

말뚝버섯 자실체의 항산화, 항콜린에스테라제 및 염증 저해 활성

윤기남¹ · 이태수^{2*}

¹안산대학교 임상병리과

²인천대학교 생명과학부

Antioxidant, anti-cholinesterase, and inflammation inhibitory activities of fruiting bodies of *Phallus impudicus* var. *impudicus* L.

Ki Nam Yoon¹ and Tae Soo Lee^{2*}

¹Department of Clinical Laboratory Science, Ansan University, Ansan, Korea

²Division of Life Sciences, Incheon National University, Incheon, Korea

ABSTRACT: *Phallus impudicus* var. *impudicus* L. is an edible mushroom that has long been used as folk medicine in China. The aim of this study was to evaluate the antioxidant, anti-cholinesterase, and inflammation inhibitory activities of a methanol extract of fruiting bodies of *P. impudicus* var. *impudicus* L. The extract exhibited good 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl scavenging activity, excellent ferrous ion chelating activity, and moderate hydroxyl radical scavenging activity compared with BHT at 2.0 mg/ml. However, the reducing power of the extract was significantly lower than that the BHT positive control. Although the inhibitory activities of methanol extract on acetylcholinesterase and butyryl cholinesterase were significantly lower than the galanthamine positive control at the concentration tested, the inhibition of acetylcholinesterase and butyryl cholinesterase was 52.83% and 55.17%, respectively, at 1.0 mg/ml. The methanol extract also demonstrated excellent inhibition of inflammation-related activities, such as production of nitric oxide in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophage cells and acute edema induced by administration of carrageenan on the hind paw of rats. The collective results suggest that the fruiting body of *P. impudicus* var. *impudicus* L. might be a good source of antioxidant, anti-cholinesterase, and anti-inflammation compounds.

KEYWORDS: Anti-cholinesterase, Anti-inflammation, Antioxidant, *Phallus impudicus* var. *impudicus* L.

서 론

세포내에서 인체가 필요로 하는 에너지를 생산하는 과정에서 활성산소(reactive oxygen species)와 자유유리기

(free radical) 등이 발생하게 된다. 인체에서는 이에 대한 방어기작으로 활성 산소 등을 억제하는 물질을 생성하여 인체에 해로운 산화물을 제어하고 있지만 불규칙적인 식습관, 약물, 유전적 요인 그리고 환경오염 등에 의해 체내의 항산화 방어체계가 무너지면서 산화물질에 의한 DNA의 변성, 세포막의 파괴 및 세포의 노화 등이 초래된다 (Kang, 2013). 활성산소의 발생을 제어하기 위해 식품이나 화장품 등에 첨가하는 합성산화제 butylated hydroxyanisole(BHA), butylated hydroxy toluene(BHT) 및 propyl gallate (PG) 등이 개발되어 이용되고 있으나 이들 물질의 분해과정에서 생기는 독성과 암 발생의 위험성으로 인해 보다 안전하고 효과가 높은 천연항산화제의 개발이 필요하게 되었으며 최근 식용식품, 약용식품 그리고 미생물로부터 항산화 효과가 높은 물질을 탐색하여 이를 인체의 생리활성 증진과 산화물질과 관련된 퇴행성 질환을 치료하기 위한 연구가 진행되고 있다 (Weisburger,

J. Mushrooms 2019 September, 17(3):152-161
<http://dx.doi.org/10.14480/JM.2019.17.3.152>
 Print ISSN 1738-0294, Online ISSN 2288-8853
 © The Korean Society of Mushroom Science

*Corresponding author
 E-mail : tslee@inu.ac.kr
 Tel : +82-32-835-4617, Fax : +82-32-835-0763

Received August 30, 2019
 Revised September 19, 2019
 Accepted September 23, 2019

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1999).

노화와 밀접한 관련이 있는 질병에 치매가 있으며, 매년 65세 이상 노인의 치매 환자 수가 전 세계에서 증가하고 있다. 치매의 중요 증상은 기억력 감퇴와 인지 능력의 퇴화이며 이로 인해 인간의 삶이 황폐화되고 완치가 불가능한 퇴행성 질병이다 (Nordberg, 1996). 치매 중 가장 많이 알려진 병은 알츠하이머 병 (Alzheimer's disease, AD)으로 전 세계 치매 환자의 약 70% 이상을 차지하고 있다 (Selkoe, 1991). 치매의 대표적인 증상은 중추신경계와 말단신경계에 모두 작용하는 신경전달물질인 acetylcholine과 butyrylcholine의 함량이 뇌에서 줄어들면서 동시에 기억력도 감퇴하는 것에 원인이 있다. 기억력의 감퇴에 가장 큰 영향을 미치는 효소에는 acetylcholinesterase (AChE)와 butyrylcholinesterase(BChE) 효소가 있다. AChE는 대뇌피질에 들어있는 아세틸콜린을 아세틸과 콜린으로 분해하여 뇌의 아세틸콜린의 농도를 감소시켜 기억력을 감퇴시킨다. 따라서 초기의 AD를 치료하는데 의료기관에서 사용하는 방법은 AChE와 BChE의 활성을 저해하는 Donepezil, Rivastigmine, Galantamine 등과 같은 약제를 처방하고 있으나 장기복용에 따른 오심, 구토, 체중 감소, 수면 장애 등의 부작용이 발생하고 있다 (Ikeya *et al.*, 2004). 따라서 체내의 아세틸콜린의 함량을 적절하게 유지해 급격한 기억력 감퇴와 AD의 진행을 막기 위해서는 천연물로부터 부작용이 적고 치료 효과가 높은 새로운 AChE 저해제를 선별하는 연구가 진행되고 있다 (Behl, 1999).

염증(inflammation)은 생체 조직이 세균이나 바이러스 등의 병원균의 침입 또는 유해한 자외선, 방사선, 대기공해 등 외부의 자극으로부터 생체를 보호하고자 하는 반응으로 면역세포, 혈관, 분자생물학적인 중간체들이 관여하고 있다. 염증의 목적은 초기에 손상된 생체 조직과 세포의 복구와 함께 상처로 인해 괴사된 조직을 제거함과 동시에 빠르게 재생하는 것이다. 염증반응은 크게 급성염증(acute inflammation)과 만성염증(chronic inflammation)으로 나뉜다. 급성염증반응은 유해한 자극원에 의해 초기에 일어나는 반응을 말하며, 이 반응은 혈관의 손상된 부위로 혈장과 백혈구의 이동이 증가되면서 일어나는 증상으로 홍조, 열 및 부기 등이 발생한다. 이와 반대로 급성염증반응이 빠르게 종료되지 않고 오랜 기간 동안 지속되는 것을 만성염증이라고 부르는데 (Fierro and Serhan, 2001), 만성염증 반응이 오랫동안 진행되면 치주염, 동맥경화증 류머티스 관절염, 암과 같은 여러 질병들이 유발될 수 있으므로 염증반응은 초기에 적절하게 조절해야 할 필요성이 있다 (Yoon *et al.*, 2013). 따라서 염증을 비롯한 인체의 각종 질환을 치료하기 위해서는 체내의 항산화 능력을 증가시키거나 염증을 줄일 수 있는 새로운 물질의 탐색이 중요하게 되었다.

말뚝버섯 (*Phallus impudicus* var. *impudicus* L.)은 담

자균문 (Basidiomycota)의 복균강 (Gasteromycetes), 말뚝버섯목 (Phallales), 말뚝버섯과 (Phallaceae), 말뚝버섯속 (*Phallus*)에 속하는 버섯으로 흙속의 부식질, 나뭇잎, 나무 줄기 등을 분해해 살아가는 부생균으로 도시주변의 정원이나 숲속 땅에 여름부터 가을에 걸쳐 단생 또는 군생한다. 대는 흰색의 원통형으로 위로 곧게 9~15 cm 뻗으며 대의 맨 윗부분은 악취를 내는 암녹색의 점액질로 덮혀 있는데 이는 동물이나 곤충을 역한 냄새로 유인해 점액질 속의 포자를 동물이나 곤충의 몸에 묻게 하여 포자를 널리 퍼뜨리는 생존전략이다 (Park and Lee, 2011). 중국의 귀주성, 산시성, 운남성 등에서는 오래 전부터 야생의 말뚝버섯을 채취하여 악취가 나는 대의 윗부분을 물에 씻어 말린 후 식용으로 사용해왔는데 최근 이들 지역에서 말뚝버섯의 인공재배에 성공하여 슈퍼마켓이나 백화점 등에서 판매하고 있다. 말뚝버섯의 생리활성 효과에 대해서는 Park and Lee (2003)가 말뚝버섯의 자실체에는 항산화, 항종양 및 비만억제에 도움을 주는 성분이 함유되어 있다고 보고하였으며, 중국에서도 이 버섯의 자실체가 설사, 류머티즘, 암의 치료에 이용되고 있다고 보고하였다 (Ying *et al.*, 1987). 따라서 본 연구에서는 말뚝버섯의 자실체의 생리활성 효과를 알아보기 위해 중국에서 생산된 말뚝버섯의 자실체를 메탄올을 이용해 추출물은 만든 뒤 항산화, 콜린에스테라제 저해 및 항염증 효과에 대한 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 말뚝버섯의 자실체는 중국 귀주성의 버섯농장에서 생산된 것을 중국 북경의 Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College의 Guo Shun-xing 교수를 통해 구하였다. 이 버섯의 자실체는 45°C의 건조기에서 48 시간 건조한 후 미세한 분말로 마쇄하여 -70°C의 저온냉동고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

성분의 추출 및 분리

Shim *et al.* (2003)의 방법에 따라 건조한 말뚝버섯 자실체 분말에 80% 메탄올을 이용해 성분을 추출하여 실험에 사용하였다. 즉, 30 g의 말뚝버섯 자실체의 분말을 80%의 메탄올 용액(덕산약품공업, Korea) 600 ml에 침지하여 48시간 동안 상온에서 3회 추출한 후 이 추출액을 모으고 여과지 (Avantec Toyo Co., No. 2, Japan)로 여과한 후 40°C에서 회전 감압농축기(N-1000, EYELA Co., Japan)를 이용하여 감압 농축한 뒤 동결건조기(FDU-8612, Operon Co., Korea)를 이용해 농축액내의 수분을 제거하여 15.91% (w/w)의 메탄올 추출물을 얻었다.

총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량의 측정은 Folin-Denis의 방법을 변형한 Swain and Hills (1959)의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 말뚝버섯 메탄을 추출물을 1 mg/ml의 농도로 용해한 각 용매 별 추출액에 Folin-Ciocalteu 시약 및 10%의 NaCO₃ 용액을 각각 1 ml씩 차례로 가한 후 실온에서 1시간 방치 후 UV/VIS Spectrophotometer (Optizen POP, Korea)를 이용해 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid (Sigma Co., Ltd., St. Louis, MO, USA)를 0~100 µg/ml의 농도로 제조한 후 시료와 동일한 방법으로 분석하여 얻은 표준 검량선을 이용하여 추출물의 총 폴리페놀 함량을 측정하였다.

총 플라보노이드 함량 측정

말뚝버섯의 총 플라보노이드 함량은 Moreno *et al.* (2000)의 방법에 따라 1 mg/ml 농도의 시료액에 10% aluminum nitrate 0.1 ml, 1M potassium acetate 0.1 ml 및 ethanol 4.3 ml를 차례로 가하여 혼합하고 실온에서 40분간 방치한 후 UV/VIS Spectrophotometer (Optizen POP, Korea)를 이용해 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. Quercetin을 표준물질로 하여 얻은 표준 검량선으로부터 추출물의 총 플라보노이드 함량을 측정하였다.

DPPH 라디칼 소거 활성

말뚝버섯 메탄을 추출물의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거활성은 Blois (1958)의 방법으로 측정하였다. 시료를 메탄올로 녹여 최종 농도가 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mg/ml이 되도록 정량하여 96 well plate에 각 시료를 100 µl를 주입하고, 동시에 0.3 mM DPPH 100 µl를 넣어 총량이 200 µl가 되도록 하였다. 실온에서 10분간 반응시킨 후 microplate reader (SpectraMax 340PC, California, USA)를 이용해 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거 활성은 다음의 계산식을 이용해 구하였다. 양성대조군으로는 BHT를 사용하였다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거 활성(\%)} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

이때 A_{control}은 무첨가군의 흡광도, A_{sample}은 시료 첨가군의 흡광도이다.

Hydroxyl radical 소거 활성

Halliwell and Gutteridge (1987)의 방법에 따라 시험관에 1 mM FeSO₄/EDTA 용액, 추출물을 각 0.2 ml 씩 가하고 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) 1.2 ml와 10 mM H₂O₂를 가하여 37°C 항온수조에서 1시간 반응시켰다. 여기에 2.8% TCA 용액 1 ml를 가하여 반응을 정지시키고 1% TBA (thiobarbituric acid)용액 1 ml를 가하여 100°C의 항온수조에서 10분 간 가열하고 급냉시킨 후 spectrophotometer

를 이용해 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 말뚝버섯 메탄을 추출물의 hydroxyl radical 소거활성은 다음의 계산식을 이용해 구하였다. 양성대조군으로는 BHT를 사용하였다.

$$\text{Hydroxyl radical 소거활성 (\%)} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

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

철 이온 제거능

말뚝버섯 메탄을 추출물의 철 이온 제거능은 Yena *et al.* (2002)의 방법에 준하여 수행하였다. 그 원리는 버섯에 함유되어 있는 항산화 물질에 의해 Fe₂⁺ 이온이 제거되어 더 이상의 ferrozine-Fe₂⁺ 복합체가 형성되지 않는 것을 측정하였다. 각각의 농도별 버섯의 메탄을 추출물을 준비한 후 2.0 ml 추출물에 2 mM FeCl₂(Sigma Aldrich Co., USA) 0.05 ml를 혼합한 후 0.2 mL의 5 mM ferrozine을 첨가하여 반응을 시작한 후 메탄을 2.75 ml를 첨가하여 총용량이 5 ml가 되도록 하고 vortex mixer를 이용하여 강하게 진탕한 뒤 UV/ VIS spectrophotometer (Optizen POP, Korea)를 이용해 반응액의 흡광도를 562 nm에서 측정하여 다음의 계산식에 의해 철 이온 제거능을 계산하였다. 양성대조군으로는 BHT를 사용하였다.

$$\text{철 이온 제거능 (\%)} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

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

환원력

말뚝버섯 메탄을 추출물의 환원력 활성 실험은 Gulcin *et al.* (2003)의 방법에 따라 수행하였다. 시료 2.5 ml에 sodium phosphate buffer (2.5 ml, 200 mM, pH 6.6)와 1% potassium ferricyanide (2.5 ml)를 혼합한 후 이 혼합물을 50°C에서 20분 동안 배양한 뒤 trichloroacetic acid (2.5 ml, 10%, w/v)를 첨가하여 650×g에서 10분간 원심 분리하였다. 원심 분리 한 상층액 5 ml에 3차 증류수 5 ml와 1% ferric chloride 1 ml를 첨가 후 UV/VIS-spectrophotometer (Optizen POP, Korea)를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Acetylcholinesterase (AChE)의 저해 활성

말뚝버섯 메탄을 추출물의 AChE 저해활성은 Ellman *et al.* (1961)의 방법에 따라 acetylthiocholine을 기질로 사용하였으며 AChE에 의해 생성되는 thiocholine을 DTNB와 반응시켜 그 결과 생성되는 5-thio-2-nitrobenzoate를 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 즉, 96 well microplate에 100 µl의 AChE assay buffer (0.1 M Tris-HCl, pH 8.2),

10 μ l의 0.5 U/ml AChE(dissolved in assay buffer containing 10% glycerol) 및 0.063~1.0 mg/ml 농도로 희석된 10 μ l의 시료를 가하고 상온에서 10분 동안 진탕배양 한 후 10 μ l의 10 mM DTNB와 5 μ l의 100 mM acetylthiocholine을 가하여 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 양성대조군으로 사용하였으며, AChE의 저해활성은 다음의 계산식을 이용해 구하였다.

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

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

Butyrylcholinesterase (BChE) 저해 활성

말뚝버섯 메탄올 추출물의 BChE 저해활성은 Orhan *et al.* (2006)의 방법에 따라 butyrylcholine iodide를 기질로 사용하였으며 BChE의 가수 분해로 생성된 thiocholine을 DTNB와 반응시켜 그 결과 생성된 반응물의 흡광도를 측정하였다. 즉, 96 well microplate에 120 μ l의 BChE assay buffer (0.1 M Tris-HCl, pH 8.2), 30 μ l의 0.5 U/mL BChE (dissolved in assay buffer containing 10% glycerol) 및 0.063~1.0 mg/ml의 농도로 희석된 30 μ l의 추출물의 시료를 첨가하고 상온에서 10분 동안 진탕배양 후 0.5 mM DTNB 10 μ l와 0.35 U/ml butyrylcholine iodide 30 μ l를 첨가해 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 계산식을 이용해 구하였다.

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

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

세포 배양

실험에 사용한 생쥐의 RAW 264.7 대식 세포는 서울대학교의 한국세포주은행에서 분양받았으며 이들 세포의 배양에는 DMEM 배지 (GIBCO, Grand Island, NY, USA)을 기본배지로 하여 10% fetal bovine serum (FBS)을 구입하여 100 U/ml penicillin 및 100 μ g/ml streptomycin이 함유한 배지를 조제하여 37°C, 5%의 CO₂ 배양기에서 3일에 한 번씩 계대 배양하였다.

세포 독성 측정

말뚝버섯 메탄올 추출물의 RAW 264.7 세포에 대한 독

성은 Mosmann의 방법 (1983)에 따라 수행하였다. 지수에 도달한 세포주를 DMEM 배지가 분주된 96 plate well에 2 \times 10⁵ cell/ml의 농도로 분주하고 24시간 배양한 후, 배지의 상층액을 제거하고 말뚝버섯 추출물을 0.063, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 mg/ml의 농도로 200 μ l 새로운 배지에 첨가하여 48시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후 상층액을 제거하고 각각의 well에 MTT용액 (5 mg/ml in PBS) 10 μ l 씩 첨가하고, 다시 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 동안 배양하여 MTT를 환원시켰다. MTT의 환원에 의해 각각의 well에 생성된 자주색의 formazan 결정은 150 μ l의 DMSO로 녹여 microplate reader (SpectraMax 340PC, California, USA)를 이용해 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Nitric oxide (NO) 생성 저해 효과

말뚝버섯 메탄올 추출물의 NO 생성 저해 효과는 Ryu *et al.* (2003)의 방법을 이용해 수행하였다. DMEM 배지가 들어있는 96 well plate에 RAW 264.7 세포를 5 \times 10⁴ cell/well로 분주하고 12시간 배양 후 말뚝버섯 메탄올 추출물을 0, 0.25, 0.5 및 1.0 mg/ml의 농도로 처리하고 1시간 경과 후 1 μ g/ml 농도의 LPS를 추가 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 상층액 100 μ l를 취한 후 동량의 Griess reagent (Sigma, St. Louis, MO, USA) 100 μ l를 넣어 총량이 200 μ l가 되도록 하고 상온에서 10분간 반응시킨 후 생성된 NO의 양을 microplate reader (SpectraMax 340PC, California, USA)를 이용해 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 농도는 아질산염 (NaNO₂)의 표준 곡선을 이용해 구하였다.

Carrageenan에 의해 유도된 부종의 저해 효과

본 실험에는 5주령의 Sprague-Dawley계 암컷 흰쥐를 Daehan Bio-Link사(Eumseong, Korea)에서 분양받아 동물 사용실에서 1주일간 온도 20 \pm 1°C, 습도 45 \pm 5%, 명암 주기 각각 12시간의 조건에서 일반사료로 적응 시킨 후 실험을 수행하였다. 흰쥐의 급성 부종 유발은 Winter *et al.* (1962)의 방법에 따라 수행하였으며 각각의 처리 당 5마리의 흰쥐를 사용하였다. 먼저 생리식염수에 5 mg/kg의 indomethacin과 0, 5, 15, 50 mg/kg 농도의 말뚝버섯 메탄올 추출물을 녹인 뒤 흰쥐 마리당 각각 0.1 ml씩 오른쪽 뒷발바닥에 주사하고 30분 지난 후 0.1 ml의 1% carrageenan 용액을 뒷발바닥에 주사하였다. 말뚝버섯 추출물의 소염효과는 각각의 추출물과 carrageenan을 주사하여 생긴 뒷발바닥의 부종 용적을 plethysmometer (MK-101P, Tokyo, Japan)로 측정해 구하였다. 즉, 흰쥐 뒷발에 부종 유발제인 carrageenan을 주입하기 전을 0으로 하고 주입 후 2, 4, 6시간 경과 후 증가한 뒷발의 용적을 각각의 실험군 별로 측정하여 다음의 식에 의해 부종의 증가율을 구하였다.

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

이 때 V_t 는 주입 후 일정시간 후의 뒷발의 용적, V_n 은 주입 직후 뒷발의 용적

통계 처리

본 연구에서는 3회 이상 반복 실시한 결과를 mean±SD로 나타내었으며, 통계는 SPSS ver. 11.5 (SPSS, Chicago, IL, USA)를 이용하였다. 각 군 간의 측정치 비교는 one-way analysis of variance (ANOVA) test를 실시한 후 $p < 0.05$ 의 수준에서 Duncan's multiple range test로 차이를 검증하였다.

결과 및 고찰

총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

폴리페놀과 플라보노이드 화합물은 광합성을 하는 식물에 의해 생산되는 2차대사물로 식물의 잎, 줄기, 뿌리에 함유되어 있으며 강한 항산화 효과가 갖고 있는 특징이 있다. 식물체를 부후시키거나 식물과 공생해 살아가는 대부분의 버섯은 폴리페놀이나 플라보노이드 함량이 숙주인 식물에 비해 적게 함유되어 있고 그 중에서도 플라보노이드 함량이 폴리페놀에 비해 상대적으로 적은 것으로 보고되어 있다 (Leong and Shui, 2002). 말뚝버섯 자실체 메탄올 추출물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량은 Table 1에 표시하였다. 메탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량과 총 플라보노이드 함량은 각각 3.18 mg GAE/g과 0.87

Table 1. Total polyphenol and flavonoid contents of methanol extract from fruiting bodies of *Phallus impudicus* var. *impudicus* L.

Samples	Yields (% w/w)	Phenolics content (mg GAE/g wt)	Flavonoids content (mg QE/g wt)
Methanol extract	15.91	3.18± 0.43	0.87± 0.15

Values are means ± SD (n=3). GAE, gallic acid equivalents; QE, quercetin equivalent. wt, dry extract weight.

mg QE/g으로 나타나 플라보노이드의 양에 비해 폴리페놀의 양이 약 3.66배 많았다. González-Palma *et al.* (2016)은 느타리 자실체의 메탄올 추출물의 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 각각 2.39 mg GAE/g과 0.049 mg QE/g으로 폴리페놀이 플라보노이드에 비해 함량 높았다고 보고하였다. 따라서 말뚝버섯과 느타리버섯 자실체에는 항산화와 항염증 등에 효과를 나타내는 폴리페놀과 플라보노이드를 느타리와 유사하게 함유되어 있는 것으로 보인다.

DPPH 라디칼 소거활성

말뚝버섯 자실체 메탄올 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성의 측정 결과를 Fig. 1A에 나타내었다. 말뚝버섯 메탄올 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성은 0.125~1.0 mg/ml의 농도 범위에서 23.17~87.67%로 나타나 동일 농도에서의 양성대조군 BHT의 96.20~96.53%에 비해 유의하게 낮았으나 2.0 mg/ml의 추출물 농도에서의 소거활성은

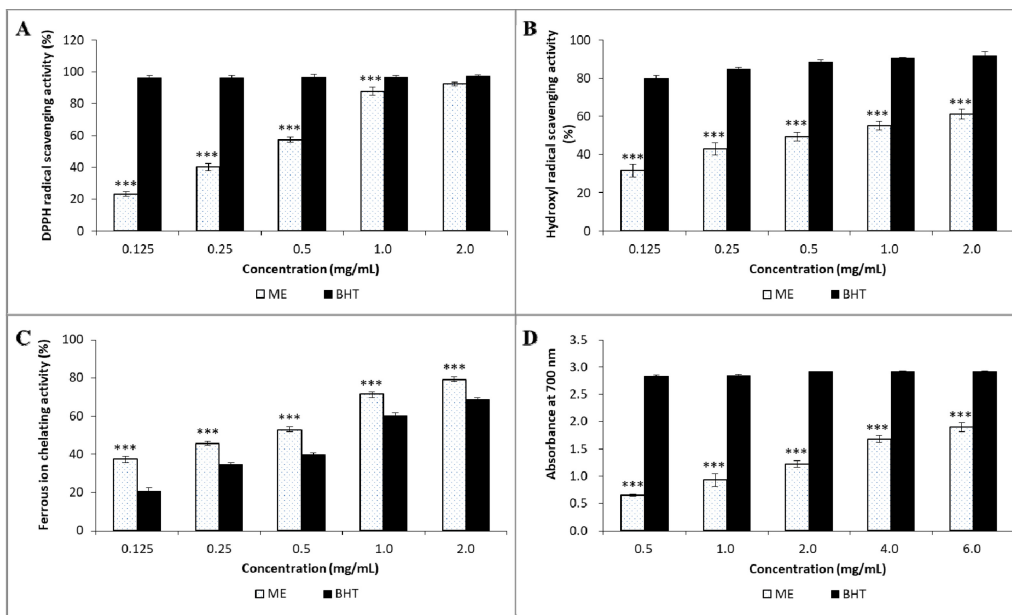


Fig. 1. Antioxidant activities of methanol extract from fruiting bodies of *Phallus impudicus* var. *impudicus* L.. A, DPPH radical scavenging activity; B, Hydroxyl radical (OH[•]) scavenging activity; C, Ferrous ion chelating activity; D, Reducing power. Values are means ± SD (n = 3). BHT, butylated hydroxytoluene; DPPH, 1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl. *** $p \leq 0.001$ vs. BHT.

92.33%로 나타나 동일농도에서의 BHT 소거활성 96.97%에 비해서 조금 낮았으나 통계적인 유의성은 없었다. 따라서 메탄올 추출물의 2.0 mg/ml 농도에서의 DPPH 라디칼 소거활성은 동일농도에서의 BHT의 소거활성과 유사한 효과를 나타냈다. 본 실험 결과는 An *et al.* (2019)이 보고한 흰우단버섯과 박막갈대기버섯 자실체를 70% 발효주정을 이용해 추출한 물질의 1.0 mg/ml 농도에서의 DPPH 라디칼 소거능이 각각 69.7%과 64.2%였다는 결과와 Um *et al.* (2010)이 보고한 노랑느타리의 DPPH 라디칼 소거능 효과에 비해 본 실험의 말뚝버섯의 DPPH 소거능이 조금 높았다. 따라서 말뚝버섯 메탄올 추출물의 DPPH 소거활성은 합성산화제 BHT에 비해 대부분의 실험농도에서 낮게 나타났지만 위의 다른 종류의 버섯에 비해서는 높은 것으로 나타나 DPPH 항산화 효과가 상대적으로 높다고 사료되었다.

Hydroxyl radical 소거활성

Hydroxyl radical은 활성산소 라디칼 중에서 화학적으로 반응성이 가장 크며 지질의 산화에 관여하고 DNA에 손상을 주어 돌연변이를 유발하는 물질로 알려져 있다. 말뚝버섯 자실체의 메탄올 추출물의 hydroxyl radical 소거활성은 0.125~2.0 mg/ml의 농도에서 31.67~61.17%로 나타나 양성 대조군인 BHT의 79.87~91.67%에 비해 유의하게 낮았다 (Fig. 1B). Punitha and Rajasekaran (2014)는 풀버섯 (*Volvariella volvacea*) 자실체 메탄올 추출물의 hydroxyl radical 소거능은 0.25 mg/ml 농도에서 62.45%로 나타났다고 보고하여 동일한 농도에서의 말뚝버섯 추출물의 소거활성 보다 높았으며, Cho *et al.* (2008)은 큰느타리의 메탄올 추출물 1~5 mg/ml 농도에서 53.73~60.50%의 소거능을 보였고, Liu *et al.* [22]은 영지 자실체와 구름버섯 균사체의 메탄올 추출물의 hydroxyl radical 소거능을 측정한 결과 0.4 mg/ml 농도에서 각각 45.75%와 54.4%의 hydroxyl radical 소거능을 나타냈다고 하였다. 따라서 말뚝버섯 자실체의 메탄올 추출물의 hydroxyl radical 소거 활성은 위에서 언급된 버섯과 유사한 활성을 나타내는 것으로 사료된다.

철 이온 제거능

철 이온의 제거능은 버섯 추출물에 함유된 페놀이나 플라보노이드 등의 항산화 성분이 Fe²⁺ 이온을 제거하여 Fe²⁺-ferrozine 복합체 형성을 저해한다는 이론에 근거한 것이다. 말뚝버섯 자실체의 메탄올 추출물은 0.125~2.0 mg/ml 농도 범위에서 37.33~79.17%의 철 이온 제거능을 보여 양성대조군인 BHT의 20.83~68.83%에 비해 철 이온 제거 효율이 유의하게 높았다 (Fig. 1C). 본 실험에서 말뚝버섯 메탄올 추출물 2.0 mg/ml의 농도에서의 철 이온 제거능 79.17%는 Lo (2005)가 보고한 메탄올 추출물 5 mg/ml 농도에서의 큰느타리와 느타리의 철 이온 제거

능 41.4%와 64%에 비해 높았으나 전복느타리 자실체의 메탄올 추출물 0.4 mg/ml 농도에서의 철 이온 제거능 98.3%에 비해서는 낮았다 (Muruke, 2014). 따라서 말뚝버섯에 자실체 추출물에는 철 이온을 제거하는 항산화능이 충분하다고 사료되어 이 버섯을 충분히 섭취하면 항산화 건강에 도움이 될 것으로 사료된다.

환원력

활성산소나 자유유리기에 전자를 공여하는 능력을 환원력이라고 부르며 항산화 활성을 검정하는데 널리 사용되는 방법이다. 실험과정에서 시료의 색이 진한 녹색으로 변하고 흡광도 값이 높아지면 환원력도 높아지고 동시에 항산화 활성도 높다는 것을 보여준다 (Song *et al.*, 2012). 말뚝버섯의 메탄올 추출물의 환원력 측정 결과를 Fig. 1D에 나타내었다. 메탄올 추출물의 환원력은 0.5~6.0 mg/ml 농도 범위에서 0.65~1.90으로 나타나 동일 농도 범위에서의 양성대조군인 BHT의 2.83~2.92에 비해 유의하게 낮았다. Mau *et al.* (2004)은 잎새버섯의 자실체의 메탄올 추출물 5 mg/ml의 농도에서의 환원력이 0.37이라고 보고하였고 Huang과 Mau (2006)는 신령버섯 균사체의 메탄올 추출물의 환원력이 5 mg/ml 농도에서 0.95라고 보고하였는데 이 결과는 본 실험의 말뚝버섯 메탄올 추출물 4 mg/ml 농도에서의 환원력 1.68에 비해 낮은 수준이었다. 따라서 본 실험에 사용한 말뚝버섯의 환원력은 양성대조군 galanthamine에 비해서는 유의하게 낮았지만 위의 잎새버섯의 자실체나 신령버섯 균사체의 환원력에 비해서는 효과가 높은 것으로 나타났다.

Acetylcholinesterase (AChE) 저해 활성

AChE는 시냅스 신호전달 물질인 아세틸콜린 (acetylcholine)을 아세틸과 콜린으로 분해하여 기억력을 감퇴시키는 역할을 하는 효소이다. 말뚝버섯 자실체의 메탄올 추출물은 AChE에 대해 0.063~1.0 mg/ml 농도에서 34.50~52.83%의 저해효과가 나타나 양성대조군인 galanthamine의 86.13~97.83%에 비해 실험에 사용한 모든 농도범위에서 저해효과가 유의하게 낮았다 (Fig. 2A). 말뚝버섯 추출물의 AChE 저해효과는 처리농도가 증가함에 따라 저해효과도 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였다. Nguyen *et al.* (2013)은 기와층버섯 자실체의 메탄올 추출물의 AChE 저해활성을 조사한 결과 0.063~1.0 mg/ml 농도에서 저해활성이 64.19%~83.34%로 나타났다고 보고하였고 Yoon과 Jang (2018)은 마른진흙버섯 자실체의 메탄올 추출물의 AChE에 대한 저해활성이 0.063~1.0 mg/ml 농도에서 79.33~96.17%라고 보고하여 동일 농도범위에서의 말뚝버섯 메탄올 추출물의 AChE 저해활성에 비해 높았다. 따라서 말뚝버섯 자실체의 AChE에 저해활성은 위의 기와층버섯과 마른진흙버섯에 비해 낮았지만 1.0 mg/ml 농도에서의 저해율이 50%를 상회해 Alzheimer's disease와 같

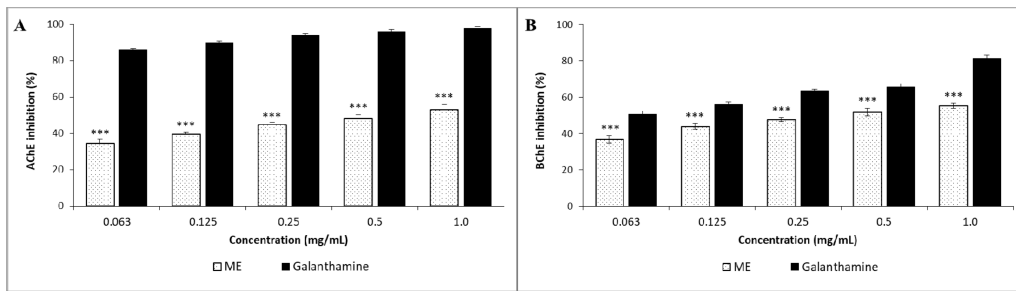


Fig. 2. Cholinesterase inhibitory activities of methanol extract from fruiting bodies of *Phallus impudicus* var. *impudicus* L.. A, Acetylcholinesterase inhibitory activity; B, Butyrylcholinesterase inhibitory activity. AChE, acetylcholinesterase; BChE, butyrylcholinesterase. Values are means \pm SD (n = 4). *** $p \leq 0.001$ vs. galantamine group.

이 기억력을 감퇴시키는 치매 질환의 개선에 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

Butyrylcholinesterase (BChE) 저해 활성

BChE는 AChE와 같이 정보를 전달하는 신경전달물질인 BCh를 분해하여 기억력을 감퇴시키는 역할을 한다고 보고된 효소이다. 말뚝버섯 자실체의 메탄올 추출물의 BChE에 대한 저해활성은 0.063~1.0 mg/ml의 농도에서 각각 36.67~55.17%로 나타나 동일 농도범위에서의 양성 대조군 galanthamine의 저해효과 50.5~81.17%에 비해 유의하게 낮았다 (Fig. 2B). Yoon과 Jang (2018)은 마른진흙버섯 자실체의 메탄올 추출물을 이용해 BChE에 대한 저해 활성을 조사한 결과 0.063~1.0 mg/ml의 농도에서 45.17~71.67%로 나타나 본 실험의 말뚝버섯 자실체추출물의 저해활성보다 효과가 높았으나 이들 실험에서 처리 농도가 높아짐에 따라 농도 의존적으로 BChE에 대해 저해효과도 높아지는 경향을 보였다.

말뚝버섯 추출물의 세포독성

말뚝버섯 자실체의 메탄올 추출물이 RAW 264.7 대식세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위해 말뚝버섯 자실체의 메탄올 추출물을 0.063, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 mg/ml의 농도로 조정하여 RAW 264.7 대식세포에 처리하고 24시간 배양 후 MTT 방법을 이용하여 세포의 생존율을 조사하였다. 실험결과 RAW 264.7 세포는 0.063~1.0 mg/ml의 농도 범위에서 97.33~78.67%의 세포가 생존하여 실험에 사용한 농도 범위에서 거의 독성을 나타내지 않았다 (Fig. 3). 따라서 lipopolysaccharide (LPS)의 유도에 의해 RAW 264.7 대식세포가 생산하는 nitric oxide 생성 실험은 메탄올 추출물 0.25~1.0 mg/ml 농도의 범위에서 수행하였다.

Nitric oxide 생성 저해효과

RAW 264.7 세포와 같은 대식세포(macrophage)는 선천면역, 획득면역 등 여러 면역반응에 관여함으로써 체내의 항상성유지에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 염증반응

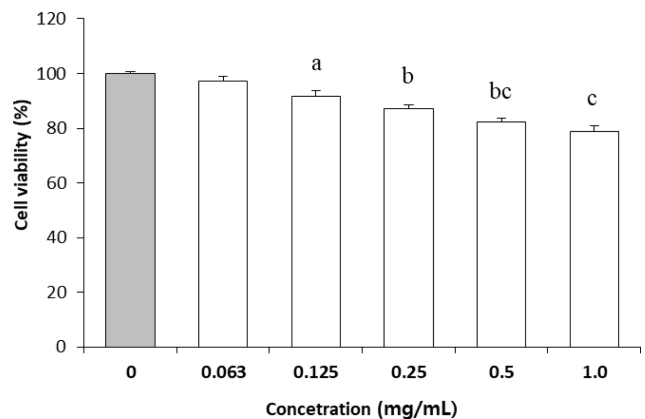


Fig. 3. Cytotoxicity of methanol extract from fruiting bodies of *Phallus impudicus* var. *impudicus* L. on RAW 264.7 macrophages. Different letters are significantly different by Duncan's multiple range test ($p \leq 0.05$).

시에는 nitric oxide와 cytokine을 생산하여 감염초기에 생체방어에 중요한 역할을 하고 NO는 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 L-arginine으로부터 만들어지며 염증을 유발하는 활성산소의 일종이다 (Garthwaite, 2010). 실험 결과 RAW 264.7 세포만을 배양한 대조군의 NO 농도는 6.37 μ M를 나타냈으며 RAW 264.7 세포에 메탄올 추출물만을 1.0 mg/ml의 농도로 처리한 실험군의 NO 농도는 6.83 μ M로 대조군에 비해 0.46 μ M 증가하였다. 그러나 LPS만을 RAW 264.7 세포에 단독 처리한 양성대조군의 NO의 농도는 43.17 μ M로 대조군에 비해 약 6.78배 증가하였다. 또한 RAW 264.7 세포에 메탄올 추출물 1.0 mg/ml와 LPS를 1 μ g/ml를 처리하여 생성된 NO는 10.17 μ M를 나타내 양성대조군에 비해 약 4.24배 낮아져 메탄올 추출물이 LPS에 의해 유도된 RAW 264.7 세포내의 NO의 생성을 크게 감소시킨다는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 4). Kang (2012)은 팽이버섯의 열수추출물을 RAW 264.7 세포에 처리 후 LPS로 처리했을 때 RAW 264.7 세포 내의 NO의 생성은 농도 의존적으로 감소하였으며, 1.0 mg/ml의 처리에 의해 NO의 생성 저해가 유의하게 나타났다라고 보고하였다. 본 실험에서도 RAW 264.7 세포에

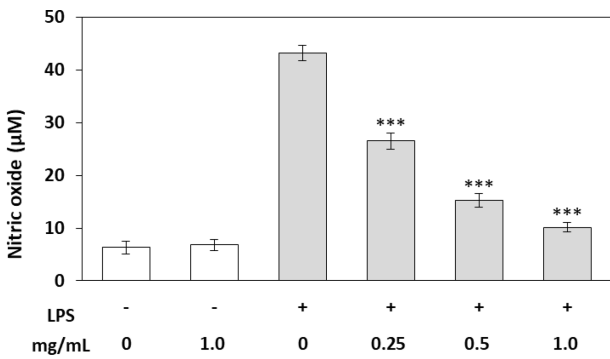


Fig. 4. Inhibitory effect of methanol extract of *Phallus impudicus* var. *impudicus* L. fruiting bodies on lipopolysaccharide (LPS)-induced nitric oxide (NO) production in RAW 264.7 macrophages. NO concentration in culture medium was determined by Griess assay. Values are means \pm standard deviation (SD, n = 3). *** $p < 0.001$ vs. LPS treated group.

서 생성된 NO의 농도는 투여한 버섯의 추출물 농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 NO의 생성량이 감소하여 위에서 보고한 결과와 유사하였다.

Carrageenan에 의해 유도된 부종의 저해효과

부종(edema)은 신체의 조직과 장기의 주변 공간에 체액이 남아있어서 붓는 상태를 나타내는 용어이다. Carrageenan은 동물에 인공적으로 염증을 유발하기 위해 사용하는 홍조류 *Chondrus crispus*에서 추출한 점액성 다당류이다 (Cho *et al.*, 1978). 염증이 carrageenan에 의해 유발되면 histamine, kinins, serotonin, prostaglandin 등의 물질이 나타나는데 초기의 염증 반응에는 histamine과 serotonin 등이 관여하고 이 후의 염증반응에는 bradykinin이 관여하면서 부종 염증반응으로 진행한다고 보고되었다 (Costa *et al.*, 2004). 말뚝버섯의 메탄올 추출물이 carrageenan에 의해 흰쥐의 뒷발에 유도된 부종을 저해하는 효과는 Fig. 5에 표시하였다. 실험결과 기염제인 carrageenan만을 주사한 대조군의 경우 흰쥐 뒷발의 부종 용적은 2~6 시간 후에 42.16~66.70% 증가했으나, 소염제인 indomethacin을 쥐 뒷발에 5 mg/kg 투여 후 carrageenan을 주사하고 2~6 시간 경과 후 측정된 부종용적은 14.14~29.98% 증가한 것으로 나타났다. 반면 말뚝버섯의 메탄올 추출물을 5 mg/kg 주사 후 carrageenan을 투여한 실험군의 부종용적은 35.60~38.40% 증가했고, 메탄올 추출물을 15 mg/kg 투여한 실험군의 부종용적은 29.20~34.00%로 증가했으며, 50 mg/kg의 메탄올 추출물을 주사한 실험군의 부종용적은 21.00~28.80%로 증가했다. 따라서 흰쥐의 뒷발에 주사한 말뚝버섯 메탄올 추출물은 실험에 사용한 모든 농도 범위 내에서 부종을 저해하는 효과가 있었다. 5 mg/kg과 15 mg/kg 농도의 메탄올 추출물을 투여한 실험군의 부종저해 효과는 5.0 mg/kg의 indomethacin을 주사한 양성대조군에 비

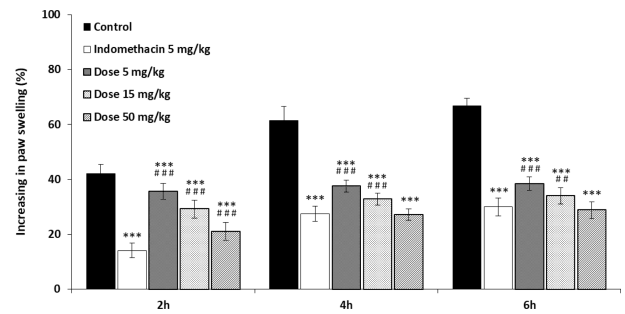


Fig. 5. Effect of methanol extract from fruiting bodies of *Phallus impudicus* var. *impudicus* L. on carrageenan-induced hind paw edema of rats. The values are means \pm SD (n = 5). *** $p \leq 0.001$ vs. control group; ### $p \leq 0.001$ vs. indomethacin group.

해 유의하게 낮았으나 50 mg/kg 농도의 메탄올 추출물을 투여한 실험군의 저해효과는 5.0 mg/kg의 indomethacin을 주사한 양성대조군과 유사하여 통계적으로 유의하지 않았다. 따라서 말뚝버섯 메탄올 추출물에는 carrageenan에 의해 유도된 부종을 저해하는 유효한 성분이 함유되어 있는 것으로 사료되었다. Lim *et al.* (2010)은 carrageenan을 주사하여 부종이 유발된 흰쥐에 목질진흙버섯의 열수추출물을 투여하고 소염효과를 확인한 결과 목질진흙버섯 추출물의 농도가 높아짐에 따라 소염효과도 이에 비례해서 유의하게 증가한다고 보고하였다. 본 실험에서도 carrageenan만을 처리한 대조군과 달리 메탄올 추출물을 5~50 mg/kg의 농도로 처리한 실험군에서 추출물의 농도가 증가함에 따라 소염효과도 지속적으로 증가하는 것을 확인되었다. 따라서 앞으로는 소염효과가 높은 말뚝버섯의 자실체에 함유되어있는 유효성분에 대한 추가적인 분석연구가 필요한 것으로 사료되었다.

적 요

본 연구에서는 말뚝버섯의 자실체 메탄올 추출물의 항산화, cholinesterase 저해 및 항염증 효과를 탐색하였다. DPPH 라디칼 소거능, hydroxyl radical 소거능, 철 이온 제거능 및 환원력 등의 항산화 효과를 측정된 결과 DPPH 라디칼 소거능, hydroxyl radical 소거능 및 환원력은 양성대조군으로 사용한 BHT에 비해 낮았으나 실험에 사용한 2.0 mg/ml의 농도에서 50% 이상의 저해효과를 나타내었고 철 이온 제거능은 BHT에 비해 높게 나타나서 다른 종류의 식의약품 버섯에 비해 항산화 효과가 우수하였다. 치매환자의 기억력 감퇴와 관련된 acetylcholinesterase와 butyrylcholinesterase의 저해실험에서 말뚝버섯 자실체의 메탄올 추출물은 실험에 사용한 전 농도 범위에서 양성대조군인 galanthamine에 비해 유의하게 낮았지만 1.0 mg/ml의 농도에서 50% 이상의 저해 효과를 나타냈다. In

in vitro 항염증 실험에서 RAW 264.7 대식세포에 서로 다른 농도의 메탄올 추출물을 처리한 후 염증 유발물질인 LPS를 처리하여 RAW 264.7 세포가 생성한 NO의 양을 측정 한 결과 추출물을 투여한 실험군의 NO 농도가 LPS만 단독으로 처리한 양성대조군에 비해 유의하게 낮았고 처리한 메탄올 추출물의 농도가 증가함에 따라 생성된 NO의 양은 유의하게 감소하는 경향을 나타냈다. 또한 *in vivo* 항염증 실험에서 먼저 각기 다른 농도의 메탄올 추출물을 생쥐의 뒷발에 주사한 후 추가로 기염제인 carrageenan을 주사하여 흰쥐 뒷발에 유도된 부종 (edema)이 추출물에 의해 저해되는 정도와 염증 치료제로 처방되는 indomethacin을 양성대조군으로 하여 실험을 진행하였다. 실험 결과 흰쥐에 주사한 말뚝버섯 자실체의 메탄올 추출물의 농도가 증가함에 따라 흰쥐 뒷발에 유도된 부종의 용적도 농도 의존적으로 유의하게 감소하는 것이 관찰되어 말뚝버섯 자실체에는 염증을 저해하는 성분이 함유되어 있는 것으로 사료되었다. 따라서 말뚝버섯 자실체의 메탄올 추출물에는 항산화, acetylcholinesterase과 butyrylcholinesterase의 저해 및 항염증 효과를 나타내는 유용 성분이 함유되어 있어 앞으로 의약품 기초 소재로서의 이용 연구가 필요하다고 사료된다.

REFERENCES

- An GH, Cho JH, Lee KH, Han JG. 2019. Physiological activities of extracts of wild mushrooms collected in Korea. *J Mushrooms* 17(2): 70-77.
- Behl C. 1999. Alzheimer's disease and oxidative stress: implications for novel therapeutic approaches. *Prog Neurobiol* 57: 301-323.
- Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
- Cho HS, Lee HJ, Lee SJ, Shin JH, Lee HU, Sung NJ. 2008. Antioxidative effects of *Pleurotus eryngii* and its by-products. *J Life Sci* 18(10): 1360-1368.
- Cho YS, Kim ND, Kim SA. 1978. Effects of concurrent administration of aspirin and prednisolone on the anti-inflammatory and antipyretic activities in rats. *Yakhak Hoeji* 22: 128-137.
- Costa B, Colleoni M, Conti S, Parolaro D, Franke C, Trovato AE, Giagnoni G. 2004. Oral anti-inflammatory activity of cannabidiol, a non-psychoactive constituent of cannabis, in acute carrageenan-induced inflammation in the rat paw. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 369: 294-299.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Featherstone RM. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7: 88-95.
- Fierro IM, Serhan CN, Serhan. 2001. Mechanisms in anti-inflammation and resolution: the role of lipoxins and aspirin triggered lipoxins. *Braz J Med Biol Res* 34: 555-566.
- Garthwaite J. 2010. New insight into the functioning of nitric oxide receptive guanylyl cyclase: Physiological and pharmacological implications. *Mol Cell Biochem* 334: 221-232.
- González-Palma I, Escalona-Buendía HB, Ponce-Alquicira E, Téllez-Téllez M, Gupta VK, Díaz-Godínez G, Soriano-Santos J. 2016. Evaluation of the antioxidant activity of aqueous and methanol extracts of *Pleurotus ostreatus* in different growth stages *Front Microbiol* 7:1099.doi: 10.3389/fmicb.2016.01099
- Gulcin I, Buyukokuroglu ME, Oktay M, Kufrevioglu OI. 2003. Antioxidant and analgesic activities of turpentine of *Pinus nigra* Arn. subsp. *pallsiana* (Lamb.) Holmboe. *J Ethnopharmacol* 86: 51-58.
- Halliwell B, Gutteridge JM, Aruoma OI. 1987. The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for the determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal Biochem* 165: 215-219.
- Huang SJ, Mau JL. 2006. Antioxidant properties of methanolic extracts from *Agaricus blazei* with various doses of γ -irradiation. *Lebensm Wiss Technol* 39(7): 707-716.
- Ikeya Y, Takeda S, Tunakawa M, Karakida H, Toda K, Yamaguchi T, Aburada M. 2004. Cognitive improving and cerebral protective effects of acylated oligosaccharides in *Polygala tenuifolia*. *Biol Pharm Bull* 27: 1081-1085.
- Kang HW. 2012. Antioxidant and anti-inflammatory effects of extracts from *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer. *J Kor Soc Food Sci Nutr* 41: 1072-1078.
- Kang SW. 2013. Role reactive oxygen species in cell death pathways. *Hanyang Med Rev* 33: 77-82.
- Leong LP, Shui G. 2002. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chem* 76: 69-75.
- Lim JH, Kim SH, Park NH, Moon CG, Kang SS, Kim SH, Shin DH, Kim JC. 2010. Acute and chronic anti-inflammatory effects of *Phellinus linteus* water extract in rats *J Biomed Res* 11: 27-35.
- Liu F, Ooi VEC, Chang ST. 1996. Free radical scavenging activity of mushroom polysaccharide extracts. *Life Sci*. 60, 763-771.
- Lo SH. 2005. Quality evaluation of *Agaricus bisporus*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus ferulae*, *Pleurotus ostreatus* and their antioxidant properties during postharvest storage, Master's Thesis. National Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan.
- Mau JL, Chang CH, Huang CJ, Chen CC. 2004. Antioxidant properties of methanolic extracts from *Grifola frondosa*, *Morchella esculenta* and *Termitomyces albuminosus* mycelia. *Food Chem* 87: 111-118.
- Moreno MIN, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. 2000. Comparison of the free radical scavenging activity of propolis from several region of Argentina. *J Ethnopharm* 71: 109-114.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Immunol Meth* 65: 55-63.
- Muruke MH. 2014. Evaluation of antioxidant and iron

- chelating activities of a wild edible oyster mushroom *Pleurotus cystidiosus* from Tanzania. *Food Sci Quali Manage* 29: 18-28.
- Nguyen TK, Shin DB, Lee KR, Shin PG, Cheong JC, Yoo YB, Lee MW, Jin GH, Kim HY, Im KH, Lee TS. 2013. Antioxidant, anti-inflammatory and anti-acetylcholinesterase activities of fruiting bodies of *Phellinus xeranticus*. *J Mushroom Sci Prod* 11: 278-286.
- Nordberg A. 1996. Pharmacological treatment of cognitive dysfunction in dementia disorders. *Acta Neurol Scand Suppl* 168: 87-92.
- Orhan I, Aslan S, Kartal M, Şener B, Hüsni Can Başer K. 2008. Inhibitory effect of Turkish *Rosmarinus officinalis* L. on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes. *Food Chem* 108: 663-668.
- Park WH, LEE JH. 2011. New wild fungi of Korea. Kyo-Hak Publishing Co., Ltd.. pp. 218. Seoul, Korea.
- Park WH, Lee HD. 1997. Illustrated book of Korean medicinal mushrooms. Kyo-Hak Publishing Co., Ltd.. pp. 576. Seoul, Korea.
- Punitha CS, Rajasekaran M. 2014. Free radical scavenging activity of fruiting body extracts of an edible mushroom, *Volvariella volvacea* (Bull.ex Fr.) Singer: an *in vitro* study. *Asian J Biomed Pharmaceut Sci* 30: 6-11.
- Ryu JH, Ahn H, Kim JY, Kim YK. 2003. Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophage. *Phytother Res* 17: 485-489.
- Selkoe DJ. 1991. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* 6: 487-498
- Shim SM, Im KH, Kim JW, Shim MJ, Lee MW, Lee TS. 2003. Studies on immuno-modulatory and antitumor effects of crude polysaccharides extracted from *Paecilomyces sinclairii*. *Korean J Mycol* 31: 155-160.
- Song CH, Seo YC, Choi WY, Lee CG, Kim DU, Chung JY, Chung HC, Park DS, Ma CJ, Lee HY. 2012. Enhancement of antioxidant activity of *Codonopsis lanceolata* by stepwise steaming process. *Kor J Med Crop Sci* 20: 238-244.
- Swain T, Hillis WE. 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. the quantitative analysis of phenolic constituents. *J Sci Food Agric* 10: 63-68.
- Um SN, Jin GE, Park KW, Yu YB, Park KM. 2010. Physiological activity and nutritional composition of *Pleurotus* species. *Korean J Food Sci Technol* 42: 90-96.
- Weisburger JH. 1999. Mechanism of action of antioxidants as exemplified in vegetables, tomatoes, and tea. *Food Chem Toxicol* 37: 943-948.
- Winter CA, Risley EA, Nuss GW. 1962. Carrageenan induced edema in the hind paw of rat as an assay for anti-inflammatory activity. *Proc Soc Exp Biol Med* 111: 544-547.
- Yena GC, Duhb PD, Tsaia L. 2002. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food Chem* 79: 307-313.
- Ying CC, Wang YC, Tang HF. 1987. Icons of medicinal fungi from China. Science Press, pp. 477. Beijing, China.
- Yoon JH, Park SG, Lee MJ, Park JY, Seo KS, Woo KC, Lee CE. 2013. Antioxidant, anti-inflammatory effects of *Bletilla striata* Reichenbach fil. fractions as cosmetic. *J Life Sci* 23: 1073-1078.
- Yoon KN, Jang HS. 2018. Anti-xanthine oxidase, anti-cholinesterase, and anti-inflammatory activities of fruiting bodies of *Phellinus gilvus*. *Korean J Clin Lab Sci* 50: 225-235.