B 柱进一步纯化后的产物, 相对分

收稿日期: 2002-10-12

作者简介: 茅仁刚 (1968-), 男, 上海人, 工程师, 硕士, 中药学专业。现任上海师范大学新康制药厂技术副厂长。主要从事中药、天然产物活性成分和制剂研究。Tel (021) 64322290 E-mail: rgmaocf@yahoo.com.cn

子质量约为  $2 \times 10^6$ , 蛋白含量 0.6%, 提取率约为 0.014%, 为含  $\beta$ -1, 3-支链的  $\beta$ -1, 6-葡聚糖。

Ohon等<sup>[14]</sup>对灰树花液体培养菌丝体中的多糖组分进行了研究, 依次用热水、冷碱或热碱提取, 分别得到了 3个组份, 即 14.9% LMHW, 6.3% LMCA和 4.5% HMHA; 用 5% 葡萄糖和 pH 4.5 的柠檬酸缓冲液提取得到了 LELFD 组分, 提取率为 48.5%。以上 4个组分均包含中性葡聚糖 ( $\alpha$ -1, 4-及  $\beta$ -1, 3-) 和酸性葡聚糖 ( $\beta$ -1, 6-及  $\beta$ -1, 3-), 其中 LELFD 主要由  $\beta$ -1, 3-葡聚糖组成, 抗癌活性最强。Ohon<sup>[5,6]</sup>还利用离子交换色谱法从灰树花子实体中分离得到具有抗肿瘤活性的中性和酸性粗多糖组分, 然后从酸性粗多糖组分中纯化得到 3种酸性葡聚糖。同时 <sup>13</sup>C核磁共振谱分析结果表明  $\beta$ -1, 3-D 葡聚糖有螺旋型和天然型两种构象, 两种构象的多糖均具有抗肿瘤活性, 灰树花子实体中的葡聚糖为天然型。

Grifolan 为灰树花中最主要的活性组份, 具有极强的抑瘤作用, 来源于子实体或菌丝体, 基本结构为每隔 3个糖基的 C<sub>6</sub>上具有一个支链的  $\beta$ -1, 3-葡聚糖, 即  $\beta$ -1, 6-支链的  $\beta$ -1, 3-葡聚糖。自灰树花液体培养的菌丝体中提取 Grifolan<sup>[4]</sup>, 由 LELFD 组分经 DEAE-Sephadex A-25 纯化而得, 相对分子质量  $5 \times 10^6$ 。Grifolan 7N<sup>[7]</sup> 为灰树花子实体的热碱提取物。F-7 经 DEAE-Sephadex A-25 柱和 Sepharose CL-4B 柱进一步纯化所得的产物; grifolan NM F-5N<sup>[8,9]</sup> 为灰树花菌丝体的冷碱提取物。grifolan NM F-5 经 DEAE-Sephadex A-25 柱纯化后的乙醇沉淀物, 相对分子质量  $7.5 \times 10^5$ 。

Kubo等<sup>[10]</sup>在进行灰树花子实体多糖分离过程中, 发现热水提取物中加入一倍量乙醇后产生了悬浮物, 离心分离后得到了一种糖蛋白, 即 X 组份 (糖: 蛋白 = 65: 35), 相对分子质量  $5 \times 10^5$ 。结构分析表明, X 组份为具有  $\alpha$ -1, 4-分支的  $\beta$ -1, 6-葡聚糖, 口服给药时具有显著的降血糖活性。

李小定等<sup>[11]</sup>也对灰树花子实体多糖进行了分离纯化, 得到了 PGF-1, PGF-2, PGF-3, PGF-4 4种单一组份的多糖, 其中 PGF-1 为  $\beta$ -葡聚糖, 相对分子质量为  $1. \times 10^6$ 。冯慧琴等<sup>[12]</sup>参照 D 组份的提取方法对灰树花子实体和菌丝体多糖进行了研究, 得到了 F-D 和 M-D 组份, 提取率分别为 0.59% 和 0.31%, 其中 F-D 组份的多糖含量为 64.8%, 蛋白含量为 15.6%; M-D 组份的多糖含量为 65.9%, 蛋白含量为 7.37%。<sup>13</sup>C-NMR 等分析表明二者均含有  $\beta$ -1, 6-及  $\beta$ -1, 3-糖苷键。

Zhuang<sup>[13]</sup>从液体培养的灰树花菌丝体中提取纯化到 23 个多糖组份, 其中的 9 个多糖组份 (5 个水不溶性组分和 4 个水溶性组分) 具有良好的抗肿瘤活性。对这 9 个活性多糖进行聚乙酰化、聚乙醇化、甲酰化等化学修饰后得到 23 种产物, 动物试验结果表明所有产物的抗肿瘤活性均得到了相应提高。Mizuno<sup>[14]</sup>从灰树花新鲜子实体中分离到 5 个具有抗肿瘤活性的多糖组分, 其结构分别为: 主链上每隔 5 个葡萄糖便有  $\beta$ -1, 6-支链的水溶性  $\beta$ -1, 3-D 葡聚糖; 水溶性酸性  $\beta$ -D 葡聚糖; 水不溶性酸性木葡聚糖; 酸性异葡聚糖和酸性葡聚糖蛋白。

## 2 灰树花多糖的药理研究

2.1 免疫调节作用: 灰树花多糖是一种有效的生物免疫调节剂, 其不同组分均含有  $\beta$ -1, 3-,  $\beta$ -1, 6-葡聚糖的结构, 能极大地激活细胞免疫功能, 提高机体免疫力。Inoue A<sup>[15]</sup>对灰树花 D 组份的细胞免疫活性进行了研究, 结果表明 D 组分可调节 T 淋巴细胞亚群 Th-1/Th-2, 抑制 B 细胞活性, 加强辅助 T 细胞的活性, 诱导脾和淋巴结细胞分泌  $\gamma$ -INF, IL-12p70 和 IL-8, 同时抑制 IL-4 的产生。Nanba<sup>[16]</sup>研究了灰树花 D 组份对各种免疫细胞的激活作用, 发现小鼠 ip 0.5 mg/kg 或 ig 1.0 mg/kg 灰树花 D 组份 10 d 后, 自然杀伤细胞 (NK)、细胞毒 T 细胞、迟敏 T 细胞分别增至 1.5~2.2 倍; 白介素-1 和超氧负离子的量也得到提高; 白介素-2 提高至 1.7 倍。Shigesue<sup>[17]</sup>在研究灰树花多糖对胶原诱导关节炎 (CIA) 模型的影响时发现, 灰树花 D 组份与对照组相比, 脾脏中的巨噬细胞增加到 2.3 倍, 巨噬细胞的迁移能力增加到 1.9 倍, 细胞中的 IL- $\beta$ 、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子和  $\alpha$  肿瘤坏死因子分别增至 2.0, 4.7 和 1.9 倍。Adachi<sup>[18]</sup>的研究表明, 在小鼠 iv 灰树花多糖 grifolan (GRN,  $\beta$ -1, 3-D 葡聚糖) 4~7 d 后, 能明显提高小鼠枯氏细胞的产物——细胞因子和 NO 含量。同时体外试验研究<sup>[19]</sup>也表明, 灰树花多糖 (GRN) 能诱导巨噬细胞释放 IL-1, IL-6 和  $\alpha$ -TNF 等细胞因子; 另外, Okazaki<sup>[20]</sup>和 Zhang<sup>[21]</sup>的研究均证实灰树花多糖可刺激巨噬细胞释放细胞因子; 项哨等<sup>[22]</sup>的研究表明, 灰树花多糖可促进新城鸡瘟病毒诱导干扰素, 并由干扰素介导灰树花多糖的抗病毒作用。

2.2 抗肿瘤作用: 灰树花多糖的抗肿瘤机制与其他真菌多糖相似, 即通过激活机体免疫系统来防止正常细胞癌变, 抑制肿瘤生长和转移; 通过与放化疗的协同作用, 提高治疗效果, 降低放化疗的毒副作用。Nanba<sup>[16]</sup>对不同真菌多糖的抗癌活性进行了比较研究, 发现灰树花多糖, 特别是灰树花 D 组份是所有真菌多糖中作用最强的, 且口服有效。在预防甲基胆蒽 (3-MCA) 对小鼠致癌作用的研究中, 每天 ig 0.2 mg 灰树花 D 组份, 连续 15 d, 试验组小鼠在 30 d 后的致癌率为 30.7%, 而对照组为 93.2%。这一结果表明灰树花 D 组份口服后能显著增强机体免疫机能, 有效阻断 3-MCA 诱导的癌变<sup>[23]</sup>。通过灰树花 D 组份和丝裂霉素 (MMC) 的抗癌活性比较研究, 表明 D 组份的抑瘤率 (80%) 比 MMC (45%) 高, 且由于 D 组份能刺激免疫功能, 而 MMC 直接杀死癌细胞, 二者联合用药后产生协同作用, 抑瘤率显著提高 (98%)<sup>[24]</sup>。采用饲料中添加 20% 灰树花细粉或 ip 1 mg/kg 灰树花 D 组份, 连续 10 次, 治疗肝移植瘤, 30 d 后对照组小鼠 100% 患肿瘤, 而 D 组份的抑瘤率为 91.3%, 灰树花细粉的抑瘤率为 81.3%<sup>[25]</sup>。另外, D 组份还具有显著抑制原发性肿瘤的活性<sup>[26, 27]</sup>。

KoDma<sup>[28]</sup>的临床研究表明, MD 组份通过刺激免疫细胞的活性呈现出强劲的抗癌作用, 其中 58.3% 的肝癌患者、68.8% 的乳房癌患者和 62.5% 的肺癌患者的肿瘤缩小或临床症状显著改善。当灰树花多糖与化疗药物联合应用后, 免

疫细胞活性比单用化疗药物增强了 1.2~ 1.4倍。另外的研究表明:灰树花多糖可恢复淋巴细胞和 NK细胞的活性,有效抑制 BBN 诱导膀胱癌的产生或显著减少癌细胞的数量<sup>[29]</sup>; MT-2组份对 Meth-A 纤维瘤、IMC瘤和 MM-46 癌细胞有显著抑制作用,抑制率为 25.6%~ 49%<sup>[30]</sup>; LELFD 组份可有效抑制 Meth-A 纤维瘤、IMC瘤细胞增殖,但对白血病细胞无效<sup>[31]</sup>。

劳华均等<sup>[32]</sup>经研究发现,ig 剂量为  $3.4 \times 10^6$  mg/(kg·d)时,灰树花粗多糖对趾甲和腋下接种 Lewis 肺癌的抑制率分别为 67.83%~ 72.44%和 45.36%~ 46.31%,对 Colon 癌的抑制率分别为 50.68%~ 56.03%和 37.31%~ 40.47%,与相应的对照组相比均达到极显著水平。孙震等<sup>[33]</sup>在灰树花多糖体内抗肿瘤作用的研究中证实,灰树花多糖能促进小鼠脾脏增重,增加腹腔巨噬细胞的数量和吞噬功能。

2.3 抗 HIV 病毒:灰树花多糖具有直接抑制 HIV,刺激机体免疫系统抵抗 HIV,并增强机体抵御续发疾病的能力。20 世纪 80 年代,日本学者首先发现灰树花 D 组份能增加 HIV 病毒靶细胞——辅助 T 细胞的量,揭示了灰树花多糖治疗 AIDS 的可能性<sup>[26]</sup>。国际癌症协会 (NCI)进行的体外试验研究表明,硫酸化灰树花多糖的抗病毒活性具有明显的量效关系<sup>[34]</sup>。Nanba<sup>[35]</sup>采用灰树花 MD 组份治疗 AIDS 患者,结果辅助 T 细胞增加者 20 人,减少者 8 人,稳定者 4 人;病毒负荷减少者 10 人,增加者 9 人,稳定者 2 人。另外的研究也表明,当 AIDS 患者连续口服葡聚糖或灰树花制剂 60 d 后,50% 患者的辅助 T 淋巴细胞数增加,另 50% 患者的辅助 T 淋巴细胞数停止下降<sup>[36]</sup>;约 40% 的晚期 AIDS 病人会并发卡波奇肉瘤,而灰树花多糖在抑制 HIV 病毒的同时,还能改善 AIDS 的并发症。采用灰树花多糖 D 组份和二亚砷 (DM SO)制成的制剂,在皮肤受损部位局部给药,几天后即可观察到卡波奇肉瘤逐渐消失<sup>[34]</sup>。

2.4 治疗肝炎作用: Nanba<sup>[37]</sup>研究发现,灰树花无论口服还是注射均具有显著的肝炎治疗作用。灰树花多糖 X 组份可使实验性肝炎小鼠的谷草转氨酶和谷丙转氨酶先升高 1.2~ 2. (倍,而后迅速下降。测定肝炎加重期和缓解期 T 细胞的活性结果表明,灰树花 X 组份可以激活被抑制的 T 细胞的活性,抑制细胞毒 T 细胞的活性,逐渐减轻肝炎病症。Ooi<sup>[38]</sup>证实,灰树花提取物可以显著降低由于口服 4 乙酰氨基酚造成的肝损伤,降低血液中的谷丙转氨酶和血液谷草转氨酶浓度。Kubo<sup>[39]</sup>报道,灰树花、灰树花 D 组份和灰树花 X-组份可有效减少实验性肝炎向自身免疫性慢性肝炎的转化。

2.5 其他作用:除了上述作用外,灰树花多糖还具有调血脂、降血糖、降血压等功能。Kubo<sup>[37, 40]</sup>发现灰树花干粉可明显促进肝脏脂肪和血脂的代谢,降低高血脂小鼠血清中胆固醇、甘油三酯以及磷脂水平。Kubo<sup>[8, 41]</sup>的研究还表明灰树花 X 组份能提高实验小鼠血浆中胰岛素水平,显著降低糖尿病动物的血糖。进一步机制研究证实,灰树花或灰树花 X 组份能直接与胰岛素受体结合,增加胰岛素的敏感性。Honio<sup>[42]</sup>

的研究也证明灰树花制剂可以提高胰岛素浓度,增加糖尿病小鼠的糖耐受性,有效改善糖尿病的相应症状。另外,灰树花多糖还可以有效降低遗传性高血压小鼠的血压<sup>[43~ 45]</sup>。

### 3 结语

国外学者已经对灰树花多糖的化学组份和药理作用进行了深入研究,由于多糖结构的复杂性和提取方法的差异,现已分别得到了不同化学组成和生理活性的多糖组份,但各组份的活性基础均为具有高度分支的  $\beta$ -1, 3-葡聚糖和  $\beta$ -1, 6-葡聚糖的多糖,且都含有一定比例的蛋白质。就目前的研究工作来讲,国内学者对灰树花多糖化学组份的研究还缺乏深度,有关灰树花多糖单一组份分离纯化的研究很少报道,而单一组份的药理作用研究还未见报道,这限制了我国灰树花资源的深度开发和利用。

此外,目前对于灰树花的研究几乎全部集中在多糖上,其实灰树花中除  $\beta$  葡聚糖外还含有大量的其他活性成分,如蛋白多糖、蛋白、核酸等大分子物质以及氨基酸、维生素、无机盐、微量元素等小分子活性物质,也同样具有开发价值,值得进一步研究开发。

目前已上市的灰树花标准  $\beta$  葡聚糖提取物产品有日本的 MAIEXT,美国的 Grifron 系列产品和我国的保力生胶囊等。但不管是 MAIEXT 还是 Grifron,其中的主要活性成分均为灰树花 D 组份、MD 组份或前 D 组份等。作为生物效应调节剂,灰树花多糖能激活机体免疫系统,有效抑制肿瘤的增殖,已成为癌症患者放化疗过程中重要的辅助药物。

### References

- [1] Hishida I, Nanba H, Kuroda H. Antitumor activity exhibited by orally administered extract from fruit body of *Grifola frondosa* (Maitake) [J]. *Chem Pharm Bull*, 1988, 36(5): 1819-1827.
- [2] Nanba H, Kubo K. Antitumor substance extracted from *Grifola* [P]. US 5854404, 1998-12-29.
- [3] Nanba H, Hamaguchi A, Kuroda H. The chemical structure of an antitumor polysaccharide in fruit bodies of *Grifola frondosa* (Maitake) [J]. *Chem Pharm Bull*, 1987, 35(3): 1162-1168.
- [4] Ohno N, Adachi Y, Suzuki I, et al. Characterization of the antitumor glucan obtained from liquid-cultured *Grifola frondosa* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1986, 34(4): 1709-1715.
- [5] Ohno N, Lino K, Oikawa S, et al. Fractionation of acidic antitumor  $\beta$ -glucan of *Grifola frondosa* by anion-exchange chromatography using urea solutions of low and high ionic strengths [J]. *Chem Pharm Bull*, 1986, 34(8): 3328-3332.
- [6] Ohno N, Ohsawa M, Sato K, et al. Conformation of grifolan in the fruitbody of *Grifola frondosa* assessed by carbon-13 cross polarization magic angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopy [J]. *Chem Pharm Bull*, 1986, 35(6): 2585-2588.
- [7] Ohno N, Adachi Y, Suzuki I, et al. Two different conformations of antitumor glucans obtained from *Grifola frondosa* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1986, 34(6): 2555-2560.
- [8] Ohon N, lino K, Takeyama T, et al. Structural characterization and antitumor activity of the extracts from matted mycelium of cultured *Grifola frondosa* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1985, 33(8): 3395-3401.
- [9] Iion K, Ohon N, Suzuki I, et al. Structure-function relationship of antitumor  $\beta$ -1-3-glucan obtained from matted mycelium

- of cultured *Grifola frondosa* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1985, 33(11): 4950-4956.
- [10] Kubo K, Aoki H, Nanba H. Anti-diabetic activity present in the fruit body of *Grifola frondosa* (Maitake). I [J]. *Biol Pharm Bull*, 1994, 17: 1106-1110.
- [11] Li X D, Wu M C, Zeng X T, et al. Isolation purification and characterization of polysaccharides from *Grifola frondosa* [J]. *J Huazhong Agri Univ* (华中农业大学学报), 2002, 21(4): 186-188.
- [12] Feng H Q, Yang Q Y. Analysis of polysaccharide isolated from the fruit bodies and mycelia of *Grifola frondosa* [J]. *J East China Normal Univ—Nat Sci* (华东师范大学学报·自然科学版), 2001, 3: 91-96.
- [13] Zhuang C, Mizuno T, Ito H, et al. Chemical modification and antitumor activity of polysaccharides from mycelium of liquid-cultured *Grifola frondosa* [J]. *J Jpn Soc Food Sci Technol*, 1994, 41(10): 733-740.
- [14] Mizuno T, Ohsawa K, Hagiwara N, et al. Fractionation and characterization of antitumor polysaccharides from Maitake, *Grifola frondosa* [J]. *Agri Biol Chem*, 1986, 50(7): 1679-1688.
- [15] Inoue A, Kodama N, Nanba H. Effect of Maitake (*Grifola frondosa*) D-fraction on the control of the T lymph node Th-1/Th-2 proportion [J]. *Chem Pharm Bull*, 2002, 25(4): 536-540.
- [16] Nanba H. Maitake mushroom-immune therapy to prevent from cancer growth and metastasis [J]. *Explore*, 1995, (6): 1.
- [17] Shigesue K, Kodama N, Nanba H. Effects of Maitake (*Grifola frondosa*) polysaccharide on collagen-induced arthritis in mice [J]. *Jpn J Pharmacol*, 2000, 84(3): 293-300.
- [18] Adachi Y, Ohno N, Yadomae T. Activation of murine Kupffer cells by administration with gel-forming (1 $\rightarrow$ 3)-beta-D-glucan from *Grifola frondosa* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1998, 21(3): 278-283.
- [19] Adachi Y, Okazaki M, Ohno N, et al. Enhancement of cytokine production by macrophages stimulated with (1 $\rightarrow$ 3)-beta-D-glucan, grifolan (GRN), isolated from *Grifola frondosa* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1994, 17(2): 1554-1560.
- [20] Okazaki M, Adachi Y, Ohno N, et al. Structure-activity relationship of (1 $\rightarrow$ 3)-beta-D-glucans in the induction of cytokine production from macrophages, *in vitro*. [J]. *Chem Pharm Bull*, 1995, 18(10): 1320-1327.
- [21] Zhuang C, Mizuno T. Antitumor activity and immunological property of polysaccharides from mycelium of liquid-cultured *Grifola frondosa* [J]. *J Jpn Soc Food Sci Technol*, 1994, 41(10): 724-732.
- [22] Xiang S, Zhu S H, Zhu Y P, et al. Enhancement of mouse interferon induction *in vivo* by grifolan polysaccharide [J]. *J Zhejiang Med Univ* (浙江医科大学学报), 1995, 24(6): 257-258.
- [23] Nanba H, Kubo K. Effect of Maitake D-fraction on cancer prevention [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1997, 833: 204-207.
- [24] Nanba H. Maitake D-fraction: healing and preventive potential for cancer [J]. *J Orthomol Med*, 1997, 12: 43-49.
- [25] Nanba H. Activity of Maitake D-fraction to inhibit carcinogenesis and metastasis [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1995, 768: 243-245.
- [26] Hishida I, Nanba H, Kuroda H. Antitumor activity exhibited by oral administered extract from fruit body of *Grifola frondosa* (Maitake) [J]. *Chem Pharm Bull*, 1988, 36: 1819-1827.
- [27] Nanba H. Antitumor activity of orally administered "D-fraction" from Maitake mushroom (*Grifola frondosa*) [J]. *J Naturopathic Med*, 1993, 1: 10-15.
- [28] Kodama N, Komuta K, Nanba H. Can Maitake M D-fraction aid cancer patients [J]. *Altern Med*, 2002, 7(3): 236-239.
- [29] Kurashige S, Akuzawa Y, Endo F. Effects of *Lentinus edodes*, *Grifola frondosa* and *Pleurotus ostreatus* administration on cancer outbreak, and activities of macrophages and lymphocytes in mice treated with a carcinogen, *N*-butyl-*N*-butanolnitrosamine [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 1997, 19: 175-183.
- [30] Adachi K, Nanba H, Kuroda H. Potentiation of host-mediated antitumor activity in mice by beta-glucan obtained from *Grifola frondosa* (Maitake) [J]. *Chem Pharm Bull*, 1987, 35: 262-270.
- [31] Suzuki I, Hashimoto K, Oikawa S, et al. Antitumor and immunomodulating activities of a beta-glucan obtained from liquid-cultured *Grifola frondosa* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1989, 37: 410-413.
- [32] Lao H J, Min S D, Zang Z D, et al. Antitumor activity of a polysaccharide from fruit bodies of *Grifola frondosa* and its effects on macrophage and NK cell [J]. *Acta Agri Shanghai* (上海农业学报), 1997, 13(1): 25-30.
- [33] Sun Z, Chen S L, Gu W Y, et al. Fractionation and antitumor activity of polysaccharide from *Grifola frondosa* [J]. *Pharm Biotech* (药物生物技术), 2001, 8(5): 279-283.
- [34] Mayell M. Maitake extracts and their therapeutic potential [J]. *Altern Med*, 2001, 6(1): 48-60.
- [35] Nanba H, Kodama N, Schar D, Turner D. Effects of Maitake (*Grifola frondosa*) glucan in HIV-infected patients [J]. *Mycoscience*, 2000, 41: 293-295.
- [36] Zhao M. Effect of anti-HIV of *Grifola frondosa* [J]. *Edible Fungi China* (中国食用菌), 1994, 13(6): 40.
- [37] Kubo K, Nanba H. Anti-hyperlipidosis effect of Maitake fruit body (*Grifola frondosa*) I. [J]. *Chem Pharm Bull*, 1997, 20: 781-785.
- [38] Ooi Y. Hepatoprotective effect of some edible mushroom [J]. *Phytother Res*, 1996, 10(6): 536-538.
- [39] Kubo K, Nanba H. Modification of cellular immune responses in experimental autoimmune hepatitis in mice by Maitake (*Grifola frondosa*) [J]. *Mycoscience*, 1998, 39: 351-360.
- [40] Kubo K, Nanba H. The effect of Maitake mushrooms on liver and serum lipids [J]. *Altern Ther Health Med*, 1996, 2: 62-66.
- [41] Royse D J. *Mushroom Biology and Mushroom Products* [M]. University Park, PA: Penn State University, 1996, 215-221.
- [42] Horio H, Ohtsuru M. Maitake (*Grifola frondosa*) improve glucose tolerance of experimental diabetic rats [J]. *J Nutr Sci Vitaminol*, 2001, 47(1): 57-63.
- [43] Kabir Y, Yamaguchi M, Kimura S. Effect of shiitake (*Lentinus edodes*) and Maitake (*Grifola frondosa*) mushrooms on blood pressure and plasma lipids of spontaneously hypertensive rats [J]. *J Nutr Sci Vitaminol*, 1987, 33: 341-346.
- [44] Kabir Y, Himura S. Dietary mushrooms reduce blood pressure in spontaneously hypertensive rats (SHR) [J]. *J Nutr Sci Vitaminol*, 1989, 35: 91-94.
- [45] Kabir Y, Hoshino T, Komai M, et al. Histopathological changes in spontaneously hypertensive rats after feeding shiitake (*Lentinus edodes*) and Maitake (*Grifola frondosa*) mushroom diets [J]. *J Clin Biochem Nutr*, 1989, 6: 187-193.