

영지버섯 균사체(*Ganoderma lucidum* IY009)로부터 추출한 β -Immunan의 시스플라틴 유발 신독성 보호효과

김용석* · 배우철 · 박정민 · 이준우¹ · 백성진² · 이상봉² · 윤경하³
일양약품 중앙연구소, ¹경북전문대학 식품가공과, ²바이오텍스텍, ³순천향대학교 생물학과

Protective Effects of β -Immunan Isolated from the Mycelium of *Ganoderma lucidum* IY009 against Cisplatin-induced Nephrotoxicity. Kim, Yong-Seok*, Woo-Chul Bae, Jeong-Min Park, Jun-Woo Lee¹, Seong-Jin Baek², Sang-Bong Lee², Kyung-Ha Yoon³. *IlYang Pharma. Co., Ltd., Central Research Institute, Yonginsi 449-900, ¹Department of Food Technology Kyungbuk College, Yeongjusi 750-712, ²Biotextech Co., Cheongwon-gun, Chungbuk, 363-883, ³Department of Biology Soonchunhyang University, Asan-si, 336-745* – β -Immunan was proteoglycan obtained from mycelium of *Ganoderma lucidum* IY009. In this study, the protective effects of β -Immunan, against the CDDP induced *in vitro* cytotoxicity and *in vivo* renal toxicity, was measured. Concentration dependent cytotoxicities of CDDP in normal kidney cells (Vero, TCMK-1) were reduced by β -Immunan treatment. Increased renal toxicity factors, such as elevation of blood urea nitrogen (BUN) and serum creatinine, reduction of kidney weight and malonaldehyde (MDA), by intraperitoneal administration of CDDP in rats was improved. These results indicated that β -Immunan have a protective effects against the CDDP induced renal toxicity, however, it needed to confirm the detailed mechanism for therapeutic effects.

Key words: β -Immunan, *Ganoderma lucidum* IY009, cisplatin, protective effects, renal toxicity

항암제로 암을 치료하는 목적은 암세포가 증식, 침윤, 전이를 통하여 결국에는 환자를 사망에 이르게 하는 것을 방지하는데 있다. 특히 백금화합물로서 알킬화제인 cisplatin (cis-diamine dichloroplatinum; CDDP)은 위암, 난소암, 방광암, 유방암, 폐암, 자궁, 자궁경부 및 자궁내막, 뇌, 임파선 등의 종양에 광범위하게 사용되고 있다[26].

현재 cisplatin을 포함한 많은 항암 화학요법제와 화학요법이 개발되어 치료율이 많이 향상 되었으며, 항암 화학요법제들은 주로 세포의 증식과 종양의 성장에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 그러나 세포증식은 암세포뿐만 아니라 많은 정상세포의 특성이기 때문에, 대부분의 항암 화학요법제들은 골수조혈세포나 점막세포 등과 같이 빠른 성장을 보이는 정상세포에도 독성을 나타내며, 일반적인 유효 농도에서도 심각한 부작용이 빈번하게 발생하고 있다. 그 중 신독성(nephrotoxicity)은 항암제의 고유 독성으로 이로 인하여 투여 후 독성과 연관된 신기능 저하가 나타날 수 있다. 신기능 저하가 나타나면 지속적인 항암치료와 병용 및 보조 약물의 최적 치료 조건에 방해가 된다[1, 26, 30].

따라서 cisplatin을 포함한 항암제의 사용은 심각한 부작용의 발현으로 치료영역 및 농도를 환자의 상태에 따라 제한하고 있으며 이러한 부작용의 경감과 효과적인 약물병용

요법의 연구가 절실히 요구되고 있다.

영지는 중국 고대 약물서인 신농본초경과 본초강목 등에 수록되었을 만큼 중국, 일본과 한국 등에서 수천년간 민간 약재로 사용되어왔다. 영지의 약효에 대하여 한방문헌이나 기타 고전에 여러 가지로 기재 되어 있지만 영지에 대한 과학적 실험결과는 1970년대에 들어서야 비로서 발표 되기 시작하였으며 최근까지 항암효과, 면역증강 작용, 혈압강하 작용, 항산화 작용 등에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다[3, 11, 17, 19, 27, 28, 29, 31]. 또한 영지를 이용한 유해물질 및 조건에 의한 발암성 억제 효과와 화학요법제들의 부작용 감소 혹은 저해 효과에 대한 연구도 진행되고 있으며, 권(1990)등[16]은 용모상피암, 자궁경부암등의 여러 가지 종양에 사용되는 methotrexate(MTX)와 영지를 병용 투여하여 MTX의 골수계 억제작용의 감소효과를 확인하였고, 윤(1993)등[38]은 벤조(a)펠렌으로 마우스에 폐선종을 유발 시킨 뒤 영지버섯 추출물을 투여한 결과 폐선종의 발생율이 감소하는 것을 확인하였다. 또한 Surh(2001)등[18]은 β -Immunan의 투여가 발암과정의 초기 단계인 돌연변이를 근원적으로 억제하고, 또한 발암원 중 활성 산소종에 의한 발암과정을 차단함으로써 정상세포가 활성산소에 노출되었을 경우 야기 되는 세포막 파괴나 유전적인 암세포화를 억제함으로써 암 예방 효과가 있음을 확인하였다.

따라서 본 시험에서는 영지 균사체 추출 단백질체인 β -Immunan의 cisplatin으로 유도된 항암치료 부작용 모델 중 신독성의 감소효과 및 항암보조제로서의 효과를 알아보기

*Corresponding author

Tel: 82-31-281-7851, Fax: 82-31-284-1010

E-mail: kys0908@chol.com

위하여 실시하였다.

재료 및 방법

실험 동물 및 세포주

실험에 사용할 200-230 g의 웅성 Wister rat는 샘타코주로 부터 구입하여 사용하였다. 사육조건은 당 소 동물실험실에서 항생제 무첨가 사료와 물을 자유롭게 먹게 하였으며, 동물 사육실은 실온을 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도를 50%로 유지하였으며 12시간 조명을 시행하였다.

Vero cell과 TCMK-1 cell 등은 한국세포주 은행에서 분양 받아 사용하였다.

시약 및 배지

Cisplatin은 Sigma(St. Louis, MO)사 제품을 구입하였으며, 0.9% 생리식염수에 2mg/ml 농도로 녹여 사용하였다.

Vero cell과 TCMK-1 cell 을 위한 배지로서 10% heat-inactivated fetal bovine serum, non-essential amino acids, 2 mM glutamine 그리고 streptomycin (100 µg/ml)과 penicillin (100 U/ml)이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM)을 사용하였다. DMEM 배지 및 streptomycin 및 penicillin은 GIBCO (Grand Island, N.Y)사, fetal bovine serum은 Hyclone(Utah, USA)사로부터 구입하였다. 기타 시약들은 필요에 따라 1급 또는 2급 시약을 적절히 선택하여 사용하였다.

단백다당체 β -Immunan 조제

β -Immunan의 조제는 본 연구실에서 보유하고 있는 특허 균주 *Ganoderma lucidum* IY009를 7일간 균사체 배양하여 배양액에 최종 농도가 2N이 되게 NaOH를 가한 후 실온에서 24시간 방치하고 glacial acetic acid(Sigma, USA)로 중화(pH 7.0)시켜 원심 분리하여 세포균체는 제거하고 상층액만 얻었다. 이 상층액을 한외여과막(membrane, M.W. 10kD)을 이용하여 분자량이 10kD이상의 단백다당체를 얻었으며, 이후 1500배의 1차 정수를 첨가하여 한외여과를 행한 후 동결 건조하였다.

β -Immunan 의 신장 세포 보호 효과

β -Immunan의 정상세포에 대한 화학요법제의 독성 경감 효과를 알아 보기 위하여, monkey의 신장 세포인 Vero cell 과 mouse의 신장세포인 TCMK-1 cell를 이용하였는데 두 가지 동물세포주는 모두 정상세포이며, cisplatin의 독성에 민감한 세포들이다. 대조군으로는 cisplatin을 단독 처리하였으며 β -Immunan과 병용으로 처리하였을 경우 나타나는 독성의 감소효과를 MTT 법으로 세포의 생존율로 확인한 것이다. 대조군인 cisplatin의 처리농도는 IC₅₀value를 기준으로 전체 생존율이 10% 정도인 농도를 설정하여 처리하였다.

Cisplatin 에 의한 급성 신부전의 유발

급성 신부전 유발은 Itoh 등[13]과 Sherif 등[26]의 방법을 응용하여 실시하였는데 요약하면 다음과 같다. 실험동물은 대조군인 생리식염수 투여군과 5, 7.5, 10 mg/kg 농도의 cisplatin 투여군 등 총 4군으로 나누어서 복강 투여를 실시하였다. 항암제 투여 3일 후, serum 내의 creatinine과 blood urea nitrogen(BUN)을 측정하기 위하여 ether 마취 후 심장 채혈을 통하여 혈액 sample을 채혈하였다. 채혈된 혈액 sample들은 3,500RPM으로 원심분리를 실시하여 serum을 분리하였다.

Cisplatin에 의해 유발되는 신독성에 대한 β -Immunan 의 효과

Cisplatin에 의한 급성 신부전을 유발하기 위하여 5 mg/kg 농도의 cisplatin을 복강 투여하였으며 투여 1시간 후 β -Immunan 100, 200 mg/kg을 각각 매일 경구 투여하였다. 투여 3일, 7일 후 심장 채혈을 통하여 혈액 sample을 채취하여 serum 내의 creatinine과 blood urea nitrogen(BUN)을 측정하였다. 또한 β -Immunan을 cisplatin 투여 7일 전부터 경구 투여하여 전 투여에 의한 cisplatin에 의한 신독성 유발 감소 효과도 병용 투여와 같은 방법으로 측정하였다.

Cisplatin 반복 투여 시 유발되는 신독성에 대한 β -Immunan 의 효과

Cisplatin의 반복 투여 시 유발되는 신독성을 측정하고자 Choi[6] 등과 Skeel[30]의 투여 스케줄을 응용하여 주 1회, 3주간 복강 투여를 실시하였으며 cisplatin의 1회 투여 농도는 각각 2.5 mg과 3.5 mg/kg으로 하였다. β -Immunan은 100, 200 mg/kg 농도로 매일 경구 투여하였다. 마지막 cisplatin 투여 후 3일 후 심장 채혈을 통하여 혈액 sample을 채취하여 serum 내의 creatinine과 blood urea nitrogen (BUN)을 측정하였고 신장을 실험동물로부터 적출하여 얼음에 냉각 시킨 생리식염수로 세척 후 filter paper로 수분을 제거한 후 무게를 측정하였다.

생화학적 요소의 측정

Cisplatin에 의한 신장독성을 관찰하는데 필수적인 혈청 내 creatinine과 blood urea nitrogen의 농도는 Jaffe's method와 Urease-Indophenol method를 이용하는 WAKO 사의 분석 kit를 사용하여 측정하였다. 신장 조직 내 Malondialdehyde의 측정과 혈청 내 nitric oxide 측정은 OXIS International 사의 kit를 사용하였다.

통계 분석

실험 data는 mean \pm SD로 표기하였으며, SigmaPlot 2001 ver.7.0 (Sigma CO., St. Louis, MO) 프로그램을 이용, student's *t*-test를 실시하여 *p*-value를 구하여 유의성을 검증하였다.

결 과

β -Immunan의 신장세포 보호효과

β -Immunan의 정상세포에 대한 화학요법제의 독성을 줄이는 효과를 알아 보기 위하여, cisplatin과의 병용 투여 시 정상세포에 대한 독성 감소를 측정하였는데 그 결과는 다음과 같이 나타났다. Vero cell에서는 Fig. 1A에서와 같이 β -Immunan 저용량을 cisplatin과 병용 처리하였을 경우 cisplatin 고유의 신장 독성작용을 감소시켜주는 효과가 있는 것으로 나타났는데 저용량으로 처리시에 최대 30%이상의 생존율 증가를 보였다. TCMK-1 cell에서는 Fig. 1B에서와 같이 대조군인 cisplatin 20 μ g/ml농도 처리시의 90%이상이었던 치사율을 β -Immunan의 병용처리로 약 10%정도의 정상세포 보호 효과가 나타났는데 β -Immunan처리시 각 농도 별 유의적인 신장세포 보호 효과가 나타나는 것이 관찰되었다. Vero cell과 TCMK-1 cell 모두에서 β -Immunan를 고농도로 처리 할 때 세포 보호 효과가 낮아지는 현상을 보였지만 유의적인 결과를 얻을 수 있었다.

Rat에서 Cisplatin에 의한 신독성 유발 및 β -Immunan의 효과

Fig. 2에서 보는 것과 같이 cisplatin 5, 7.5, 10 mg/kg을 처리한 군에서 blood urea nitrogen (BUN)과 creatinine 수치가 농도 의존적으로 증가하였다.

Cisplatin 7.5와 10 mg/kg 처리군에서 blood urea nitrogen과

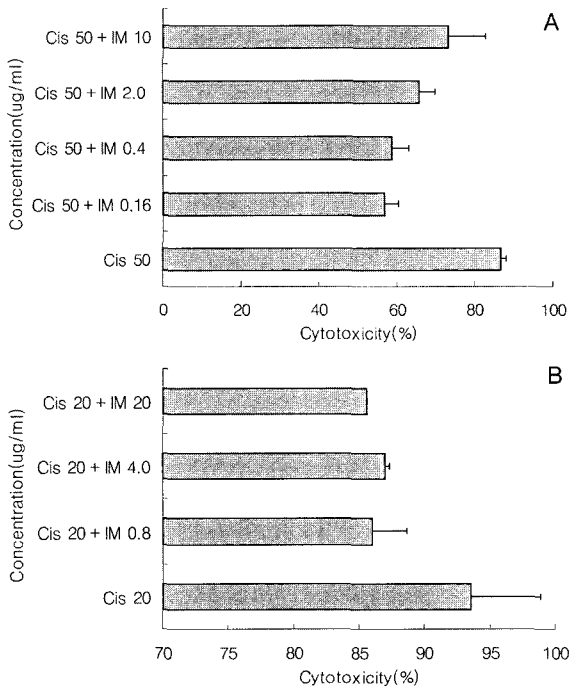


Fig. 1. Effect of β -Immunan against cisplatin-induced cytotoxicity in Vero cell(A) and TCMK-1 cell(B).

creatinine 농도가 대조군 대비 최대 10배정도 증가하였으나 cisplatin 처리 후 두 군 모두에서 실험 동물의 사망이 관찰되었다. 따라서 신독성에 대한 β -Immunan의 효과를 cisplatin 5 mg/kg 처리군에서 측정하였다.

β -Immunan 100, 200 mg/kg을 7일 동안 매일 경구 투여하여 cisplatin에 의해 유발된 혈액 내 BUN과 creatinine 수치를 경감을 측정하였다(Fig. 3).

β -Immunan 100, 200 mg/kg을 투여한 군에서 cisplatin만을 처리한 군과 비교할 때 농도 의존적으로 BUN과 creatinine의 증가가 억제되는 것으로 나타났다. 특히 200 mg/kg 투여군의 BUN과 creatinine의 3일째 수치가 cisplatin 단독 처리한 군의 7일째 수치와 유사하여 현저한 경감 효과를 나타내었다.

β -Immunan 전 투여에 의한 신독성 감소 효과

β -Immunan 100, 200 mg/kg을 cisplatin 투여 7일 전부터 매일 투여하여 신 독성 감소 효과를 측정된 결과, β -Immunan을 cisplatin 투여와 동시에 처리했을 때와 같이 농도 의존적으로 BUN과 creatinine의 수치를 감소시켰다. 이번에도 200 mg/kg 투여군의 BUN과 creatinine 3일째 수치가 cisplatin 단독 처리한 군의 7일째 수치와 유사하여 현저한 경감 효과가 관찰되었다. 그러나 β -Immunan의 cisplatin

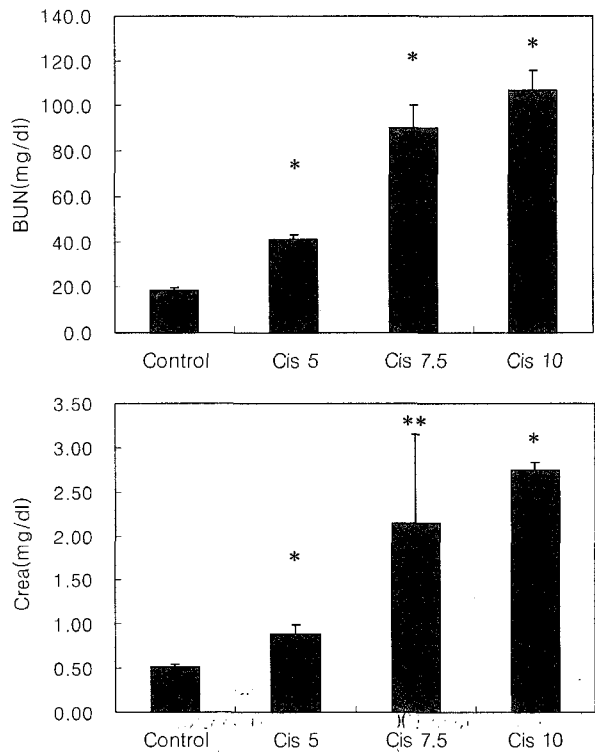


Fig. 2. Dose-dependent renal toxicity induced by cisplatin in rats, as determined by serum levels of blood urea nitrogen and creatinine. *P<0.01 as compared to control **P<0.05 as compared to control.

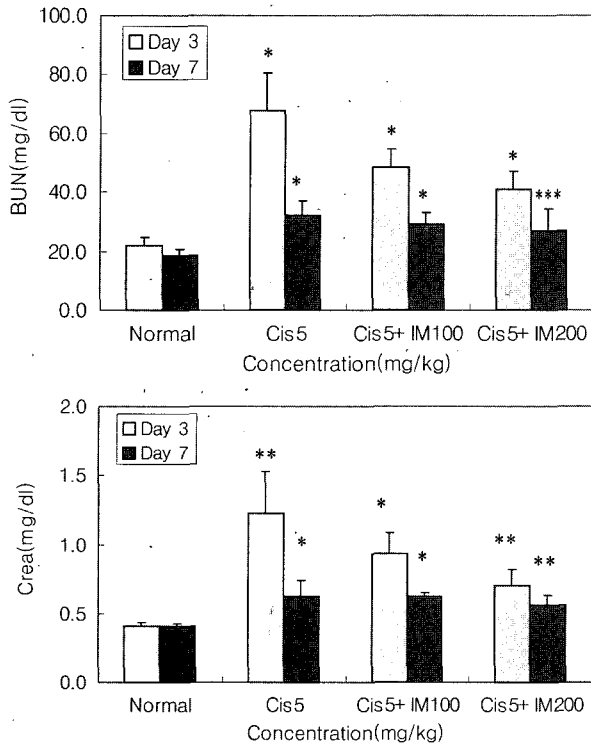


Fig. 3. Dose-dependent protective effect of β -Immunan on cisplatin-induced renal toxicity in rats. Blood urea nitrogen and creatinine were measured at the third and the eighth day after cisplatin injection. *P<0.01 as compared to control **P<0.05 as compared to control ***P>0.05 as compared to control.

병용 투여와 전 투여 시 측정된 혈액학적 지표는 유사한 것으로 나타났다.

Cisplatin의 반복 처리시 β -Immunan 투여에 의한 신독성 감소 효과

Table 1에 cisplatin 2.5 mg과 3.5 mg/kg 농도를 3주간 주 1회 투여할 때 β -Immunan 병용 투여에 의한 신독성 감소효과를 나타내었다. Cisplatin을 단독으로 3회 투여 받은 실험동물의 신장 무게는 cisplatin을 투여 받지 않은 대조군에 비해 35~37%정도 증가한 반면 β -Immunan을 병용 투여한 군

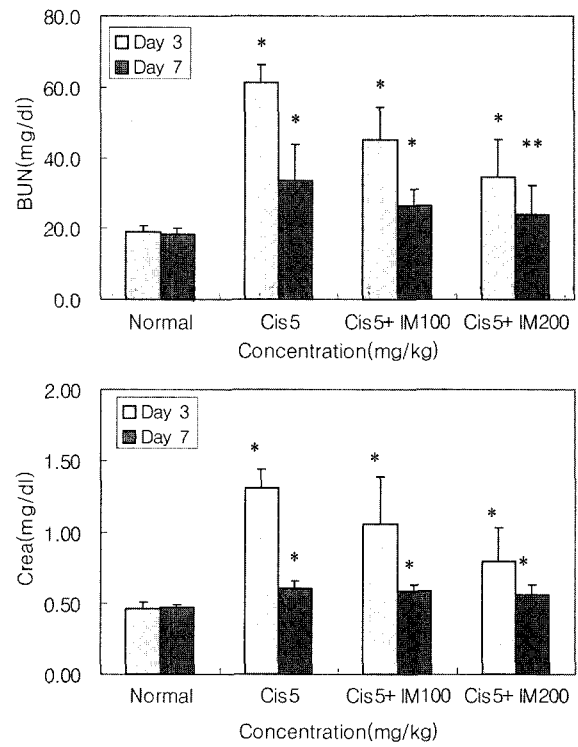


Fig. 4. Protective effect of Pre-administration of β -Immunan on cisplatin-induced renal toxicity in rats. Blood urea nitrogen and creatinine were measured at the third and the eighth day after cisplatin injection. *P<0.05 as compared to control **P>0.05 as compared to control.

은 10~15% 증가하는데 그쳤다. BUN와 creatinine 수치는 cisplatin 단독 처리군 대비 각각 35%와 21%의 감소효과를 나타내었으며 β -Immunan 100 mg/kg 투여군이 200 mg/kg 투여군 보다 신독성 감소 효과가 좋은 것으로 나타났다.

Cisplatin을 2.5 mg, 3.5 mg/kg으로 단독 투여했을 때 두 군 간의 혈액학적 지표는 농도의존적인 증가는 나타내지 않았다.

고찰

Cisplatin은 암환자에게 가장 확실한 치료효과를 나타내는

Table 1. Effects of β -Immunan on cisplatin-induced renal toxicity by the treatment frequency in rats.

Group(mg/kg)	Kidney weight as a % of total body weight	Creatinine(mg/dl)	BUN**(mg/dl)	Nitric oxide (μ mol/ml serum)	MDA(μ M)
Control	0.392 \pm 0.01	0.55 \pm 0.03	16.1 \pm 1.6	18.5 \pm 0.01	2.60 \pm 0.24
Cis* 2.5	0.537 \pm 0.13	0.86 \pm 0.18	38.9 \pm 12.6	26.4 \pm 0.01	3.32 \pm 0.23
Cis 3.5	0.559 \pm 0.11	0.93 \pm 0.26	38.2 \pm 9.5	29.5 \pm 0.02	3.45 \pm 0.25
Cis 2.5+ β -Immunan 100	0.433 \pm 0.03	0.68 \pm 0.02	25.7 \pm 3.8	21.6 \pm 0.01	2.70 \pm 0.41
Cis 2.5+ β -Immunan 200	0.449 \pm 0.07	0.75 \pm 0.08	32.3 \pm 5.3	20.7 \pm 0.01	3.24 \pm 0.34
Cis 3.5+ β -Immunan 100	0.434 \pm 0.06	0.72 \pm 0.09	29.1 \pm 5.6	21.1 \pm 0.01	3.31 \pm 0.26
Cis 3.5+ β -Immunan 200	0.453 \pm 0.02	0.79 \pm 0.09	33.8 \pm 6.4	20.9 \pm 0.01	3.34 \pm 0.22

All values are the mean \pm SD. P<0.05 as compared to control. *cisplatin ** Blood urea nitrogen

항암제이기는 하지만, 치료를 위해 반복 사용하게 되면 치료 기간 중에 신독성(Nephrotoxicity)이 빈번하게 발생한다. 따라서, cisplatin에 의한 신독성은 이 항암제를 사용하는데 제한을 주는 주요한 요소 중의 하나이다. 이러한 결과들은 이전 연구자들에 의해 *in vitro*, *in vivo* system 및 임상시험을 통하여 확인하였다[2, 10, 20, 21, 22, 33].

본 실험에서 cisplatin의 정상세포에 대한 cytotoxicity와 실험동물에 대한 신장 독성 유발을 확인하였으며, 영지 균 사체 추출 단백질인 β -Immunan의 병용 투여에 의한 신장독성 감소 효과를 측정하였다.

원숭이 신장 세포인 Vero cell의 경우는 β -Immunan처리 농도가 2 μ g/ml 이하 인 처리군에서 30%정도의 독성 감소 효과를 보였고, 흰쥐 신장세포인 TCMK-1 cell의 경우는 약 10%정도만 감소 되었다.

Rat를 대상으로 한 실험에서 cisplatin을 고농도로 투여된 경우 실험동물의 사망이 관찰되어 독성이 매우 강한 것으로 생각되며 혈청 내 BUN과 creatinine의 수치도 무처리 대조군과 비교할 때 최소 2배에서 최대 10배정도까지 증가되는 것이 관찰되었는데, 특히, creatinine 수치의 증가는 cisplatin 용량의 증감과 신독성을 줄여 주기 위한 이뇨제의 투여 결정에 중요한 지표인 creatinine clearance와 관련이 있어 항암치료에 중요한 역할을 한다[6, 30].

Cisplatin을 단회 투여했을 때 β -Immunan을 병용 투여하면 BUN과 creatinine의 수치가 농도 의존적으로 cisplatin만을 단독 투여 받은 군보다 최대 40~45%정도 낮은 수치를 나타냈다. 그러나 Choi[6] 등과 Skeel[30]의 임상 투여 스케줄을 실험 동물에 응용하여 cisplatin을 총 3회 반복 투여 했을 때는 β -Immunan 100 mg/kg 투여군에서 신독성 감소 효과가 좋은 것으로 나타났다. 이는 cisplatin 투여로 신장 조직의 근위세뇨관의 괴사, 팽창 등이 발생하고, 원위세뇨관과 집합관에서의 급성 병변과 수반되어 사구체 여과율 감소가 발생하는데 [8, 25] 이 때 신장의 체중대비 중량이 증가하고 혈청 내의 BUN와 creatinine 수치도 증가하는 것으로 알려져 있다[23]. 본 실험에서도 신장의 체중대비 중량이 증가할 때 혈청 내의 BUN와 creatinine 수치 역시 증가를 나타내었는데 신장기능의 저하가 발생한 실험동물에게 고농도 β -Immunan의 투여는 오히려 부담으로 작용한 것으로 사료된다.

Cisplatin에 의한 신독성의 기전을 밝히려는 많은 연구에도 불구하고 그 정확한 기전은 아직 확실히 밝혀지지 않았으나 여러 가지 가능성이 제시되고 있다. 신혈류의 감소에 의한 신부전이 발생할 수 있으며[36], 신세뇨관에 고농도로 농축된 cisplatin이 생전환(biotransformation)되면서 세포의 기능장애와 손상을 초래하고 이로 인한 세뇨관의 폐쇄와 역류출이 발생하여 신부전을 일으킬 수 있다[39]. 한편, cisplatin이 활성 산소종(Reactive Oxygen Species: ROS)을 생성하고 항산화 효소의 활성 감소로 인하여 신장 조직에 산화적 손상을 줌으로서 독성을 나타내며 항산화제를 사용함

으로써 독성을 감소시킬 수 있다는 주장도 있다[1, 4, 13, 14, 24, 32, 34, 35]. 이에 본 실험에서도 cisplatin을 반복 투여할 때 지질과산화의 지표인 malondialdehyde(MDA)의 농도와 혈청 내 nitric oxide의 변화를 측정하였는데 MDA의 농도는 β -Immunan 100 mg/kg 투여군에서 유의할 만한 감소 효과를 관찰할 수 있었다.

따라서 β -Immunan이 실험 결과에서와 같이 cisplatin 투여에 의한 신독성을 유의성 있게 감소시키는 효과가 있음을 확인하였으며, β -Immunan의 투여 농도는 실험 동물을 이용한 cisplatin의 단회 및 일반 처치 스케줄에 따른 반복 투여에 의한 신독성 감소효과의 결과에서 나타난 바와 같이 100 mg/kg 농도로 일정기간 매일 투여하는 것이 신독성을 줄이는 조건으로 사료된다. 그러나 신독성 등의 항암제 부작용 감소 효과와 면역 증강 및 항암능을 동시에 갖는 β -Immunan 투여의 최적 조건(투여량, 투여 시기 등) 그리고 β -Immunan이 신독성 감소 효과를 나타나게 하는 작용 기전에 대한 것은 추가적인 실험이 필요할 것으로 생각된다.

REFERENCES

1. Antunes, G. L. M., J. D. Darin, and M. D. Bianchi. 2000. Protective effects of vitamin C against cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in adult rats: a dose-dependent study. *Pharmacol. Res.* **41**: 405-411.
2. Arany, I. and L. S. Robert. 2003. Cisplatin nephrotoxicity. *Semin. in Nephrol.* **23**: 460-464.
3. Baek, S. J., Y. S. Kim, H. M. Yong, J. B. Chae, H. M. Yun, D. W. Park, D. Y. Kim, J. O. Lee, J. W. Lee, and S. K. Park. 2001. Antitumor activities of the proteoglycans from the mycelium of *Ganoderma lucidum* IY009. *Yakhak Hoeji* . **45**: 641-649.
4. Choi, H. J., Y. H. Shin, K. C. Moon, D. G. Song, I. C. Kim, S. H. Seo, C. S. Kwak, E. J. Chang, and H. C. Kim. 2004. protective effect of melatonin on the nephrotoxicity by cisplatin. *Kor. J. Nephrol.* **23**: 205-212.
5. Choi, Y. H., K. S. Shon, K. U. Lee, H. Y. Lee, S. Y. Kim, Y. T. Shin, H. K. No, and B. H. Lee. 1987. a study of cisplatin nephrotoxicity. *Kor. J. Inter. Med.* **32**: 410-415.
6. Choi, K. U. and J. E. Ha. 2004. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of chemotherapeutic agent, pp 26-29. 4th ed. Koonja Press, Korea.
7. Choie, D. D., D. S. Longnecker, and A. A. del Campo. 1981. Acute and chronic cisplatin nephropathy in rats. *Lab Invest.* **44**: 397-402.
8. Cronin, R. E. and J. A. Newman. 1985. Protective effect of thyroxine but not parathyroidectomy on gentamicin Nephrotoxicity. *Am. J. Physiol.* **248**: F332-339.
9. Dobyan, D. C., J. Levi, C. Jacobs, J. Kosek, and M. W. Weiner. 1980. Mechanism of cis-platinum nephrotoxicity: II. Morphologic observation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **213**: 551-556

10. Fillastre, J. P. and G. R. Viotte. 1989. Cisplatin nephrotoxicity. *Toxicol. Lett.* **46**: 163-175.
11. Han, M. D., J. W. Lee, H. Jeog, Y. S. Kim, S. J. Na, and K. H. Yoon. 1999. Nitric oxide, TNF- α and TGF- β formation of rat kupffer cell activated by the β -glucan from *Ganoderma lucidum*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 28-34.
12. Harder, H. C. and B. Rosenberg. 1970. Inhibitory effects of antitumor platinum compounds with DNA, RNA and protein synthesis in mammalian cells *in vitro*. *Int. J. Cancer* **6**: 207-216.
13. Itoh, K., S. Kuniyoshi, K. Mishima, K. Makino, Y. Tsuruya, H. Hirakata, and R. Oishi. 2002. Protection by a radical scavenger edaravone against cisplatin-induced Nephrotoxicity in rats. *Eur. J. Pharm.* **451**: 203-208.
14. Kadikoylu, G., Z. Bolaman, S. Demir, M. Balkaya, N. Akalin, and Y. Enli. (2004) The effects of desferrioxamine on cisplatin-induced lipid peroxidation and the activities of antioxidant enzymes in rat kidneys. *Hum Exp Toxicol.* **23**, 29-34 (2004)
15. Knox, R. J., F. Friedlos, D. A. Lydall, and J. J. Roberts. 1986. Mechanisms of cytotoxicity of anticancer agents: evidence that *cis*-diaminedichloroplatinum (II) and *cis*-diamine (1,1-cyclobutanecarboxylato) platinum (II) differ only in the kinetics of their interaction with DNA. *Cancer Res.* **46**: 1972-1979.
16. Kwon, J. M., J. S. Park, M. W. Ha, and W. W. Kim. 1990. Effects of methotrexate alone and with *Ganoderma lucidum* on hematologic finding of rat. *Kor. J. Obstetr. Gynecol.* **33**: 521-527
17. Lakshmi, B., T. A. Ajith, N. Sheena, N. Gunapalan, and K. K. Janardhanan. 2003. Antiperoxidative, anti-inflammatory, and antimutagenic activities of ethanol extract of the mycelium of *Ganoderma lucidum* occurring in south india. *Tera. Carcino. Mutagen. Suppl.* **1**: 85-97.
18. Surh, Y. J., J. M. Lee, H. J. Kwon, H. Jeong, J. W. Lee, S. Y. Lee, and S. J. Baek. 2001. Inhibition of lipid peroxidation and oxidative DNA damage by *Ganoderma lucidum*. *Phytother. Res.* **15**: 245-249.
19. Lee, J. W., H. Jeog, M. D. Han, S. J. Baek, Y. S. Kim, and S. M. Kang. 1996. Effect of G009 on CCl₄ - induced hepatic injury and lipid peroxidation in rats. *Kor. J. Pharmacol.* **27**: 159-166.
20. Lieberthal, W., V. Triaca, and J. Levine. 1996. Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: apoptosis vs necrosis. *Am. J. Physiol.* **270**: F700-708.
21. Minoru, K., T. Hideto, Y. Masayuki, H. Yoji, H. Shun, T. Akihiko, F. Akio, and K. Eiji. 2000. Effects of dosing time and schedule on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* **52**: 1233-1237.
22. Montine, T. J. and R. F. Borch. 1988. Quiescent LLC-PK1 cells as a model for nephrotoxicity and modulation by thiol rescue agents. *Cancer Res.* **48**: 6017-6024.
23. Park, Y. H., J. O. Kim, and S. M. Shin. 1994. Effect of thyroxine on cisplatin-induced nephrotoxicity. *Kor. J. Nephrol.* **13**: 42-52.
24. Rao, M., M. K. Mavinekere, and A. R. Mysore. 1999. *In vitro* and *in vivo* effects of phenolic antioxidants against cisplatin-induced nephrotoxicity. *J. Biochem.* **125**: 383-390.
25. Safirstein, R., P. Miller, S. Dikman, N. Lyman, and C. Shapiro. 1981. Cisplatin nephrotoxicity in rats: defect in papillary hypertonicity. *Am. J. Physiol.* **241**: F175-F185.
26. Sherif, Y. S., A. O. N. Tawreeg, M. N. Ayman, and C. A. Ammar. 2001. Effects of gemcitabine on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats: Schedule-dependent study. *Pharm. Res.* **43**: 193-198.
27. Shiao, M. S. 2003. Natural products of the medicinal fungus *Ganoderma lucidum*: occurrence, biological activities, and pharmacological functions. *Chem. Record.* **3**: 172-180.
28. Sissi, W. G., Y. T. Szeto, B. Tomlinson, and I. FF. Benzie. 2004. *Ganoderma lucidum* ('Lingzhi'); acute and short-term biomarker response to supplementation. *Intern. J. Food sci. Nutri.* **55**: 75-83.
29. Sissi, W. G., Y. T. Szeto, B. Tomlinson, and I. FF. Benzie. 2004. *Ganoderma lucidum* ('Lingzhi'), a Chinese medicinal mushroom: biomarker responses in a controlled human supplementation study. *British J. Nutri.* **91**: 263-269.
30. Skeel, R. T. 1999. Handbook of cancer chemotherapy, pp 89-91. 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins Press, Philadelphia, U.S.A.
31. Sliva, D. 2003. *Ganoderma lucidum* (Reishi) in cancer treatment. *Integ. Cancer Thera.* **2**: 358-364.
32. Suleyman, O., A. Omer, I. Mustafa, S. Sadik, O. Fikret, O. Huseyin, O. Ersan, and Y. Zeki. 2004. Role of caffeic acid phenethyl ester, an active component of propolis, against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *J. Appl. Toxicol.* **24**: 27-35.
33. Tay, L. K., C. L. Bregman, B.A. Masters, and P. D. Williams. 1988. Effects of *cis*-diaminedichloroplatinum (II) on rabbit kidney *in vivo*: and on rabbit renal proximal tubule cells in culture. *Cancer Res.* **48**:2538-2543.
34. Tsutsumishita, Y., T. Onda, K. Okada, M. Takeda, H. Endou, S. Futaki, and M. Niwa. 1998. Involvement of H₂O₂-production in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **242**: 310-312.
35. Vermeulen, N. P. E. and G. S. Baldew. 1992. The role of lipid peroxidation in the nephrotoxicity of cisplatin. *Biochem. Pharmacol.* **44**: 1193-1199.
36. Wilson, D. R., P. E. Arnold, T. J. Burke, and R.W. Schrier. 1984. Mitochondrial calcium accumulation and respiration in ischemic acute renal failure in the rat. *Kidney Int.* **25**: 519-526.
37. You, Y. H. and Z. B. Lin. 2002. Protective effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides peptide on injury of macrophages induced by reactive oxygen species. *Acta. Pharmacol. Sin.* **23**: 787-791.
38. Yun, T. K. and Y. S. Lee. 1993. Effects of *Ganoderma lucidum* on Mouse Pulmonary Adenoma Induced by Benzo(a) pyrene. *J. Kor. Cancer. Associ.* **25**: 531-538.
39. Zwelling, L. A. and K. W. Kohn. 1979. Mechanism of action of *cis*-diamminedichloro-platinum (II). *Cancer Treat. Rep.* **63**: 1439-1444.

(Received May 28, 2004/Accepted Sep. 6, 2004)