

Anti-Xanthine Oxidase, Anti-Cholinesterase, and Anti-Inflammatory Activities of Fruiting Bodies of *Phellinus gilvus*

Ki Nam Yoon, Hyung Seok Jang

Department of Clinical Laboratory Science, Ansan University, Ansan, Korea

마른진흙버섯 자실체의 Xanthine Oxidase, Cholinesterase 및 염증 저해 효과

윤기남, 장형석

안산대학교 임상병리과

Phellinus gilvus is a medicinal mushroom used that has been used in folk medicine in Asian countries for centuries. The aim of this study was to investigate the anti-xanthine oxidase, anti-cholinesterase, and anti-inflammatory activities of methanol (ME) and hot water (HW) extracts prepared from fruiting bodies of *Ph. gilvus*. ME and HW had good anti-xanthine oxidase (XO) activities compared to allopurinol, an inhibitor of xanthine oxidase. ME showed comparable and slightly lower inhibitory activity against acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE), respectively, than galanthamine, a standard AChE and BChE inhibitor. ME also showed a protective effect against glutamate-induced cytotoxicity at 40 mg/mL and 100 mg/mL in PC-12 cells. ME (0.5~2.0 mg/mL) significantly inhibited nitric oxide (NO) production in RAW 264.7 murine macrophage cells stimulated with lipopolysaccharide (LPS). Carrageenan-induced hind-paw edema in rats was significantly reduced 2~6 hr after treatment with 50 mg/kg of ME, which was comparable to administration of 5 mg/kg of indomethacin, the positive control. These results demonstrate that ME and HW of *Ph. gilvus* fruiting bodies possess good anti-xanthine oxidase, anti-cholinesterase, and anti-inflammatory activities.

Key words: Anti-inflammation, Anti-xanthine oxidase, Cholinesterase inhibitors, *Phellinus gilvus*

Corresponding author: Ki Nam Yoon
Department of Clinical Laboratory Science,
Ansan University, 155 Ansandaehak-ro,
Sangnok-gu, Ansan 15328, Korea
Tel: 82-31-400-7068
Fax: 82-31-363-7702
E-mail: kinam@ansan.ac.kr

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Copyright © 2018 The Korean Society for Clinical Laboratory Science. All rights reserved.

Received: May 19, 2018
Revised 1st: July 30, 2018
Revised 2nd: August 9, 2018
Revised 3rd: August 16, 2018
Accepted: August 16, 2018

서 론

의식주 환경의 개선과 의학의 발달로 인한 인간의 수명 연장으로 노령인구가 증가하면서 노인성 치매가 증가하는 경향을 나타내고 있으며 65세 이상의 노인 인구 중 약 10%가 치매 발병률을 보이고 있어 경제적, 사회적으로 큰 문제를 야기하고 있다[1]. 노인성치매는 크게 뇌혈관성 치매와 알츠하이머병(Alzheimer

disease, AD)으로 나누어지는데 이중 알츠하이머병이 치매의 50% 이상을 차지하고 있다. AD의 원인으로는 뇌 속의 콜린(choline)성 신경계의 변화, 과도한 glutamate와 amyloid plaque 생성, tau 단백질의 침착, 염증 등이 주요 인자로 알려져 있다[2]. 알츠하이머병 증상의 하나인 기억력 감퇴 현상은 뇌의 신경전달물질인 아세틸콜린 함량의 감소와 깊이 관련되어 있다는 연구결과가 널리 보고되고 있다[3]. Talesa [4]는 뇌 속에

acetylcholine (ACh)을 가수분해하는 acetylcholinesterase (AChE) 효소의 농도가 증가하면 신경세포 내의 콜린성 신경전달물질이 감소하여 기억 및 인지 기능에 장애가 일어난다고 보고하였다. Block 등[5]은 신경 전달물질의 하나인 glutamate는 신경의 정상적인 반응을 일으키는 물질이지만, 뇌 속의 농도가 정상 이상으로 과도하게 높아지면 뇌세포 내의 활성산소의 양을 증가시키고 유입되는 칼슘의 양을 증가시킴으로써 독성을 유발해 뇌세포에 치명적인 손상을 일으킨다고 보고하였다. 최근 치매의 치료에 사용되고 있는 의약품이 오십, 구토, 체중 감소, 수면장애, 간 독성, 위궤양, 천식 등의 부작용을 일으키는 임상 사례가 보고되면서 기존의 의약품을 대체해야 할 필요성이 대두되어 새로운 천연물을 이용한 치매의 치료제를 개발하려는 연구가 시도되고 있다[6].

염증반응은 외부의 물리적, 화학적 자극 또는 세균이나 바이러스 등의 감염에 대응해 체내의 면역세포가 이를 인지하고 염증 매개 물질을 분비하여 손상된 조직을 복구하고 재생하려는 방어 작용이다[7]. 대식세포(macrophages)는 염증반응에 관여하는 대표적인 면역세포로써 lipopolysaccharid (LPS)와 같은 유발물질에 의해 활성화되면 활성화된 대식세포에서 분비하는 각종의 염증 물질은 염증반응을 촉진하는 여러 인자들과 상승효과를 일으켜 기관지 천식, 기관지염, 류머티즘 관절염, 심혈관계 질환, 치매 등 만성 만성질환의 원인이 되고 있다[8, 9]. 염증반응에 사용되는 제제는 염증으로 인해 유발되는 만성질환을 예방하거나 제어하는 것을 주목적으로 하고 있다[10]. 현재 사용되는 대부분의 항염증제제를 장기간 복용한 경우 출혈성 소화관 궤양, 신장의 기능저하, 혈압 상승, 혈전 형성 등 소화기나 순환계에 질환을 유발하는 등의 임상 사례가 보고되고 있다[11]. 따라서 염증을 억제하고 염증 매개체들의 생성을 보다 효과적으로 저해할 수 있는 천연 재료를 이용한 새로운 항염증제의 개발이 큰 주목을 받고 있다.

대부분의 버섯은 담자균문(Basidiomycota)에 속해있고 일부의 버섯이 자낭균문(Ascomycota)에 속해있다. 최근 기능성 건강식품에 대한 관심이 높아지면서 버섯에 대한 소비도 증가하고 있다. 고등균류에 속하는 버섯은 예로부터 식용과 약용으로 널리 이용되어 왔으며 당뇨, 비만, 암, 고혈압, 고지혈증 등의 성인병을 예방하고 개선하는 효과가 밝혀짐에 따라 버섯의 생리활성 증진에 대한 연구가 널리 진행되고 있다[12-14]. 마른진흙버섯은 담자균문의 소나무비늘버섯목(Hymenochaetales), 소나무버섯과(Hymenochaetaceae), 진흙버섯속(*Phellinus*)에 속하는 약용버섯으로 한국을 비롯한 중국, 일본에서 오래전부터 "상황"으로 불리며 주로 암의 치료에 이용해 왔으나 최근 항

산화, 항균, 고지혈증 및 폐렴 등의 약용 효과에 대한 선행연구가 수행된 바 있다[15-17]. 이에 본 연구에서는 최근 인공 재배에 성공하여 시장에서 판매되는 마른진흙버섯의 자실체를 구입하여 메탄올과 열수로 추출한 물질의 xanthine oxidase, cholinesterase 및 염증의 저해 작용에 대한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

실험에 사용한 마른진흙버섯의 자실체는 서울의 경동 한약재 시장에서 구입하여 45°C의 열풍건조기에서 48 시간 건조하고 마쇄 후 -70°C의 저온 냉동고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

2. 성분의 추출

Shim 등[18]의 방법에 따라 건조한 마른진흙버섯 자실체의 분말에 80% 메탄올과 열수를 이용해 성분을 추출하여 실험에 사용하였다. 즉, 50 g의 마른진흙버섯 자실체의 분말을 80%의 메탄올 용액(Duksan, Ansan, Korea) 1,000 mL에 침지하여 48 시간 동안 상온에서 3회 추출한 후 이 추출액을 모아 여과지(Avantec Roshi, Tokyo, Japan)로 여과한 후 40°C에서 회전 감압농축기(N-1000, EYELA, Tokyo, Japan)를 이용하여 감압농축하고 농축액 내의 수분은 동결건조기(FDU-8612, Operon, Kimpo, Korea)로 제거하여 메탄올 추출물의 분말을 얻었다. 열수추출물은 3차 증류수 1,000 mL에 50 g의 자실체 분말을 넣어 100°C에서 10시간 동안 추출하였다. 추출 후 추출액은 4°C에서 24시간 동안 정치시킨 후 여과지(Avantec Roshi, Tokyo, Japan)로 여과하고 동결건조기로 여과액의 수분을 제거하여 열수추출물 분말을 얻었다.

3. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis 법을 변형한 Swain 등[19]의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 마른진흙버섯 메탄올과 열수추출물을 각각 1 mg/mL 농도로 메탄올에 녹인 후 Folin-Ciocalteu's phenol reagent와 10%의 Na₂CO₃ 용액을 각각 1 mL씩 차례로 가한 후 실온에서 60분간 반응시킨 후 UV/VIS Spectrophotometer (Optizen POP, CM Science, Busan, Korea)를 이용해 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀의 측정은 표준물질로 gallic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)를 0~100 mg/mL의 농도로 제조한 후 시료와 동일한 방법으로 처리하여 검량선을 작성한 후 추출물의 총 폴리페놀 함

량을 구하였다.

총 플라보노이드 함량의 측정은 Moreno 등[20]의 방법에 따라 1 mg/mL 농도의 시료액에 10% aluminum nitrate 0.1 mL, 1 M potassium acetate 0.1 mL 및 ethanol 4.3 mL를 차례로 가하고 혼합한 후 실온에서 40분간 방치 후 UV/VIS Spectrophotometer (Optizen POP, CM Science, Busan, Korea)를 이용해 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 함량은 quercetin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)을 표준물질로 하여 얻은 검량선을 이용하여 각각의 추출물의 총 플라보노이드 함량을 구하였다.

4. 세포배양

실험에 사용한 RAW 264.7과 PC-12 세포주는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, KCLB)에서 분양받았으며 이들 세포의 배양에는 각각 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco, NY, USA)와 Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI-1640, Gibco, NY, USA) 배지를 기본배지로 하고 이 배지에 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin 및 100 mg/mL streptomycin을 첨가하여 37°C, 5% CO₂의 조건으로 배양하여 실험에 사용하였다.

5. RAW 264.7 세포 독성

마른진흙버섯 자실체의 메탄올과 열수 추출물의 RAW 264.7 세포에 대한 독성은 Mosmann의 방법[21]에 따라 수행하였다. 지수기에 도달한 세포주를 DMEM 배지가 분주된 96-well plate에 2×10^5 cell/mL의 농도로 분주하고 24시간 배양한 후, 배지의 상층 액을 제거하고 마른진흙버섯 추출물을 10, 100, 500, 1,000, 2,000 mg/mL 농도로 200 μL씩 새 배지에 첨가하여 48시간 추가 배양하였다. 배양 완료 후 상층액을 제거하고 각각의 well에 MTT용액(5 mg/mL in PBS) 10 mL를 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 동안 배양하여 MTT를 환원시켰다. MTT의 환원에 의해 생성된 자주색 formazan의 결정은 150 μL의 DMSO로 녹인 다음 microplate reader (SpectraMax 340PC, California, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. Xanthine oxidase (XO) 저해 활성

Xanthine oxidase 효소의 저해활성 실험은 Stirpe와 Corte Della의 방법[22]에 따라 수행하였다. 농도가 다른 추출물 (0.5 ~ 8.0 mg/mL) 0.1 mL와 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5) 0.6 mL에 2 mM의 xanthine 기질액 0.2 mL를 첨가하

고 xanthine oxidase (0.2 unit/mL) 0.1 mL를 가한 다음 37°C에서 15분간 반응시킨 후 1 N HCl 1 mL를 가하여 반응을 중지시킨 후, UV-VIS spectrophotometer (Optizen POP, CM Science, Busan, Korea)를 이용해 290 nm에서 흡광도를 측정해 반응액 중에 생성된 uric acid의 양을 구하였다. 양성대조군으로 통증 치료에 이용되는 xanthine oxidase 저해제인 allopurinol을 사용하였다. Xanthine oxidase 저해활성(%)은 다음의 식에 의하여 산출하였다.

$$\text{Inhibition effect (\%)} = [1 - (A - B) / C] \times 100$$

A: Xanthine 용액 (2 mM)에 추출물 시료와 효소액을 첨가하여 반응시킨 후의 흡광도

B: A에서 효소액 대신 증류수 0.1 mL를 첨가하여 반응시킨 후의 흡광도

C: A에서 추출물 시료 대신 증류수 0.1 mL를 첨가하여 반응시킨 후의 흡광도

7. Acetylcholinesterase (AChE) 저해 활성

AChE의 효소의 저해 활성은 Ellman 등[23]의 방법에 따라 acetylthiocholine iodide를 기질로 사용하였으며 AChE에 의해 생성되는 thiocholine을 DTNB와 반응시켜 생성된 2-nitrobenzoi-5-mercatothocholine과 5-thio-2-nitrobenzoate의 흡광도를 측정하였다. 즉, 96 well microplate에 100 μL의 AChE assay buffer (0.1 M Tris-HCl, pH 8.2), 10 μL의 0.5 U/mL AChE (dissolved in assay buffer containing 10% glycerol) 및 0.063 ~ 1.0 mg/mL의 농도로 희석한 10 μL의 시료를 가하고 상온에서 10분 동안 진탕배양 후 10 μL의 10 mM DTNB와 100 mM acetylthiocholine 5 μL을 가해 2분 동안 반응시킨 후 microplate reader (SpectraMax 340PC, California, USA)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 효소 대신 동량의 assay buffer를 가한 것을 control로 galanthamine을 가한 것을 양성대조군으로 사용하였으며, AChE의 저해활성은 다음의 수식을 이용하여 구하였다.

$$\text{AChE 저해율(\%)} = [100 - (A_{\text{sample}} / A_{\text{control}})] \times 100$$

이때, A_{control}은 대조군의 흡광도, A_{sample}은 시료군의 흡광도이다.

8. Butyrylcholinesterase (BChE) 저해 활성

BChE의 효소활성은 Ellman 등[23]의 방법에 따라 butyrylcholine iodide를 기질로 사용하였으며 BChE의 가수분해로 생성된 thiocholine을 DTNB와 반응시켜 그 결과 생성

되는 반응물을 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 즉, 96 well microplate에 100 μ L의 BChE assay buffer (0.1 M Tris-HCl, pH 8.2), 10 mL의 0.5 U/ml BChE (dissolved in assay buffer containing 10% glycerol) 및 0.063~1.0 mg/mL의 농도로 희석된 10 mL의 시료를 가하고 상온에서 10분 동안 진탕배양 후 10 mL의 10 mM DTNB와 100 mM acetylthiocholine 5 mL를 가해 2분 동안 반응시킨 후 microplate reader (SpectraMax 340PC, California, USA)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 효소 대신 동량의 assay buffer를 가한 것을 control로 galanthamine를 가한 것을 양성대조군으로 사용하였으며, BChE의 저해활성은 다음의 수식을 이용하여 구하였다.

$$\text{BChE 저해율(\%)} = [100 - ((A_{\text{sample}}/A_{\text{control}}))] \times 100$$

이때, A_{control} 은 대조군의 흡광도, A_{sample} 은 시료군의 흡광도이다.

9. Glutamate 독성에 의해 유도된 세포사멸의 억제 효과

본 실험에는 쥐의 크롬친화세포종(rat pheochromocytoma)에서 유래한 PC-12 세포를 사용하였다. 이 세포에 신경 성장인자(nerve growth factor, NGF)를 처리하면 신경세포로 최종 분화하는 특성으로 인해 신경 분화의 연구모델로 널리 사용되고 있다[24]. Glutamate에 의해 PC-12 세포에 유도된 독성이 마른진흙버섯 자실체의 메탄올과 열수추출물에 의해 억제되는 실험은 Ma 등[25]의 방법을 변형하여 수행하였다. 10%의 FBS가 첨가된 RPMI-1640 배지에 PC-12 세포를 5% CO₂와 37°C의 조건에서 3일 배양한 후, 96-well plate에 1×10^5 cells/well 농도로 분주하여 24 시간 배양한 다음, glutamate가 10 mM 농도로 함유된 배지에 옮겨 12시간 배양하여 독성을 유도한 뒤 마른진흙버섯의 메탄올과 열수추출물이 각각 5, 10, 20, 40, 100 mg/mL 농도로 첨가된 배지에서 24시간 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 100 mL의 DMSO를 처리하여 MTT를 용해한 후 microplate reader로 570 nm의 흡광도에서 측정해 세포의 생존율을 구하였다.

10. Nitric oxide (NO) 생성 저해 효과

마른진흙버섯의 메탄올과 열수추출물에 의한 NO의 생성 저해효과는 Ryu 등[26]의 방법을 이용하여 측정하였다. DMEM 배지가 들어있는 96 well plate에 RAW 264.7 세포를 5×10^4 cell/well로 분주하여 12시간 배양 후 마른진흙버섯 추출물을 0, 0.5, 1.0 및 2.0 mg/mL의 농도로 처리하고 1시간 경과 후 LPS를 1 μ g/mL 농도로 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 상층액 100 μ L를 취한 후 동량의 Griess reagent

(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA) 100 μ L를 넣어 총량이 200 μ L 되도록 하고 상온에서 10 분간 반응시킨 후 생성된 NO의 양을 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO의 농도는 아질산염(NaNO₂)의 농도별 표준곡선을 이용하여 구하였다.

11. Carrageenan에 의한 부종유발 및 항염증 효과

흰쥐의 뒷발 바닥에 급성 부종을 유발하는 실험은 Winter 등[27]의 방법에 따라 수행하였다. 생리식염수에 녹인 0, 5, 15, 50 mg/kg 농도의 마른진흙버섯 추출물과 0.5 mg/kg 농도의 indomethacin을 마리당 각각 0.1 mL씩 오른쪽 뒷발바닥에 주사하고 30분이 경과한 후 1%의 carrageenan 용액을 흰쥐의 뒷발 바닥에 0.1 mL씩 주사하였다. 본 실험에는 처리 군 당 각각 5마리의 흰쥐를 사용하였다. 항염증 효과는 각각의 마른진흙버섯 메탄올 추출물과 indomethacin을 주사하고 carrageenan을 추가로 투여해 흰쥐의 뒷발 바닥에 생긴 부종의 용적을 plethysmometer (MK-101P, Tokyo, Japan)로 측정하여 구하였다. 흰쥐의 뒷발 바닥에 기염제인 carrageenan을 주입하기 전을 0으로 하고 주입 후 2, 4, 6시간이 지난 후 부종에 의해 증가한 뒷발의 용적을 각각의 실험 군 별로 측정하여 다음의 식에 의하여 부종의 증가율을 산출하였다.

$$\text{부종증가율(\%)} = (V_t - V_n) / V_n \times 100$$

V_t =주입 후 일정 시간 후의 뒷발의 용적

V_n =주입 직후 뒷발의 용적

12. 통계 처리

실험은 3회 이상 반복 실험을 통하여 얻은 각각의 결과를 mean \pm S.D로 나타내었다. 각 시료 농도 군에 대한 통계적 유의 검정은 대조군과 비교하여 Student's t-test (SPSS PASW Statistics 18.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 후, $P < 0.05$ 수준에서 통계적으로 유의성 있는 결과로 표시하였다.

결 과

1. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

마른진흙버섯 자실체의 메탄올과 열수추출물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량의 결과를 잘 정리한 후(Table 1) 나타냈다. 메탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량과 총 플라보노이드 함량을 3번에 걸쳐 측정한 결과 각각 31.37 ± 1.69 mg/g과 6.17 ± 0.57 mg/g으로 나타났고, 열수추출물의 총 폴리페놀과

Table 1. Total phenolic and flavonoids content of methanol and hot water extracts from fruiting bodies of *Phellinus gilvus*

Samples	Extraction yield % (w/w)	Phenolic content (mg GAEs/g extract)	Flavonoids content (mg QEs/g extract)
Methanol extract (N=3)	10.3	31.37±1.69	6.17±0.57
Hot water extract (N=3)	6.2	20.27±1.27	17.33±0.85

The values are means±SD (N=3). Abbreviations: GAEs, gallic acid equivalents; QEs, quercetin equivalents.

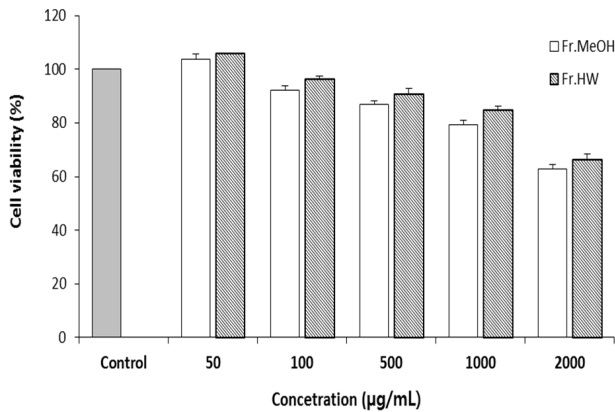


Figure 1. *In vitro* cytotoxicity against RAW 264.7 cells at different concentrations of methanol and hot water extracts from fruiting bodies of *Phellinus gilvus*. The values are means±SD (N=3). Abbreviation: Fr.MeOH, fraction extracted with 80% methanol; Fr.HW, fraction extracted with hot water.

플라보노이드 함량은 각각 20.27±1.27 mg/g과 17.33±0.85 mg/g으로 나타났다. 따라서 메탄올 추출물은 열수 추출물에 비해 총 폴리페놀의 함량이 약 1.54배 높았으나 총 플라보노이드의 함량은 열수 추출물이 메탄올 추출물에 비해 약 2.89배 높았다.

2. RAW 264.7 세포 독성

마른진흙버섯 자실체의 메탄올과 열수 추출물이 쥐의 대식 세포인 RAW 264.7 세포의 생존율에 미치는 효과를 규명하기 위해 메탄올과 열수 추출물을 50, 100, 500, 1,000, 2,000 µg/mL의 농도로 RAW 264.7 세포에 처리하고 MTT 방법을 이용하여 세포의 생존율을 조사하였다. 실험결과 RAW 264.7 세포는 50~2,000 mg/mL의 메탄올 추출물 농도에서 103.50~62.63%의 생존율을 보였고, 동일한 농도의 열수 추출물은 105.57~66.17%의 생존율을 보였다(Figure 1). 따라서 메탄올과 열수 추출물 50 mg/mL의 농도에서 RAW 264.7 세포의 생존율이 모두 100% 이상으로 나타나서 이들 농도의 추출물은

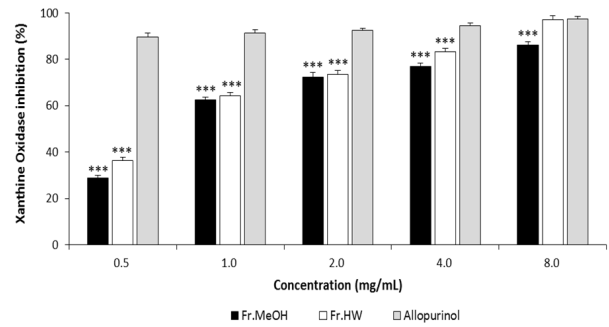


Figure 2. Xanthine oxidase inhibitory activity of methanol and hot water extract from fruiting bodies of *Phellinus gilvus*. The values are means±SD (N=3). ***P≤0.001 vs. allopurinol group. Abbreviation: Fr.MeOH, fraction extracted with 80% methanol; Fr.HW, fraction extracted with hot water.

RAW 264.7 세포의 증식을 촉진하는 효과를 보였으나 2,000 mg/mL 농도에서 RAW 264.7 세포의 생존율은 각각 62.63%와 66.17%로 나타내 추출물의 농도가 증가함에 따라 RAW 264.7 세포의 생존율은 각각 농도 의존적으로 감소하였다. 따라서 마른진흙버섯 자실체 추출물을 이용한 RAW 264.7 세포의 nitric oxide (NO) 생성 저해 실험에서는 추출물 농도 50~2,000 범위에서 수행하였다.

3. Xanthine oxidase (XO) 저해 활성

XO 효소에 대한 마른진흙버섯 자실체의 메탄올과 열수추출물의 저해활성 실험 결과를 Figure 2에 표시하였다. 메탄올과 열수추출물의 농도 0.5~8.0 mg/mL 범위 내에서 XO에 대한 저해효과는 각각 28.60~86.20%와 36.53~97.07%를 나타내 동일 농도 범위 내에서의 양성대조군 allopurinol의 저해효과 89.67~97.33%에 비해 유의하게 낮았다. 열수추출물 농도 8.0 mg/mL에서의 XO 저해효과는 allopurinol에 비해 조금 낮았으나 통계적인 유의성은 없었다.

4. Acetylcholinesterase (AChE) 저해 활성

마른진흙버섯 자실체의 메탄올과 열수추출물의 AChE 효소에 대한 저해활성은 추출물의 농도 0.063~1.0 mg/mL에서 수행하여 그 결과를 Figure 3에 표시하였다. 실험을 수행한 농도 범위에서 메탄올과 열수 추출물의 AChE 저해활성은 각각 79.33~96.17%와 59.67~89.33%로 나타나 동일 농도 내에서의 양성대조군 galanthamine의 86.33~97.67%에 비해 조금 낮았다. 메탄올 추출물의 AChE에 대한 저해 활성은 0.25~1.0 mg/mL 의 농도에서 93.73~96.17%를 나타내 양성대조군 galanthamine의 94~96.67%에 비해 조금 낮았으나 통계적인 유의성은 없었다.

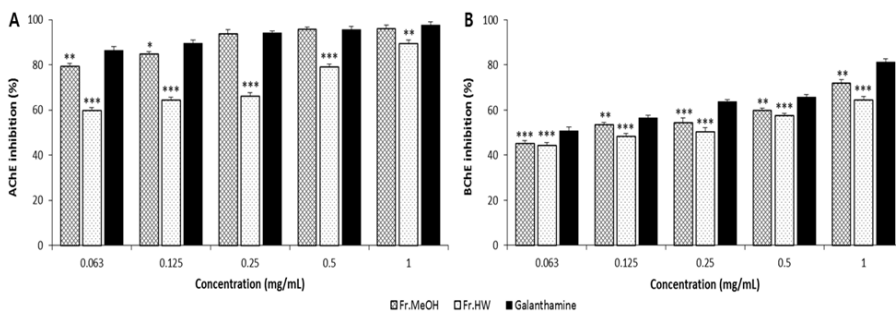


Figure 3. Cholinesterase inhibitory activity of methanol and hot water extracts from fruiting bodies of *Phellinus gilvus*. A, acetylcholinesterase inhibitory activity; B, butyrylcholinesterase inhibitory activity. The values are means \pm SD (N=3). *** $P \leq 0.001$, ** $P \leq 0.01$, * $P \leq 0.05$ vs. galanthamine group. Abbreviation: AChE, acetylcholinesterase; BChE, butyrylcholinesterase; Fr.MeOH, fraction extracted with 80% methanol; Fr.HW, fraction extracted with hot water.

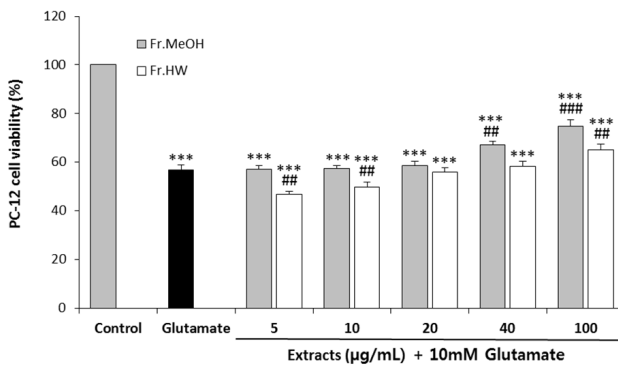


Figure 4. Inhibitory effect of methanol and hot water extracts from fruiting bodies of *Phellinus gilvus* on glutamate-induced cytotoxicity in PC-12 cells. Values are means \pm SD (N = 3). *** $P \leq 0.001$ vs. control group. ### $P \leq 0.001$, ## $P < 0.01$ vs. glutamate group. Abbreviation: Fr.MeOH, fraction extracted with 80% methanol; Fr.HW, fraction extracted with hot water.

5. Butyrylcholinesterase (BChE) 저해 활성

마른진흙버섯 자실체의 메탄올과 열수추출물의 BChE에 대한 저해활성은 0.063~1.0 mg/mL의 농도에서 각각 45.17~71.67%와 44.10~64.33%로 나타나 동일한 농도 범위에서의 양성대조군 galanthamine의 저해효과 50.57~81.17%에 비해 유의하게 낮았다(Figure 4). 마른진흙버섯 추출물의 BChE에 대한 저해효과는 처리 농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 저해효과도 증가하는 경향을 나타냈다.

6. Glutamate 독성에 의해 유도된 세포사멸의 억제효과

PC-12 세포에 glutamate를 처리하여 유도된 독성이 마른진흙버섯 자실체의 메탄올과 열수 추출물의 첨가에 의해 억제된 결과를 Figure 5에 표시하였다. RPMI-1640 배지에 glutamate를 10 mM 농도로 첨가하여 PC-12 세포를 배양하고 생존율을 측정할 결과 56.67%를 나타내 glutamate 첨가 없이 배양한 대조군의 PC-12 세포의 생존율 100%에 비해 유의하게 낮았다. Glutamate를 배지에 첨가하고 PC-12 세포를 12시간 배양한

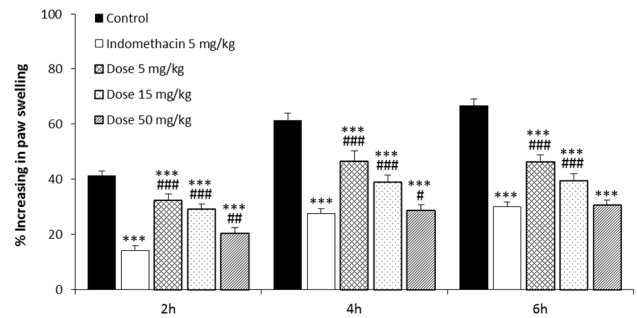


Figure 5. Inhibitory effect of methanol extract of fruiting bodies from *Phellinus gilvus* on carrageenan-induced paw edema in rats. The values are means \pm SD (N=5). *** $P \leq 0.001$ vs. control group; ### $P \leq 0.001$, # $P < 0.05$ vs. indomethacin group.

후 각각 5, 10, 20, 40, 100 mg/mL 농도의 메탄올추출물을 첨가하여 24시간 배양 후 측정된 세포의 생존율은 각각 57.00%, 57.17%, 58.33%, 67.00%, 74.77%를 보였고, 열수 추출물을 첨가해 동일 조건에서 배양한 세포의 생존율은 각각 49.83%, 56.33%, 58.10%, 65.17%를 나타냈다. 따라서 glutamate가 첨가된 RPMI-1640 배지에 메탄올 추출물(40 mg/mL와 100 mg/mL)과 열수 추출물(100 mg/mL)을 각각 첨가해 배양한 PC-12 세포의 생존율은 RPMI-1640 배지에 glutamate만을 첨가해 배양한 세포의 생존율 56.67%에 비해 통계적으로 유의하게 높아 glutamate의 처리에 의해 PC-12 세포에 유도된 독성이 마른진흙버섯 추출물의 처리에 의해 억제되는 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

7. Nitric oxide (NO) 생성 저해 효과

DMEM 배지에 RAW 264.7 세포를 배양하여 생성된 대조군의 NO 농도는 6.47 μ M이었으나 DMEM 배지에 LPS를 1.0 μ g/mL 농도로 첨가하여 배양한 양성대조군의 RAW 264.7 세포가 생성한 NO는 43.53 μ M로 측정되었다. 배지에 메탄올 추출물을 각각 0.5 mg/mL, 1.0 mg/mL, 2.0 mg/mL 농도로 처리하고 RAW 264.7 세포를 배양한 뒤 1.0 mg/mL의 LPS를 첨가하

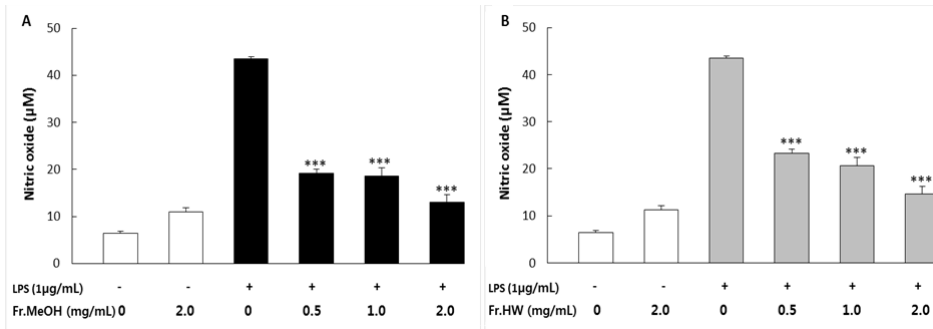


Figure 6. Inhibitory effect of methanol and hot-water extracts from fruiting bodies of *Phellinus gilvus* on LPS-induced nitric oxide production in RAW 264.7 cells. The cells were incubated for 24 hours with LPS (1µg/mL) in the presence or absence of indicated concentration of mushroom extracts. The values are means±SD (N=3). *** $P \leq 0.001$ vs. LPS treated group. Abbreviation: Fr.MeOH, fraction extracted with 80% methanol; Fr.HW, fraction extracted with hot water.

여 배양한 RAW 264.7 세포가 생성한 NO의 농도는 각각 19.17 mM, 18.67 mM, 13.10 mM로 측정되었고, RAW 264.7 세포에 동일한 농도의 열수 추출물을 처리하여 생성된 NO는 각각 23.33 mM, 20.67 mM, 14.77 mM로 나타났으며, 각각의 농도의 메탄올과 열수 추출물 처리에 의해 RAW 264.7 세포에 생성된 NO는 양성대조군에 비해 모두 유의하게 낮았다(Figure 6).

8. Carrageenan에 의한 부종유발 및 항염효과

앞의 실험에서 RAW 264.7 세포에 LPS를 처리해 생성된 NO의 생성 저해효과가 메탄올 추출물이 열수 추출물에 비해 높게 나타나 흰쥐 뒷발바닥의 부종 유발 억제실험은 메탄올 추출물만을 이용해 수행하였다. 부종을 유발하는 기염제인 carrageenan만을 주사한 대조군의 흰쥐 뒷발에 생성된 부종(edema)의 용적은 주사 후 2~6시간에 41.16~66.70% 증가했고, 소염제인 indomethacin을 5 mg/kg 농도로 투여 후 carrageenan을 주사한 양성대조군의 부종 용적은 동일 시간대에 14.16~30.10% 증가했다. 이에 반해 마른진흙버섯 메탄올 추출물을 5 mg/kg 농도로 투여 후 carrageenan을 주사한 실험군의 부종 용적은 32.40~46.80% 증가했으며, 15 mg/kg의 메탄올 추출물을 투여한 실험군의 부종용적은 29.20~39.40% 증가했고, 50 mg/kg 농도의 메탄올 추출물을 투여한 실험군의 부종용적의 증가율은 20.40~30.60%를 나타내서 투여한 메탄올 추출물의 농도가 높아짐에 따라 농도 의존적으로 부종의 저해효과도 증가하였다.

고 찰

폴리페놀과 플라보노이드 화합물은 생체 내에서 활성산소의 생성을 억제하거나 제거하여 세포와 조직의 손상을 방지하는 항산화 작용을 통해 생체를 보호하는 것으로 알려져 있다[27]. 일반적으로 식물에는 다량의 폴리페놀과 플라보노이드가 함유되어 있으나 죽은 식물을 분해해 살아가는 버섯에는 소량 함유

되어 있다[28]. 마른진흙버섯 자실체에서 메탄올로 추출한 총 페놀과 총 플라보노이드 함량은 각각 31.37 mg/g과 6.17 mg/g으로 Yim 등[29]이 보고한 느타리 자실체의 메탄올 추출물의 페놀 함량 5.1 mg/g과 플라보노이드 함량 0.1 mg/g에 비해 높은 것으로 나타났다. 따라서 마른진흙버섯 자실체에는 많은 양의 페놀과 플라보노이드가 함유되어있어서 항산화 작용을 비롯한 여러 생리 활성의 효과를 높일 수 있을 것으로 사료된다.

통풍(gout)은 혈액 내에 요산(uric acid)이 과도하게 증가하게 되면 용해성이 낮은 요산이 관절 부위에 바늘과 같은 결정체의 형태로 침착되어 심한 통증을 일으키는 질병이다[30]. 체내의 요산 생성은 퓨린(purine) 염기에 속하는 구아닌(guanine)이 효소 작용에 의해 xanthine 또는 hypoxanthine으로 전환된 후 xanthine oxidase (XO) 효소의 촉매 작용을 거쳐 생산된다. 혈액 내 요산의 70% 정도는 체내의 대사과정을 통해 생성되고 약 30%는 음식을 통해 섭취하기 때문에 체내의 과도한 요산 농도를 낮추기 위해서는 음식을 가려서 섭취하기보다는 체내의 요산 생성에 관여하는 XO 효소의 활성을 저해하는 것이 중요하다[31]. 마른진흙버섯 자실체의 메탄올과 열수 추출물의 XO에 대한 저해효과는 0.5 mg/mL 농도에서 각각 28.6%와 36.53%로 나타나 양성대조군 allopurinol의 89.67%에 비해 통계적으로 유의하게 낮았으나($P \leq 0.001$) 고농도인 8.0 mg/mL에서의 메탄올 추출물, 열수 추출물 그리고 allopurinol은 각각 86.20%, 97.07%, 97.33%의 저해효과를 나타내서 allopurinol에 비해 열수 추출물의 저해효과가 유의하게 낮았으나($P \leq 0.01$), 이 농도에서의 메탄올 추출물의 XO에 대한 저해효과는 allopurinol과 비교가 될 만큼 높아 XO를 억제할 수 있는 건강식품으로 충분한 효과를 갖고 있다고 사료된다. 또한 메탄올과 열수 추출물의 XO에 대한 저해효과는 농도가 높아짐에 따라 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였다. Costantino 등[32]은 항산화 효과가 높아 다이어트에 이용되는 까치밥나무속에 속하는 *Ribes rubrum*과 *Ribes nigrum*의 열매에서 분리한 페놀과 플라보노이드 성분이 XO에 대한 높은 저해효과를 갖고 있어서

건강식품으로도 이용이 가능하다고 보고하였다. Alam 등[33]은 아귀버섯(*Pleurotus ferulae*)의 자실체에서 열수로 추출한 물질의 XO에 대한 저해효과가 0.5~8.0 mg/mL의 농도에서 3.21~45.56%로 보고하였는데 이는 마른진흙버섯 자실체의 메탄올과 열수추출물의 XO에 대한 저해효과가 동일 농도범위 내에서 아귀버섯 추출물에 비해 높게 나타난 것으로 마른진흙버섯의 자실체에 함유된 페놀과 플라보노이드 함량이 느타리에 비해 상대적으로 높은 것에 기인한다고 사료된다.

치매와 알츠하이머의 가장 큰 특징의 하나는 기억력이 크게 감퇴하여 인간의 삶이 황폐화 되는 병으로 뇌의 신경전달 물질인 ACh나 BCh 등이 AChE나 BChE 등의 효소에 의해 과도하게 분해되어 뇌에 ACh나 BCh 등 콜린(choline)의 함량이 부족해져서 일어나는 현상이다. 따라서 감퇴한 기억력을 높이기 위해서는 AChE나 BChE 효소의 작용을 억제해 ACh나 BCh를 과도하게 분해되는 것을 억제하는 donepezil, rivastigmine, galanthamine 등과 같은 cholinesterase 저해제가 사용되고 있다[34]. 마른진흙버섯 자실체의 메탄올 추출물은 0.063 mg/mL와 1.0 mg/mL 농도에서 AChE에 대한 저해활성이 각각 79.33%와 96.17%로 나타났고 동일 농도에서 열수 추출물은 각각 59.67%와 89.33%의 저해활성을 나타내 양성대조군인 galanthamine의 저해활성 86.33%와 97.67%에 비해 통계적으로 유의하게 낮았다. 동일 농도에서 BChE에 대한 메탄올 추출물의 저해활성은 각각 45.17%와 71.67%를 나타냈고, 열수 추출물은 각각 44.10%와 64.33%의 저해효과를 보여 galanthamine의 50.57%와 81.17%에 비해 유의하게 낮았다. 또한 메탄올 추출물의 AChE와 BChE에 대한 저해활성은 모든 농도범위에서 열수 추출물에 비해 높았다. Nguyen 등[35] 등은 기와층버섯의 자실체메탄올추출물의 AChE에 대해 0.063 mg/mL와 1.0 mg/mL에서 각각 64.19%와 83.34%의 저해활성을 나타냈으며, 동일 농도에서 열수추출물은 각각 51.44%와 77.53%의 저해효과를 보였다고 하였다. Yoon과 Leel[36]은 장미무당버섯 자실체의 메탄올 추출물은 0.063 mg/mL과 1.0 mg/mL의 농도에서 AChE에 대한 저해활성이 각각 45.67%와 75.57%를 나타냈으며, 동일 농도에서 열수 추출물은 각각 33.66%과 74.08%의 저해효과를 나타냈다고 보고하였다. 마른진흙버섯 자실체의 메탄올과 열수 추출물의 AChE와 BChE에 대한 저해효과는 앞의 기와층버섯과 장미무당버섯에 비해 높은 것으로 나타났다. 따라서 마른진흙버섯 자실체 추출물의 AChE나 BChE에 대한 강한 저해효과를 효율적으로 이용하기 위해서는 앞으로 유효성분을 중심으로 Alzheimer병과 같은 뇌의 퇴행성 질환에 관한 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Glutamate는 중추신경계의 신경 흥분성 전달물질이나 뇌에 필요이상으로 과다하게 존재하게 되면 신경세포에 독성을 나타낸다고 보고되어 있다[37]. 뇌 속에 glutamate가 과도하게 축적되면 뇌세포 내에 활성산소(reactive oxygen species)가 다량으로 생성되면서 뇌신경 세포벽의 지방질 산화가 촉진되어 뇌신경 세포의 사멸이 유도되면서 신경세포의 손상이 일어나 AD와 같은 신경 퇴행성 질환이 발생할 가능성이 높아진다[38, 39]. 본 실험에서 10 mM의 glutamate가 함유된 배지에 PC-12 세포를 배양하고 각각 농도가 다른 마른진흙버섯 자실체의 메탄올 추출물을 첨가하고 배양하여 세포의 생존율을 측정한 결과 40 mg/mL와 100 mg/mL를 첨가한 실험군이 10 mg/mL의 glutamate만을 첨가해 배양한 대조군에 비해 유의하게 세포의 생존율이 높았으며($P \leq 0.01$), 열수 추출물의 경우에는 100 mg/mL 농도 처리 군에서만 glutamate만 처리한 군에 비해 생존율이 유의하게 높았다($P \leq 0.01$). Choi 등[40]은 20 mg/mL 농도의 glutamate를 PC-12 세포 배양액에 첨가하여 독성을 유발한 후 느릅나무 근피의 에틸아세테이트와 부탄올 분획을 처리하여 배양한 결과 glutamate만을 처리하여 배양한 실험 군에 비해 세포의 생존율이 유의하게 높았다고 보고하였는데 이는 PC-12 세포 내에 glutamate에 의해 생성된 활성산소의 독성이 느릅나무 추출물의 항산화 작용에 의해 감소되어 PC-12 세포의 생존율이 높아지게 된 것이라고 하였다. 따라서 본 실험에서 마른진흙버섯 자실체의 메탄올과 열수 추출물에 의해 glutamate가 처리된 PC-12 세포의 생존율이 증가된 것은 이 버섯의 자실체에 함유된 풍부한 페놀과 플라보노이드 등의 항산화 성분이 glutamate가 PC-12 세포에 유도한 활성산소의 독성을 감소시킨 때문으로 사료된다.

Lipopolysaccharide (LPS)는 그람 음성 세균의 세포막 구조 성분으로 다당류, 인지질 및 소량의 단백질로 구성되어 있으며 생체 내의 대식세포(macrophage)를 자극하여 inducible nitric oxide synthase (iNOS)를 발현시켜 L-arginine으로부터 nitric oxide (NO)를 생성해 매개성 면역반응을 일으킨다고 알려져 있다[41]. LPS는 또한 대식세포를 자극하여 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β) 등과 같은 염증 촉진성 사이토카인(cytokine)의 생산을 증가시키는 것으로 보고되었다[42, 43]. 본 실험에서 DMEM 배지에 LPS를 첨가해 배양한 양성대조군의 RAW 264.7 세포가 생성한 NO의 농도는 43.53 mM로 DMEM 배지에 RAW 264.7 세포만을 배양해 생성된 대조군의 NO의 농도 6.47 μ M에 비해 6.73배 증가하였다. 메탄올 추출물을 2.0 mg/mL 농도로 배지에 처리하고 RAW 264.7 세포를 배양하여 생산된 실험 군의

NO 농도는 13.10 μM 로 양성대조군에 비해 3.33배 감소하였고 2.0 mg/mL 농도의 열수 추출물을 첨가하여 배양한 RAW 264.7 세포가 생성한 NO의 농도는 14.77 mM로 측정되어 2.95배 감소하였다. 메탄올과 열수 추출물은 모든 실험 농도의 범위에서 RAW 264.7 세포의 NO의 생성을 저해하였으며 메탄올 추출물이 열수 추출물에 비해 NO의 생성 저해효과가 높았다. Jang 등[44]은 낙엽송추출물(*Phellinus pini*) 자실체의 메탄올 추출물의 hexane 분획을 RAW 264.7 세포 배양액에 첨가하고 LPS를 처리하여 생성된 NO가 LPS만을 처리한 양성대조군에 비해 농도 의존적으로 유의하게 감소하였는데 이는 hexane 분획에 함유된 2종의 ergosterol 유도체에 의해 나타난 저해효과라고 보고하였다. Fangkrathok 등[45]은 *Lentinus polychrous*의 균사체 추출물이 NO의 생성에 관여하는 RAW 264.7 대식세포 내의 iNOS 효소의 발현을 저해하여 RAW 264.7 세포에서 생성되는 NO가 감소하는 것을 확인하였고 추출물에 농도 의존적으로 NO의 생성이 감소했다고 보고하였다. 본 실험에서도 RAW 264.7 세포에 처리한 마른진흙버섯 메탄올과 열수추출물의 농도가 높아짐에 따라 NO의 생성량도 농도 의존적으로 유의성 있게 감소되는 것이 관찰되었다.

부종(edema)은 신체 내의 조직과 장기 주변 공간에 체액이 저류되어 붓는 상태를 말하며, 신체 부위의 어느 곳이나 생길 수 있다. 다리나 손에 부종이 있는 경우 말초 부종이라고 하고, 복부에 물이 차는 경우 복수, 폐에 물이 차는 경우 폐부종이라 부른다[46]. Carrageenan은 홍조류의 일종인 *Chondrus crispus*에서 추출한 점액성의 유황이 풍부한 다당류로 동물에 염증을 효과적으로 유발하는 물질이다. Carrageenan에 의한 초기의 염증반응은 histamine, kinins, serotonin, prostaglandin E 등에 의해 혈관의 확장이나 투과성이 증가하고 이후에는 bradykinin에 의해 부종을 수반하는 지속적인 염증반응이 일어나는 것으로 보고되어 있다[47]. Carrageenan을 흰쥐의 뒷발 바닥에 주사하여 급성 부종을 유발하는 실험은 소염 물질의 염증 저해 효과를 확인하는 체내검사(*in vivo*) 모델로 널리 알려져 있다[48]. 마른진흙버섯의 메탄올추출물은 실험에 사용한 모든 농도에서 부종을 저해하는 효과가 나타났으나 50 mg/kg을 투여한 실험군은 5.0 mg/kg을 투여한 실험군에 비해 투여 6시간 경과 후의 부종 저해율은 2.18배로 나타나 고농도 추출물을 투여한 실험군의 저해효과가 저농도 투여군에 비해 크게 높았다. 그러나 5.0 mg/kg의 동일 농도 범위에서 메탄올 추출물의 저해효과는 양성대조군인 indomethacin에 비해 유의하게 낮았다. Lim 등[49]은 carrageenan으로 부종을 유발한 흰쥐에 목질진흙버섯(*Phellinus linteus*)의 자실체 열수추출물을 투여하여 항염증

효과를 측정된 결과 투여한 추출물 농도가 증가함에 따라 부종 저해효과도 비례해서 증가했다고 보고하였으며 본 실험에서도 추출물의 농도 증가에 따라 부종의 저해효과도 높아지는 것이 관찰되었다. 따라서 마른진흙버섯 자실체에는 흰쥐의 부종을 현저하게 저해하는 물질이 함유되어 있을 것으로 추정되며, 본 실험의 중요성과는 우리나라의 민간이나 한방에서 오랫동안 약용으로 사용해왔던 마른진흙버섯을 실험을 통해 통풍, 치매 및 염증의 치료에 이용이 가능하다는 것을 입증한 것이 가장 중요하다고 판단된다. 그러므로 이들 추출물의 분획을 통한 유효성분의 규명과 이를 이용한 여러 염증질환을 대상으로 추가의 실험이 필요할 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 마른진흙버섯 자실체를 메탄올과 열수를 이용해 추출한 물질의 anti-xanthine oxidase, anti-cholinesterase 및 염증 저해 효과에 대한 연구를 수행하였다. 마른진흙버섯 자실체의 메탄올 추출물과 열수 추출물의 xanthine oxidase에 대한 저해효과는 양성대조군으로 사용한 allopurinol과 대등하게 높은 효과를 나타냈다. Acetylcholinesterase에 대한 메탄올 추출물의 1.0~2.0 mg/mL 농도에서의 저해효과는 양성대조군인 galanthamine과 유사하게 높았지만 butyrylcholinesterase에 대한 메탄올과 열수 추출물의 저해효과는 양성대조군에 비해 실험에 사용한 모든 농도범위에서 유의하게 낮았다. PC-12 세포에 glutamate의 처리에 의해 유도된 독성은 40 mg/mL와 100 mg/mL 농도의 메탄올 추출물과 100 mg/mL 농도의 열수 추출물의 처리에 의해 크게 완화되어 PC-12 세포의 생존율이 유의하게 증가하는 것이 관찰되었다. 마른진흙버섯의 메탄올과 열수 추출물의 염증 저해 실험에서 RAW 264.7 대식세포에 메탄올 추출물을 2.0 mg/mL 농도로 처리하고 염증을 매개하는 LPS를 추가로 투여한 후 RAW 264.7 세포에 생성되는 NO를 측정된 결과, 양성대조군에 비해 3.37배 높은 저해효과를 나타냈고, 처리한 자실체 메탄올 추출물의 농도가 증가함에 따라 생성된 NO의 양이 현저하게 감소하는 경향을 나타내었다. 또한 기염제인 carrageenan에 의해 흰쥐 뒷발에 유도된 부종 저해 실험에서는 투여한 버섯 추출물의 농도가 증가함에 따라 흰쥐의 뒷발에 유도된 부종의 용적이 농도 의존적으로 감소하는 경향을 나타냈다. 따라서 마른진흙버섯 자실체에 함유된 물질은 acetylcholinesterase과 butyrylcholinesterase 등의 cholinesterase에 대한 저해작용과 glutamate에 의해 유도된 PC-12세포의 독성을 완화하고 또한 염증을 저해하는 효과를 나타내 기

역력이 감퇴되는 초기 알츠하이머병과 염증을 완화하는 천연 소염제로의 이용이 가능할 것으로 사료된다.

Acknowledgements: None

Conflict of interest: None

REFERENCES

- Francis PT, Palmer AM, Snape M, Wilcock GK. The cholinergic hypothesis of alzheimer's disease: a review of progress. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1999;66:137-147.
- Beal F. Aging, energy and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann Neurol*. 1995;38:357-366.
- Coyle JT, Price DL, DeLong MR. Alzheimer's disease: a disorder of cholinergic innervation. *Science*. 1983;219:1184-1190.
- Talesa VN. Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Mech Aging Dev*. 2001;122:1961-1969.
- Block F, Pergande G, Schwarz M. Flupirtine reduces functional deficits and neuronal damage after global ischemia in rats. *Brain Res*. 1997;754:279-284.
- Colovic MB, Krstic DZ, Lazarevic-Pasti TD, Bondzic AM, Vasic VM. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Curr Neuropharmacol*. 2013;11:315-335.
- Xie QW, Whisnant R, Nathan C. Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon γ and bacterial lipopolysaccharide. *J Exper Medi*. 1993;177:1779-1784.
- Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008;454:428-435.
- MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:323-350.
- Hippeli S, Elstner EF. Inhibition of biochemical model reactions for inflammatory processes by plant extracts: a review on recent developments. *Free Radi Res*. 1999;31(Suppl):S81-S87.
- Boumpas DT, Chrousos GP, Wilder RL, Cupps TR, Balow JE. Glucocorticoid therapy of immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. *Ann Intern Med*. 1993;119:1198-1208.
- Wasser SP, Weis AL. Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. *Crit Rev Immunol*. 1999;19:65-96.
- Lindequist U, Niedermeyer THJ, Julich WD. The pharmacological potential of mushrooms. *eCAM*. 2005;2:285-299.
- Yoon KN, Jang HS, Jin GH. Antioxidant, anti-diabetic, anti-cholinesterase, and nitric oxide inhibitory activities of fruiting bodies of *Agaricus brasiliensis*. *Korean J Clin Lab Sci*. 2015;47:194-202.
- Park WH, Lee HD. Illustrated book of Korean medicinal mushrooms. 2nd ed. Seoul: Kyohak Publishing; 2003. p359-360.
- Bae JS, Jang KH, Yim H, Jin HK. Polysaccharide isolated from *Phellinus gilvus* inhibit melanoma growth in mouse. *Caner Lett*. 2005;218:43-52.
- Yoon KN, Jang HS. Antioxidant and antimicrobial activities of fruiting bodies of *Phellinus gilvus* collected in Korea. *Korean J Clin Lab Sci*. 2016;48:355-364.
- Shim SM, Im KH, Kim JW, Shim MJ, Lee MW, Lee TS. Studies on immuno-modulatory and antitumor effects of crude polysaccharides extracted from *Paecilomyces sinclairii*. *Korean J Mycol*. 2003;31:155-160.
- Swain T, Hillis WE, Ortega M. Phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. Quantitative analysis of phenolic constituents. *J Sci Food Agric*. 1959;10:83-88.
- Moreno MIN, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. Comparison of the free radical scavenging activity of propolis from several region of Argentina. *J Ethnopharmacol*. 2000;71:109-114.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Immunol Meth*. 1983;65:55-63.
- Stirpe F, Corte Della E. The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion *in vitro* of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J Biol Chem*. 1969;244:3855-3863.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*. 1961;7:88-95.
- Greene LA, Tischler AS. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci*. 1976;73:2424-2428.
- Ma S, Liu H, Jiao H, Wang L, Chen L, Liang J, et al. Neuroprotective effect of ginkgolide K on glutamate-induced cytotoxicity in PC 12 cells via inhibition of ROS generation and Ca^{2+} influx. *Neurotoxicol*. 2012;33:59-69.
- Ryu JH, Ahn H, Kim JY, Kim YK. Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophage. *Phytother Res*. 2003;17:485-489.
- Winter CA, Riskey EA, Nuss GW. Carrageenan induced edema in the hind paw of rat as an assay for anti-inflammatory activity. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1962;111:544-547.
- Rocha-Guzmán NE, González-Laredo JA, Conzalez-Laredo RF, Reynoso-Camacho R, Ramos-Gmez M, Garcia-Gasca T, et al. Antioxidant activity and genotoxic effect on HeLa cells of phenolic compounds from infusions of *Quercus resinosa* leaves. *Food Chem*. 2009;115:1320-1325.
- Yim HS, Chye FY, Ho SK, Ho WC. Phenolic profiles of selected edible wild mushrooms as affected by extraction solvent, time and temperature. *Asian J Food Ag-Ind*. 2009;2:392-401.
- Ling X, Bochu W. A review of phytotherapy of gout: perspective of new pharmacological treatments. *Pharmazie*. 2014;69:243-256.
- Storch I, Ferber E. Detergent-amplified chemiluminescence of lucigenin for determination of superoxide amino production by NADPH oxidase and xanthine oxidase. *Anal Biochem*. 1988;169:262-267.
- Costantino L, Albasini A, Rastelli G, Benvenuti S. Activity of polyphenolic crude extracts as scavengers of superoxide radicals and inhibitors of xanthine oxidase. *Planta Med*. 1992;58:342-344.
- Alam N, Yoon KN, Lee JS, Cho HJ, Lee TS. Consequence of the antioxidant activities and tyrosinase inhibitory effects of various extracts from the fruiting bodies of *Pleurotus ferulae*. *Saudi J Biol Sci*. 2012;19:111-118.

34. Tayebati SK, Di Tullio MA, Amenta F. Effect of treatment with the cholinesterase inhibitor rivastigmine on vesicular acetylcholine transporter and choline acetyltransferase in rat brain. *Clin Exp Hypertens*. 2004;26:363-373.
35. Nguyen TK, Shin DB, Lee KR, Shin PG, Cheong JC, Yoo YB, et al. Antioxidant, anti-inflammatory and anti-acetylcholinesterase activities of fruiting bodies of *Phellinus xeranticus*. *J Mushroom Sci Prod*. 2013;11:278-286.
36. Yoon KN, Lee TS. *In vitro* antioxidant, anti-hyperglycemic, anti-cholinesterase, and inhibition of nitric oxide production activities of methanol and hot water extracts of *Russula rosacea* mushroom. *J Mushrooms*. 2015;13:1-10.
37. Choi DW. Excitotoxic cell death. *J Neurologic*. 1991;23:1262-1276.
38. Naito M, Umegaki H, Iguchi A. Protective effects of probucol against glutamate-induced cytotoxicity in neuronal cell line PC 12. *Neurosci Lett*. 1995;186:211-213.
39. Beal MF. Mechanisms of excitotoxicity in neurologic diseases. *PASEB J*. 1992;6: 3338-3344.
40. Choi WH, Oh YS, Ahn JY, Kim SR, Ha TY. Antioxidative and protective effects of *Ulmus davidiana* var. *japonicus* extracts on glutamate-induced cytotoxicity in PC 12 cells. *Korean J Food Sci Technol*. 2005;37:479-483.
41. Abbas AK, Lichtman AH, et al. Cellular and molecular immunology. 6th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2006. p75-77.
42. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cell. *The FASEB J*. 1992;6:3051-3064.
43. Willeaume V, Kruys V, Mijatovic T, Huez G. Tumor necrosis factor-alpha production induced by viruses and by lipopolysaccharides in macrophages: similarities and differences. *J Inflamm*. 1996;46:1-12.
44. Jang HJ, Kim AK, Pyo MY, Yang KS. Inhibitors of nitric oxide synthesis from *Phellinus pini* in murine macrophages. *J Pharm Soc Korea*. 2007;51:430-434.
45. Fangkrathok N, Junlatat J, Sripanidkulchai B. *In vivo* and *in vitro* anti-inflammatory activity of *Lentinus polychrous* extract. *J Ethnopharm*. 2013;147:631-637.
46. Lee IG. Differential diagnosis and treatment of generalized edema. *J Korean Acad Fam Med*. 2003;24:6-10.
47. Cho YS, Kim ND, Kim SA. Effects of concurrent administration of aspirin and prednisolone on the anti-inflammatory and antipyretic activities in rats. *J Pharm Soc Korea*. 1978;22:128-137.
48. Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W, Lee L, Isakson P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:12013-12017.
49. Lim JH, Kim SH, Park NH, Moon CG, Kang, SS, Kim SH, Shin DH, Kim JC. Acute and chronic antiinflammatory effects of *Phellinus linteus* water extract in rats. *J Biomed Res*. 2010; 11:27-35.