

Cisplatin의 신장독성에 대한 영지추출물 복합제제의 보호효과

김대근 · 김근중 · 주성민 · 김용익 · 최호승 · 금경수¹ · 김원신² · 고익괴³ · 전병훈*

원광대학교 한의과대학 병리학교실, 1: 한의학전문대학원,
2: 자연과학대학 생명과학기술학부, 3: 뉴질랜드 마시대학교 식품영양인체건강연구소

Protective effect of Ganopoly and Ganopoly/C+ on nephrotoxicity induced by cisplatin in rats

Dae Geun Kim, Kun Jung Kim, Sung Min Ju, Yong Ik Kim, Ho Seung Choi,
Kyung Soo Keum¹, Won Sin Kim², Yiu Ai Gao³, Byung Hun Jeon*

Department of Pathology, College of Oriental Medicine, 1: Department of Oriental Medical Informatics, Professional Graduate School of Oriental Medicine, 2: Division of Natural Science & Technology, College of Natural Sciences and Institute of Basic Natural Sciences, Wonkwang University, 3: Institute of Food, Nutrition and Human Health, Auckland, Massey University

In this paper, the effect of Ganopoly(extracts of *Ganoderma lucidum*) and Ganopoly/C+(70% Ganopoly + 30% chitosan) on cisplatin-induced nephrotoxicity was investigated in Sprague-Dawley rats. A single dose of cisplatin(5 mg/kg) was administered intraperitoneally after pretreatment of saline, Ganopoly and Ganopoly/C+ for 7 days. The nephrotoxicity and renal function were manifested by the changes of body weight, blood pressure, biochemical changes and solute in urine and plasma. After the treatment of CDDP(cis-dichlorodiamineplatinum), a significant elevation of kidney weight, serum urea, creatinine, urine volume for 24 hours, urine magnesium, and a severe or significant decrease in body weight, blood pressure, creatinine clearance, urine osmolarity, serum albumin, etc. The nephrotoxicity was further confirmed by a significant decrease in glutathione S-transferase(GSH) in urine and kidney homogenate, GSH, glutathione peroxidase(GSH-Px) and catalase in kidney tissue. And also the lipid peroxidation was significantly increased in kidney homogenate. These signs of nephrotoxicity was ameliorated by the pretreatment and consecutive administration of Ganopoly and Ganopoly/C+ for 14 days after the i.p. injection of CDDP on 7th day after pretreatment of Ganopoly and Ganopoly/C+. The amelioration of nephrotoxicity was evidenced by significant reduction in serum urea and creatinine concentration, and improvement of other index of renal function. And The activity of antioxidant enzymes were partially recovered in kidney tissue of rats treated by CDDP and the administration of Ganopoly and Ganopoly/C+. These results indicate the cisplatin induced nephrotoxicity is due to an impairment of tubular reabsorption systems enhanced by necrosis of proximal tubule, and the Ganopoly and Ganopoly/C+ has a partial protective effect on nephrotoxicity induced by CDDP. The polysaccharide of *Ganoderma lucidum* may improve the therapeutic index of nephrotoxicity induced by CDDP. However, it is needed to elucidate the mechanism for confirming the therapeutic effect.

Key words : *Ganoderma lucidum*, Ganopoly(polysaccharide), CDDP, chemotherapy, nephrotoxicity

서 론

cisplatin(cis-diamine-dichloroplatinum)은 중금속 성분을 포함하는 약물로서 사용 범위가 광범위한 항암제이다^{1,2)}. 특히 고

환암, 식도암, 난소암, 방광암, 뇌종양, 위암, 폐암, 자궁경부암, 전립선암 등의 고형암에 많이 사용된다^{3,4)}. 그러나 위장관 장애로 인한 심한 오심과 구토 및 신장독성의 부작용이 발생하여 임상적 사용이 제한되고 있다⁵⁻⁷⁾. 이러한 신장독성의 유발기전은 충분히 밝혀져 있지는 않지만 주로 세뇨관의 괴사에 의한 것으로 알려졌다^{11,16)}. cisplatin의 낮은 농도에서도 신장독성이 나타나므로 미루어 세포자극에 따른 2 차적으로 세포 손상이 증폭되는

* 교신저자 : 전병훈, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의과대학
· E-mail : omdjbh@wonkwang.ac.kr Tel : 063-850-6843
· 접수 : 2003/01/13 · 수정 : 2003/02/20 · 채택 : 2003/03/20

것으로 보고되었다⁸⁻¹⁰). 특히 유리기 중에서 활성산소종(reactive oxygen species)이 관련되어 있다는 보고가 많이 있었다¹⁰⁻¹³). 즉 신장으로 배설되는 cisplatin이 주위 혈관으로부터 염증세포인 호중구를 유도하여 자극하고, 이 과정에서 분비되는 활성산소종이 신장의 근위세뇨관에 독성을 나타내는 것으로 보인다¹²⁻¹⁶). 최근에는 신장독성이 산소 유래의 유리기로 인하여 세뇨관과사가 유발되고 이로 인하여 신장독성이 나타난다는 보고가 있었으며, 항산화제의 투여로 cisplatin에 의한 신장독성이 억제된다는 보고도 있다¹⁰⁻¹⁶). 또한 활성산소의 scavenger 효소인 SOD, catalase 등에 의하여 cisplatin에 의한 신장세포독성이 억제되는 결과를 보였다^{13-16,19,20}). 따라서 cisplatin의 신장독성의 기전과 독성을 감소시키는 방법을 찾아내는 것은 효과적이며 안전한 cisplatin의 사용에 중요한 것이다. 이에 따라 cisplatin 투여 전에 생리식염수를 과량으로 투여하는 수액요법이나 mannitol과 같은 삼투성이뇨제의 병행투여 및 diethyldithiocarbamate(DDTC) 투여 등의 방법이 신장독성을 줄이는 것으로 알려져 있다^{17,18}). 그러나 이러한 방법은 cisplatin의 효과를 반감시키며 독성억제를 부분적으로 나타내고, 항암작용의 저하 등이 발생하는 문제점이 있다^{19,20}). 따라서 cisplatin의 주독성인 신장독성을 억제시키면서 항암 약리효과는 충분히 나타낼 수 있는 약물을 개발하는 것은 항암제 치료에서 중요한 것이다. 근래에 항암요법에 대한 부작용을 경감하고 항암효과를 나타낼 수 있는 약물 개발의 대상으로 한 약에 대한 관심이 높아지고 있다. 즉 동서의 결합적 치료법으로 화학적 항암요법과 방사선요법의 부작용을 감소시키면서 항암작용도 나타내는 약물 및 처방을 한의학적 지식을 근간으로 개발하려는 연구가 활발하게 진행되고 있다²¹⁻²⁸). 본 연구에서는 靈芝를 포함하는 복합제제를 이용하여 항암치료의 부작용을 억제하고 부분적으로는 항암효과를 나타내는 약물의 효과를 확인하고자 하였다. 영지는 한의학에서 味甘性溫하여 堅筋骨, 益精氣, 滋補強壯, 解毒收斂, 消積 등의 효과가 있으므로 虛勞, 해수, 불면, 소화불량 등의 만성적질환을 치료하는데 사용한다²⁹⁻³³). 약리작용 및 임상적 효능에 대한 보고로는 중추신경작용의 억제로 근육이완, 활동력 감소, 수면시간연장, 완만한 혈압강하 등의 약리작용을 보이며, 만성기관지염, 천식, 백혈구감소증, 관상동맥질환, 고지혈증 개선, 간기능활성화, 혈당강하 등의 작용과 최근에는 면역조절작용 및 항암효과등도 많이 보고되고 있다^{30,33-42,44,45}).

본 연구에 사용된 영지버섯 *Ganoderma lucidum*(Curt.:Fr.) P.Karst는 일명 만년버섯, 신이, 적지, 단지 등으로 불리우는 고등균류로 분류학상 균계(Mycota) 잔핵균아계(Eukaryomycota) 진균문(Eumycota) 담자균아문(Basidiomycotina) 동담자균아강(Hymeno-basidiomycetidae) 민주름목(Aphylohorales) 불로초과(Ganodermataceae) 불로초속(*Ganoderma* ITO) 불로초속(*Ganoderma* KARST. em MURR)에 속한다^{34,43}). 영지의 약리성분은 30 여종의 트리테르펜류의 저분자 물질과 단백질 결합하여 형성된 다당체인 고분자물질로 분류된다. 이 중에서 분리된 다당체는 고지혈증, 혈당강하, 간기능 활성, 면역조절작용, 항암효과 등의 효능을 보인다^{29,32,35-42,44,45}). 영지로부터 추출된 단백질 다당류는 neutral sugar, uronic acid 등이 주류를 이룬다⁴⁶). 다당체

를 구성하는 아미노산은 16 종으로서 글루탐산, 글리신, 아스파르트산, 알라닌등의 함량이 비교적 높다. 기타 성분으로 mannitol, α-mycoese, stearic acid, ergosterol 등이 있다⁴⁷⁻⁵⁰).

본 연구에서는 이러한 영지의 효능을 응용하여 항암치료로서 시행하는 화학요법의 부작용을 완화할 수 있는 영지 복합제제의 효과를 확인하고자 한다. 특히 암치료의 유용한 성분으로 생각되는 영지의 다당류 추출을 효율적으로 하기 위하여 저온법을 이용하여 추출하였고, 항암작용 등의 효능이 널리 알려져 있는 키토산을 가미하여 영지 복합제제를 제조하였다. 이것이 cisplatin으로 유도된 항암치료 부작용의 모델에서 cisplatin으로 인한 독성에 미치는 효과를 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 시약

실험동물은 180±10g의 수컷 Sprague-Dawley rat을 한국 신타코로부터 구입하여 본 동물사육실에 적응시킨 다음 실험에 사용하였다. 실험동물의 사육은 온도 23±1℃, 습도 40~60%, 환기는 1시간당 12~15회로 하였다. 1일 중 12시간은 200~300 Lux로 조명하고 12시간은 모든 빛을 차단하였다. 먹이는 삼양사의 사료로 매일 충분히 공급하였으며, 식수는 정제된 물로 제한 없이 공급하였다. Cisplatin은 Sigma에서 구입하였고, 영지추출물(Ganopoly)과 영지추출물복합제(Ganopoly/C+)는 Alpha Healthcare(NZ) Ltd.에서 제조한 것을 사용하였다.

2. 실험군

실험군은 정상대조군으로 실험기간 중 약물을 투여하지 않은 군(정상대조군), 5 mg/kg의 용량으로 cisplatin을 만을 1 회 복강투여한 군(실험대조군), 영지추출물(Ganopoly) 160 mg/kg/day를 구강으로 1 일 1 회 투여하고 cisplatin과 동량의 생리식염수를 1 회 복강투여한 군(약물대조군A), 영지추출물과 키토산을 7:3으로 배합한 Ganopoly/C+ 160 mg/kg/day를 구강으로 투여하고 cisplatin과 동량의 생리식염수를 복강투여한 군(약물대조군B), 그리고 영지추출물(Ganopoly) 160 mg/kg/day를 구강투여하고 5 mg/kg의 cisplatin을 복강으로 1 회 투여한 군(실험군A), Ganopoly/C+ 160 mg/kg/day를 구강으로 투여하고 5 mg/kg의 cisplatin을 복강으로 1 회 투여한 군(실험군B) 등으로 구별하였다. Ganopoly와 Ganopoly/C+ 및 생리식염수는 Cisplatin 복강투여 7일 전부터 투여하였으며, 실험기간 총 14일간 실시하였다. Cisplatin 투여 후 6 일에 metabolic cage에 분리하여 넣은 후 24 시간 채뇨하였으며, cisplatin 투여 후 7일에 ether 마취 하에서 심장천자하여 채혈하였다.

3. 영지다당체 저온 추출법

추출과정은 초기에 70℃의 물에서 수용성 영지다당체를 추출하고, 70℃ ethanol에서 비수용성 영지다당체를 추출한다(Fig. 1). 영지자실체를 조각내서 70℃ 물에 침전시킨 후 회전시키면서 3 시간 동안 추출하여 상청액을 이용하여 수용성 영지다당체를

수득하고, 그 잔사를 70°C의 80% ethanol에서 2 시간 동안 2 회 씩 추출한다. 상청액을 합하여 서서히 냉각시킨 후 침전물을 버 리고 상청액을 여과한다. 여액을 감압농축하고 동결시킨 다음 분쇄하여 제조한다. Ganopoly/C+는 70%의 영지추출물에 30%의 키토산을 혼합한다.

4. 체중측정 및 장기적출

체중은 매일 측정하였으며, 실험종료 후 12 시간 절식시킨 실험동물을 20% urethane으로 마취하고 심장천자로 채혈하였다. 장기의 적출은 해부한 다음 간, 신장을 적출하여 무게를 측정하였다.

5. 혈압 및 전해질 측정과 혈액의 생화학적 및 혈액학적 지표 측정

채혈한 혈액은 EDTA-2K가 처리된 진공 채혈관(Vacutainer Co, USA)을 사용하여 응고를 방지했고 혈액생화학적 검사를 위해서는 혈청분리관을 사용하였다. 혈액학적인 임상지표(WBC, =Platelet)의 측정은 혈액자동 분석기인 SE-9000(TOA Medical Co., LTD, Japan)를 사용하여 분석하였으며, 혈액생화학적 검사는 채혈후 40 분 이내에 3000 rpm으로 10 분 간 원심분리를 실시하여 분리된 혈청은 deep freezer(-70°C)에 보관하며 측정하였다. Albumin, Creatinine 등의 혈청 생화학적 지표는 생화학자동 분석기 Hitachi-747(Hitachi Medical Co., LTD, Japan)를 사용하여 분석하였다. 또한 Na, K, Ca과 Mg는 원자흡수분광계로, 삼투질 농도는 osmometer를 사용하여 각각 측정하였다. 각 용질의 fractional excretion(FE)은 각 용질의 청소율을 Crcl로 나누어 계산하였다. 혈압은 간접법으로 꼬리에서 생리현상측정기를 이용하여 실시하였다.

6. 조직의 균질액 제조

흰쥐로부터 적출한 7 g의 간(150 mM KCl이 포함된 30 mM Hepes buffer, pH7.4) 및 비장(50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4)은 각각의 buffer로 glass teflon homogenizer를 이용하여 균질화하였다. 이 균질액은 4°C에서 3,000 rpm으로 10 분 간 원심분리하였으며, 비장은 상등액 homogenate 분획을 실험에 사용하였고, 간은 상청액을 다시 4°C에서 38,000 rpm에서 60분간 원심분리하여 얻은 상청액 cytosol 분획을 실험에 사용하였으며, 자질과산화 및 효소 활성도 측정은 UV/VIS Spectrophotometer V560(Jasco, Japan)를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

7. 자질과산화 측정

자질과산화는 Buege 등⁵⁹⁾의 방법에 준하여 측정하였다. 즉, 균질액에 thiobarbituric acid(TBA) 용액을 첨가하여 30 초 동안 vortex mixer로 혼합시킨 후 100°C 물에서 15 분 간 중탕시켜 반응시킨 후 실온에서 냉각시킨 다음 3,000 rpm에서 10 분 동안 원심분리하여 그 상청액을 535 nm에서 흡광도를 측정하였다.

8. Glutathione S-Transferase 활성도 측정

GST 활성도의 측정은 Habig 등⁶⁰⁾의 방법에 의하여 측정하였다. 즉 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 6.5) 890 µl, 100

mM CDNB 10µl, 20 mM GSH 50 µl, 균질액 50 µl을 cuvette에 넣고 파장 340 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다.

9. Glutathione Reductase 활성도 측정

GR의 활성 측정은 Racker⁶¹⁾의 방법에 준하여 측정하였다. 즉 0.1 M Tris-HCl buffer(pH8.0) 2.5 µl, 26.978 mM EDTA 100 µl, 66.01 mM GSSG 200 µl, 9.184 mM NADPH 50 µl, 균질액 20 µl을 cuvette에 넣고 파장 340 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다.

10. Glutathione Peroxidase 활성도 측정

GPx의 활성 측정은 Flohe 등⁶²⁾의 방법에 의하여 측정하였다. 즉, 0.3 M sodiumphosphate buffer 500 µl, 25.5 mM sodium Azide 250 µl, 1 mM cumone hydroperoxide 160 µl, 294.37 mM Glutathione 30 µl, 8.4 mM NADPH 55 µl, Glutathione Reductase(2.5 mg/ml) 5 µl, 균질액 25 µl을 cuvette에 넣고 파장 340 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다.

10. Catalase의 활성도 측정

Catalase의 활성도는 Aebi⁶³⁾의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 130 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0) 250 µl, 3차 증류수 330 µl, 균질액 20 µl, 기질로 15 mM H₂O₂ 용액 900 µl를 취하여 cuvette에 넣고 파장 240 nm에서 흡광도의 변화를 측정했다.

11. 통계적 분석

실험성적은 평균±표준오차로 나타냈으며 실험군간의 차이에 대한 유의성 검정은 Student's t-test(unpaired comparison)와 분산분석(one way ANOVA)을 적용하였다.

Table 1. Experimental protocol for rats treatments to evaluate the effect of different doses of Ganopoly and Ganopoly/C+ on the hepatotoxicity and nephrotoxicity induced by cisplatin

Experimental Group	Treatment
Normal	oral feeding of 1 ml/day water for 14 days + i.p. injection of 1.0 ml saline solution
E-Control	oral feeding of 1 ml/day water for 14 days + i.p. injection of 1.0 ml cisplatin(5 mg/kg)
D-Control-A1	oral feeding of 1 ml Ganopoly(120 mg/day) for 14 days + i.p. injection of 1.0 ml saline solution
D-Control-A2	oral feeding of 1 ml Ganopoly(240 mg/day) for 14 days + i.p. injection of 1.0 ml saline solution
D-Control-B1	oral feeding of 1 ml Ganopoly/C+(120 mg/day) for 14 days + i.p. injection of 1.0 ml saline solution
D-Control-B2	oral feeding of 1 ml Ganopoly/C+(240 mg/day) for 14 days + i.p. injection of 1.0 ml saline solution
Ganopoly120	oral feeding of 1 ml Ganopoly(120 mg/day) for 14 days + i.p. injection of 1.0 ml cisplatin(5 mg/kg)
Ganopoly240	oral feeding of 1 ml Ganopoly(240 mg/day) for 14 days + i.p. injection of 1.0 ml cisplatin(5 mg/kg)
Ganopoly/C+ 120	oral feeding of 1 ml Ganopoly/C+(120 mg/day) for 14 days + i.p. injection of 1.0 ml cisplatin(5 mg/kg)
Ganopoly/C+ 240	oral feeding of 1 ml Ganopoly/C+(240 mg/day) for 14 days + i.p. injection of 1.0 ml cisplatin(5 mg/kg)

Cisplatin was administer intraperitoneally after pretreatment of saline, Ganopoly, and Ganopoly/C+ for 7 days. Ganopoly was extracted at 70°C for 3 hours from Ganoderma lucidum (Curt.Fr.) P. Karst by the method developed by Gao, et al. Ganopoly/C+ was composed of 70% Ganopoly and 30% chitosan.

실험결과

1. 체중 및 신장 중량 변화

정상군에서는 전 실험기간 동안 체중이 점차로 증가하는 경향을 보였다. 그러나 cisplatin을 투여한 실험대조군에서는 투여 1일 후부터 체중감소가 나타나기 시작하였으며 7일 후부터는 체중 감소가 회복되는 경향을 보였다. Ganopoly와 Ganopoly/C+를 투여한 약물대조군에서는 정상적인 체중증가에 영향을 미치지 않았으며, cisplatin을 투여하고 Ganopoly와 Ganopoly/C+를 투여한 실험군에서는 cisplatin 투여로 유발된 체중감소를 억제하는 경향을 나타냈다(Fig. 1). 또한 신장의 체중대비 중량변화는 cisplatin의 투여로 증가하는 결과를 보였으며, Ganopoly와 Ganopoly/C+의 투여로 증가가 억제되는 효과를 관찰하였다(Fig. 4).

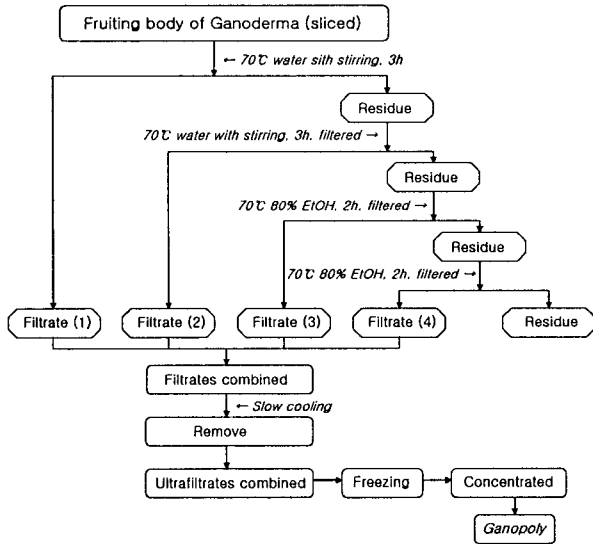


Fig. 1. The method of Ganopoly development; flowchart of *Ganoderma lucidum*(Curt.:Fr.) P. Karst extraction at low temperature developed by Gao, et al.

2. 혈압의 변화

cisplatin 투여 후 3 일과 7 일 사이에 정상군에 비하여 40% 이상 감소하는 결과를 보였으며, 계속하여 낮은 혈압상태를 유지하였다. 약물대조군에서는 별다른 변화를 보이지 않았다. cisplatin을 투여하고 Ganopoly와 Ganopoly/C+를 투여한 실험군에서는 실험대조군에 비하여 혈압의 감소가 20% 이상 억제되는 결과를 관찰할 수 있었다(Fig. 2).

3. 신장기능의 변화

1) 사구체 여과율

creatinine 청소율로 계산한 사구체 여과율은 cisplatin 투여군에서 정상군에 비하여 25% 이하로 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. Ganopoly와 Ganopoly/C+ 만을 투여한 약물대조군에서는 별다른 변화가 없었으며, cisplatin을 투여하고 Ganopoly와

Ganopoly/C+를 투여한 실험군에서는 정상군에 비하여 50% 정도로 회복되는 결과를 보여 Ganopoly와 Ganopoly/C+의 투여가 cisplatin 투여로 유발된 사구체 여과율의 감소를 억제시키는 것을 관찰할 수 있었다. 특히 Ganopoly/C+ 120 mg/kg/day를 투여한 실험군에서 사구체 여과율 감소가 가장 억제되는 결과를 나타냈다(Fig. 3).

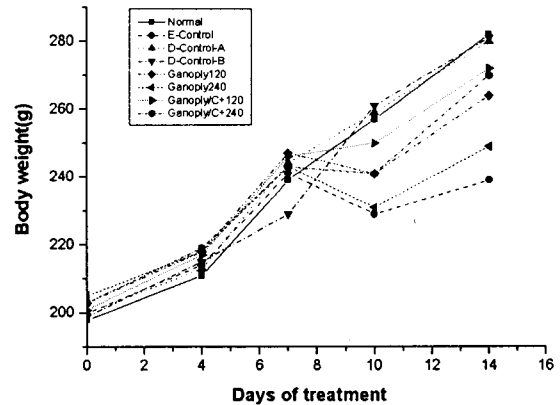


Fig. 2. Changes of body weight after treatment of CDDP, Ganopoly and Ganopoly/C+. All data represent mean±SE(n=6). Ganopoly and Ganopoly/C+ were orally administered for 14 consecutive days before and after CDDP(5 mg/kg i.p.) administration on 7th day. CDDP: cis-dichlorodiamineplatinum.

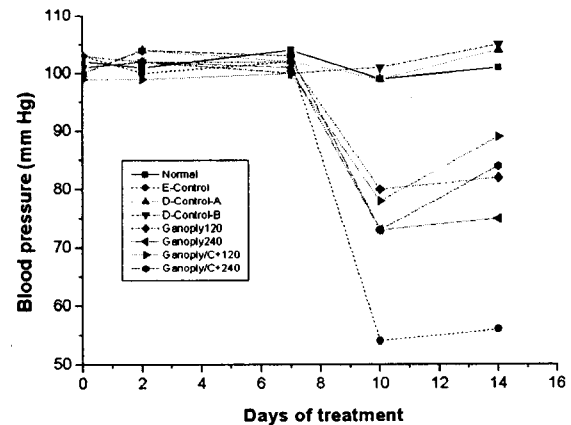


Fig. 3. Changes of blood pressure after treatment of CDDP, Ganopoly and Ganopoly/C+. All data represent mean±SE(n=6). Ganopoly and Ganopoly/C+ were orally administered for 14 consecutive days before and after CDDP(5 mg/kg i.p.) administration on 7th day.

2) 요량 및 요삼투질농도

요량은 cisplatin 투여 후 6 일에 24시간 뇨를 채뇨하여 측정하였다. cisplatin을 투여한 실험대조군에서 뇨량은 200% 이상 증가하였으며, 약물대조군에서는 감소의 큰 차이를 나타내지는 않았다. Cisplatin 투여와 Ganopoly와 Ganopoly/C+를 같이 투여한 실험군에서는 뇨량의 감소가 억제되는 결과를 보였으나 통계적으로 유의한 수준은 아니었다. 뇨의 삼투질 농도도 실험대조군

에서 72.6 mOsm/kg H₂O로 227.9 mOsm/kg H₂O인 정상군의 30% 수준으로 감소하는 결과를 보였다. Cisplatin을 투여하고 Ganopoly와 Ganopoly/C+를 투여한 실험군에서는 저하된 삼투질 농도의 저하가 약간 억제되는 결과를 나타냈다(Table 2).

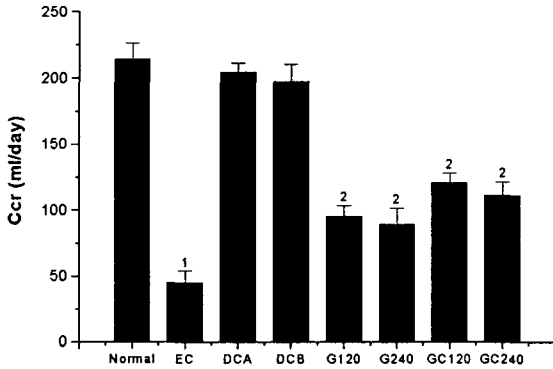


Fig. 4. Changes of creatinine clearance after treatment of CDDP, Ganopoly and Ganopoly/C+. All data represent mean±SE(n=6). Ganopoly and Ganopoly/C+ were orally administered for 14 consecutive days before and after CDDP (5 mg/kg i.p.) administration on 7th day. Urine was collected on final day.

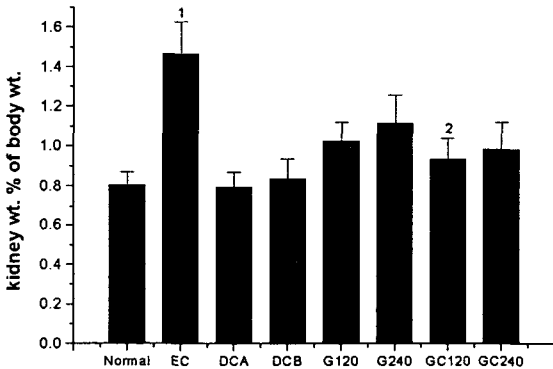


Fig. 5. Changes of relative kidney weight after treatment of CDDP, Ganopoly and Ganopoly/C+. All data represent mean±SE(n=6). Ganopoly and Ganopoly/C+ were orally administered for 14 consecutive days before and after CDDP (5 mg/kg i.p.) administration on 7th day. Urine was collected on final day.

3) 용질의 혈장농도, 요중 배설 및 fractional excretion
Na⁺과 K⁺의 요중 배설농도는 cisplatin 투여의 실험대조군에서 감소하는 50% 정도로 감소하는 결과를 나타냈으며, Ganopoly와 Ganopoly/C⁺의 투여는 영향을 미치지 않았으며, Ganopoly와 Ganopoly/C⁺의 투여로 실험대조군에서 Na⁺과 K⁺의 농도 감소를 약간 억제하는 결과를 보였다. Na⁺과 K⁺의 혈장 농도는 cisplatin을 투여한 실험대조군이나 Ganopoly와 Ganopoly/C⁺만을 투여한 약물대조군이나 cisplatin과 Ganopoly와 Ganopoly/C⁺를 투여한 실험군 모두에서 큰 차이를 관찰할 수 없었다. FE Na⁺와 FE K⁺의 농도는 실험대조군에서 증가하였

고, Ganopoly와 Ganopoly/C⁺의 투여로 FE Na⁺와 FE K⁺의 농도 증가가 억제되는 결과를 나타냈다. Cisplatin으로 인한 신독성의 가장 특징적인 소견 중의 하나인 Mg²⁺ 배설의 증가가 관찰되었으며, 혈중의 Mg²⁺ 농도가 감소하는 결과를 보였다. FE Mg²⁺도 증가하였으며, Ganopoly와 Ganopoly/C⁺의 투여로 증가가 억제되는 경향을 보였다(Table 2, 3, 4).

Table 2. Changes of urine volume and solute excretion after treatment of CDDP and Ganopoly

Parameters Experimental Group	Uvol (ml/day)	Uosm (mOsm/kg H ₂ O)	UNav (mg/day)	UKv (mg/day)	UMgv (mg/day)
Normal	7.4±1.2	227.9±12.6	32.8±2.7	113.6±15.9	127.5±15.1
E-Control	16.8±2.5 ²	72.6±5.8 ²	16.9±2.1	56.4±6.9 ²	256.8±21.7 ²
D-Control-A	6.6±1.1	210.7±13.9	29.5±2.8	117.5±17.2	251.5±22.6
D-Control-B	7.1±1.5	231.5±14.9	31.5±2.4	112.8±15.6	278.6±19.2
Ganopoly120	11.5±2.1	88.1±7.9 ²	22.5±3.1	67.5±8.8 ²	154.8±14.7
Ganopoly240	12.1±1.9	89.6±8.7 ²	24.3±2.9	66.3±8.9 ²	164.8±15.9
Ganopoly/C+ 120	10.6±1.5 ¹	121.5±11.5 ²	25.7±2.1 ¹	73.9±6.8 ²	183.9±16.4
Ganopoly/C+ 240	11.9±1.7	115.8±16.9	23.8±2.6	77.4±7.3	179.2±15.8

All data represent mean±SE(n=6). Ganopoly and Ganopoly/C+ were orally administered for 14 consecutive days before and after CDDP administration on 7th day. Urine samples were obtained on 6 days after the administration of CDDP(5 mg/kg i.p.). CDDP: cis-dichlorodiamineplatinum. 1 significant difference from e-control group, 2 significant difference from normal group, p<0.05

Table 3. Changes of plasma solute concentration after treatment of CDDP and Ganopoly

Parameters Experimental Group	Pcr (mg/dl)	Posm (mOsm/kg H ₂ O)	PNa (mEq/l)	Pk (mEq/l)	PMg (mEq/l)
Normal	0.4±0.1	251.5±12.5	128.9±6.4	4.4±0.3	2.1±0.4
E-Control	4.1±0.8 ²	354.8±28.6	121.7±5.3	4.0±0.4	1.5±0.3
D-Control-A	0.5±0.1	264.7±16.6	126.8±6.9	4.5±0.5	2.2±0.4
D-Control-B	0.5±0.1	247.9±15.3	131.5±7.1	4.4±0.2	2.0±0.5
Ganopoly120	2.1±1.0	312.7±11.7	125.7±6.5	4.5±0.3	1.8±0.6
Ganopoly240	2.6±1.1	315.8±13.2	129.5±3.8	4.6±0.2	2.0±0.4
Ganopoly/C+ 120	1.7±0.5 ¹	278.5±12.8	124.7±7.9	4.3±0.7	1.9±0.5
Ganopoly/C+ 240	1.8±0.7 ¹	298.5±16.4	121.6±8.3	4.6±0.5	2.2±0.2

All data represent mean±SE(n=6). Ganopoly and Ganopoly/C+ were orally administered for 14 consecutive days before and after CDDP administration on 7th day. Blood samples were obtained on 7 days after the administration of CDDP(5 mg/kg i.p.). 1 significant difference from e-control group, 2 significant difference from normal group, p<0.05

Table 4. Changes of fractional excretion of urine substances after treatment of CDDP and Ganopoly

Parameters Experimental Group	FE Na(%)	FE K(%)	FE Mg(%)	FE Osm(%)	FE H ₂ O(%)
Normal	0.5±0.1	6.7±2.1	0.8±0.2	7.9±1.8	0.7±0.2
E-Control	11.7±2.3 ²	45.1±8.5 ²	7.7±2.1 ¹	67.3±16.1 ¹	29.5±7.2 ²
D-Control-A	0.6±0.1	6.8±1.4	0.8±0.3	7.5±1.6	0.6±0.1
D-Control-B	0.5±0.2	6.3±2.0	0.7±0.2	7.7±1.5	0.7±0.3
Ganopoly120	9.5±1.2 ²	34.2±8.5 ²	5.6±1.4 ²	43.6±11.8 ²	21.6±7.3 ²
Ganopoly240	9.0±1.1 ¹	37.5±6.4 ²	6.1±2.7 ²	45.7±15.1 ¹	21.6±7.3 ²
Ganopoly/C+ 120	10.2±1.4 ²	22.7±3.9 ^{1,2}	5.1±1.5 ²	34.5±12.6 ²	18.4±2.1 ¹
Ganopoly/C+ 240	10.1±1.2 ²	26.4±7.3 ^{1,2}	5.5±1.3 ²	41.5±13.5 ²	20.3±6.1 ¹

All data represent mean±SE(n=6). Ganopoly and Ganopoly/C+ were orally administered for 14 consecutive days before and after CDDP administration on 7th day. Urine samples were obtained on 6 days after the administration of CDDP(5 mg/kg i.p.). FE: fractional excretion. 1 significant difference from e-control group, 2 significant difference from normal group, p<0.05

4. 혈장과 요의 생화학적 변화

Cisplatin의 투여군에서는 비정상적인 신기능 손상을 유발하

는 것을 관찰할 수 있었다. 혈장의 urea와 creatinine은 실험대조군에서 정상군에 비하여 3 배 이상 증가하는 결과를 보였으며, 혈장의 albumin 농도는 40% 이상 감소하는 결과를 보였다. 약물대조군으로 Ganopoly와 Ganopoly/C* 만을 투여한 군에서는 정상군과 별다른 차이를 보이지 않았고, Ganopoly와 Ganopoly/C*를 처치한 실험군에서는 혈장 albumin 농도의 감소를 억제하는 효과를 보였으며, 증가된 혈장 creatinine과 urea의 농도를 억제하는 효과를 나타냈다(Table 5). Cisplatin 투여 후 요량은 증가하였으며, albumin과 요중의 GST의 농도도 증가하였다. 특히 요중의 GST의 농도는 정상군일 때 나타나지 않는데 비하여 실험대조군에서는 95.6(U/I)로 측정되었다. 약물대조군에서는 정상군과 차이가 없었으며, Ganopoly와 Ganopoly/C*를 처치한 실험군에서는 정상군에 비하여 6 배 이상 증가한 albumin 농도를 60% 이상 억제시키는 효과를 보였다. 또한 creatinine과 urea의 농도 감소를 억제시켜 정상군과 비슷한 수준으로 회복시키는 결과를 보였다(Table 2, 6).

Table 5. Effect of Ganopoly and Ganopoly/C+ on CDDP-induced changes in rat serum albumin, creatinine and urea

Parameters Experimental Group	Albumin(g/l)	Creatinine (mmol/dl)	Urea (mmol/l)
Normal	45.2±4.6	0.8±0.1	6.9±0.4
E-Control	24.5±3.9 ²	2.5±0.4 ²	19.4±3.6 ²
D-Control-A	44.6±4.1	0.8±0.1	6.5±0.6
D-Control-B	43.8±6.5	0.7±0.2	6.8±0.9
Ganopoly120	34.2±3.8	1.5±0.4	14.6±2.9
Ganopoly240	33.7±4.4 ¹	1.6±0.3	15.3±3.6
Ganopoly/C + 120	40.6±5.2	1.3±0.3 ¹	11.8±2.1
Ganopoly/C + 240	36.4±4.4	1.5±0.2 ¹	12.7±3.3

All data represent mean±SE(n=6). Ganopoly and Ganopoly/C+ were orally administered for 14 consecutive days before and after CDDP administration on 7th day. Blood samples were obtained on 7 days after the administration of CDDP(5 mg/kg i.p.). 1 significant difference from e-control group, 2 significant difference from normal group, p<0.05

Table 6. Effect of Ganopoly and Ganopoly/C+ on CDDP-induced changes in rat urine volume, abuminuria and urinary excretion of creatinine, urea and GST activity

Parameters Experimental Group	Albumin (µg/day)	Creatinine (mmol/l)	Urea(mol/l)	GST(U/l)
Normal	100.5±12.5	10.4±1.5	1.4±0.2	n.d.
E-Control	645.1±113.1 ²	4.3±0.4 ²	0.3±0.1 ²	95.6±12.7
D-Control-A	98.3±10.2	9.8±1.3	1.3±0.1	n.d.
D-Control-B	103.1±14.1	11.1±1.0	1.5±0.2	n.d.
Ganopoly120	214.6±56.2 ^{1,2}	6.7±1.0	0.8±0.2	76.4±8.5
Ganopoly240	233.8±38.6 ^{1,2}	6.5±1.4	0.7±0.1	77.1±12.4
Ganopoly/C + 120	187.1±23.1 ^{1,2}	8.4±1.2	1.0±0.3 ¹	42.1±6.91
Ganopoly/C + 240	202.4±31.9 ^{1,2}	7.1±1.6	1.1±0.2 ¹	45.7±8.21

All data represent mean±SE(n=6). Ganopoly and Ganopoly/C+ were orally administered for 14 consecutive days before and after CDDP administration on 7th day. Blood samples were obtained on 7 days after the administration of CDDP(5 mg/kg i.p.). 1 significant difference from e-control group, 2 significant difference from normal group, p<0.05

5. 신장조직의 지질과산화 및 효소활성의 변화

Cisplatin의 투여로 체중대비 신장조직의 중량은 증가하였고 이것은 지질과산화등의 신장조직 손상으로 유발되었을 것으로 생각된다. 신장조직의 지질과산화는 정상군에 비하여 cisplatin을

투여한 실험대조군에서 2.5 배 이상 증가하는 결과를 보였으며, Ganopoly와 Ganopoly/C*를 처치한 실험군에서 지질과산화의 정도가 실험대조군에 비하여 50%로 억제되는 결과를 보였다. 특히 Ganopoly/C* 120 mg/kg/day를 투여한 실험군에서 가장 유의성있는 결과를 보였다. 특히 항산화효과를 나타내는 효소인 GSH의 신장조직내 농도는 cisplatin의 투여로 33% 정도 감소하는 결과를 보였다. Ganopoly와 Ganopoly/C*를 투여한 실험군에서 GSH의 감소를 개선하는 효과가 나타났으며, 다른 항산화 관련 효소인 GST, GSH-Px, catalase 등의 효소 등도 cisplatin 투여로 활성이 억제되었으며, Ganopoly와 Ganopoly/C*의 투여로 이러한 활성감소가 억제되는 경향을 나타냈다(Table 7).

Table 7. Effect of Ganopoly and Ganopoly/C+ on CDDP-induced changes on the lipid peroxides(MDA), GSH level, GST, GSH-Px, catalase of rat kidney homogenate

Parameters Experimental Group	MDA (mmol/g)	GSH (µmol/g)	GST (µmol/min per g)	GSH-Px (µmol/min per g)	Catalase (mmol/min per g)
Normal	213.4±15.8	5.4±0.7	6.7±0.6	178.9±21.8	51.7±6.9
E-Control	586.4±49.2 ²	3.6±0.4 ²	4.1±0.5 ²	131.6±16.5	30.4±4.1 ²
D-Control-A	227.8±13.5	5.3±0.5	6.3±0.8	174.6±15.2	52.1±6.3
D-Control-B	231.8±16.9	5.2±0.6	6.9±0.5	177.3±18.3	54.2±5.3
Ganopoly120	321.6±17.3 ^{1,2}	4.1±0.8	5.3±0.6	153.5±22.1	37.8±4.3
Ganopoly240	345.7±35.1 ^{1,2}	4.6±0.6	5.6±0.8	151.4±20.1	38.2±5.3
Ganopoly/C + 120	297.8±32.7 ^{1,2}	4.6±0.5	5.5±0.5	162.8±15.1	44.7±5.2
Ganopoly/C + 240	311.5±29.2 ^{1,2}	4.7±0.4	5.4±0.3	160.1±14.7	40.6±6.6

All data represent mean±SE(n=6). Ganopoly and Ganopoly/C+ were orally administered for 14 consecutive days before and after CDDP administration on 7th day. Blood samples were obtained on 7 days after the administration of CDDP(5 mg/kg i.p.). MDA: malon dialdehyde, GSH: glutathione, GST: glutathione S-transferase, GSH-Px: glutathione peroxidase. 1 significant difference from e-control group, 2 significant difference from normal group, p<0.05

고찰 및 결론

Cisplatin은 백금함유 배위 화합물로서 세포내에서 DNA 합성을 억제하여 항암효과를 나타내는 약물로서 고환암, 자궁암, 난소암, 방광암, 전립선암 등의 악성종양 치료제로서 널리 사용되고 있다. 그러나 신장독성을 비롯한 여러 가지 부작용으로 그 치료가 제한되고 있다. Cisplatin의 신장독성은 주로 용량증가에 따른 세뇨관의 괴사로 나타나는 것으로 알려져 있으며, 신피질, 원위세뇨관, 집합관 등에도 독성을 나타내지만 근위세뇨관에 가장 심한 영향을 준다고 보고되었다. Cisplatin은 신장으로 배설되는데 혈장에서는 90%가 단백질과 결합하며 유리 cisplatin은 분자량이 적고 극성을 띠지 않아 사구체에서 자유롭게 여과된다. 신세포 안으로 cisplatin이 들어가는 과정은 확실치 않으나, 근위세뇨관의 P3 segment에 가장 많이 축적되므로 신독성을 나타내는 중요 부위라고 하였다. 세포 안으로 들어간 cisplatin은 생전환을 하는데 즉 cis 위치에 있는 chloride(Cl)가 정상적인 세포내액에는 Cl의 농도가 낮으므로 H₂O로 대신 치환되고 이것이 OH기로 바뀌어 cis위치에 존재하여 세포 독성을 나타낸다. 이 물질이 신세뇨관에 축적되면 세포의 손상을 가져와 신세뇨관 기능이 이상을 초래하여 다뇨, 요 농축능의 저하, Mg²⁺을 비롯한 여러 전해질의 비정상적인 배설이 나타나며 혈관 저항 증가에 따른 신혈류의 감소와 더불어 사구체 여과율의 감소를 초래한다.

를 유도하여 자극하고, 이 과정에서 분비되는 활성산소종이 신장의 근위세뇨관에 독성을 나타내는 것으로 보인다¹²⁻¹⁶. 신장독성이 산소 유래의 유리기로 인하여 세뇨관괴사가 유발되고 이로 인하여 신장독성이 나타난다는 보고가 있었으며, 항산화제의 투여로 cisplatin에 의한 신장독성이 억제된다는 보고도 있다¹⁰⁻¹⁶. 또한 활성산소의 scavenger 효소인 SOD, catalase 등에 의하여 cisplatin에 의한 신장세포독성이 억제되는 결과를 보였다^{13-16, 19, 20}. 또한 증금속은 신세포의 GSH농도를 감소시키고, 효소기능에 필요한 protein bound sulfhydryl(SH) group과 결합하여 세포내 SH를 감소하여 신독성을 유발한다는 보고가 있다.

GSH는 SH group 단백질을 보하는 작용을 하며, peroxide와 자유기를 불활성화시키며, 이물질의 해독 및 아미노산이 세포막을 투과하는데 작용하는 기능을 나타낸다. 간세포의 산화적 손상은 자유기들이 환원형의 GSH의 농도를 감소시키고 protein bound thiol의 농도를 감소시켜 protein bound thiol과 저분자 thiol의 평형을 깨뜨려 세포독성을 유발한다. Cisplatin을 투여하면 신조직내에서 GSH의 농도가 감소하고 protein bound thiol의 농도도 신장 세포손상을 유발하는데 이것은 자유기와 관련이 있는 것으로 보인다. 신장조직내의 산화성 반응이 증가하면 자유기가 증가하게 되는데 이것은 사구체 질환에 영향을 주게된다. 이 산화물들은 catalase, SOD, glutathione peroxidase 같은 항산화효소에 의해 제거된다. 자유기의 무독화 장치로서 GST는 친전자성 물질을 무독화시키는 과정을 촉매하는 효소로서 친전자성 물질(Rx) 등에 GSH를 포함시켜 glutathione의 thioester 형성 반응을 촉매하는 효소이다. Glutathione peroxidase(GSH-Px) 과산화물과 GSH로부터 GSSG와 acohol과 물을 형성하는 반응을 촉매하는 효소로서 조직의 산화적 손상을 방지하는 역할을 한다. Catalase는 여러 장기에 존재하지만 신장과 간에서 활성도가 높다. 본 실험에서 cisplatin을 투여한 후 신장의 장기 무게가 증가하였고 지질과산화물인 MDA의 신장조직내의 함량이 높아졌으며, 항산화능 효소로 작용하는 GSH, GST, GSH-Px와 catalase 등의 효소가 활성이 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 효소 활성의 감소는 세포막내의 지질과산화로 유발되는 것으로보이며, 신장세포의 사멸과 관련이 있는 것으로 여겨진다. Cisplatin의 투여로 증가한 신장조직의 지질과산화의 증가와 이로 인한 항산화계효소 활성의 감소는 Ganopoly의 투여로 활성감소가 억제되는 효과를 보였다. 이러한 결과는 cisplatin 투여로 인한 신장세포 독성이 증금속 유리기로 인한 신세포의 손상과 이로 인한 항산화계효소의 활성감소를 영지추출 다당체가 억제할 수 있다는 결과를 보여주는 것이지만 이에 대한 관련 기전의 연구와 임상적 연구 등이 선행되어야만 영지추출 다당체인 Ganopoly 제제가 신독성을 유발하는 항암치료의 보조제로서 활용할 근거를 제시할 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구의 일부는 2001년 원광대학교 교내연구비 지원에 의하여 수행되었습니다.

참고문헌

1. Von Hoff D, Schilsky R, Reichert CM, et al: Toxic effects of cis-dichlorodiammineplatinum(II) in man. *Cancer Treat Rep* 63:1527, 1979.
2. 정태준, 심승철, 강경원, 최일영: Cisplatin 병합 화학요법에 의한 오심 및 구토에서 ondansetron과 metoclopramide의 효과에 대한 비교 연구. *대한암학회지*, 23:418, 1991.
3. Jenis K: Importance of nausea. *Cancer Nurs* 17:488, 1994.
4. Borch RF. The platinum antitumor drugs. In : Powis G, Prough RA, eds. *Metabolism & Action of Anticancer Drugs*. London : Taylor & Francis. 163-193, 1987.
5. Madias NE, Harrington JT. Platinum nephrotoxicity. *Am.J.Physiol.* 65:307-14, 1978.
6. Garnick MB, Mayer RJ, Abelson HT. Acute renal failure associated with cancer treatment. In: Brenner BM, Lazarus JM, eds. *Acute Renal Failure*. New York : Churchill Livingstone. 621-657, 1988.
7. Kim YK, Byun HS, Kim YH, Woo JS, Lee SH. Effect of cisplatin on renal function in rabbits: Mechanism of reduced glucose reabsorption. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 130:19-26, 1995.
8. Sugihara K, Nakano S, Koda M, Tanaka K, Fukuishi N, Gemba M. Stimulatory effect of cisplatin on production of lipid peroxidation in renal tissues. *Japan J. Pharmacol.* 43:247-52, 1987.
9. Hannemann J, Duse J, Baumann K. Iron - and ascorbic acid-induced lipid peroxidation in renal microsomes isolated from rats treated with platinum compounds. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 28:427-33, 1991.
10. Hannemann J, Duse J, Baumann K. Cisplatin-induced lipid peroxidation and decrease of gluconeogenesis in rat kidney cortex : different effects of antioxidants and radical scavengers. *Toxicology.* 51:119-32, 1988.
11. Brady HR, Zeidel ML, Kone BC, Giebisch G, Gullans SR. Differential actions of cisplatin on renal proximal tubule and inner medullary collecting duct cells. *J. Pharmacol. Exp. The.* 265:1421-8, 1993.
12. Zhang JG, Lindup WE. Role of mitochondria in cisplatin-induced oxidative damage exhibited by rat renal cortical slices. *Biochem. Pharmacol.* 45:2215-22, 1993.
13. Anderson ME, Naganuma A, Meister A. Protection against cisplatin toxicity by administration of glutathione ester. *FASEB J.* 4:3251-5, 1990.
14. Baldew GS, van den Hamer CJA, Los G, Vermeulen NPE, de Goeij JJM, McVie JG. Selenium-induced protection against cis-diamminedichloroplatinum (II) nephrotoxicity in mice and rats. *Cancer Res.* 49:3202-3, 1989.

15. Zunino F, Pratesi G, Micheloni A, Cavalletti E, Sala F, Tofanetti O. Protective effect of reduced flutathione against cisplatin-induced renal and systemic toxicity and its influence on the therapeutic activity of the antitumor drug. *Che. Biol. Interactions*. 70:89-101, 1989.
16. Gottlieb. J. A. and Drewinko. B. Reviw of the current clinical status of platinum coordination complses in cancer chemotherapy. *Cancer Chemother. Rep*. 59:621-628, 1975.
17. Litters CL. Alteration in toxicity of platinum. *Toxicol Appl Pharmacol* 61:291, 1973.
18. Thomas. J.M. and Richard. F. B. Quiescent LLC-PKI cells as a model for cisdiaminodichloroplatinum(II) nephrototoxicity and modulation by thiol rescue agents. *Cancer Research* 63:6017, 1988.
19. Boogaard PJ, Slikkerveer A, Nagelkerke JF et al., The role of metallothionein in the reduction of cisplatin-induced nephrotoxicity by Bi3+-pretreatment in the rat in vivo and in vitro. Are antioxidant properties of metallothionein more relevant than platinum binding? *Biochem Pharmacol* 41:369, 1991.
20. Sausen PJ, Elfarra AA, Cooley AJ : Methimazole protection of rts against chemically induced kidney damage in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 260:393, 1992.
21. 안창범, 권혜연, 윤현민, 장경진, 송춘호, 黃芩藥鍼液이 Cisplatin에 의해 유발된 急性腎不全에 미치는 영향, 대한침구학회지 19(3) 156-167, 2002.
22. 이경태, 노영수, 안규석, 장성구, 정지창, 생약제제인 이공산의 Cisplatin 유도 신장독성 보호효과, 생약학회지 29(3) 258-264, 1988.
23. 김동희, 抗癌劑 및 放射線 副作用에 대한 韓方療法, 동의병리학회지, (9)239-64, 1994.
24. 김한섭, 癌의 治療法에 관한 文獻的 考察, 대한한의학회지, 10:161-6, 1989.
25. 배성식, 癌과 豫防, 대한한의학회지, 7(2):58-60, 1986.
26. 김근택, 전병훈 加味夏枯草散이 항암제의 항종양효과와 종양 세포에 미치는 효과, 대한한방내과학회지, 18(1): 175-190. 1997.
27. 송호철 · 길재호 · 김성훈 加味蔘苓白朮散 용매분획의 抗轉移 및 抗癌活性에 대한 연구, 대한동의생리병리학회지, 15(6): 927-935, 2001.
28. 이효정 · 이효정 · 박정민 · 송규용 · 강경선 · 김성훈 캄보디아 상황버섯의 항암 및 면역조절작용에 대한 연구, 대한동의생리병리학회지 16(2): 332-337, 2002.
29. 李尙仁 外 : 漢藥臨床應用, 서울, 成輔社, pp.370, 589-590, 1981.
30. 江蘇中醫學院 : 中藥大辭典, 上海, 上海科學技術出版社, pp.29-30, 1180-1182, 2232-2235, 1988.
31. 常敏毅 : 抗癌本草, 長沙, 湖南科學技術出版社, pp.153-154, 1987.
32. 王浴生 : 中藥藥理與應用, 北京, 人民衛生出版社, pp.551-560, 1983.
33. 안덕균, 한국본초도감, 서울, 교학사. pp. 676, 2002.
34. 안덕균 : 한국산 약용균류. 한국균학회지, 20, 154, 1992.
35. Murasugi, A., Tanaka, S., Komiyama, N., Iwata, N.,Kino, K., Tsunoo, H. and Sakuma, S.: Molecular cloning of a cDNA and a gene encoding an immunomodulatory protein, Ling Zhi-8, from a fungus, *Ganoderma lucidum*. *J. Biol. Chem.*, 266, 2486, 1991.
36. Lee, S.Y. and Rhee, H.M. ; Cardiovascular effects of mycelium extract of *Ganoderma lucidum* ; Inhibition of sympathetic outflow as a mechanism of its hypotensive action outflow as a mechanism of its hypotensive action. *Chem. Pharm. Bull.*, 38, 1359, 1990.
37. Adachi, Y., Ohno, N., Ohsawa, M., Oikawa, S. and Yadomae, T.: Macrophage activation in vitro by chemically cross-linked(1→3)-β-D-glucan. *Chem. Pharm. Bull.*, 38, 988, 1990.
38. 신혜원, 김하원, 최철웅, 도상화, 김병각: 한국산 영지버섯의 무기성분 및 면역증강작용에 관한 연구. 한국생약학회지, 16,181, 1985.
39. 현진원, 최응철, 김병각: 한국산 고등균류의 성분 연구(제67보) : 영지버섯 자실체의 항암성분. 한국균학회지, 18,58, 1990.
40. Miyazaki, T. and Nishijma, M. : Studies on fungal polysaccharides, XXVII : Structural examination of a water-soluble, antitumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum*. *Chem. Pharm. Bull.*, 29,3611, 1981.
41. Maruyama, H., Yamazakim, K., Murofushi, S., Konda, C. and Ikekawa, T.: Antitumer activity of *Sarcodon aspratus*(BERK.)S. Ito and *Ganoderma lucidum*(FR.) KARST.J. *Pharmacobio-Dyn.*12,118, 1989.
42. Usui, T., Iwasaki, Y., Hayashi, K., Mizuno, T, Tanaka, M., Shinkai, K. and Arakawa, M. : Antitumor activity of water-soluble β-D-glucan elaborated by *Ganoderma applanatum*. *Agric. Biol. Chem.*, 45,323, 1981.
43. 한국균학회 : 한국말 버섯이름 통일안. 한국균학회지, 6,43, 1978.
44. Shiao MS, Lee KR, Lin LJ and Wang CT, Natural products and biological activities of the Chinese medical fungus, *Ganoderma lucidum*, in Food phytochemicals for cancer prevention, II : Teas, spice, and gerbs(Ho CT, Osawa T, Huang MT and 깐두 RT eds) pp.342-354, American Chemical Society, Washington DC. 1994.
45. Wasser SP and Weis AL, Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms : Amodern perspective. *Crit Rev Immunol* 19:65-96, 1999.
46. 김성환, 김을상, 김영식, 영지버섯에서 분리한 항암성 다당체에 관한 연구, 한국영양식량학회지, 24(1):147-153, 1995.
47. Cheong J, Jung W and Park W, Characterization of an alkali-extracted peptidoglycan from Korean *Ganoderma lucidum*. *Arch Pharm Res* 22:515-519, 1999.

48. Gao YH, The miracle herb, scientific reports of Ganoderma. Yuanqizai Publisher, Taipei(in Chinese).
49. Miyazaki T and Nishijima M, Studies on fungal polysaccharides. XXXII. Structural examination of an alkali-soluble, water-soluble heteroglycan of the fungus *Ganoderma lucidum*. Carbohydr Res 109: 290-294, 1982.
50. Mizuno T and Hazama TSDNKH-y, Studies on the host-mediated antitumor polysaccharides. X. Fractionation, formolysis and antitumor activity of fibrous polysaccharides (noncellulose) from Reishi, the fruiting body of *Ganoderma lucidum*. Shizuoka Daigaku Nogakuba Kenkyu Hokoku 36: 77-83, 1986.
51. Sone Y, Okuda R, Wada N, Kishida E and Misaki A, Structural and anti-tumor activities of polysaccharides isolated from fruiting body and the growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum*. Agric Biol Chem 49: 2641-2653, 1985.
52. Su CH, Sun CS, Juan SW, Hu CH, Ke WT and Sheu MT, Fungal mycelia as the source of chitin and polysaccharides and their applications as skin substitutes. Biomaterials 18: 1169-1174, 1997.
53. Kubota, T., Aska, Y., Miura, I. and Mori, H., Structures of ganoderic acid A and B, two new lanostane type bitter triterpenes from *Ganoderma lucidum*(Fr.)KARST. Helvetica Chemica Acta, 62,611, 1982.
54. 久保道德 : 靈芝, 명보출판사, 서울, p.51, 1986.
55. 김명자, 김하원, 이영순, 심미자, 최응철, 김병각 : 영지의 안전성에 관한 연구, 한국균학회지, 14, 49, 1986.
56. 강창률, 심미자, 최응철, 이영남, 김병각: 한국산 담자균류의 항암성분에 관한 연구 만년버섯의 균사배양 및 항암성분. 한국생화학회지, 14, 101, 1981.
57. 이준우, 정 훈, 정천희, 이권행: 영지균사체의 알카리 추출물이 보체계와 망내계에 미치는 영향. 한국균학회지, 18,137, 1990.
58. 이권행 : *Ganoderma lucidum* IY 009에서 분리된 항암성 다당류의 약리, 독성 및 구조에 관한 연구. 연세대학교 박사학위논문, 1992.
59. Buege J.A., and Aust S.D.: Microsomal lipid peroxidation. Methods Enzymol. 52, 302-310, 1978.
60. Habig W.H., Pabst M.J. and Jaloby, W.B., Glutathione S-Transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J. Biol. Chem. 249, 7130-7139, 1974.
61. Racker E.: Glutathione reductase from baker's yeast and beef liver. J. Biol. Chem., 217: 855-865, 1955.
62. Flohe L. and Gunzler W.A.: Assay of glutathione peroxidase. Methods Enzymol. 105, 114-121, 1984.
63. Aebi H.: Catalase. In methods of enzymatic analysis. Bergmeyer, H., Bergmeyer, J., Gal, M.(eds), 3rd. ed. Verlag Chemie. 3, 273-286, 1983.