

영지 균사체 분획이 일차배양 간세포 기능회복에 미치는 영향

박혜선¹ · 현진원² · 김하원* · 심미자 · 김병각¹
서울시립대학교 생명과학과, ¹서울대학교 약학대학 종합약학연구소,
²서울대학교 의과대학 약리학교실

Effect of *Ganoderma lucidum* Mycelial Fractions on the Functional Recovery of Primary Cultured Hepatocytes. Park, Hae Sun¹, Jin Won Hyun², Ha Won Kim*, Mi Ja Shim and Byong Kak Kim¹. Department of Life Science, University of Seoul, Seoul 130-743, ¹College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, ²Department of Pharmacology, College of Medicine, Seoul National University, Seoul 110-799, Korea - The cultured mycelia of *Ganoderma lucidum* were extracted and the extract was separated into six fractions by organic solvent fractionation. The antihepatotoxic activity of all the fractions was evaluated by measuring activities of glutamic pyruvic transaminase (GPT) and glutamic oxaloacetic transaminase (GOT). Among the fractions tested, the high-polarity fractions such as aqueous and n-butanol fractions significantly reduced activities of GPT and GOT in CCl₄- and galactosamine-intoxicated rat primary hepatocytes. When intracellular synthetic activities were measured by pulsing the rat primary cultured hepatocytes with [³H]-thymidine, [³H]-uridine and [³H]-leucine, the high-polarity fractions such as aqueous, high-molecular weight and n-butanol fractions increased synthetic activities of DNA, RNA and protein. When direct toxicities of the fractions were measured against human hepatoma (SK-Hep-1), the non-polarity fractions such as n-butanol and ethyl acetate fractions showed potent direct cytotoxicities even at the concentration of 1 µg/ml. These data showed that *Ganoderma lucidum* has hepatoprotective and hepatotoxic recovery principles in its mycelia.

Key words: *Ganoderma lucidum*, hepatocyte, hepatoprotective effect

아시아의 여러 나라에서 전통의약으로 쓰이던 영지버섯은 오늘날 가장 많이 연구된 담자균류 중의 하나이다. 자실체와 포자, 그리고 균사체로부터 100여 가지 이상의 성분들이 분리되었으며 그들의 화학구조도 밝혀져 있다. 그러나 영지버섯 추출물 혹은 전체 분말의 약효에 대해서는 많이 연구되었으나[1] 단일 성분의 약리작용에 대해서는 아직 많이 밝혀지지 못했다. 최근에 약리 작용을 나타내는 중요한 단일 성분들에 대해 연구가 활발히 진행되고 있으며 이러한 성분들은 주로 triterpene계와 polysaccharide계에 속한다고 보고되었다.

영지버섯으로부터 130여종의 triterpene이 분리되었는데 ganoderic acid, ganoderenic acid, lucidenic acid, ganoderals, ganoderiols, epoxyganoderiols, lucidons, ganodermanondiol, ganodermanontriol, ganoderetriol 등이 그것이며 이들은 대부분 불포화 lanostan 구조를 가진다고 보고되었다[2]. 자실체로부터 분리된 lucideric acid A와 D1, lucidone A와 C, ganoderic acids A, C1, J 등은 bitter compound로 보고되었다[3]. 균사체로부터 분리된 ganoderic acids T, U,

V, W, X, Z 등은 간암세포에 세포독성을 나타낸다고 보고되었으며, Lin 등은 자실체로부터 새로운 lanostanoid와 steroid를 분리하였다[4]. Ganoderic acids R, S는 간 보호 작용이 있음이 보고되었으며[5] 몇몇 ganoderic acid 유도체는 hypolipidemic 활성이 있음이 보고되었다[6]. 균사체로부터 분리된 ganoderic acid S는 용량에 따라 혈소판 응집에 관여함이 보고되었고[7-8], ganoderol A, ganoderol A와 B, ganoderic acids K, S 등은 angiotensin converting enzyme(ACE)을 저해함이 보고되었으며[9], ganoderic acids C, D는 항염증 효과를 가진다고 보고되었다[10].

한편 몇몇 담자균류로부터 분리된 단백결합 다당체는 항암효과를 가진다고 보고되었으며[11], 영지버섯의 경우 자실체의 열수 추출물로부터 (1-3)-β-, (1-4)-β- 그리고 (1-6)-β-구조를 갖는 단백결합 다당체가 분리되었다[12]. Kino 등은 균사체로부터 분리된 Ling Zhi-8이 유사분열 촉진효과와 면역억제, 항알러지, 항바이러스 작용을 나타냄을 보고하였다[13]. 이러한 약효가 입증된 영지버섯에 대해 특히 균사체로부터 저분자 물질로서 간 기능 회복작용을 나타내는 성분을 확인, 분리하고자 영지버섯의 열수추출물을 에탄올 처리하여 용성분획과 불용성분획으로 분리한 후 극성에 따라 여러 분획으로 나누어 일차배양 간세포에 대하여 *in vitro* 에서 재생 정도에 미치는 영향을 검색하였다.

*Corresponding author
Tel. 02-2210-2480, Fax. 02-2210-2554
E-mail: hwkim@uoscc.uos.ac.kr

간 보호작용을 검색하려면 정상적인 간세포를 이용하는 것보다 먼저 간세포에 독성을 유발시키는 몇가지 방법이 개발, 응용되고 있는데 본 실험에서는 간질환 중간경변과 관련된 사염화탄소(CCl₄)와 바이러스성 간염과 관련된 galactosamine (GalN)을 이용하여 독성을 유발하고 각 분획의 독성회복 효과를 검색하였으며, 부분 간 절제수술 후의 일차배양 간세포에 대해 DNA합성, RNA합성, 단백질합성 활성도를 측정하여 손상된 간 조직 회복에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

검체의 조제

한국 마그네슘로부터 받은 영지버섯 균사체 500g으로부터 열수추출물(35g)을 얻었으며, 에탄올을 가하여 6시간 반응시켜 고분자분획(24.7g)은 침전되었으며, 침전되지 않는 저분자분획(8.6g)은 n-hexane을 가하여 수층과 n-hexane층(0.17g)으로 분리하였다. 수층에는 다시 ethyl acetate를 가하여 수층과 ethyl acetate층(0.58g)으로 나누었으며, 남은 수층에는 n-butanol을 가하여 n-butanol층(1.44g)을 얻었다. 이러한 방법으로 얻은 각 분획을 동결 건조한 후 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 용해하여 최종농도가 0.1% 이하가 되도록 간세포 배양액에 가하였다.

Hepatocytes의 분리 및 배양

Hepatocytes의 분리는 Seglen의 방법[14]을 변형한 Guguen-Guillouzo와 Guillouzo의 two step perfusion방법을 이용하였다[15]. SD Rat (male, 150-200g)를 urethane (1g/kg, *ip.*)으로 마취하였다. 복부는 면도후 회색 iodine tincture로 처리하고 이후 모든 실험은 무균적으로 수행하였다. 복부의 중앙선을 복개하고 양측을 자른 후 간 문맥을 노출시켜서 20 gauge catheter placement unit로 cannulation하고 하대 정맥을 절단한 후 15-20 ml/min의 유속으로 *in situ* perfusion buffer (magnesium, calcium-free Hanks balanced salt solution)를 간을 통해 perfusion하고 thoracic cavity를 열고 상대정맥을 18 gauge catheter placement unit로 cannulation하고 하대 정맥을 묶은 후, 상대 정맥을 통해 나오는 맥을 perfusion bottle로 재순환시켰다. 이 조작은 37°C를 유지하였다.

Perfusion bottle의 재순환을 마친 후, perfusion buffer에 0.05-0.06% 농도의 0.45 μm Millipore membrane으로 여과멸균한 collagenase (Sigma chem. Co. U.S.A.)를 perfusion buffer에 첨가하고 간이 부풀어오를 정도인 15-20분간 계속 perfusion 하였다. Collagenase로 녹인 후, 간을 collagenase가 포함되지 않은 washing medium (60 ml)의 beaker로 옮기고 멸균된 가위로 capsule을 파괴하고 hepatocyte는 간을 가볍게 흔들거나 large pore pipette으로 유리시켰으며

cell suspension은 2 layer gauze로 여과하였다. 여액을 2000 rpm에서 2회 원심분리하여 hepatocyte를 세척하고 마지막 침전은 배양액으로 현탁하였다. 세포의 생존율은 0.4% trypan blue (0.95% NaCl)로 희석하여 hemocytometer로 counting하였다.

배양조건

간세포를 Waymouth's medium으로 1.0×10^6 cells/ml로 희석하여 6 well plate에 1.5 ml, 24 well plate에는 0.3 ml의 cell suspension을 주입하였으며, 각 dish는 rat tail collagen으로 미리 coating하여 사용하였다. 간 세포를 collagen-precoated culture dish에 inoculation한 후 37°C, 5% CO₂/95% air incubator에서 배양하였다. 배지는 처음 plating한 1.5시간 후 갈아주었다.

사염화탄소 및 galactosamine에 의한 독성유도

간 세포를 6 well plate에서 24시간 배양한 후 10 mM 사염화탄소 또는 15 mM galactosamine로 1.5시간 처리하여 독성을 유도하고 동시에 각 분획물을 100 μg/ml의 농도로 투여하여 독성회복 효과를 측정하였다[17].

GPT 및 GOT의 활성 측정

세포독성이 유도된 간세포의 배양액을 취하여 GPT 활성을 Retiman-Frankel의 방법으로 측정하였다. 세포독성이 유도된 간세포의 배양액을 취하여 GOT 활성을 Retiman-Frankel의 방법으로 측정하였다.

간 기능 회복 효과

DNA 합성 활성도를 측정하기 위하여 처음 plating 한 1.5시간 후 medium을 제거하고 [³H]-thymidine (1 μCi/ml)이 포함된 새로운 medium을 가했다. 20시간 후 배양액을 제거하고 PBS buffer로 씻어준 후 4°C에서 10% TCA로 5분간 세척하고 2 N-TCA 0.5 ml를 넣고 68°C에서 30분간 배양하여 radioactivity를 측정하였다. RNA 합성 활성도를 측정하기 위하여 처음 plating 한 1.5시간 후 medium을 제거하고 [³H]-uridine (1 μCi/ml)이 포함된 새로운 medium을 가했다. 20시간 후 배양액을 제거하고 PBS buffer로 씻어준 후 4°C에서 10% TCA로 두번 세척하고 0.3 N NaOH를 함유하는 1% SDS 0.5 ml를 넣고 실온에서 30분간 incubation하여 radioactivity를 측정하였다. Protein 합성 활성도는 [³H]-leucine (1 μCi/ml)을 사용하고 방법은 RNA합성 활성도와 동일한 방법으로 진행하였다.

MTT assay

Carmichael 등의 방법에 준하여 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay를 실시하였다[16]. SK-HEP-1 암세포를 5×10^3 cells/well로 조

정한 다음, 96 well microplate (Nuclon, Denmark)에 well 당 100 μ l 씩 분주하였다. 모든 분획을 1,000, 100, 10, 1 μ g/ml의 농도로 조정된 후 well 당 100 μ l씩 가하였다. 대조군에는 sample 대신 RPMI-1640 (Gibco Co., U.S.A.) 배지를 100 μ l 씩 가하였다. 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 3일간 배양한 다음, MTT 시약 (5 mg/ml in PBS, Sigma Chem. Co., U.S.A.)을 20 μ l씩 가하여 4시간 배양하였다. 2000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액은 버리고 100% DMSO 150 μ l를 가한 다음 150 rpm에서 30분간 혼돈 후, ELISA Reader (Flow Lab., U.K.)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포성장 억제정도를 관찰하였다.

결 과

영지 균사체 분획의 간 보호효과

랫트의 일차 배양 간세포에 영지로부터 추출한 각분획이 GPT와 GOT수치에 미치는 영향을 검토하였다. 사염화탄소군에서 생리식염수만 가하였을 경우 GPT와 GOT수치는 각각 13.5 \pm 0.2와 53.8 \pm 1.8 IU/L (n=3)이었다. 사염화탄소 (10 mM)를 가하였을 경우의 GPT와 GOT수치는 각각 49.8 \pm 0.6와 99.0 \pm 4.3 IU/L (n=3)로서 간 독성을 유발하였다. 영지로부터 분리한 각 분획을 배양 간세포에 가하였을 경우에 영지의 열수추출물이 GPT와 GOT를 각각 64.4%와 64.7%회복시켜 가장 양호하였다. 그 다음으로는 n-butanol 분획이 우수한 작용을 나타내었다.

Galactosamine으로 독성을 유발시켰을 경우에는 생리식염수를 처리한 경우 GPT와 GOT수치는 각각 14.3 \pm 1.8과 80.6 \pm 2.6 IU/L (n=3)이었으며, Galactosamine(1.5 mM)을 가하였을 경우의 GPT와 GOT수치는 각각 50.9 \pm 1.3과 122.5 \pm 2.5 IU/L (n=3)이었다 (Table 1). 영지의 각 분획

을 가하였을 경우에 GPT와 GOT의 회복에 가장 양호한 작용을 나타낸 분획은 역시 열수추출물 분획과 n-butanol 분획이었다. 따라서 영지의 분획중 극성이 큰 분획이 간세포의 기능을 회복시키는 능력이 강하였다.

영지균사체 분획의 간기능 회복효과

부분 간절제수술 후의 일차배양 간세포에 대하여 영지의 열수추출물, 고분자분획, n-butanol 분획이 DNA합성, RNA합성 및 단백질합성 능력에 미치는 영향을 검토하였다. 상기의 3분획중 대조군 (59 \pm 4 dpm \times 10³)에 비해 열수추출물 (2,392 \pm 422 dpm \times 10³)과 고분자분획 (2,130 \pm 143 dpm \times 10³)에서 [³H]-thymidine uptake가 현저히 증가하므로 DNA합성을 크게 촉진시켰다. 간세포의 RNA합성을 [³H]-uridine uptake로 측정된 결과 대조군 (65 \pm 3 dpm \times 10³)에 비해 가장 크게 촉진시킨 분획은 열수추출물 (2,981 \pm 96 dpm \times 10³)이었으며, 그 다음으로는 n-butanol분획 (2,373 \pm 135 dpm \times 10³)이었다. [³H]-leucine uptake에 의하여 단백질합성정도를 측정된 결과 대조군 (28 \pm 6 dpm \times 10³)에 비해 가장 크게 촉진시킨 분획은 n-butanol분획 (315 \pm 53 dpm \times 10³)과 고분자분획 (306 \pm 24 dpm \times 10³)이었다(Table 2). 따라서 영지의 성분중 극성이 강한 분획은 모두 간세포의 기능회복에 우수한 효과를 나타내었다.

사람유래의 간암세포의 성장에 미치는 영향

사람의 간암세포인 SK-Hep-1세포주에 대하여 영지의 각 분획이 세포 성장에 미치는 영향을 MTT assay로 측정하였다. 영지의 6종의 분획중에서 1 μ g/ml의 저농도에서도 유의성있게 간암세포의 성장을 억제시킨 분획은 n-hexane 분획과 ethyl acetate 분획이었다. 10 mg/ml의 농도에서 유의성있게 성장을 저지시킨 분획은 저분자분획, n-hexane 분획, ethyl acetate 분획이었다. 100 μ g/ml의 농도에서 가장 우수

Table 1. Effects of fractions of *Ganoderma lucidum* on CCl₄- and galactosamine(GalN)- intoxicated rat primary hepatocytes

Fractions	Relative activity (%) ^{a)} by CCl ₄ (10 mM)		Relative activity (%) ^{a)} by GalN (1.5 mM)	
	GPT	GOT	GPT	GOT
Control ^{a)}	100.0	100.0	100.0	100.0
Control ^{b)}	0.0	0.0	0.0	0.0
Water fraction	64.4*	64.7*	51.9*	82.8*
High MW fraction	63.0*	13.7	29.8*	74.9*
Low MW fraction	57.5*	25.8*	41.9*	71.2*
Hexane fraction	52.5*	15.0	36.7*	68.1*
Ethyl acetate fraction	44.6*	46.1*	27.4*	75.0*
n-Butanol fraction	67.4*	49.9*	39.6*	83.7*

a) Values of GPT and GOT in the CCl₄ negative control group were 13.5 \pm 0.2 and 53.8 \pm 1.8 IU/L (n=3), respectively. And values of GPT and GOT in the galactosamine negative control group were 14.3 \pm 1.8 and 80.6 \pm 2.6 IU/L (n=3), respectively.

b) Values of GPT and GOT in the CCl₄ (10 mM) treated positive control group were 49.8 \pm 0.6 and 99.0 \pm 4.3 IU/L (n=3), respectively. And values of GPT and GOT in the galactosamine (1.5 mM) treated positive control group were 50.9 \pm 1.3 and 122.5 \pm 2.5 IU/L (n=3), respectively.

c) Relative activity (%) = 100 \times (Control^{a)} - Sample)/(Control^{b)} - Control^{a)}).

* p < 0.01

Table 2. Effects of fractions of *Ganoderma lucidum* on the intracellular synthetic activities of rat primary hepatocytes

Fractions	Synthetic activity (dpm x 10 ³ /μg protein) ^a		
	DNA	RNA	Protein
Control	59 ± 4	65 ± 3	28 ± 6
Water extracted fraction	2,392 ± 422**	2,981 ± 96**	223 ± 31**
High molecular weight fraction	2,130 ± 143**	1,505 ± 346*	306 ± 24**
n-Butanol fraction	1,610 ± 70**	2,373 ± 135**	315 ± 53**

^aSynthetic activity of DNA, RNA and protein were measured by adding 1 μCi/ml of [³H]-thymidine, [³H]-uridine and [³H]-leucine to the culture system for 20 hrs, respectively.

*: $p < 0.01$

Table 3. Effects of fractions of *Ganoderma lucidum* on SK-Hep-1 hepatoma cell line *in vitro*

Fraction	Optical density (540 nm) by MTT assay		
	100 μg/ml	10 μg/ml	1 μg/ml
Control	(0.55 ± 0.01)		
Water extracted fraction	0.27 ± 0.01*	0.54 ± 0.01	0.53 ± 0.01
High molecular weight fraction	0.29 ± 0.02*	0.56 ± 0.04	0.61 ± 0.02
Low molecular weight fraction	0.41 ± 0.01*	0.41 ± 0.01*	0.45 ± 0.02
Hexane fraction	0.25 ± 0.01*	0.36 ± 0.01*	0.40 ± 0.04*
Ethyl acetate fraction	0.19 ± 0.01*	0.40 ± 0.04*	0.41 ± 0.02*
n-Butanol fraction	0.43 ± 0.02*	0.49 ± 0.05	0.49 ± 0.01

*: $p < 0.01$

한 작용을 나타낸 분획도 역시 n-hexane 분획과 ethyl acetate 분획이었다 (Table 3). 따라서 영지의 각 분획중 간암세포의 성장을 직접적으로 억제시킬 수 있는 분획은 극성이 낮은 유기용매분획이었다.

고 찰

영지버섯은 항암 작용을 비롯한 탁월한 효능을 가지는 명약으로 소개되고 있으며 최근에는 영지버섯의 항염증 작용, 심근 세포에 대한 작용, 항 HIV 작용뿐 아니라 항염유와 효과에 이르기까지 연구의 폭이 더욱 넓어졌다. 영지버섯 자실체의 ganoderic acid R, S 가 간 보호작용을 가지며, ganoderic acids T, U, V, W, X, 와 Z는 간암 세포에 대해 세포독성을 가짐이 이미 밝혀진 바 있다. 본 실험에서는 영지버섯 균사체의 저분자 물질에 대하여 이러한 간 기능 회복, 보호작용과 세포독성을 탐색할 목적으로, 전체 extract인 열수추출물에 에탄올을 가하여 고분자분획과 저분자분획으로 분리하였으며, n-hexane, ethyl acetate, n-butanol로 극성에 따라 3개의 분획으로 나누었다.

간보호 작용을 검색하기 위하여 사염화탄소와 galactosamine으로 독성을 유도한 일차배양 간세포를 이용하여 실험을 실시하였다. 사염화탄소는 간에서 합성된 triglyceride의 방출을 억제하여 지방간 형성을 유도하며 사염화탄소 자체의 대사 산물인 free radical은 지질막의 과산화유발하여 microsome lysosome등의 세포내 소기관을 손상시키고

결국에는 간세포 괴사를 일으킨다[18]. Galactosamine으로 손상을 입은 간세포는 그 기능 및 형태에 있어서 바이러스성 간염과 유사한 것으로 알려져 있다. Galactosamine은 간세포 내에서 uridine diphosphate hexosamine 형성 및 UDP-N-acetylhexosamine의 합성을 증가시키므로 결국에는 undine이 고갈되어 간세포 내의 UDP-glucose, UDP-galactose 및 UDP가 급속히 감소하게 된다. 따라서 UDP-glucuronic acid와 같은 uracil nucleotides와 관련된 생체 고분자들의 생합성이 저해되고 세포 소기관들이 손상을 받게 되어 결국에는 세포의 괴사를 초래하는 것으로 알려져 있다[19].

모든 분획에 대해 실험한 결과 전반적으로 열수추출물과 n-butanol 분획에서 GOP, GPT 값이 가장 크게 감소하였으며, 최대 83%까지 간 보호 효과를 나타내었다. 부분 간 절제술 후 얻어진 일차배양 간 세포에 대해 DNA, RNA, 단백질 합성 활성에 미치는 영향을 검색한 결과 열수추출물, 고분자분획, n-butanol 분획이 DNA, RNA, 단백질 합성을 크게 증가시켰다. 이 결과로부터 영지의 성분중 극성이 큰성분이 손상된 간세포의 재생에 기여함을 알 수 있다. 각 분획이 간암 세포에 대해 억제 작용을 나타내는지 알아보기 위해 MTT assay를 실시하여 *in vitro*에서 암세포의 성장정도를 측정하였다. 그 결과 단백질 결합 다당체를 포함하지 않는 분획인 비극성용매 분획이 암세포에 대한 직접적인 세포독성을 보였으며 ethyl acetate 분획은 100 μg/ml에서 가장 큰 세포 독성을 나타냈다. 이상의 실험은 모두

*in vitro*에서 수행한 것으로, *in vivo*에서의 결과와 반드시 일치한다고 볼 수는 없지만, 비슷한 양상을 나타낼 것이라고 생각한다. 가장 효과적으로 간암세포에 독성을 나타낸 ethyl acetate 분획과 전반적으로 GPT, GOT 값을 가장 크게 저하시켜 간 보호작용을 나타낸 분획인 n-butanol 분획을 분석하면 새로운 간 보호 물질의 개발이 가능할 것으로 사료된다.

요 약

영지버섯 균사체의 ethanol 용성분획을 극성에 따라 6개의 fraction으로 나누었다. 사염화탄소와 galactosamine으로 독성을 유도한 일차배양 간세포를 이용하여 검색한 결과 전반적으로 열수출물분획과 n-butanol 분획의 극성분획이 GPT, GOP 값을 가장 크게 저하시켜 간 보호작용을 나타냈으며, 부분 간 절제수술 후의 일차배양 간세포에 대해 열수출물, 고분자분획, n-butanol 분획이 유의성있게 DNA, RNA, Protein 합성을 증가시켜 손상된 간 조직에 대해 회복 효과를 보였다. 간암세포에 대해서는 ethyl acetate 분획이 가장 강한 세포독성을 나타내었다.

감사의 말씀

본 연구는 서울대학교 약학대학 부속 종합약학연구소의 연구비로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Kim, R. S., H. W. Kim, B. K. Kim. 1997. Suppressive effects of *Ganoderma lucidum* on proliferation of peripheral blood mononuclear cells. *Mol. Cells* **7**: 52-57.
- Kim, H. W. and B. K. Kim. 1999. Biomedical triterpenoids of *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllophoromycetideae). *Int J. Med Mushrooms* **1**: 121-138.
- Nishitoba, T., H. Sato, and S. Sakamura. 1988. Bitterness and structure relationship of the triterpenoids from *Ganoderma lucidum* (Reishi). *Agric. Biol. Chem.* **52**: 1791-1795.
- Lin, C. N., W. P. Tome, and S. J. Won. 1991. Novel cytotoxic principles of formosan *Ganoderma lucidum*. *J. Nat. Prod.* **54**: 998-1002.
- Hirota, M., C. Ino, T. Furuya, and M. Shiro. 1986. Ganoderic acids T, S and R, new triterpenoids from the cultured mycelia of *Ganoderma lucidum*. *Chem. Pharm. Bull.* **34**: 2282-2285.
- Komoda, Y., M. Shimizu, Y. Sonoda, and Y. Sato. 1989. Ganoderic acid and its derivatives as cholesterol synthesis inhibitors. *Chem. Pharm. Bull.* **37**: 531-533.
- Wang, C. N., J. C. Chen, M. S. Shiao, and C. T. Wang. 1989. The aggregation of human platelet induced by ganoderic acid. *S. Biochim. Biophys. Acta* **986**: 151-160.
- Wang, C. N., J. C. Chen, M. S. Shiao, and C. T. Wang. 1991. The inhibition of human platelet function by ganoderic acids. *Biochem. J.* **277**: 189-197.
- Morigiwa, A., K. Kitabatake, Y. Fujimori, and N. Ikekawa. 1996. Angiotensin converting enzyme-inhibitory triterpenes from *Ganoderma lucidum*. *Chem. Pharm. Bull.* **34**: 3025-3028.
- Kohda, H., W. Tokumoto, K. Sakamoto, M. Fujii, Y. Hirai, K. Yamasaki, Y. Komoda, H. Nakamura, S. Ishihara, and M. Uchida. 1985. The biologically active constituents of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. histamine release-inhibitory triterpenes. *Chem. Pharm. Bull.* **33**: 1367-1374.
- Kim, B. K., H. Y. Cho, J. S. Kim, H. W. Kim, and E. C. Choi. 1993. Studies of constituents of higher fungi of Korea. (LXV III). Antitumor components of the cultured mycelia of *Ganoderma lucidum*. *Kor. J. Pharmacogn.* **24**: 203-212.
- Mizuno, T. and S. Sakamura. 1985. Medicinal and dietary effects of Mannentake(Reishi). antitumor polysaccharides and bitter terpenoids. *Kagaku and Seibutsu* **23**: 797-802.
- Kino, K., T. Sone, J. Watanabe, A. Yamashita, H. Tsuboi, H. Miyajima, and H. Tsunoo. 1991. Immunomodulator, LZ-8, prevents antibody production in mice. *Int. J. Immunopharmacol.* **13**: 1109-1115.
- Seglen, P. O. 1975. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol.* **13**: 29-83.
- Guguen-Guillouzo, C. 1983. Isolation and culture of animal and human hepatocytes. In Freshney, R. I. (ed), *Culture of Epithelial Cells*, Willey-Liss, New York, pp. 198-223.
- Carmichael, J., W. G. Degraff, A. F. Gazdar, J. D. Minna, and J. B. Mitchell. 1987. Evaluation of a tetrazolium based semi-automated colorimetric assay, assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* **47**: 936-942.
- Kiso, Y., M. Tohkin, and H. Hikino. 1983. Assay method for antihepatotoxic activity using carbon tetrachloride induced cytotoxicity in primary cultured hepatocytes. *Planta Medica* **49**: 222-225.
- Paduraru, I., A. Saramet, G. Dantila, M. Nichifor, L. Jerca, A. Iacobovici, D. Ungureanu, and M. Filip. 1996. Antioxidant action of a new flavonic derivative in acute carbon tetrachloride intoxication. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **21**: 1-6.
- Gregus, Z., C. Madhu, D. Goon, and C. D. Klaassen. 1988. Effect of galactosamine-induced hepatic UDP-glucuronic acid depletion on acetaminophen elimination in rats. Dispositional differences between hepatically and extrahepatically formed glucuronides of acetaminophen and other chemicals. *Drug Metab Dispos.* **16**: 527-533.

(Received May 25, 2000)