

꽃송이버섯 추출물의 항염활성 효과

최우석¹, 신평균², 유영복², 노형준³, 김군도^{1*}

¹부경대학교 자연과학대학 미생물학과, ²농촌진흥청 국립원예특작과학원 버섯과,

³농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부

Anti-inflammatory effects of *Sparassis crispa* extracts

Woo-Suk Choi¹, Pyung-Gyun Shin², Yoo Young Bok², Noh Hyung Jun³ and Gun-Do Kim^{1*}

¹Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Pukyong National University, Busan 608-737, Republic of Korea

²Mushroom Research Division, National Institute of Horticultural & Herbal Science, Rural Development Administration, Eumseong 369-874, Republic of Korea

³Department of Herbal Crop Research, National Institute of Horticultural & Herbal Science, Rural Development Administration, Eumseong 369-873, Republic of Korea

ABSTRACT: *Sparassis crispa* is a medicinal mushroom, which has been reported to have anti-cancer effect. In this study, we designed to investigate the effects of *Sparassis crispa* extracts on the production of nitric oxide (NO) in LPS-stimulated RAW264.7 cells. The pre-treatment of the extracts prior to add LPS in RAW264.7 cells suppressed NO production and iNOS expression at protein and mRNA levels. The phosphorylation of I κ B α was inhibited by the extracts, which was induced through suppressing the activation of NF- κ B. *Sparassis crispa* extracts showed the effect on the down-regulation of STAT-1 activation in a dose-dependent manner. In LPS-stimulated RAW264.7 cells, NF- κ B was translocated into the nucleus, while the treatment of *Sparassis crispa* extracts induced to sequestered NF- κ B in the cytosol. These experimental results determined that *Sparassis crispa* extracts play a inhibitory role in inflammatory reactions via regulating NO production, which suggests potential as a component of inflammatory drugs.

KEYWORDS :

서 론

전통적으로 버섯은 다양한 질병에 대처하기 위해 약용재료로 이용되어 왔다. 특히 최근 연구에 버섯추출물은 phenolic acid계열의 성분들을 함유하여 항산화 (Guillamon 등, 2010), 항암 (Moradali 등, 2007), 항균 (Barros, 2007), 항염증 (Andrej 등, 2011)에 효과적인 것으로 나타났다. 다양한 식용 또는 약용버섯들 중, 특히 꽃송이버섯 (*Sparassis crispa*)은 β -1,3-D-glucan을 함유하고 있으며, 이로 인해 항염활성을 촉진시키는 것으로 보고되었고, 신생혈관 생성억제와 전이를 억제하여

암세포의 미세환경 조성을 저해하는 것으로 밝혀졌다(Kim 등, 2010, Yamamoto 등, 2009). β -1,3-D-glucan은 면역세포 중 하나인 수지상세포의 분화를 촉진하여 면역반응 및 항암활성을 유도한다 (Kim 등, 2010). 꽃송이버섯은 또한 진성 당뇨병에서 나타나는 상처회복 능력이 저해되는 현상을 회복하는데 도움을 주는 것으로 보고되었다 (Kwon 등, 2009). 꽃송이버섯에는 β -1,3-D-glucan과 더불어 다양한 phenolic compound가 많이 함유되어 있는데, 그중 veratric acid 등의 benzoic acid 계열의 성분이 다른 약용 버섯에 비해 많이 함유된 것으로 보고되었다 (Kim 등, 2008). Benzoic acid 계열 중 하나인 veratric acid는 항

* Corresponding author: Gun-Do Kim

Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Pukyong National University, 45 Yongso-ro, Nam-gu, Busan 608-737, Republic of Korea

E-mail: gundokim@pknu.ac.kr

산화 기작과 더불어, 인위적으로 고혈압이 유도된 마우스에게 veratric acid를 경구투여 하였을 때, nitric oxide (NO)의 농도는 증가시키고, 산화 스트레스를 감소시켜 혈압을 조절하는 것으로 나타났다 (Raja 등, 2011).

염증 반응이란 감염 및 트라우마, 조직손상 등에 대한 보호 기작으로서, 혈관 투과성을 높여 면역 세포들이 손상 부위에 접근성을 높여 회복을 돕는 것을 목적으로 한다. 면역 세포들은 NO 및 prostaglandin E₂, pro-inflammatory cytokines의 생성을 통해 염증반응을 촉진시킨다 (Yoon 등, 2009). 다양한 염증 유도 인자 중, NO는 inducible nitric oxide synthase (iNOS)에 의해 생성되며, 자극을 받지 않은 세포에서는 발현되지 않지만, cytokines이나 감염 등에 의해 대식세포, 간세포, 근육세포 등에서 발현될 수 있다. 특히, 대식세포의 경우 iNOS의 발현을 위해 LPS가 요구된다 (Aktan 등, 2004, Farlik 등, 2010). NO는 염증을 촉진시킬 뿐 만 아니라, 완하시키는 역할도 수행한다. Pro-inflammatory cytokines의 과도한 발현은 정상조직의 손상과 면역시스템의 교란을 유도하는데, NO가 생성됨으로써 세포신호 전달체계는 pro-inflammatory cytokine 유전자의 전사를 억제하도록 전환된다 (Laskin 등, 1995, Walley 등, 1999).

꽃송이버섯의 추출물인 항암효과에 대해서는 많은 연구가 이루어졌으나, 항염증반응의 유도 및 세부적인 효과에 대해서는 보고되지 않았다. 따라서, 꽃송이버섯 추출물의 항염증반응을 확인하고자, 마우스 대식세포인 RAW264.7 cell에 LPS를 처리하여 꽃송이버섯 추출물의 NO 생성에 관련되어 있는 iNOS 및 전사인자들의 발현 조절을 확인하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 추출물 조제

꽃송이버섯(*Sparassis crispa*)을 80% 메탄올로 24시간 추출 후 상등액을 여과지로 걸러 감압농축 후 농도별로 희석하여 사용하였다.

세포 배양

마우스 대식세포 RAW264.7, human embryonic kidney (HEK) 293, human keratinocyte (HaCaT) 세포는 American Tissue Culture Collection에서 분양받은 세포주를 사용하였다. BV-2 microglia는 동의대학교 면역제어공학 실험실로부터 분양받아 이용하였다. 모든 세포는 10% FBS, 1% penicillin (100 U/ml)/streptomycin (100 µg/ml)을 첨가한 DMEM (Cellgro Mediatech, Manassas, VA, USA) 배지를 이용하여 37°C에서 5% CO₂와 95% air가 함유된 습한 대기 조건에서 배양하였다.

꽃송이버섯 추출물의 세포독성 측정

꽃송이버섯 추출물의 세포독성 측정은 WST-1 (Daeil Lab Service, Seoul, Korea)을 이용한 세포 증식 측정법은 사용하였고, 각각의 세포들은 1 × 10⁵ cells/well로 96-well plate에 분주하였다. 세포를 12시간 배양한 후, 꽃송이버섯 추출물의 최종농도 50 및 100, 150, 200 µg/ml이 되도록 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 24시간 배양 후, 배지를 교체하고, WST-1을 1 µl/well로 첨가하고 3시간동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. 3시간 반응이 끝나면, microplate reader (Molecular Devices, Sunnydale, CA, USA)를 이용하여 460 nm에서 OD를 측정하였다.

꽃송이버섯 추출물의 NO 생성 저해 효과 측정

RAW264.7 세포를 24 well plate에 5 × 10⁵ cell/well로 분주하고 12시간 배양 후 꽃송이버섯 추출물의 최종농도를 50 및 100 µg/ml로 1시간 전처리 한 다음 LPS 1 µg/ml를 처리하여 24시간 배양하였다. 배양 후 상층액에서 분비된 NO생성량을 Griess reagent (Sigma, St. Louis, MO, USA)와 상층액을 1:1 비율로 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 540nm에서 OD를 측정하였다.

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)을 이용한 iNOS의 mRNA 발현 분석

LPS 단일처리 군과 LPS와 꽃송이버섯 추출물 복합처리군으로 배양한 RAW264.7세포에서 발현된 iNOS의 mRNA를 측정하기 위해 RT-PCR을 수행하였다. Total RNA는 2-mercaptoethanol (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 이용하여 분리하였다. 분리된 Total RNA의 reverse transcription을 위하여 MIMLV reverse transcriptase를 이용하여 cDNA를 합성하였고, 합성된 cDNA를 이용하여 iNOS와 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 해당 primer를 사용하여 PCR기법으로 증폭시켰다. iNOS의 primer는 forward 5'-ATG-TCC-GAAGCA-AAC-ATC-AC-3' 과 reverse 5'-TAA-TGT-CCA-GGA-AGT- AGG-TG-3', GAPDH의 primer는 forward 5'-AGG-CCG-GTG-CTG-AGTATG-TC-3' 와 reverse 5'-TGC-CTG-CTT-CAC- CAC-CTT-CT-3'를 이용하였다. 증폭된 PCR 생성물은 agarose gel에 electrophoresis를 이용하여 확인하였다.

Western blot을 이용한 iNOS의 단백질 발현 분석

RAW264.7 세포는 LPS 단독 처리한 군과 꽃송이버섯 추출물과 LPS의 복합처리한 군으로 배양하였다. 배양된 세포는 lysis buffer (50 mM Tris-Cl [pH7.5], 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.5% NP-40, 1% Triton X-100, 1% deoxycholate, 0.1% SDS and a cocktail of proteinase inhibitors [1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 1 µM aprotinin, 1 µM leupeptin, and 1 µM pepstatin A

(Intron Biotechnology, Gyeonggi, Korea)]를 이용하여 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질은 12% SDS-PAGE를 이용하여 분획한 후, nitrocellulose membrane (Pall Life Sciences, Ann Arbor, MI, USA)에 옮겼다. Membrane은 5% skim milk를 첨가한 PBST (135 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM NaPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄, and 0.5% Tween-20)에 1시간동안 처리하고, iNOS와 GAPDH에 해당하는 primary antibody를 첨가하여 4°C에서 12시간 반응하였다. Primary antibody가 처리된 membrane은 HRP가 부착된 anti-rabbit IgG (Cell signaling Technology Inc., Beverly, MA, USA)를 첨가하여 1시간동안 배양하였다. Anti-rabbit IgG와 반응한 단백질들은 enhanced chemiluminescent (ECL) detection solution (Pierce, Rockford, IL, USA)를 이용하여 확인하였다. 분석에 이용된 primary antibody는 모두 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서 구입하였다.

Immunofluorescent microscopy

RAW264.7 세포를 coverslip bottom dish에 24시간동안 배양한 후, *Sprassis crisp* extracts를 첨가 또는 불첨가하여 1시간동안 반응시키고, LPS를 처리하여 3시간동안 반응시킨다. LPS와의 반응 후, DAPI를 첨가하여 상온에서 15분 반응을 시키고 4% 포름알데하이드를 처리하여 15분 그리고 5% rabbit normal serum을 처리하고 1시간동안 고정시킨다. 고정 과정이 완료된 세포는 NF- κ B에 대한 primary antibody를 처리하고 4°C에서 24시간동안 반응시키고, Alexa Fluor 488이 부착된 anti-rabbit IgG를 1시간동안 처리하였다. 세포는 Prolong Antifade Reagent (Invitrogen, Eugene, OR, USA)를 처리한 후 Nikon ECLIPS 50i 현미경을 이용하여 관찰하였다. 푸른색과 초록색의 형광이미지를 합치기 위해 High-Content Analysis Software (Cambridge Healthtech Institute, Needham, MA, USA)를 이용하였다.

통계학적 분석

통계처리는 Graphpad prism 5.0을 이용하였으며 Control 군과 LPS가 처리된 group은 *t-test*를 이용하여 분석하였고, LPS 단일처리 군 및 추출물과 LPS 복합처리 군은 ANOVA post hoc test와 Dunnett's multiple comparison test를 이용하여 분석하였다. 모든 실험은 각 실험군 당 3개의 샘플을 적용하였고, 총 3회에 걸쳐 분석되었다.

결과 및 고찰

꽃송이버섯 추출물의 세포생존율에 미치는 영향

꽃송이버섯 추출물의 세포독성을 RAW264.7 및 BV-2, HEK293, HaCaT 세포에서 확인한 결과, 그림 1과 같이 모든 처리군에서 특징적인 세포 생존율 변화는 관찰되지 않았다.

꽃송이버섯 추출물의 NO 저해능

염증반응에서 과도하게 생성된 NO는 염증 유발 인자의 생성을 더욱 촉진시켜 염증성 질환의 원인이 되므로, 염증반응에서 NO의 조절은 매우 중요하다 (Cirino 등, 2006). 약용버섯으로 잘 알려진 상황버섯의 추출물을 LPS에 의해 자극된 RAW264.7 cell에 처리하였을 때, NO 생성이 감소되었다 (Kim 등, 2007). 꽃송이버섯 추출물의 NO 저해능을 측정된 결과 그림 2와 같이 LPS를 처리한 RAW264.7, BV-2세포는 NO의 생성이 대조군보다 증가하였으나, 꽃송이버섯 추출물의 처리 농도가 높아질수록 NO의 생성량도 줄어드는 것을 확인할 수 있다.

꽃송이버섯 추출물의 iNOS 단백질과 mRNA 발현 조절 효과

NO는 iNOS의 발현에 의해 생성되므로 NO 생성을 제어하기 위해서는 iNOS의 발현 조절이 요구된다 (Cirino 등, 2006). 상황버섯의 추출물 또한 iNOS를 단백질 수준에서 조절하여 NO 생성을 조절하는 것으로 나타났다 (Kim 등, 2007). 꽃송이버섯 추출물에 의해 NO의 생성이 억제되는 결과를 바탕으로 NO를 생성하는 단백질인 iNOS의 발현이 조절되는지 단백질과 mRNA 수준에서 확인하였다. 그림3에서 확인할 수 있듯이 LPS 1 μ g/ml을 처리한 RAW264.7 cell과 BV-2 세포는 iNOS의 발현이 증가함을 확인할 수 있다. 하지만 꽃송이버섯 추출물을 전처리 하였을 때, iNOS의 발현이 감소하며, 농도가 증가함에 따라 더욱 감소하는 것을 확인할 수 있다. iNOS의 발현은 단백질에서 뿐만 아니라 mRNA 수준에서도 조절됨을 확인할 수 있다. 따라서, Schmidt 등과 Lee 등의 RAW264.7과 BV-2에서의 iNOS 조절은 NO 생성을 조절한다는 결과와 일치하며, 꽃송이버섯 추출물의 농도에 따라 iNOS의 발현이 단백질과 mRNA 수준에서 조절됨을 확인할 수 있다.

꽃송이버섯 추출물의 iNOS 전사인자 활성화조절 효과

꽃송이버섯 추출물이 처리된 세포의 iNOS의 mRNA 발현량은 LPS에 처리되었을 때보다 감소하였음을 확인하였다. iNOS 유전자의 promoter에는 전사인자인 NF- κ B와 STAT-1이 결합할 수 있으며, mRNA의 발현 감소는 전사인자 억제에 의한 결과로 나타날 수 있다 (De Stefano 등, 2006, Xie 등, 1994). iNOS의 전사인자인 NF- κ B와 STAT-1의 인산화를 확인하여 활성화 정도를 측정하였다. 그림 4에서 인산화된 NF- κ B와 STAT-1는 LPS 처리에 의해서 증가하였지만, 꽃송이버섯 추출물의 처리에 의해 감소하였고, 농도 의존적인 감소를 보였다. NF- κ B는 억제인자인 I κ B α 와의 결합으로 활성이 저해되는 것으로 알려져 있으며, I κ B α 는 인산화 되었을 때 NF- κ B로부터 분리되어 분해되는 것으로 보고되었다 (Gomez 등, 2005). 꽃송이버섯 추출물이 처리되었을 때 I κ B α 의 인산화 또한 감소하였다. RAW264.7 cell에서 LPS에 의해 활성화된 NF- κ B는 상황

버섯 추출물에 의해 감소되었으며, 이 결과는 본 실험의 결과와 일치한다. 따라서 꽃송이버섯 추출물은 iNOS의 전사인자인 NF-κB와 STAT-1의 활성화 감소와 IκBα의 NF-κB 억제능 향상을 통하여 iNOS 유전자의 전사과정을 저해하는 것으로 나타났다.

꽃송이버섯 추출물에 의한 NF-κB의 세포내 위치전환 억제 효과

NF-κB가 활성화되면 세포질에서 핵 내부로 이동하여 iNOS 유전자의 promoter에 결합하게 된다 (Liang 등, 1999). 따라서, NF-κB가 핵 내부로의 이동성이 저해된다면 iNOS 유전자의 발현 또한 감소하는 결과가 나타난다. 그림5의 결과를 보면 LPS만 처리한 RAW264.7 세포에서는 NF-κB가 핵 내부로 이동하여 푸른색으로 염색된 핵이 거의 보이지 않는다. 하지만 꽃송이버섯 추출물을 처리한 RAW264.7 세포에서는 NF-κB는 세포질에만 위치하며, 푸른색으로 염색된 핵의 형태도 확연히 구분된다. 따라서, 꽃송이버섯 추출물은 NF-κB의 핵 내부로의 이동을 억제하였으며, 이로 인해 iNOS 유전자 발현이 저해되었음을 확인할 수 있다. 상황버섯의 추출물을 LPS에 의해 자극된 RAW264.7 cell에 처리하였을 때, NF-κB의 인산화가 감소하였고, 이는 NF-κB의 위치전환이 약화되었음을 확인하였다 (Park 등, 2004).

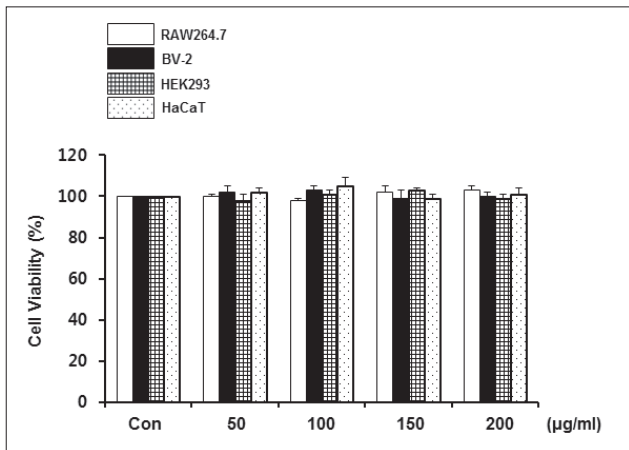


Fig. 1. Cytotoxicity of *Sparassis crispa* extracts in RAW264.7, BV-2, HEK293, and HaCaT. The cells were treated with *Sparassis crispa* extracts at the concentration of 50, 100, 150 and 200 µg/ml for 24 h. After incubation, *Sparassis crispa* extracts-treated cells were reacted with WST-1. Con; Control

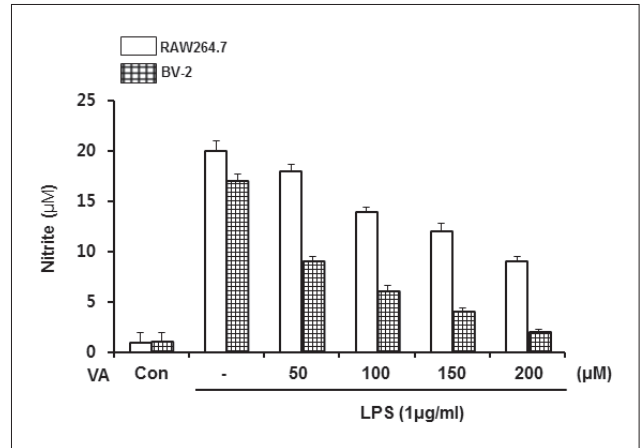


Fig. 2. The effect of *Sparassis crispa* extracts on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 and BV-2 cells. The cells were treated with *Sparassis crispa* extracts for 1 h prior to LPS stimulation for 24 h. NO in supernatant of incubated cells was measured by the reaction with Griess reagent. Con; Control

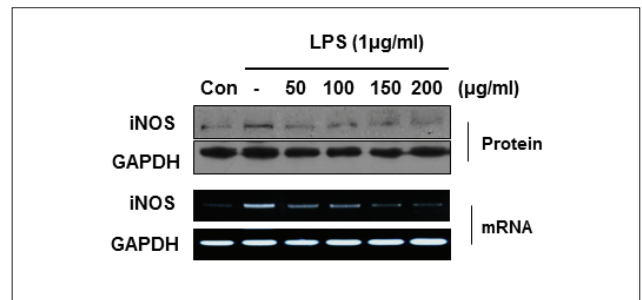


Fig. 3. The effect of *Sparassis crispa* extracts on iNOS expression in LPS-stimulated RAW264.7 cells. The cells were treated with *Sparassis crispa* extracts for 1 h before adding LPS for 24 h. Western blot analysis and RT-PCR were performed to detect iNOS at the level of protein and mRNA, respectively. Con; Control

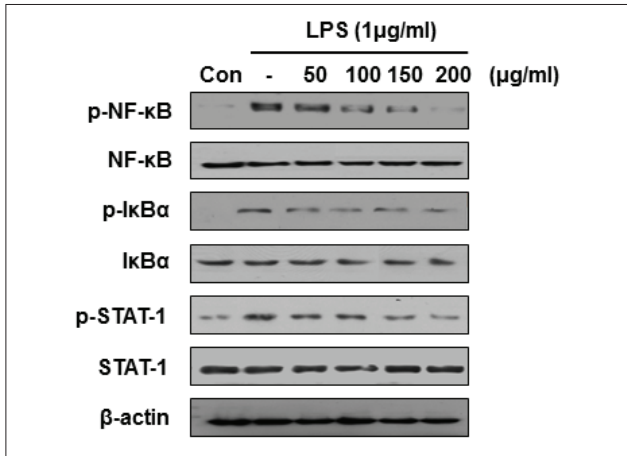


Fig. 4. The inhibition of phosphorylation of transcription factors, including NF-κB, IκBα, and STAT-1, by *Sparassis crispa* extracts in LPS-stimulated RAW264.7 cells. The cells were treated with *Sparassis crispa* extracts for 1 h before adding LPS for 3 h. The expression of proteins were measured by Western blot analysis. Con; Control

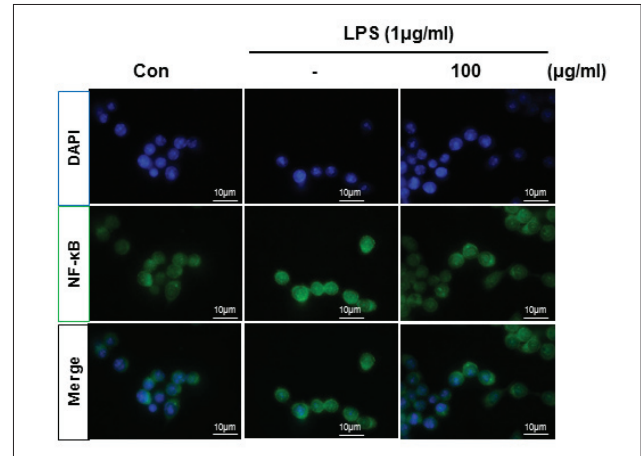


Fig. 5. The inhibitory effect of *Sparassis crispa* extracts on the translocation of NF-κB in LPS-stimulated RAW264.7 cells. The cells were treated with *Sparassis crispa* extracts for 1 h before adding LPS for 3 h. NF-κB was visualized by the attachment of anti-rabbit IgG tagged with Alexa Fluor 488. The nucleus was stained with DAPI. Con; Control

적 요

꽃송이버섯 추출물은 염증반응 시 유도되는 NO 생성을 저해하는 활성이 있는 것으로 나타났으며, 200 μg/ml의 꽃송이버섯 추출물을 처리하였을 때 NO 저해능이 최대 효과를 보였고 RAW264.7 cell에서는 대조군과 유사한 수준으로 NO 생성을 억제하였다. 이러한 NO 생성의 저해는 iNOS의 발현이 감소한 것에 의한 결과임을 단백질과 mRNA의 발현량 변화를 통하여 확인하였으며, mRNA 발현 변화는 iNOS 유전자의 전사를 담당하는 전사인자인 NF-κB와 STAT-1의 활성감소에 의한 결과임을 western blot을 통하여 확인하였다. 특히, NF-κB의 활성감소는 IκBα의 활성증가에 의한 NF-κB의 억제능 향상에 의한 것임을 확인하였고, 활성억제된 NF-κB가 핵 내부로의 이동이 저해되면서 iNOS 유전자 발현에 영향을 미친 것임을 확인하였다. 그러므로, 꽃송이버섯 추출물은 NO 저해능을 이용한 항염증소재로서 염증성질환의 완화에 도움이 될 것으로 사료된다.

참고문헌

- Aktan, F. 2004. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation, *Life Sciences* **75**: 639-653.
- Andrej, J., Shailesh, D., Qing-li, W., James, S. and Daniel, S. 2011. Anti-inflammatory activity of edible oyster mushroom is mediated through the inhibition of NF-κB and AP-1 signaling, *Nutr. J.* **10**: 52.
- Barros, L., Baptista, P., Estevinho, L. M. and Ferreira, I.C.F.R. 2007. Effect of fruiting body maturity stage on chemical composition and antimicrobial activity of *Lactarius* sp. mushrooms, *J. Agr. Food Chem.* **55**: 8766-8771.
- Cho, S. Y., Park, S. J., Kwon, M. J., Jeong, T. S., Bok, S. H., Choi, W. Y., Jeong, W. I., Ryu, S. Y., Do, S. H. and Lee, C.S. 2003. Quercetin suppresses proinflammatory cytokines production through MAP kinases and NF-κB pathway in lipopolysaccharide-stimulated macrophage, *Mol. Cell. Biochem.* **243**: 153-160.
- Cirino, G., Distrutti, E. and Wallace, J. L. Nitric oxide and inflammation, *Inflamm. Allergy.* (2006) 115-119.
- Farlik, M., Reutterer, B., Schindler, C., Greten, F., Vogl, C., Müller, M. and Decker, T. 2010. Conventional initiation complex assembly by STAT and NF-κB transcription factors regulates nitric oxide synthase expression, *Immunity* **33**: 25-34.

- Gomez, P. F., Pillinger, M. H., Attur, M., Marjanovic, N., Dave, M., Park, J., Bingham III, C. O., Al-Mussawir, H. and Abramson, S. B. 2005. Resolution of inflammation: prostaglandin E2 dissociates nuclear trafficking of individual NF- κ B subunits (p65, p50) in stimulated rheumatoid synovial fibroblasts, *J. Immunol.* **175**: 6924-6930.
- Guillamón, E., García-Lafuente, A., Lozano, M., D'Arrigo, M., Rostagno, M. A., Villares, A. and Martínez, J. A. 2010. Edible mushrooms: role in the prevention of cardiovascular diseases, *Fitoterapia* **81**: 715-723.
- Kim, G. Y., Han, M. G., Song, Y. S., Shin, B. C., Shin, Y. I., Lee, H. J., Moon, D. O., Lee, C. M., Kwak, J. Y., Bae, Y. S., Lee, J. D. and Park, Y. M. 2004. Proteoglycan Isolated from *Phellinus linteus* induces toll-like receptors 2- and 4-mediated maturation of murine dendritic cells via activation of ERK, p38, and NF- κ B, *Biol. Pharm. Bull.* **27**: 1656-1662.
- Kim, H. G., Yoon, D. H., Lee, W. H., Han, S. K., Shrestha, B., Kim, C. H., Lim, M. H., Chang, W., Lim, S. and Choi, S. 2007. *Phellinus linteus* inhibits inflammatory mediators by suppressing redox-based NF- κ B and MAPKs activation in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophage, *J. Ethnopharmacol.* **114**: 307-315
- Kim, H. S., Kim, J. Y., Ryu, H. S., Park, H. G., Kim, Y. O., Kang, J. S., Kim, H. M., Hong, J. T., Kim, Y. and Han, S. B. 2010. Induction of dendritic cell maturation by β -glucan isolated from *Sparassis crispa*, *Int. Immunopharmacol.* **10**: 1284-1294.
- Kim, M. Y., Seguin, P., Ahn, J. K., Kim, J. J., Chun, S. C., Kim, E. H., Seo, S. H., Kang, E. Y., Kim, S. L. and Park, Y. J. 2008. Phenolic compound concentration and antioxidant activities of edible and medicinal mushrooms from Korea, *J. Agr. Food Chem.* **56**: 7265-7270.
- Kwon, A., Qiu, Z., Hashimoto, M., Yamamoto, K. and Kimura, T. 2009. Effects of medicinal mushroom (*Sparassis crispa*) on wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats, *Am. J. Surg.* **197**: 503-509.
- Laskin, D. L. and Pendino, K. J. 1995. Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury, *Annu. Rev. Pharmacol.* **35**: 655-677.
- Liang, Y. C., Huang, Y. T., Tsai, S. H., Lin-Shiau, S. Y., Chen, C. F. and Lin, J. K. 1999. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages, *Carcinogenesis* **20**: 1945-1952
- Moradali, M. F., Mostafavi, H., Ghods, S. and Hedjaroude, G. A. 2007. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi), *Int. Immunopharmacol.* **7**: 701-724.
- Raja, B. 2011. Veratric acid, a phenolic acid attenuates blood pressure and oxidative stress in L-NAME induced hypertensive rats, *Eur. J. Pharmacol.* **671**: 87-94.
- Stefano, D. D., Maiuri, M.C., Iovine, B., Ialenti, A., Bevilacqua, M. A. and Carnuccio, R. 2006. The role of NF- κ B, IRF-1, and STAT-1 α transcription factors in the iNOS gene induction by gliadin and IFN- γ in RAW 264.7 macrophages, *J. Mol. Med.* **84**: 65-74.
- Walley, K. R., McDONALD, T. E., Higashimoto, Y. and Hayashi, S. 1999. Modulation of proinflammatory cytokines by nitric oxide in murine acute lung injury, *Am. J. Resp. Crit. Care.* **160**: 698-704.
- Xie, Q., Kashiwabara, Y. and Nathan, C. 1994. Role of transcription factor NF- κ B/Rel in induction of nitric oxide synthase, *J. Biol. Chem.* **269**: 4705-4708.
- Yamamoto, K., Kimura, T., Sugitachi, A. and Matsuura, N. 2009. Anti-angiogenic and anti-metastatic effects of β -1, 3-D-glucan purified from hanabiratake, *Sparassis crispa*, *Biol. Pharma. Bull.* **32**: 259-263.
- Yoon, W. J., Ham, Y. M., Kim, S. S., Yoo, B. S., Moon, J. Y., Baik, J. S., Lee, N. H. and Hyun, C. G. 2009. Suppression of pro-inflammatory cytokines, iNOS, and COX-2 expression by brown algae *Sargassum micracanthum* in RAW 264.7 macrophages, *EurAsia J. BioSci.* **3**: 130-143.