

DNA 손상 및 돌연변이에 대한 영지버섯의 방어효능

이길수* · 공석경 · 최수영
한림대학교 자연과학대학 생명과학부

The Protective Effects of *Ganoderma lucidum* on the DNA Damage and Mutagenesis

Kil Soo LEE*, Seok-Kyoung KONG and Soo Young CHOI

Division of Life Sciences, Hallym University, Chunchon 200-702, Korea

(Received May 9, 2003; Accepted May 30, 2003)

Abstract—*Ganoderma lucidum* is commonly known as medically potent mushroom, which has been widely used in China and other oriental countries for the treatment of various diseases, including cancer. In this report, we investigated the anti-oxidant and protective effect of *Ganoderma lucidum* extract (GLE) against the DNA damage induced by free radical and U.V. In the assay of cell growth inhibition, the inhibitory cell growth rate induced by hydroxyl radical was dose-dependently decreased by GLE. This results support that GLE has a detoxifying activity against cytotoxicity of hydroxyl radical in *E. coli* cell. GLE also protected ColE1 plasmid DNA damage in the concentration of 200 µg per reaction on the DNA fragmentation assay. The nuclear tailing by hydrogen peroxide in single cell gel electrophoresis(SCGE) was decreased by GLE in the concentration of 50 µg/ml. These data indicate that *Ganoderma lucidum* has an anti-oxidative activity to hydrogen peroxide. The mutation rate after irradiation of U.V. was reduced by 50 µg/ml GLE and total number of Rif (Rifampicin) resistant mutants was decreased in a concentration dependent manner when added the GLE exogenously in a culture media. According to the results, it is likely that GLE has not only an anti-oxidative activity to hydroxyl radical but also an anti-mutagenic activity to U.V. mutagenesis.

Keywords □ *Ganoderma lucidum*, free radical, DNA damage, UV mutagenesis, anti-oxidant effect

산소는 생물체에게는 없어서는 안 될 매우 중요한 분자이다. 그러나 체내의 산소분자가 주변의 환경요인이나 화학작용에 의하여 전자를 잃게 되면, O₂⁻(superoxide)로 환원되며 다시 superoxide는 SOD(superoxide dismutase)에 의하여 H₂O₂(hydrogen peroxide)로 전환된다. 이렇게 발생된 H₂O₂는 일차적으로 catalase에 의하여 분해되고, 여분의 H₂O₂는 Fe²⁺와 반응하여 세포에 매우 강한 손상을 주는 OH·(hydroxyl radical)을 발생시킨다(Fridovich, 1978). Reactive oxygen species(ROS)로서, superoxide, hydrogen peroxide와 hydroxyl radical들은 oxide radical 또는 free radical이라 하며, 이들은 세포내 단백질, 세포막, DNA등에 손상을 주어 세포의 노화, 괴사 등을 초래한다(Emerit 등, 2001). O₂⁻는 SOD가 결여된 세포내에서 DNA에 결합된 Fe²⁺의 양에 비례하여 DNA damage를 유도하고(Keyer 등, 1995; Keyer와 Imlay, 1996), H₂O₂는 세포의 유전독성을 일으켜 세포 괴사를 이끌게 된다

(Barbouti 등, 2002). Free radical은 세포내 단백질을 분해시켜 proteosome과 lysosomal system의 기능적 변화를 초래하고(Szweda 등, 2002), DNA에 가해지는 oxidative damage, 또는 proteolysis는 결국 돌연변이의 유발과 노화를 불러일으킨다(Halliwell과 Gutteridge, 1989). 정상상태의 세포의 경우 catalase에 의하여 H₂O₂는 물로 분해되지만, H₂O₂가 다량으로 생성되거나, 세포환경변화에 따라서 분해되지 않을 때는 metal ion에 의하여 hydroxyl radical로 전환되어 위와 같은 세포손상이 초래될 수 있을 것이다. 그러나, vitamin C와 E, 은행나무(*Ginkgo biloba*) 추출물 같은 항산화제를 oxidative damage를 받은 mitochondrial DNA에 투여함으로써 mitochondria의 노화가 억제되었다고 보고되었다(Sastre 등, 2002). 따라서 항산화 기능을 하는 물질은 항노화 작용과 연관이 있다고 할 수 있다.

담자균류 민주름목에 속하는 영지버섯(*Ganoderma lucidum*)은 활엽수 뿌리에서 발생하여 땅위로 돋는 1년 생 버섯이다. 예로부터 불로초라고도 불렸으며, 일본에서

*To whom correspondence should be addressed.

는 만년버섯, 중국에서는 영지라고 하여 장식용이나 약재로 많이 사용되어져 왔으며, 최근에는 민간에서부터 일차적인 효과가 입증되면서, 그 추출물을 이용한 기능성 대체의약품이나 식품으로서 각광을 받게 되었다. 영지버섯의 추출물은 칼슘 전달체계를 변화시켜 세포의 신호변환에 영향을 주며, 세포주기조절에도 효과가 있다고 보고되었다(Zhu 등, 2000). Interleukin, TNF(tumor necrosis factor)와 interferon 등의 cytokine을 증가시켜 항종양활성을 나타내며(Wang 등, 1997), mouse에서 T-극구와 B-림프구의 증식을 향상시켜 면역증대활성을 나타내었다(Bao 등, 2002; Zhang 등, 2002). 또한 영지 추출물은 superoxide로 인한 간과 신장의 손상을 막으며(Shieh 등, 2001), 세포내 DNA를 산화적 damage로부터 강력한 보호작용을 한다고 보고되었다(Shi 등, 2002). 영지버섯 추출물의 항암효과, 면역활성증대, 항산화능에 관한 보고는 있으나(Sliva 등, 2002), hydroxyl radical에 의한 DNA damage 및 U.V. 돌연변이성에 대한 영지버섯 추출물의 영향은 연구된 바 없으므로, 본 실험은 hydrogen peroxide에 의하여 유도된 hydroxyl radical의 *in vitro* DNA strand break와 rat liver cell에서 hydroxyl radical에 의한 DNA손상에 대하여 영지버섯 추출물의 활성을 측정, 관찰하였고, 성장저해 assay를 이용하여 catalase defective mutant cell인 *E. coli* UM255에서 hydrogen peroxide에 대한 영지버섯 추출물의 효과를 실험하였다. 또한 영지버섯 추출물의 항돌연변이능을 관찰하기 위하여 *E. coli* 세포를 이용하여 U.V 돌연변이에 따른 돌연변이율 측정 실험(mutation rate assay)를 수행하였다.

실험방법

균주, 시약 및 배지

DNA fragmentation assay에는 Sigma사의 ColE1 plasmid DNA(from *E. coli* C600, D-9683)를 사용하였으며, growth inhibition assay에는 catalase mutant *E. coli* UM255(*pro leu rpsL hsdM hsdR endI lacY katG2 katE 12::Tn10 recA*)를, mutation rate assay에는 *E. coli* CSH138(*ara ilvJ? Δgpt-lac5 Tn5*)을 사용하였다. Single cell gel electrophoresis(Comet assay)의 rat은 한림대학교 실험동물센터에서 받은 Sprague Dawley albino male 4-5주령을 사용하였다. Superoxide dismutase(SOD)(from *E. coli*, S-5389)와 catalase(from *Aspergillus niger*, C-3515)는 Sigma-Aldrich사 제품을 사용하였다. Hydrogen peroxide(30%)는 Aldrich사 제품을 사용하였다. 영지버섯(*Ganoderma lucidum*)은 시판되는 제품을 사용하여 건량 10 g을 정량하여 400 ml의 증류수로 120°C에서 2시간동안 성분을 추출하였다. 열수 추출물 400 ml은 여과한 후 rotary evaporator를 이용하여 10 ml로 농축

시켰다.

Cell growth inhibition

LB broth 30 ml에 catalase mutant *E. coli* UM255를 37°C에서 overnight culture를 하였다. 새로운 LB broth 10 ml에 overnight cultured cell 100 μ l와 영지버섯 추출물을 첨가하여 한 시간 동안 배양한 후 0.5 mM H₂O₂를 처리하였다. 매 30분마다 A_{600nm}에서 흡광도를 측정하여 growth inhibition assay를 수행하였다.

DNA fragmentation assay

ColE1 plasmid DNA 0.21 μ g에 1 mM H₂O₂와 0.05 mM FeCl₃를 넣고, 그와 동시에 영지버섯을 농도별로 처리한 후, 증류수로 전체 반응 액을 10 μ l로 하여 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 6xloading buffer(pH 8.0, 0.1 M EDTA, 0.05% bromophenol blue, 40% sucrose, 0.5% SDS) 2 μ l를 넣고 1.0% agarose gel에서 100 V, 70 mA로 2 시간동안 전기영동 한 후, gel은 ethidium bromide(1.0 μ g/ml TBE buffer)에서 30분간 염색하였고, 증류수에서 1 시간동안 탈색하였다. 탈색후 gel을 U.V.(360 nm) transilluminator로 관찰하고, Computer Image Analysis System (program: BioCaptMW, camera: Sony XC-75CE)을 이용하여 촬영하였다.

Single cell gel electrophoresis (SCGE, Comet Assay)

Ding(1998)의 방법을 사용하여 rat(SD albino, male)으로부터 hepatocyte를 분리, 수거하였다. SCGE(Comet assay)는 Ding 등(1999)의 방법과 Olive 등(1992)의 방법을 혼합하여 사용하였다. Liver cell 100 μ l(40~50 cell/plate)에 0.5 mM H₂O₂와 영지버섯추출물을 농도별로 적정량씩 처리하여 37°C 항온수조에서 2시간동안 반응시켰다. 0.7% low melting agarose($\geq 70^\circ\text{C}$)로 slide glass에 첫 번째 층을 만들고, 반응이 끝난 cell과 0.7% low melting agarose를 혼합하여 두 번째 층을 만들었다. 유리 slide를 lysis buffer(pH 10, 2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10% Triton X-100, 1.0% DMSO)로 옮겨 1시간 동안 4°C를 유지시켰다. Electrophoresis buffer(pH 13, 300 mM NaOH, 1 mM Na₂EDTA)에 20분간 방치한 후, 25 V, 300 mA에서 20분간 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 후 neutralizing buffer(pH 7.5, 0.4 M Tris buffer)로 옮겨 10분간 중화시킨 뒤, propidium iodide(3 μ g/ml in H₂O)로 1시간동안 염색하였다. 암실에서 형광현미경(Lcica DMLS, 배율: 400)으로 관찰 후, Computer Image Analysis System (Program: Kanscope KR 3.0, Camera: Polaroid DMC-LE)으로 촬영하였다. Tail length data는 SAS(Statistical Analysis System, release 8.12, SAS Institute Inc.) program을 이용

하여 control과 각각의 집단 모평균과의 차이를 ANOVA 처리하여 p value를 구하였다.

Mutation rate assay

Mutation rate assay는 Miller(1992)의 방법을 이용하여 LB broth 30 ml에 overnight culture된 *E. coli* CSH138 600 μ l를 접종한 후 37°C에서 2시간동안 배양하였다. 원심분리 (1000 rpm, 10 min, 15°C, Supra 21K High Speed Refrigerated Centrifuge)하여 상층액을 제거하여 cell을 모으고 0.1 M $MgSO_4$ 15 ml을 첨가하여 0°C에서 10분 동안 반응하였다. 반응 후 5 ml씩 petri-dish에 각각 분주한 후, 암소에서 U.V lamp(UVP, UVGL-58)를 이용하여 25 cm 거리에서 U.V. 254 nm로 일정시간 동안 조사하였다. 조사가 끝난 후, 조사된 각각의 sample로부터 적정한 농도까지 serial dilution하여 LB plate에 spreading하였고, 영지버섯 추출물이 농도별로 첨가되어 있는 LB broth 5 ml에 20 μ l씩 각각 접종하여 37°C에서 overnight culture 하였다. Overnight culture된 LB plate는 colony counter (Reichert, Quebec dark-field colony counter)를 이용하여 colony 수를 측정하여 cell titer를 구하고, 각 조사시간별 titer에서 U.V. 조사시간 0초일 때의 titer로 나누어 percentage를 survival rate로 구하였으며, U.V. 조사시간 0 초일 때의 titer를 100%로 하였다. Overnight culture된 LB broth는 mutation rate assay를 위하여 serial dilution한 후 LB plate와 LB-rifampicin plate에 각각 spreading하였다. Overnight culture후 각각의 plate에서 colony counter를 이용, colony 수를 측정한 후, 돌연변이개체수와 LB plate에서의 survival을 구하였다. 매 시간별 돌연변이 개체수에서 survival을 나누어 mutation rate를 구하였다.

결과 및 고찰

영지버섯은 중국과 여러 아시아 국가에서 오래 전부터 암을 포함한 여러 가지 질병의 치료에 많이 사용되어 왔다(Jong과 Birmingham, 1992). 특히 항종양, 항세균 그리고 항virus기능을 나타낸다고 한다. 그러나 이러한 영지버섯의 여러 가지 생리학적 기능에도 불구하고 정확한 항산화 효과는 아직 잘 알려진 바 없다. Catalase는 hydrogen peroxide를 H_2O 로 분해함으로써 hydrogen peroxide에 의한 세포내 손상을 막게 된다(Halliwell과 Gutteridge, 1989). 그러나, 세포내 Fe^{2+} 와 같은 metal ion 등에 의해 hydrogen peroxide가 hydroxyl radical로 전환이 이루어지면 세포에 강력한 산화제 역할을 하게 된다(Fridovich, 1978). 그러므로, 세포내의 catalase는 hydroxyl radical의 생성을 억제함으로써 세포 노화를 억제하게 된다. 이에 대한 손상방어 효과를 확인하기 위하여 catalase

defective mutant인 *E. coli* UM255를 이용하여 H_2O_2 에 의한 세포성장 저해에 대한 영지버섯 추출물의 회복효과를 growth inhibition assay를 이용하여 실험하였다. *E. coli* UM255는 0.5 mM hydrogen peroxide에 의하여 세포성장 저해를 받았고, 영지버섯 추출물(GLE)을 0.5 mM hydrogen peroxide를 처리하기 1시간 전에 농도별로 전 처리 하였다. 영지버섯 추출물(GLE)을 처리하였을 경우 처리농도에 따라 세포성장률이 회복되었다(Fig. 1). 따라서 영지버섯 추출물은 hydrogen peroxide에 의해 유발된 hydroxyl radical의 산화적 damage로부터 일차적으로 세포를 보호하는 것으로 판단된다.

Hydrogen peroxide에 의해 발생된 hydroxyl radical에 의한 산화적 damage와 이에 대한 영지버섯 추출물의 영향을 관찰하기 위하여 in vitro에서 DNA fragmentation assay를 이용하여 산화적 damage에 의한 DNA strand 절단과 영지버섯 추출물에 의한 DNA 손상방어 효과를 실험하였다. ColE1 plasmid DNA에 hydrogen peroxide (H_2O_2)와 $FeCl_2$ 를 첨가하여, hydroxyl radical(OH^\cdot)의 발생을 유도하여 DNA strand break를 일으켰으며, 그 결과, supercoiled form이 감소하고 relaxed form이 증가하는 DNA 절단 양상이 관찰되었다(Fig. 2, lane 3). Catalase의 DNA strand break 억제작용을 확인하기 위해서 catalase

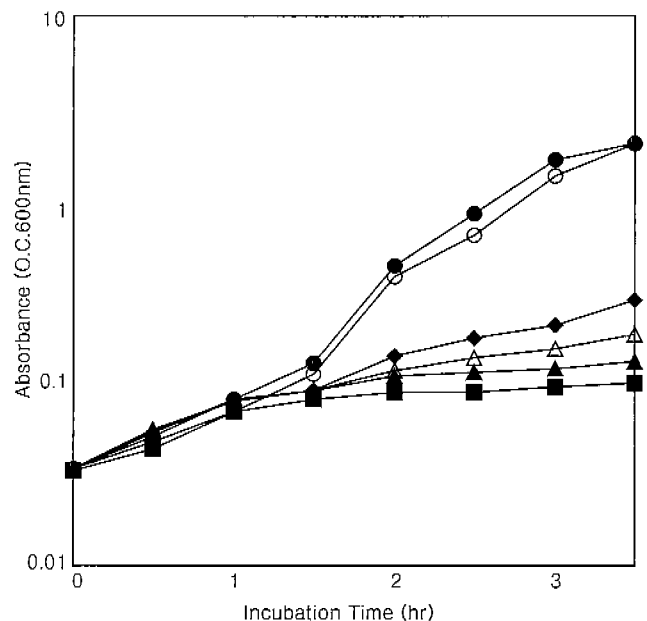


Fig. 1. Effect of *Ganoderma lucidum* extract (GLE) on *E. coli* UM255 cell growth treated with hydrogen peroxide.

○: Control (*E. coli* UM255)

■: 0.5 mM H_2O_2

▲: GLE(50 μ g/ml) preincubation 60 min+0.5 mM H_2O_2

△: GLE(100 μ g/ml) preincubation 60 min+0.5 mM H_2O_2

◆: GLE(200 μ g/ml) preincubation 60 min+0.5 mM H_2O_2

●: GLE(200 μ g/ml) preincubation 60 min

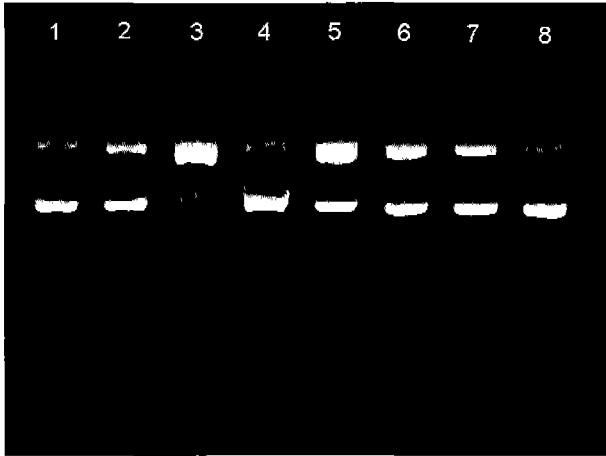


Fig. 2. Effect of *Ganoderma lucidum* extract (GLE) on ColE1 plasmid DNA damage. Total reaction volume 10 µl was incubated for 2 hrs. Gel electrophoresis was performed in 1% agarose gel at 100 volt, 70 mA for 70 min.
 lane 1: Control (ColE1 plasmid DNA 0.21 µg)
 lane 2: 0.05 mM FeCl₂
 lane 3: 1 mM H₂O₂ + 0.05 mM FeCl₂
 lane 4: 1 mM H₂O₂ + 0.05 mM FeCl₂ + catalase 23.6 µg
 lane 5: 1 mM H₂O₂ + 0.05 mM FeCl₂ + GLE 50 µg
 lane 6: 1 mM H₂O₂ + 0.05 mM FeCl₂ + GLE 100 µg
 lane 7: 1 mM H₂O₂ + 0.05 mM FeCl₂ + GLE 200 µg
 lane 8: GLE 200 µg

를 23.6 µg을 처리하였고(Fig 2. lane 4), 영지버섯 추출물은 산화적 DNA damage에 의한 DNA strand break 작용을 억제하였다(Fig 2. lane 5, 6, 7). 영지버섯 추출물의 농도에 따라 DNA strand break가 50 µg/ml에서부터 억제되어 relaxed form이 감소하면서 supercoiled form이 증가되어 control과 유사한 양상을 나타내었다.

*E. coli*에서 확인된 hydroxyl radical에 대한 영지버섯 추출물의 세포내 방어효과에 기초하여 진핵세포에서의 영향을 관찰하기 위하여 rat liver cell을 이용하여 single cell gel electrophoresis(SCGE, comet assay)를 수행하였다. 분리된 liver cell에 0.5 mM hydrogen peroxide를 처리함으로써 nuclear tailing을 관찰할 수 있었다(Fig. 3B). 여기에 catalase에 의한 세포내 damage억제효과를 보기 위하여 catalase 23.6 µg을 처리함으로써 대조군(Fig. 3A)과 유사하게 tailing이 감소되었다(Fig. 3C). 영지버섯 추출물은 catalase 처리에서와 유사하게 nuclear tailing을 감소시켰다(Fig 3D, E). 이것은 hydroxyl radical의 세포내 산화적 damage에 대하여 영지버섯 추출물이 세포 방어기작에 관여하여 산화적 damage를 억제하는 것으로 생각된다.

U.V. 조사에 의한 세포의 돌연변이성에 대한 영지버섯 추출물의 항 돌연변이성을 보기 위하여 *E. coli* CSH138을 이용하여 U.V. mutagenesis assay를 실험하였다. Rifampicin에 내성을 갖고 있지 않는 *E. coli* CSH138은

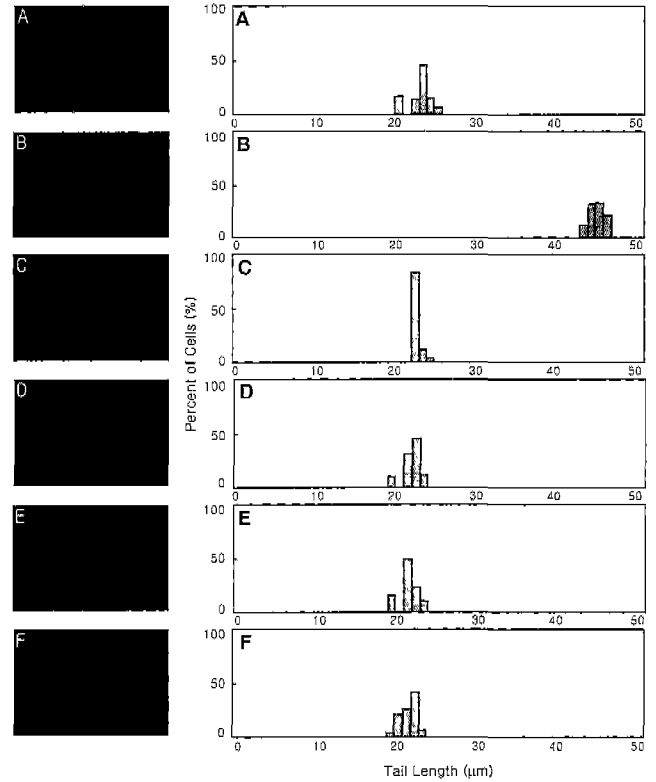


Fig. 3. Effect of *Ganoderma lucidum* extract (GLE) on rat hepatocyte DNA damage caused by hydrogen peroxide. Cell number: 50 cells/plate, Magnification: X400(P<0.0001).
 A: Control (Rat hepatocyte)
 B: 0.5 mM H₂O₂
 C: 0.5 mM H₂O₂ + catalase 23.6 µg
 D: 0.5 mM H₂O₂ + GLE (50 µg/ml)
 E: 0.5 mM H₂O₂ + GLE (100 µg/ml)
 F: GLE (100 µg/ml)

U.V. 조사 후 보통의 LB 배지에서 overnight culture를 하였을 때, U.V. 조사 시간이 증가함에 따라 mutagenesis가 일어나 rifampicin에 내성을 갖게되어 돌연변이율이 7.54×10⁻⁵까지 증가되고 돌연변이체의 수도 30초를 기점으로 하여 다시 감소되었다(Fig. 4, ●, ○). 그러나 U.V.를 30초 조사한 뒤 영지버섯 추출물을 처리한 배지에서 overnight culture를 한 경우에는 영지버섯 추출물의 농도 50 µg/ml에서 5.13×10⁻⁶(Fig. 4, ■), 100 µg/ml에서 1.51×10⁻⁶(Fig. 4, ▲)과 200 µg/ml일때 6.92×10⁻⁷(Fig. 4, ◆) 정도로 추출물을 처리하지 않은 대조군(Fig. 4, ●)에 비하여 돌연변이율과 돌연변이체의 감소(Fig. 4, □, △, ◇)가 관찰되었다. 특히 영지버섯 추출물이 50 µg/ml의 농도로 배지에 처리되었을 때와 추출물을 처리하지 않았을 때, 가장 효과적인 조사시간 30초에서의 돌연변이율과 돌연변이체의 수를 비교하면 영지버섯추출물을 처리하였을 때 처리하지 않은 대조군보다 매우 낮게 나타났다. 이것은

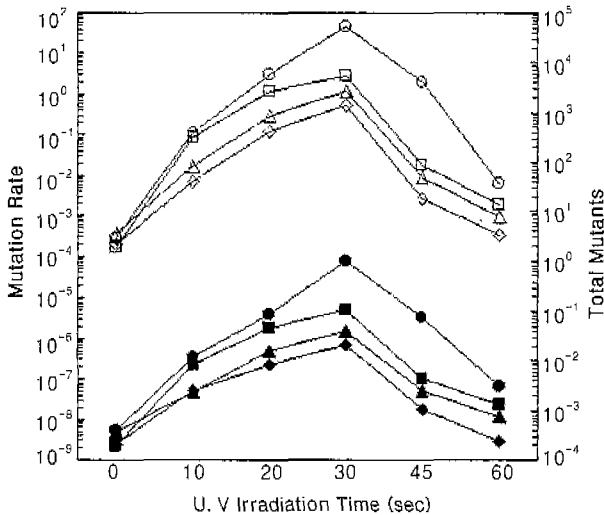


Fig. 4. Effect of *Ganoderma lucidum* extract (GLE) on the U.V. mutagenesis of *E. coli* CSH138. Closed plots are mutation frequency and open plots are total number of Rif^r mutants.

●, ○: Control (*E. coli* CSH 138)
 ■, □: GLE 50 µg/ml
 ▲, △: GLE 100 µg/ml
 ◆, ◇: GLE 200 µg/ml

영지버섯 추출물이 U.V.에 의한 mutagenesis에 대해서 DNA repair system에 관여하거나 DNA protection의 기능 때문에 돌연변이율과 돌연변이체의 수가 감소된 것으로 생각된다.

Growth inhibition assay 실험에서 세포 성장 저해에 대한 성장 회복 정도는 영지버섯 추출물을 200 µg/ml 정도 처리한 경우에 나타난 것을 볼 수 있다. 즉 영지버섯 추출물이 hydroxyl radical의 세포내 산화적 damage에 의한 세포 성장 저해에 대하여 회복 기능이 있다는 것을 알 수 있다. hydroxyl radical의 산화적 damage에 의한 DNA strand break에 대한 천연물의 방어효과를 알기 위한 DNA fragmentation assay 결과, 영지버섯 추출물의 농도가 total reaction(10 µl)당 200 µg에서 각각 DNA strand break이 억제됨을 볼 수 있었다. rat liver cell을 이용한 nuclear tailing 실험의 경우, 영지버섯 추출물 50 µg/ml에서 tailing 감소가 관찰되었다. 이것은 영지버섯 추출물에 의하여 세포내 산화적 damage가 억제되어 tailing이 감소되는 것으로 여겨진다. 이상과 같은 영지버섯 추출물의 hydroxyl radical에 대한 항산화 작용과 U.V. irradiation에 의한 mutagenesis에 대한 항 돌연변이성에 관한 실험의 결과로 미루어, 영지버섯은 세포 또는 세포내 DNA에 대하여 항산화성이나 항돌연변이성을 나타내었다. 영지버섯추출물은 hydroxyl radical에 의한 DNA strand break를 보호하며(Kim과 Kim, 1999), superoxide에 의한 간과 신

장의 손상을 막는다(Shieh 등, 2001)고 보고된 바, 영지버섯 추출물의 hydroxyl radical에 의한 세포내 산화적 damage와 그에 따른 세포 성장저해 억제 및 방어 기작과 U.V.에 의한 mutagenesis에 대한 항 돌연변이 활성은 보고된 바 없었으나, 본 실험의 결과, 영지버섯추출물은 hydroxyl radical에 의한 세포손상의 경우 높은 방어효과와 U.V mutagenesis에 대하여 항돌연변이 활성이 있는 것으로 생각되고, 이러한 영지버섯의 기능은 나아가서는 세포노화 억제와 깊은 관계가 있을 것으로 추측되며, 앞으로 영지버섯추출물 및 polysaccharide와 같은 효능있는 분획은 항노화 화장품이나 의약품의 원료로서 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 말씀

이 논문은 2002년도 한국과학재단 지역협력연구센터사업 한림대학교 실버생물산업기술연구센터 R12-2001-047-01004-0의 지원과 중소기업청 산학연전소사업 연구개발비 지원에 의하여 연구되었음.

참고문헌

- Bao, X. F., Wang, X. S., Dong, Q., Fang, J. N., and Li, X. Y. (2002). Structural features of immunologically active polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry* **59**(2), 175-181.
- Barbouti, A., Doulias, P., Nouis, L., Tenopoulou, M., and Galaris, D. (2002). DNA damage and apoptosis in hydrogen peroxide-exposed Jurkat cells: bolus addition versus continuous generation of H₂O₂. *Free Radic Biol. Med.* **33**(5), 691.
- Ding, W. X., Shen, H. M., Zhu, H. G., Lee, B. L., and Ong, C. N. (1999). Genotoxicity of microcystic cyanobacteria extract of a water source in China. *Mutat. Res.* **442**(2), 69-77.
- Ding, W. X., Shen, H. M., Zhu, H. G., and Ong, C. N. (1998). Studies on oxidative damage induced by cyanobacteria extract in primary cultured rat hepatocytes. *Environ. Res.* **78**, 12-18.
- Emcrit, J., Beaumont, C. and Trivin, F. (2001). Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. *Biomed Pharmacother.* **55**, 333-339.
- Fridovich, I. (1978). The Biology of Oxygen Radicals. *Science.* **201**, 875-880.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (1989). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford Science. New York, pp.86.
- Jong, S. C. and Birmingham J. M. (1992). Medicinal benefits of the mushroom *Ganoderma*. *Adv. Appl. Microbiol.* **37**, 101-134.
- Keyer, K. and Imlay J. A. (1996). Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- USA. **93**, 13635-13640.
- Keyser, K., Gort A. S. and Imlay J. A. (1995). Superoxide and the production of Oxidative DNA damage. *Journal of Bacteriology*. **177**, 6782-6790.
- Kim, K. C. and Kim, I. G. (1999). *Ganoderma lucidum* extract protects DNA from strand breakage caused by hydroxyl radical and UV irradiation. *Int. J. Mol. Med.* **4**(3), 273-277.
- Miller, J. H. (1992). *A short course in bacterial genetics*, CSHL Press, USA, pp.150.
- Olive, P. L., Wlodek, D., Durand, R. E. and Banath, J. P. (1992). Factors influencing DNA Migration from individual Cells Subjected to Gel Electrophoresis. *Exp. Cell Res.* **198**, 259-267.
- Sastre, J., Borrás, C., Garcia-Sala, D., Lloret, A., Pallardo, F. V. and Vina, J. (2002). Mitochondrial damage in aging and apoptosis. *Ann N.Y. Acad. Sci.* **959**, 448-451.
- Shi, Y., James, A. E., Benzie, I. F. and Buswell, J. A. (2002). Mushroom-derived preparations in the prevention of H₂O₂-induced oxidative damage to cellular DNA. *Tetrahedron Lett.* **43**(2), 103-111.
- Shieh, Y. H., Liu, C. F., Huang, Y. K., Yang, J. Y., Wu, I. L., Lin, C. H. and Li, S. C. (2001). Evaluation of the hepatic and renal-protective effects of *Ganoderma lucidum* in mice. *Am. J. Chin. Med.* **29**(3-4), 501-507.
- Sliva, D., Labarrere, C., Slivova, V., Sedlak, M., Lloyd, F. P. Jr. and Ho, N. W. (2002). *Ganoderma lucidum* suppresses mobility of highly invasive breast and prostate cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **298**(4), 603-612.
- Szweda, P. A., Friguet, B. and Szweda, L. I. (2002). Proteolysis, free radicals, and aging. *Free Radic Biol. Med.* **33**(1), 29-36.
- Wang, S. Y., Hsu, M. L., Hsu, H. C., Tzeng, C. H., Lee, S. S., Shiao, M. S. and Ho, C. K. (1997). The anti-tumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes. *Int. J. Cancer* **70**(6), 699-705.
- Zhang, J., Tang, Q., Zimmerman-Kordmann, M., Reutter, W. and Fan, H. (2002). Activation of B lymphocytes by GLIS, a bioactive proteoglycan from *Ganoderma lucidum*. *Life Sci.* **71**(6), 623-638.
- Zhu, H. S., Yang, X. L., Wang L. B., Zhao, D. X. and Chen, L. (2000). Effects of extracts from sporoderm-broken spores of *Ganoderma lucidum* on HcLa cells. *Cell Biol. Toxicol.* **16**(3), 201-206.