

G009의 간 보호작용에 관한 연구

이주영 · 박기숙 · 정진호 · 조미정 · 고광호 · 이준우¹ · 정 훈¹ · 이승룡^{1,*}

서울대학교 약학대학, ¹*일양약품 중앙연구소

Effects of G009 on Chemical-Induced Liver Damage in Rats

Joo Young LEE, Ki Sook PARK, Jin Ho CHUNG, Mee Jung CHO, Kwang Ho KO,

Jun Woo LEE¹, Hoon JEONG¹, and Seung Yong LEE^{1,*}

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

¹*Central Research Institute of Il Yang Pharm Co., Kyunggi-do, 449-900, Korea

(Received July 19, 1994; accepted August 13, 1994)

Abstract—The present study was performed to determine the protective effect of G009 on liver damage induced by ethanol, CCl₄ and thioacetamide in rats. In acute fatty liver animal model induced by ethanol, triglyceride accumulation was markedly decreased to the normal control level by 25 mg/kg G009 treatment. In addition, G009 significantly reduced serum ALT and AST levels in CCl₄-induced acute hepatitis animals. Treatment of G009 to the acute hepatitis rats induced by thioacetamide resulted in a dose dependent reduction of serum ALT level as well as AST level up to the normal control level. These protective effects of G009 were confirmed by histological examinations of the liver. These results suggested that G009 could be effective for the protection from the liver damage induced by ethanol, CCl₄ and thioacetamide.

Keywords □ G009, ethanol, CCl₄, thioacetamide, liver damage.

Ganoderma lucidum IY009는 불로초속(*Ganoderma*)에 속하는 영지버섯으로서 전남 해남군 두륜산에서 자실체를 채집하여 균사를 분리한 것이다. G009는 *G. lucidum* IY009의 배양액으로부터 분리된 단백질다당체이다. 최근 G009는 면역조절작용(Chung, 1993), 항염증(Ukai 등, 1983), 항암(Miyazaki와 Nishijima, 1981; Sone 등 1985; Stavinoha 등, 1993), 항바이러스(Kim 등, 1993) 등의 효과를 가지는 것이 보고되었다. 또한 G009는 간장보호 효과를 나타내어 간의 fibrosis 등을 억제함이 연구되었다(Park 등, 1993). 본실험에서는 G009의 간장보호효과 연구의 일환으로 알코올성 지방간에 대한 효과 및 기전이 서로 다른 두 가지 급성 간염 모델하에서의 G009의 효과 등을 연구하였다.

실험방법

시료 및 시약

* To whom correspondence should be addressed.

실험에서 사용된 시약 중 CCl₄는 Wako Chemical Company(Tokyo, Japan)제품을 사용하였고, thioacetamide는 Sigma Chemical Company(St. Louis, MO)로부터 구입하였다. G009는 주식회사 일양약품으로부터 공급된 자가규격에 적합한 제품을 사용하였으며, AST 및 ALT kit는 영동제약(Korea)제품을 구입하여 사용하였다. 기타 사용된 모든 시약들은 reagent grade 이상의 것을 사용하였고 실험에 사용된 물은 탈이온 이차 증류수를 사용하였다.

실험 동물

실험 동물은 서울대학교 실험 동물 사육장으로부터 공급받았으며, Sprague-Dawley 흰쥐를 항온, 항습이 유지되는 실험 사육장에 일주일 이상 적응시킨 후 사용하였다.

G009 투여 농도의 설정

본 실험에서는 G009 2.5, 10, 25, 100 mg/kg *b.w.*의 용량군을 대상으로 G009를 탈이온수에 녹여 1일 1회, 5일간 경구투여한 후 실험을 실시하였다.

Ethanol 및 독성 물질의 처리

Ethanol 투여 및 시료 제조 : 체중 200 g 내외의 S.-D. 흰쥐를 3군으로 분리하여 G009 25 mg/kg *b.w.*로 1일 1회 4일간 경구투여하였다. 절식시킨 후 5일째 G009를 투여하고 2시간 후 ethanol을 3g/kg 용량으로 경구 투여하였다. Ethanol을 투여한 후 2, 4, 6, 8, 그리고 10시간 쯤에 꼬리 정맥으로부터 혈액을 취하여 ethanol 농도를 측정하였다. Serum aspartate transaminase(AST) 및 serum alanine transaminase(ALT) 활성을 측정하기 위하여, ethanol 투여 24시간 후 흰쥐를 ether로 마취시키고 heart puncture로 채혈하여 상온에서 1시간 이상 방치 후 12,000 g에서 2분간 원심분리하여 혈청을 얻었으며, 냉장보관하여 3일 이내에 사용하였다. 또한 간을 적출하여 67 mM phosphate buffer(pH 7.0)로 세척한 후 무게를 측정하고 -20°C 에서 냉동 보관 후 hepatic triglyceride 함량 측정에 사용하였다.

Ethanol 농도 측정 : Ethanol의 농도는 Bonnicksen과 Theorell의 방법을 이용하여 측정하였다(Bonnicksen과 Theorell, 1951). 꼬리 정맥으로부터 취한 혈액 100 μl 에 0.33 N perchloric acid 800 μl 를 가한 후에 12,000 g에서 45초간 원심 분리하였다. 원심 분리한 상등액 50 μl 를 취해서 pH 8.7 buffer(75 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 75 mM semicarbazide·HCl, 21 mM glycine) 2.4 ml가 있는 시험관에 가했다. 상등액 대신 0.33 N perchloric acid 50 μl 를 가한 것을 blank로 하였다. 여기에 25 mM NAD^+ 50 μl 와 15 kU/ml ADH 10 μl 를 가하여 25°C 에서 70분간 배양 후 UV-VIS spectrophotometer(Schimadzu, Japan)를 이용하여 blank를 대조로 하여 340 nm에서 흡광도를 측정했다.

CCl_4 의 처리 : 체중 200 g 내외의 S.-D. 흰쥐를 사용하여 G009를 용량별(2.5, 10, 25 mg/kg *b.w.*)로 1일 1회, 4일 동안 투여하였다. 절식시킨 후 다음날 CCl_4 (0.1 또는 0.15 ml/kg, corn oil, *i.p.*)를 투여하기 2시간 전에 G009를 다시 투여하였다. CCl_4 를 투여하고 24시간 후에 ether로 마취시키고 복대동맥으로부터 채혈하였다. 채취한 혈액은 상온에서 1시간 이상 방치 후 12,000 g에서 2분간 원심분리하여 혈청을 얻었으며, 냉장 보관하여 3일 이내에 사용하였다. 또한 간을 적출하여 무게를 측정하고 조직검사를 위해 일정부위의 것을 10% formalin액에 고정시켰다.

Thioacetamide 처리 : 체중 200 g 내외의 S.-D. 흰쥐를 1군당 5마리씩 사용하여 G009를 용량별(10, 25, 100 mg/kg *b.w.*)로 1일 1회, 4일 동안 투여하였다. 다음날, thioacetamide(150 mg/kg, saline, *p.o.*)를 투여하기 2시간 전에 G009를 다시 투여하였으며, thioacetamide를 투여하고 48시간 후에 ether로 마취시키고 복대동맥으로부터 채혈하였다. 채취한 혈액은 상온에서 1시간 이상 방치 후 12,000 g에서 2분간 원심분리하여 혈청을 얻었으며, 냉장 보관하여 3일 이내에 사용하였다. 또한 간을 적출하여 무게를 측정하고 조직검사를 위해 일정부위의 것을

10% formalin액에 고정시켰다.

AST 및 ALT 활성 측정

AST 및 ALT 활성은 영동제약의 Kit를 사용하여 측정하였다. 시험관에 AST 및 ALT 기질액을 0.5 ml씩 취하여 37°C 에서 2~3분간 가온 후 피검 혈청 100 μl 를 가하고 37°C 에서 AST는 60분간, ALT는 30분간 반응시켰다. 발색액(2,4-dinitrophenylhydrazine)을 0.5 ml씩 가하여 반응을 종료시키고 실온에서 20분간 방치 후 0.4 N NaOH 5 ml를 가하여 종류수를 대조로 하여 505 nm에서 흡광도를 측정하였다.

간 triglyceride 함량 측정

간 triglyceride 함량은 Van Handel과 Zilversmit의 방법(Van Handel과 Zilversmit, 1957)을 Butler 등이 변형시킨 방법(Butler 등, 1961)으로 측정하였다. 간 1 g에 67 mM phosphate buffer(pH 7.0) 9 ml를 가해서 분쇄하였다. 이 분쇄물 1 ml를 chloroform 2 ml가 포함된 활성 zeolite 4 g이 있는 50 ml glass-stopper tube에 가했다. 이 시험관에 chloroform 18 ml를 가하여 10분간 교반한 후 Whatman No. 2 paper로 여과하였다. 여과액을 0.5 ml씩 취해서 3개의 시험관에 나누어 가하고 chloroform 0.5 ml를 가한 것을 blank로 한 후, 80°C 에서 30분 동안 가열하여 chloroform을 제거하였다. 3개의 시험관 중에 2개의 시험관에는 alcoholic-KOH(0.4%) 0.5 ml를 가하고 (비누화) 나머지 하나의 시험관에는 95% alcohol 0.5 ml를 가하여(불비누화) 65°C 에서 20분간 가온 후 0.2 N H_2SO_4 0.5 ml를 가해서 95°C 에서 15분 동안 가온하여 남아 있는 alcohol을 제거하였다. 시험관을 냉각시킨 후, 0.05 M sodium metaperiodate 0.1 ml를 가하여 10분간 방치한 다음 2 M sodium arsenite 0.1 ml를 가해서 10분간 방치하였다. 각각의 시험관에 0.2% chromotropic acid 5 ml를 가해 압소에서 95°C 로 30분간 반응시킨 후 blank를 대조로 하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Triglyceride 함량(mg/g tissue)은 다음 공식에 의하여 산출하였다.

$$(\text{Asu} - \text{Ansu}) / (\text{Ass} - \text{Anss}) \times 0.05 \times (200/\text{F})$$

Asu ; 비누화된 검체의 흡광치

Ansu; 불비누화한 검체의 흡광치

Ass ; 비누화된 표준품의 흡광치

Anss; 불비누화한 표준품의 흡광치

F ; chloroform 추출물의 양(ml)

Ethanol Kinetic Parameter 계산법

Ethanol을 투여한 각 동물의 혈중 ethanol kinetic curve로부터 Widmark 등식(Widmark, 1933)을 사용하여 계산하였다. Elimination phase의 slope(β)는 ethanol curve의 감소 부분을 직선화하여 구했다. Ethanol 투여 초기농도(C_0)는 직선화한 line의 y-intercept로부터 얻었다. 분포 용적(V_d)의 계산은 투여량을 초기 농도로 나누

Table I. Effect of G009 on body weight, liver weight, and liver weight/body weight in ethanol-treated rats

Group	N	Body Weight (g)	Liver Weight (g)	L. W./B. W. × 100 (%)
Normal	5	214 ± 11	7.0 ± 0.5	3.3 ± 0.3
Ethanol Control	4	187 ± 6	8.9 ± 0.5	4.7 ± 0.3
Ethanol + G009 25 mg/kg	4	193 ± 9	9.1 ± 0.4	4.7 ± 0.1

어서 구하였고, 체내 ethanol 소실 속도($\beta \times V_d$)는 slope (β)와 분포 용적(V_d)을 곱하여 얻었다. AUC(area under the curve)는 trapezoidal 방법을 사용하여 계산하였다. 간조직 검사

CCl_4 및 thioacetamide 처리군에서 얻은 간조직을 10% formalin액에 고정시킨 다음 탈수과정을 거쳐 파라핀 포매를 하였으며, 4~6 μm 두께의 조직절편을 만들어 Hematoxylin & Eosin 염색 후 검경하였다.

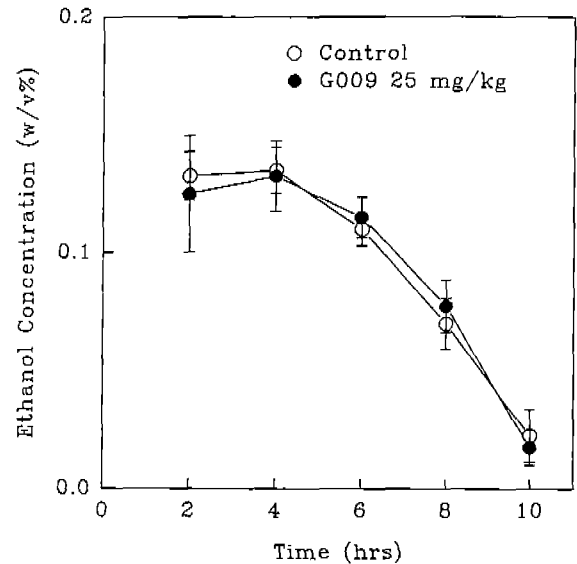
통계학적 분석

모든 실험 결과는 One way-ANOVA test를 거친 후 Duncan's multiple range test를 행하였다. p값이 0.05 미만인 경우 통계학적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

실험결과 및 고찰

급성 지방간 회복 실험

흰쥐를 사용하여 탈이온수에 녹인 G009를 1일 1회, 4일 동안 25 mg/kg b.w. 용량으로 투여한 후 실험 전날 절식시켰다. 다음날 ethanol 투여 2시간 전에 G009를 가한 뒤, ethanol을 3g/kg 용량으로 경구투여하였다. G009 및 ethanol 투여에 따른 체중 및 간장 무게의 변화는 관찰되지 않았다(Table I). Fig. 1은 G009 투여에 따른 혈액의 ethanol kinetics 변화를 나타낸 것으로, 투여군에서 ethanol 흡수율 및 대사에 유의적인 차이는 관찰되지 않았다. 또한 Fig. 1으로부터 kinetic 상수를 계산한 결과, AUC(생체 이용율)를 포함한 모든 상수에 투여군간의 유의적인 차이가 없었다(Table II). Ethanol의 급성 독성에는 말초 조직으로부터 지방을 간으로 이동시켜 지방간을 유발하는 작용이 있으며, 이러한 작용은 ethanol의 AUC와 밀접한 관계가 있다고 알려져 있다. Ethanol 투여 24시간 뒤 지방간 생성 억제 유무를 관찰하였다(Table II 및 Fig. 2). Ethanol 처리군에서는 대조군과 비교하여 지방간이 2배 증가하였으며, G009 25 mg/kg 투여군에서 ethanol에 의해 유도된 지방간이 억

**Fig. 1.** Effect of G009 on kinetics of orally administrated ethanol in rats.

제되어 대조군과 유사한 수준으로 낮아졌다. Table II와 Fig. 2를 종합하여 보면 혈액 ethanol kinetic parameter에 영향없이 지방간을 억제함은 서로 상반된 결과로 보이나, G009는 ethanol에 의한 말초조직에서의 지방동원을 직접 억제하여 대조군 수준으로 낮춘다고 추정된다. 따라서 ethanol에 의해 유도된 급성 지방간 형성에 25 mg/kg G009는 억제 효과가 있는 것으로 사료된다. CCl_4 에 의해 유도된 급성간염에 대한 G009의 억제 효과

CCl_4 로 흰쥐에 급성간염을 유도시키고 G009를 용량별로 가하여 억제 효과를 연구하였다. CCl_4 를 복강주사하고 24시간 뒤 체중 및 간장 무게 등은 전혀 변화가 없었으며, G009 투여에 의해서도 큰 변화가 없었다(Table III). 급성간염 독성지표인 혈중 ALT 변화를 측정된 결과 정상군에 비하여 CCl_4 처리군은 10배 증가하였다(Fig. 3).

Table II. Effect of G009 on kinetic parameters of blood ethanol levels and triglyceride accumulation in rats

Group	N	AUC (mg/ml × hr)	Slope (β) (mg/ml/hr)	Rate of Disappearance (mg/hr/kg b.w.)	Triglyceride (mg/g liver)
Control	6	—	—	—	2.3 ± 0.5
Ethanol Control	8	8.9 ± 0.3	0.19 ± 0.01	272 ± 13	5.5 ± 1.7
Ethanol + G009 25 mg/kg	4	9.1 ± 1.4	0.20 ± 0.02	280 ± 9	2.2 ± 0.6

G009 2.5 mg/kg에서는 CCl₄ 처리군과 차이가 없었으나 G009 10 mg/kg에서는 ALT가 현저히 감소하는 예민한 용량-반응선을 나타내고 있다. G009 25 mg/kg에서는 10 mg/kg과 동등한 효과가 있었다. 또다른 간독성 지표인 혈액내 AST 변화를 측정된 결과 정상군과 비교하여 CCl₄ 처리군에서는 6배 증가하였다(Fig. 4). G009의 3가지 투여용량에서 앞서 관찰된 ALT양 변화와 유사한 결과가 관찰되었다. ALT 및 AST 두가지 결과를 종합하여 보면 G009의 효과는 sharp dose-response curve를 나타내며 G009 10 mg/kg 용량부터 현저한 효과가 있었다. 따라서 CCl₄에 의해 유도된 급성간염 모델에서 G009는 억제효과가 있음이 확인되었다. G009의 이러한 효과를 간조직 검사를 통하여 알아보았다(Fig. 5). CCl₄ 처리에 의해 특히 periportal 구역에 광범위한 necrosis가 일어났으나 G009를 투여한 군에서는 간세포 necrosis가 현저히 감소함을 보여주고 있다. 이상은 혈액내 ALT 및 AST 결과와 일치하였다.

Thioacetamide로 유도된 급성간염에 대한 G009의 억제 효과

Thioacetamide는 지방간을 유도하지 않으며, 소포체 막이나 핵막을 변화시키고 간세포 괴사를 유발하여 급

성간염을 유발시키는 것으로 알려져 있는데, G009의 thioacetamide에 의한 급성간염에 대한 효과를 규명하였다. Thioacetamide 150 mg/kg을 경구투여하고 48시간 뒤 체중, 간장 무게 및 체중에 대한 간장의 무게비는 모두 큰 변화가 일어나지 않았다(Table IV). 또한 G009를 10, 25, 100 mg/kg의 3가지 용량으로 투여한 결과, 상기 지표

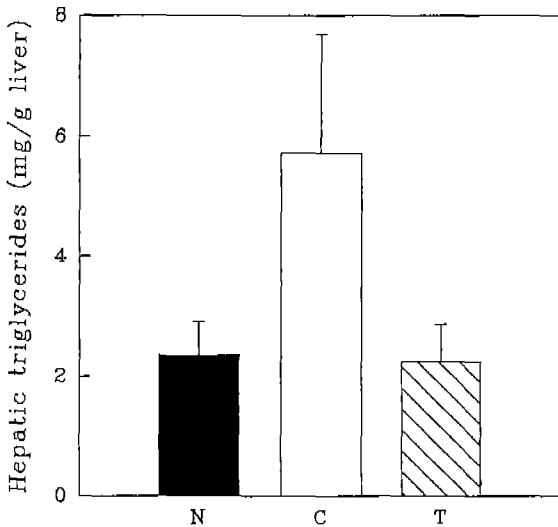


Fig. 2. Effect of G009 on hepatic triglyceride accumulation induced by ethanol. N; Normal (6), C; Ethanol Control (8), T; Ethanol+G009 25 mg/kg (4).

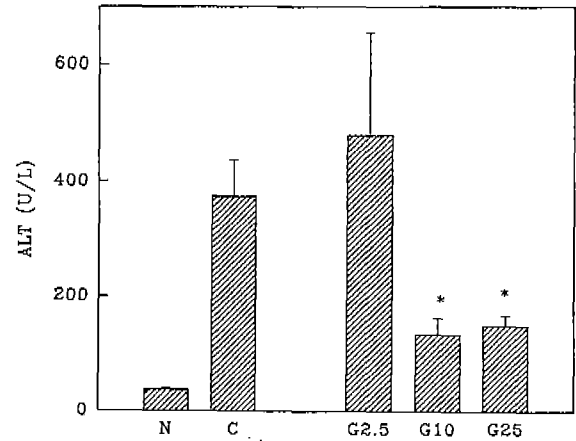


Fig. 3. Effect of G009 on ALT in CCl₄-intoxicated rats. N: Normal, C: CCl₄ control, G2.5: CCl₄+G009 2.5 mg/kg, G10: CCl₄+G009 10 mg/kg, G25: CCl₄+G009 25 mg/kg. *represents significant difference from CCl₄ control.

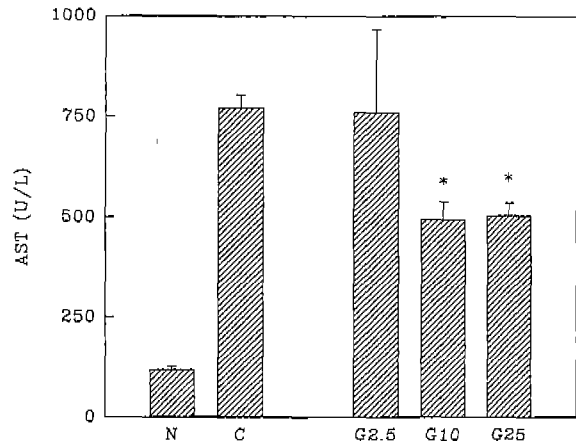


Fig. 4. Effect of G009 on AST in CCl₄-intoxicated rats. N: Normal, C: CCl₄ control, G2.5: CCl₄+G009 2.5 mg/kg, G10: CCl₄+G009 10 mg/kg, G25: CCl₄+G009 25 mg/kg. *represents significant difference from CCl₄ control.

Table III. Effect of G009 on body weight, liver weight, and liver weight/body weight in CCl₄-intoxicated rats

Group	N	Body Weight (g)	Liver Weight (g)	L. W./B. W×100 (%)
Normal	9	201± 14	9.1± 0.63	4.55± 0.15
CCl ₄ Control	15	209± 8	8.9± 0.53	4.19± 0.13
CCl ₄ +G009 2.5 mg/kg	5	203± 4	9.8± 0.33	4.81± 0.14
CCl ₄ +G009 10 mg/kg	5	234± 7	12.2± 0.25	5.09± 0.09
CCl ₄ +G009 25 mg/kg	12	196± 8	8.9± 0.57	4.49± 0.15

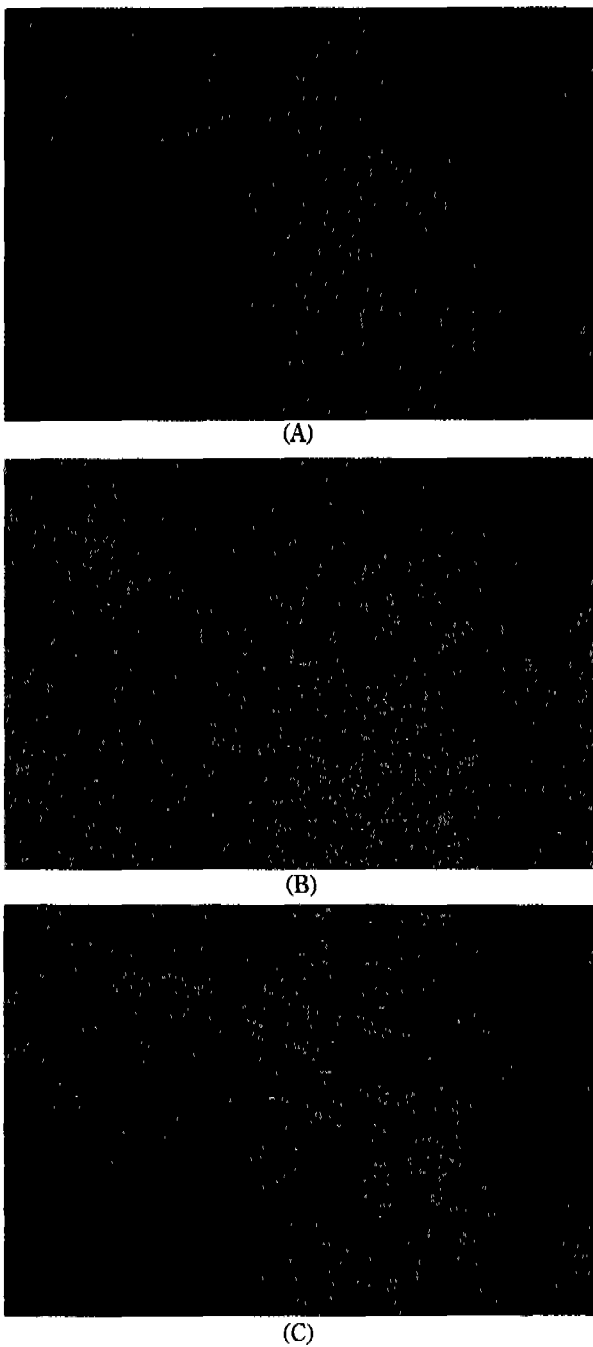


Fig. 5. Photomicrograph of paraffin sections from livers of rats killed 24h after administration of CCl₄. Sections were stained with hematoxylin and eosin. ×200. A) Corn oil control, B) CCl₄ treatment only, C) G009 pretreatment.

모두에서 차이가 없었다. Thioacetamide를 투여한 후 급성간염의 지표인 혈액내 ALT 및 AST 농도를 측정하였다(Fig. 6, 7). Thioacetamide를 투여한 결과 정상군

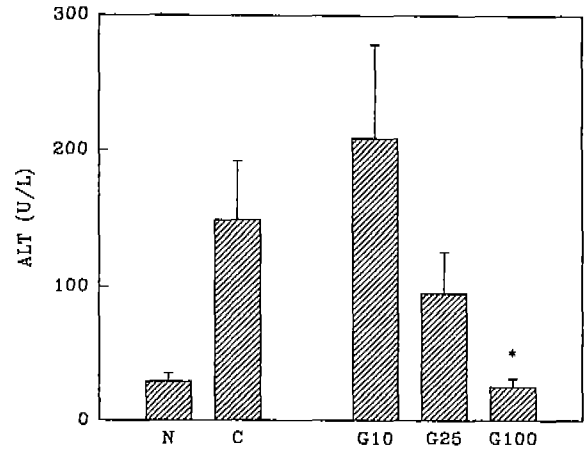


Fig. 6. Effect of G009 on ALT in thioacetamide-intoxicated rats.

N: Normal, C: Thioacetamide+G009 10 mg/kg, G25: Thioacetamide+G009 25 mg/kg, G100: Thioacetamide+G009 100 mg/kg.

*represents significant difference from thioacetamide control.

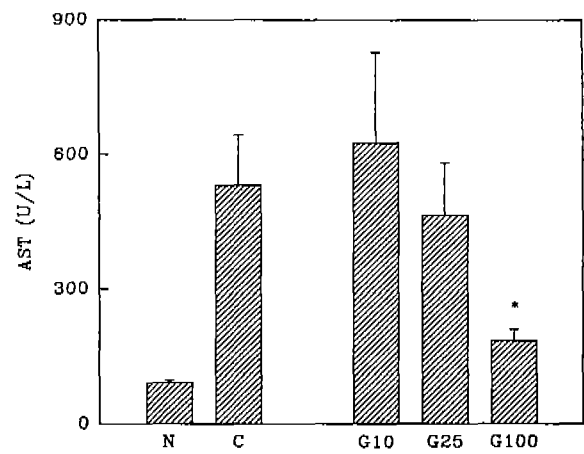


Fig. 7. Effect of G009 on AST in thioacetamide-intoxicated rats.

N: Normal, C: Thioacetamide control, G10: Thioacetamide +G009 10 mg/kg, G25: Thioacetamide+G009 25 mg/kg, G100: Thioacetamide+G009 100 mg/kg.

*represents significant difference from thioacetamide control.

Table IV. Effect of G009 on body weight, liver weight, and liver weight/body weight in thioacetamide-intoxicated rats

Group	N	Body Weight (g)	Liver Weight (g)	L. W./B. W×100 (%)
Normal	5	225± 7	8.2± 0.47	3.6± 0.18
Thioacetamide Control	5	197± 8	9.7± 0.56	4.9± 0.08
Thioacetamide+G009 10 mg/kg	5	193± 5	9.4± 0.29	4.9± 0.17
Thioacetamide+G009 25 mg/kg	5	190± 5	9.7± 0.34	5.1± 0.10
Thioacetamide+G009 100 mg/kg	5	217± 5	10.9± 0.40	5.0± 0.10

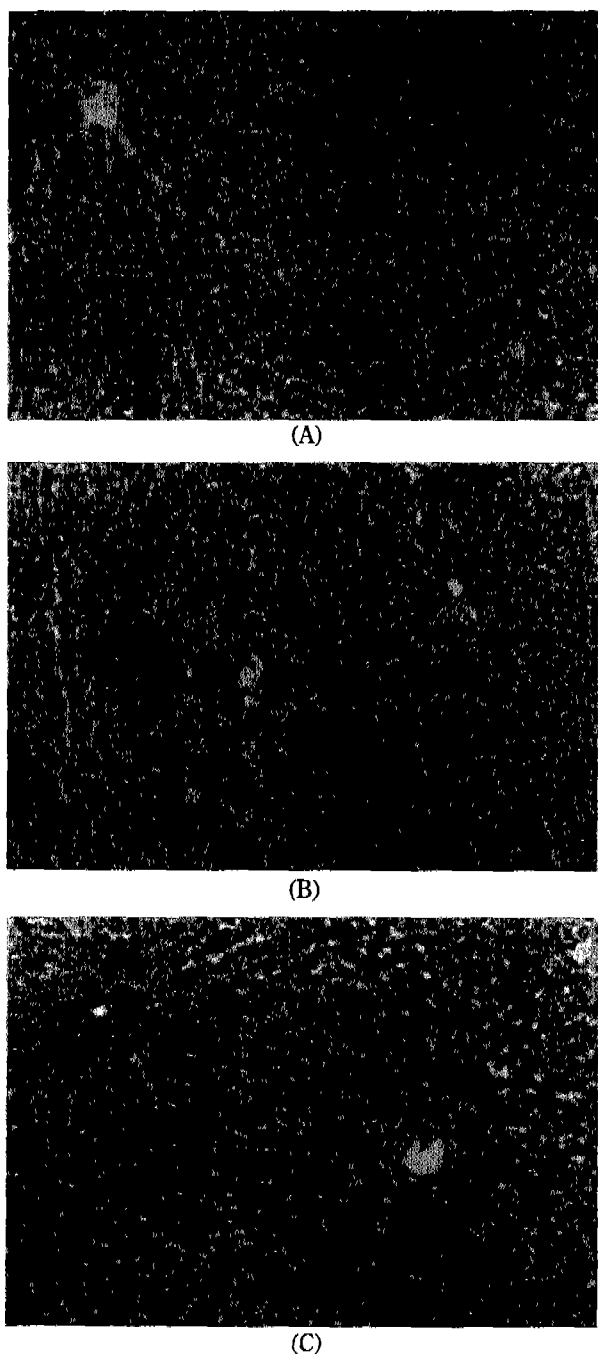


Fig. 8. Photomicrograph of paraffin sections from livers of rats killed 48h after administration of thioacetamide. Sections were stained with hematoxylin and eosin. $\times 200$. A) Saline control, B) Thioacetamide treatment only, C) G009 pretreatment.

과 비교하여 ALT양은 5배 증가하였다. G009 10 mg/kg에서는 효과가 없었으나 25 및 100 mg/kg에서는 thioacetamide에 의한 ALT의 농도 증가를 용량 의존적으로 감소시켰다. 특히 100 mg/kg 용량에서는 정상군과 큰 차이가 없었다. 한편 혈액내 AST 농도는 thioacet-

amide에 의해 정상군의 5배 정도로 증가하였고, ALT와 마찬가지로 농도의존적으로 효과를 나타내었다. Thioacetamide 처리시 G009의 효과를 간조직 검사를 통하여 알아보았다(Fig. 8). 흰쥐에 thioacetamide를 처리한 결과 periportal 구역에 necrosis 및 염증세포의 현저한 증가가 관찰되고 있다. G009를 100 mg/kg 처리한 결과 간세포 necrosis는 관찰되지 않았으며 염증세포의 출현도 thioacetamide 처리군에 비하여 감소함을 보여주고 있다. 이상의 결과는 혈액내 ALT 및 AST 활성 변화와 유사한 양상을 나타내었다.

기전이 서로 다른 급성간염 및 지방간 모델에서 G009의 효과를 종합하여 보면 G009는 ethanol, CCl₄ 및 thioacetamide 유도 모델에서 간손상에 대한 유의적인 억제 효과가 관찰되었다. 이러한 G009의 효과는 실험에 사용한 model에 따른 약간의 차이는 있었으나 G009 10 mg/kg과 100 mg/kg 사이에서 가장 유효한 효과를 보인다고 추정된다.

결 론

지방간 회복실험 및 급성간염 억제 실험에서 G009의 효과를 요약하면 다음과 같다.

급성지방간 회복실험에서 알코올 투여에 의하여 증가된 지방간은 G009 25 mg/kg 용량 투여에 의하여 현저히 감소되었으며 그 수준은 정상군과 동일하였다. CCl₄로 유도된 급성간염 모델에서 G009는 10, 25 mg/kg 용량에서 혈중 ALT 및 AST를 현저히 감소시켰다. 이와 같은 결과는 간조직 관찰을 통하여 G009의 간손상 보호 작용을 확인할 수 있었다.

Thioacetamide로 유도된 급성간염 모델에서 G009는 혈액내 ALT 및 AST 농도를 농도 의존적으로 감소시켜 정상군 수준으로 낮추었으며 이는 간조직 결과를 통하여 확인할 수 있었다.

참고문헌

- Bonnichsen, R. K. and Theorell, H. (1951). An enzymatic method for the microdetermination of ethanol. *Scan. J. Clin. Lab. Invest.* 3, 58-62.
- Butler, W. M., Maling, H. M., Horning, M. G. and Bordie, B. B. (1961). The direct determination of liver triglycerides. *J. Lipid. Res.* 2, 95-96.
- Chung, H. T. (1993). Effect of G009 (Extract of *Ganoderma lucidum* mycelium) on the nitric oxide from Macrophage-derived cell line (RAW 264.7). *Proc. Int. Sym. on Ganoderma lucidum.* June 17, 39-54, Seoul, Korea.
- Kim, B. K., Kim, H. W. and Choi, E. C. (1993). Anti-HIV activities of *Ganoderma lucidum*. *Proc. Int. Sym. on Ganoderma lucidum.* June 17, 67-72, Seoul, Korea.
- Miyazaki, T. and Nishijima, M. (1981). Studies on fungal polysaccharides (XXVII), structural examination of a water-solu-

- ble, antitumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum*. *Chem. Pharm. Bull.* **29**, 3611-3616.
- Park, E. J., Kim, K. Y., Kim, J. B., Kim, S. W., Lee, S. Y. and Sohn, D. H. (1994). The anti fibrotic effects of polysaccharides extracted from *Ganoderma lucidum* on the experimental hepatic cirrhosis. *Yakhak Hoeji* **38**, 3, 338-344.
- Sone, Y., Okuda, R. Wada, N., Kishida, E. and Misaki, A. (1985). Structures and antitumor activities of the polysaccharides isolated from fruiting body and the growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum*. *Agri. Biol. Chem.* **49**, 2641-2653.
- Stavinoha, W. B., Hardman, W. E. and Cameron, I. L. (1993). Short term dietary supplementation with *Ganoderma lucidum* slows development and growth of microadenomatous lesions in the colon of rats treated with the carcinogen 1,2-Dimethylhydrazine. *Proc. Int. Sym. on Ganoderma lucidum*. June 17, 12-22, Seoul, Korea.
- Van Handel, E. and Zilversmit, D. B. (1957). Micromethod for the direct determination of serum triglycerides. *J. Lab. Clin. Med.* **50**, 152-157.
- Widmark, E. M. P. (1933). Verteilung und unwandlung des ethyl alcohols in organismus des hundes. *Biochem. Z.* **267**, 128-134.
- Ukai, S., Kiho, T., Hara, C., Kuruma, I. and Tanaka, Y. (1983). Polysaccharides in fungi (XIV), anti-inflammatory effect of the polysaccharides from the fruit bodies of several fungi. *J. Pharm. Dyn.* **6**, 983-990.