KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 46, No. 6, pp. 729~733 (2014)
http://dx.doi.org/10.9721/KJFST.2014.46.6.729

KOREAN JOURNAL OF
한국식품과학회지
FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY

©The Korean Society of Food Science and Technology

# Lipopolysaccharide로 유도된 RAW 264.7 세포에서 다시마 뿌리 에탄올 추출물의 항염증 효과

강보경 · 김꽃봉우리[1] · 김민지[1] · 박시우 · 박원민 · 김보람 · 안나경 · 최연욱 · 안동현*
부경대학교 식품공학과/식품연구소, [1]부경대학교 수산과학연구소

# Anti-inflammatory Activity of an Ethanol Extract of *Laminaria japonica* Root on Lipopolysaccharide-induced Inflammatory Responses in RAW 264.7 Cells

**Bo-Kyeong Kang, Koth-Bong-Woo-Ri Kim[1], Min-ji Kim[1], Si-Woo Bark, Won-Min Pak, Bo-Ram Kim, Na-Kyung Ahn, Yeon-Uk Choi, and Dong-Hyun Ahn***
*Department of Food Science & Technology/Institute of Food Science, Pukyong National University*
*[1]Institute of Fisheries Sciences, Pukyong National University*

**Abstract** *Laminaria japonica* roots have not been used practically in Korea. In this study, in order to promote the use of these by-products, the anti-inflammatory activity of an ethanol extract of *Laminaria japonica* root (LJREE) was investigated using a lipopolysaccharide (LPS) to induce an inflammatory response in RAW 264.7 cells. To examine the potential anti-inflammatory effects of LJREE, levels of nitric oxide (NO) and pro-inflammatory cytokines, such as interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor-α (TNF-α), and interleukin-1β (IL-1β), and cell proliferation were measured. We found that NO levels decreased in a dose-dependent manner, the production of IL-6, TNF-α, and IL-1β was suppressed, and the production of IL-1β was inhibited over 30% after treatment with 100 μg/mL LJREE. In conclusion, the proliferation of RAW 264.7 cells, measured by MTT assay, confirmed that LJREE may have significant effects on inflammatory factors without any cytotoxicity, making it a potential anti-inflammatory agent.

**Keywords:** *Laminaria japonica* root, anti-inflammatory effect

## 서 론

다시마(*Laminaria japonica*)는 우리나라 전 해안에 광범위하게 분포하는 해조류로 갈조식물군 다시마과에 속하며(1), 칼슘, 칼륨, 요오드, 아연 등의 주요 무기질 뿐만 아니라 uronic acid로 구성된 alginic acid, 황산기를 함유하는 fucoidan 및 laminaran과 같은 식이섬유가 다량 함유되어 있어(2), 항비만(3), 항당뇨 활성(4), 해독 작용(5), 항암(6), 항돌연변이(7), 항바이러스(8), 면역 증강(9) 등의 다양한 생리활성 효과가 보고되어 있으며, 실제로 기능성 건강식품의 소재로 활발히 이용되고 있다. 특히 다시마로부터 분리된 fucoidan은 항종양 효과(10), 항산화 및 항혈액응고(11) 기능을 가지는 것으로 보고된 바 있으며, Lee 등(12)은 다시마 헥산 분획으로부터 분리한 fucoxanthin이 항염증 효과를 가진다고 보고하였다.

다시마는 타 해조류에 비해 채취 과정 및 가공 과정 중 폐기되는 부분이 많아 환경오염 유발 가능성이 높으며, 현재 국내 생산량이 약 200-300 kt으로 매년 증가함에 따라 다시마 가공 부산물인 다시마 뿌리 또한 발생량이 증가하고 있는 실정이다(13). 폐기되는 다시마 뿌리 부위는 식용으로 이용되는 잎과 그 조성이 비슷하여 식이섬유와 alginic acid, fucoidan 등의 다당과 칼륨이 많이 함유되어 있는 것으로 알려져 있으나, 현재까지 다시마 뿌리의 생리 활성에 대한 연구는 진행된 바 없다(1,13).

한편, 염증 반응은 외부 자극에 대한 생체 조직의 방어 반응의 하나로 외부로부터 물리적 작용이나 유해물질, 화학적 자극 및 세균 감염에 의한 손상을 수복 재생하려는 기전이다(14). 이러한 체내 염증 반응에서 대식세포(macrophage)는 일산화질소(NO)와 interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor-α (TNF-α), IL-1β와 같은 염증성 매개 물질을 생산하여 감염 초기에 생체 방어 역할을 하는 것으로 알려져 있으나(15), 이러한 매개 인자의 과잉된 생산에 의한 지속적인 염증 반응은 점막 손상을 촉진하고, 일부는 동맥경화, 당뇨병, 관절염 및 암과 같은 각종 만성 염증성 질환을 유도한다(16). 이와 같이 NO 및 염증성 cytokine은 염증 반응과 밀접하게 관련되어 있어 이들의 생성을 조절할 수 있는 물질이 염증 질환의 예방 및 치료제로 주목 받고 있다. 특히 현재 사용되고 있는 항염증제가 위염, 신장염 및 심장 질환을 초래하는 등의 문제점을 안고 있어, 그 사용이 일부 제한되고 있기 때문에(17,18), 천연물 유래의 보다 안전한 염증 질환 치료제 및 치료 보조제가 각광 받고 있으며 이에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(19,20).

*Corresponding author: Dong Hyun Ahn, Department of Food Science and Technology/Institute of Food Science, Pukyong National University, Busan, 608-737, Korea
Tel: 82-51-629-5831
Fax: 82-51-629-5824
E-mail: dhahn@pknu.ac.kr
Received August 2, 2014; revised October 14, 2014; accepted Octoer 16, 2014

이에 본 연구는 다시마 부산물로 발생하는 뿌리의 효율적 활용을 목적으로 하여 LPS로 유도한 RAW 264.7 세포의 염증 반응에 대한 다시마 뿌리 에탄올 추출물의 효과를 관찰하기 위해 NO 및 전염증성 cytokine (IL-6, TNF-α, IL-1β)의 발현 정도, 세포 독성에 대하여 조사하였으며, 이를 통해 항염증 활성을 갖는 기능성 소재로의 가능성을 밝히고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험 재료

본 실험에 사용한 다시마(*Laminaria japonica*) 뿌리는 부산 기장 소재의 (주)석하로부터 제공받았으며 이를 담수로 깨끗이 수세하고 동결 건조한 후 분말화하고 진공 포장하여 –20°C에서 저장하며 사용하였다.

### 다시마 뿌리 에탄올 추출물 제조

다시마 뿌리의 건조 분말에 10배의 95% 에탄올을 가하고, 교반기(H-0820, Dongwon Science Co., Busan, Korea)를 이용하여 24시간 동안 상온에서 교반하여 추출하였다. 원심분리기(UNION 32R, Hanil Co., Incheon, Korea)를 이용하여 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 취하였고, 이후 남은 잔사를 이와 동일한 방법으로 2회 반복 추출하였다. 추출한 상층액은 37°C에서 감압농축기(RE200, Yamoto Co., Tokyo, Japan)로 농축하였으며, 농축하여 건조된 시료는 –20°C에서 보관하며 실험에 이용하였다.

### 세포배양

Murine의 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(KCLB 40071, Seoul, Korea)에서 분양 받아 사용하였으며, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (GIBCO, Grand Island, NY, USA)에 10% inactivated fetal bovine serum과 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 배지를 배양액으로 37°C, 5% $CO_2$ 조건에서 배양하였다.

### 세포 독성 측정

시료의 세포독성을 평가하기 위해 Park 등(21)의 방법을 약간 변형하여 MTT assay를 실시하였다. RAW 264.7 세포를 $1\times10^6$ cells/mL의 농도로 96-well plate에 분주하고 20시간 동안 전 배양 후, 1 μg/mL의 LPS와 추출물을 농도별(0.1, 1, 10, 50, 100 μg/mL)로 첨가하여 37°C, 5% $CO_2$ incubator (MCO-15AC, Sanyo, Osaka, Japan)에서 24시간 배양하였다. 배양 후, 5 mg/mL 농도의 MTT 시약을 첨가하여 2시간 재 배양하고 이를 4°C, 2,000 rpm에서 10분간 원심분리(UNION 32R, Hanil Co., Incheon, Korea)하여 상층액을 제거하였다. 그 후, 각 well에 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 첨가하고 이를 microplate reader (Model 550, Bio-rad, Richmond, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포증식능은 다음 식에 의해 계산하였다.

Proliferation Index (%)=sample 흡광도/control 흡광도×100

### Nitric Oxides (NO) 생성량 측정

NO의 농도는 griess 반응(22)을 이용하여 배양액 내의 nitrite 농도를 측정하였다. RAW 264.7 세포는 DMEM 배지로 $2.5\times10^5$ cells/mL으로 조절한 후 24-well plate에 접종하고 5% $CO_2$ incubator (MCO-15AC, Sanyo, Osaka, Japan)에서 20시간 동안 전 배양하였다. 세포에 1 μg/mL의 LPS와 추출물을 동시에 처리하여 24시간 재 배양하였다. 배양액의 상층액에 동량의 griess 시약(1% sulfanilamide+0.1% naphthylendiamine dihydrochloride, 1:1)을 첨가하여 실온에서 10분간 반응시키고, microplate reader (Bio-rad)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 배양액 내 NO의 농도는 sodium nitrite ($NaNO_2$)의 농도별 표준곡선과 비교하여 산출하였다.

### Pro-inflammatory cytokine 분비량 측정

RAW 264.7 세포를 $2.5\times10^5$ cells/mL로 조절한 후 24-well plate에 접종하고 18시간 동안 전 배양하였다. 세포에 1 μg/mL의 LPS와 추출물을 동시에 처리하여 12시간 재 배양하였다. 세포배양액 내의 IL-6, TNF-α 및 IL-1β cytokine의 분비량을 ELISA kit (Mouse ELISA set, BD Bioscience, San Diego, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. 이를 위해 ELISA microplate에 capture antibody로 anti-mouse IL-6, TNF-α 및 IL-1β를 분주하여 4°C에서 하룻밤 동안 coating시켰다. 이를 0.05% Tween 20이 포함된 phosphate buffered saline (PBST)로 세척하고 10% fetal bovine serum (FBS) 용액으로 blocking 하였다. PBST로 세척한 뒤, 각 배양 상층액을 분주하고 실온에서 2시간 반응시켰다. 다시 PBST로 세척한 뒤 희석한 biotinylated anti-mouse IL-6, TNF-α detection antibody와 streptavidin-horseradish peroxidase conjugate를 첨가하여 실온에서 1시간 반응시켰다. IL-1β의 경우, biotinylated anti-mouse IL-1β detection antibody를 첨가하고 1시간 반응 후, streptavidin-horseradish peroxidase conjugate를 첨가하여 30분 반응시켰다. 그 후, 이를 다시 PBST로 세척한 다음, O-phenylendiamine (OPD) 용액을 첨가하여 실온에서 30분 동안 암반응 시켰다. 2 N $H_2SO_4$로 반응을 종료시킨 후 microplate reader (Bio-rad)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 통계처리

모든 실험 결과에 대한 유의차 검정은 SAS software (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA)에서 평균값을 분산분석 한 후, Duncan's multiple range test법에 따라 $p<0.05$ 수준에서 검정하였다.

## 결과 및 고찰

### 다시마 뿌리 에탄올 추출물의 세포독성

MTT assay를 이용하여 다시마 뿌리 에탄올 추출물의 처리 농도에 따른 RAW 264.7 세포의 생존률을 측정하였다. 그 결과(Fig. 1), 다시마 뿌리 에탄올 추출물을 0.1, 1, 10, 50, 100 μg/mL의 농도로 처리 시 모든 농도에서 무처리구에 비해 세포 증식률이 증가함을 보여 세포 독성이 없음을 확인하였다. 이는 Lee와 Lim(23)의 여정실 항염증 효과에 대한 연구 및 Yoon 등(24)의 황금 추출물의 항염증 효과에 대한 연구의 MTT assay 결과와 유사하다. 따라서 추후의 다시마 뿌리 에탄올 추출물의 항염증 활성 평가 실험에서는 세포 독성이 나타나지 않은 0.1, 1, 10, 50, 100 μg/mL의 농도 조건으로 시료를 처리하여 NO 및 cytokine 분비 억제 효과를 측정하였다.

### RAW 264.7 세포의 NO 분비량 측정

NO는 NO 합성효소인 inducible nitric oxide synthase (iNOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성되는 무기 유리체로 정상적인 상태에서는 신경전달, 혈관 확장, 면역 반응 등의 생리적인 기능을 조절하는 주요한 역할을 하지만(25,26), 염증 반응에서 과발현된 NO는 혈관 투과성을 증가시켜 부종을 일으키고 염증을 심화시켜 다양한 세포 및 조직손상을 일으켜 만성 염증 질환 및 자가면역질

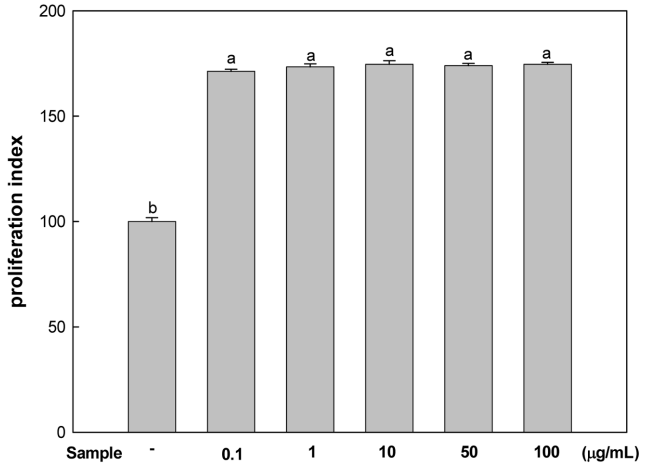


**Fig. 1. Effect of *Laminaria japonica* roots ethanol extract on the proliferation of RAW 264.7 cells.** [a,b]Means with different superscripts are significantly different ($p$<0.05).

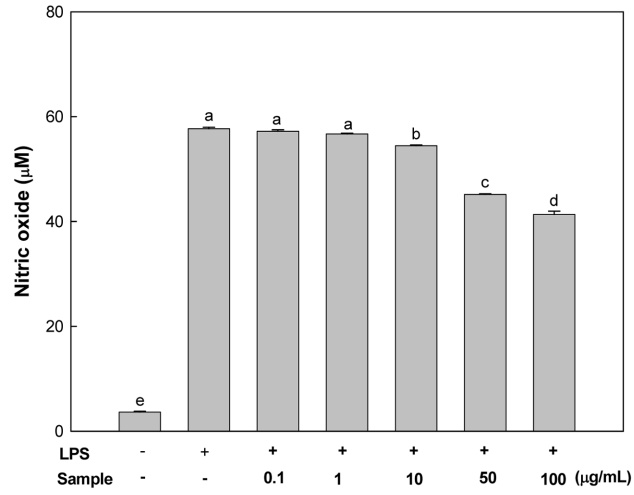


**Fig. 2. Inhibitory effect of *Laminaria japonica* roots ethanol extract on the production of nitric oxide in RAW 264.7 cells.** [a-e]Means with different superscripts are significantly different ($p$<0.05).

환 등을 초래하는 것으로 알려져 있다(27,28). 따라서 본 연구에서는 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에 다시마 뿌리 에탄올 추출물을 농도별(0.1, 1, 10, 50, 100 μg/mL)로 첨가하여 배양 상층액 내의 NO의 양을 측정하여 NO 분비에 미치는 다시마 뿌리 에탄올 추출물의 효과를 살펴보았다(Fig. 2). LPS 처리 후 NO 생성량은 57.70 μM/mL으로 정상세포(3.65 μM/mL)에 비해 약 15배 증가함을 보였으나, 다시마 뿌리 에탄올 추출물 첨가에 의해 농도별로 각각 57.21, 56.72, 54.44, 45.15, 41.35 μM/mL으로 LPS 처리 대조군에 비해 NO 분비량이 유의적으로 감소함을 보였다. Choi 등(29)은 다시마 잎 부위 메탄올 추출물을 약 200 μg/mL의 농도로 처리 시 RAW 264.7 세포에서 약 21.4%의 NO 생성 저해 효과를 보였다고 보고하였다. 본 연구 결과, 다시마 뿌리 에탄올 추출물의 경우 100 μg/mL의 농도에서 약 28%의 효과를 보이는 것을 확인하여 다시마 잎 부위 보다 뿌리 부분이 우수한 NO 생성 억제 효과를 가지고 있음을 확인하였으며, 이를 통해 다시마 뿌리 에탄올 추출물이 iNOS 효소를 억제하여 NO 생성량을 억제하는 것으로 추측할 수 있다.

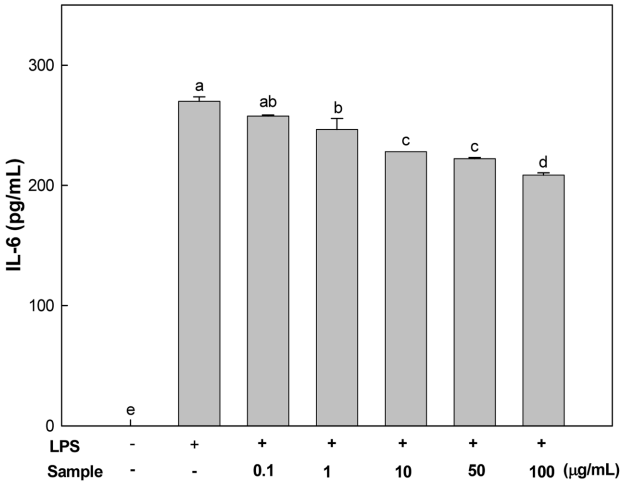


**Fig. 3. Inhibitory effect of *Laminaria japonica* roots ethanol extract on the production of IL-6 in RAW 264.7 cells.** [a-e]Means with different superscripts are significantly different ($p$<0.05).

### RAW 264.7 세포의 IL-6 분비량 측정

염증 반응에서 cytokine의 분비에 대해 다시마 뿌리 에탄올 추출물이 미치는 영향을 알아보기 위해, LPS로 염증 반응을 유도한 RAW 264.7 세포에 다시마 뿌리 에탄올 추출물을 농도별 (0.1, 1, 10, 50, 100 μg/mL)로 첨가하여 배양 상층액의 IL-6를 ELISA kit를 이용하여 측정하였다, 그 결과(Fig. 3), 정상군에서 IL-6 분비는 나타나지 않았고, LPS만 처리한 대조군에서는 269.97 pg/mL의 분비량을 보였으나, 다시마 뿌리 에탄올 추출물 처리시 농도별로 각각 257.54, 246.42, 228.10, 222.21, 208.47 pg/mL의 분비를 보여 농도 의존적으로 IL-6의 분비가 억제됨을 확인하였으며, 특히 100 μg/mL의 농도로 처리 시 약 23%의 효과를 보임을 확인하였다. 본 실험에 이용된 그람 음성 세균의 세포 외막 성분인 LPS는 대식세포에서 면역 기능을 조절하는 매개물질로 NO와 $PGE_2$와 같은 염증 매개물 이외에도 nuclear factor-kappa B (NF-κB) 활성화 경로를 통해 IL-6, TNF-α, IL-1β와 같은 pro-inflammatory cytokine의 분비를 증가시키며(30-32), 이러한 cytokine은 대식세포와 단핵구를 포함하는 다양한 세포에서 생성되어 세균의 침입을 효과적으로 방어하는 역할을 한다(33,34). 특히 IL-6는 B 세포가 plasma 세포로 분화되는 단계를 활성화 시킴으로써 항체 분비를 촉진시켜 급성 염증 반응을 만성 염증 반응으로 전환시키는 역할을 한다(35-37). 따라서 다시마 뿌리 에탄올 추출물이 RAW 264.7 세포에서 IL-6 발현을 억제하는 것을 통해 염증 억제 효과를 가짐을 확인하였다.

### RAW 264.7 세포의 TNF-α 분비량 측정

TNF-α는 LPS 반응의 주요 매개체로 단핵구, 대식세포 및 비만세포에서 발생되는 것으로, 염증의 개시 및 유지에 핵심적 작용을 하여 염증성 병변 과정에서 증가된 발현을 보이며, 특히 만성 염증 질환과 밀접한 관련이 있다(38-40). 이러한 TNF-α는 내분비와 외분비를 통해 자신과 다른 대식세포의 TNF-α 수용체에 리간드로 결합해 염증 매개 전사 인자인 NF-κB p50/p65를 활성화시켜 TNF-α 및 IL-6와 iNOS, COX-2를 발현시키는 기작을 통해 염증을 심화시킨다(41-44). TNF-α의 국소적인 증가는 열, 부종, 통증, 발적 등의 염증의 기본적인 임상 징후를 일으키지만, 전신적인 증가는 미세혈관의 혈전, 전신적으로 모세혈관의 누출을 유발시켜 심장 박출량을 억제하여 심각한 조직의 손상을 가

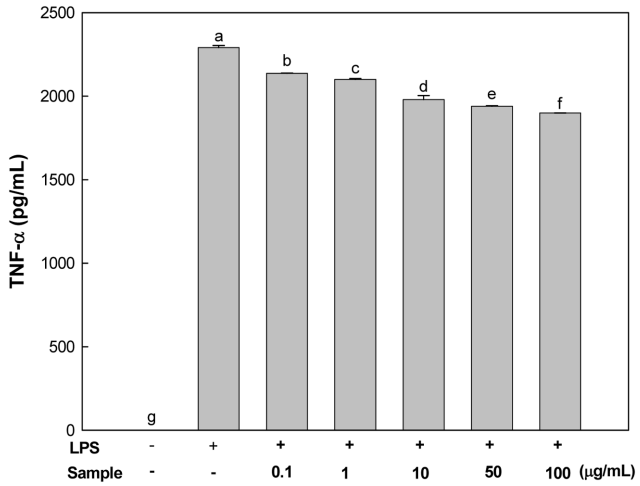


**Fig. 4. Inhibitory effect of *Laminaria japonica* roots ethanol extract on the production of TNF-α in RAW 264.7 cells.** [a-g]Means with different superscripts are significantly different ($p$<0.05).

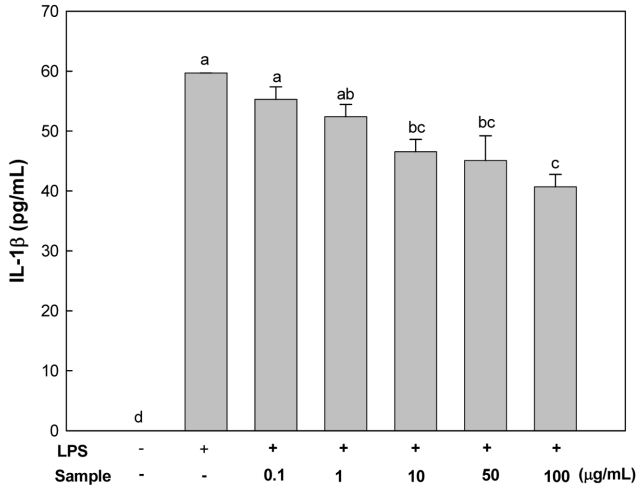


**Fig. 5. Inhibitory effect of *Laminaria japonica* roots ethanol extract on the production of IL-1β in RAW 264.7 cells.** [a-d]Means with different superscripts are significantly different ($p$<0.05).

져 온다(45). 따라서 염증 반응의 억제를 위해 TNF-α의 분비 억제에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(36-38). 다시마 뿌리 에탄올 추출물을 농도별(0.1, 1, 10, 50, 100 μg/mL)로 첨가하여 RAW 264.7 cell의 배양 상층액 내 TNF-α를 ELISA kit를 이용하여 측정한 결과(Fig. 4), LPS 처리구에서 2290.64 pg/mL의 높은 TNF-α 분비량을 보였으며, 다시마 뿌리 에탄올 추출물 100 μg/mL의 농도에서 1898.99 pg/mL으로 억제되어 농도 의존적인 감소 효과를 확인하였다. 이러한 결과를 통해 다시마 뿌리 에탄올 추출물이 RAW 264.7 세포에서 TNF-$\alpha$ 분비를 억제하여 항염증 기능에 관여하는 것을 확인하였다.

### RAW 264.7 세포의 IL-1β 분비량 측정

IL-1β의 경우, LPS 처리구에서는 59.68 pg/mL의 분비를 보였으나, 다시마 뿌리 에탄올 추출물 첨가 시 농도 의존적으로 유의적인 감소를 보였으며, 특히 100 μg/mL의 농도로 처리 시 40.7 pg/mL의 분비량을 보여 30% 이상의 감소 효과를 확인하였다(Fig. 5). IL-1β는 다양한 염증성 자극 요인에 의하여 활성화된 단핵구, 대식세포, B 세포, 수지상세포 등에서 분비되는 것으로, T 세포를 활성화 시키고 B 세포의 성숙을 돕는 역할을 하여 염증을 심화시키며, 염증 반응 시 시상하부에 작용하여 발열증상을 유도하는 cytokine이다(46,47). 따라서 다시마 뿌리 에탄올 추출물은 LPS에 의한 RAW 264.7 세포의 IL-6, TNF-α 및 IL-1β 분비를 효과적으로 억제함으로써 항염증 효과를 가짐을 확인하였으며, 이를 통해 다시마 뿌리 에탄올 추출물의 pro-inflammatory cytokine 억제 효과는 up-stream 단계인 전사인자 NF-κB를 억제함으로써 나타내는 것을 예측할 수 있다.

## 요 약

본 연구에서는 다시마의 가공 시 부산물로 발생하는 다시마 뿌리의 항염증 효과를 알아보기 위하여 LPS로 염증을 유도한 RAW 264.7 세포에 대한 추출물의 효과를 살펴보았다. 먼저 다시마 뿌리 에탄올 추출물이 세포독성을 가지는지 알아보기 위해 MTT assay를 진행한 결과, 모든 첨가 농도에서 대식세포 증식능이 control에 비해 유의적으로 증가하여 세포 독성을 가지지 않는 것을 확인하였다. 세포 독성을 가지지 않았던 농도대(0.1, 1, 10, 50, 100 μg/mL)에서 염증 억제 효과를 살펴보기 위해 NO 및 염증성 cytokine의 분비 억제 효과를 살펴보았다. 대식세포 배양액 내의 $NO_2^-$ 농도를 측정한 결과, 추출물 첨가 농도에 따라 유의적으로 분비량이 감소함을 확인하였으며, 특히 100 μg/mL의 농도에서 약 28%의 억제 효과를 보였다. 또한 대식세포의 염증성 cytokine인 IL-6, TNF-α 및 IL-1β의 분비량을 첨가 농도 의존적으로 억제함을 확인하였다. 특히 IL-1β에 대해, 100 μg/mL의 농도에서 약 32%의 감소 효과를 보였다. 따라서 다시마 뿌리 에탄올 추출물은 세포 독성을 가지지 않고 염증성 매개 인자인 NO 및 cytokine을 억제하여 항염증 효과를 가짐을 확인하였다.

## 감사의 글

본 연구는 2014년도 정부(해양수산부) 재원으로 영남씨그랜트 센터의 지원을 받아 수행된 연구이며 이에 감사드립니다.

## References

1. Kim YS, Kang CO, Kim MH, Cha WS, Shin HJ. Contents of water extract for *Laminaria japonica* and its antioxidant activity. Korean Soc. Biotechnol. Bioeng. J. 26: 112-118 (2011)
2. Kang KS, Nam CH, Park EK, Ha BJ. The enzymatic regulatory effects of *Laminaria japonica* fucoidan extract in hepatotoxicity. Korean J. Life Sci. 16: 1104-1108 (2006)
3. Choi JH, Choi JS, Byun DS, Yang DS. Basic studies on the development of diet for the treatment of obesity. II. Comparison of the inhibitory effect of algae and crude drug components on obesity. Korean J. Fish. Aquat. Sci. 19: 485-492 (1986)
4. Lahaye M. Marine algae as sources of fibres: determination of soluble and insoluble dietary fibre contents in some 'sea vegetables'. J. Sci. Food Agr. 54: 587-594 (1991)
5. Kim YY, Lee KW, Kim GB, Cho YJ. Studies on physicochemical and biological properties of depolymerized alginate from sea tangle, *Laminaria japonicus* by thermal decomposition. J. Korean Fish. Soc. 33: 388-392 (2000)
6. Ryu BH, Kim DS, Cho KJ, Sin DB. Antitumor activity of seaweeds toward sarcoma-180. Korean J. Food Sci. Technol. 21: 595-600 (1989)
7. Oh CK, Oh MC, Kim SH, Lim SB, Kim SH. Antimutagenic and antimicrobial effect of ethanol extracts from sea-mustard and seatangle. J. Korean Fish. Soc. 31: 90-94 (1998)
8. Nakashima H, Kido N, Kobayashi N, Motoki M, Neushul M, Yamamoto N. Purification and characterization of an avian

myeloblastosis and human immunodeficiency virus reverse transcriptase inhibitor sulfated polysaccharide extracted from sea algae. Antimicrob. Agents Chemother. 31: 1524-1528 (1987)
9. Ryu DS, Oh SM, Kim KH, Kim SH, Choi HJ, Lee DS. Immunomodulating activity of *Laminaria japonica* polysaccharides. Korean J. Food Sci. Technol. 42: 350-354 (2010)
10. Vishchuk OS, Ermakova SP, Zvyagintseva TN. Sulfated polysaccharides from brown seaweeds *Saccharina japonica* and *Undaria pinnatifida*: isolation, structural characteristics, and antitumor activity. Carbohydr. Res. 346: 2769-2776 (2011)
11. Wang J, Zhang Q, Zhang Z, Song H, Li P. Potential antioxidant and anticoagulant capacity of low molecular weight fucoidan fractions extracted from *Laminaria japonica*. Int. J. Biol. Macromol. 46: 6-12 (2010)
12. Lee JY, Lee MS, Choi HJ, Choi JW, Shin TS, Woo HC, Kim JI, Kim HR. Hexane fraction from *Laminaria japonica* exerts anti-inflammatory effects on lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages via inhibiting NF-kappaB pathway. Eur. J. Nutr. 52: 409-421 (2013)
13. Chun JY, Cha SH, Lee JS, Kim YS, Park KP. Extraction of carbohydrates and minerals from laminaria using organic acid. Korean Chem. Eng. Res. 50: 238-243 (2012)
14. Jung HK, Kang BM, Jang JH, Ahn BK, Yeo JH, Jung WS, Cho JH, Kuk YI, Hyun KH, Cho HW. Inhibitory effect of *Alopecurus aequalis* sobol ethanol extracts on LPS-induced inflammatory response in RAW 264.7 cells. Korean J. Medicinal Crop Sci. 22: 98-104 (2014)
15. Higuchi M, Hisgahi N, Taki H, Osawa T. Cytolytic mechanism of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. J. Immunol. 144: 1425-1431 (1990)
16. Ljung T, Lundberg S, Varsanyi M, Johansson C, Schmidt PT, Herufl M, Lundberg JO, Hellstrom PM. Rectal nitric oxide as biomarker in the treatment of inflammatory bowel disease: responders versus nonresponders. World J. Gastroenterol. 12: 3368-3392 (2006)
17. Dogne JM, Hanson J, Supuran C, Pratico D. Coxibs and cardiovascular side-effects: from light to shadow. Curr. Pharm. Design 12: 971-975 (2006)
18. Makins R, Ballinger A. Gastrointestinal side effects of drugs. Expert Opin. Drug Saf. 2: 421-429 (2003)
19. Kim YJ, Son DY. Inflammatory mediator regulation of the *Zizyphus jujube* leaf fractions in the LPS-stimulated Raw 264.7 mouse macrophage. Korean J. Food Preserv. 21: 114-120 (2014)
20. Leem HH, Kim EO, Seo MJ, Choi SW. Antioxidant and anti-inflammatory activities of eugenol and its derivatives from clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 40: 1361-1370 (2011)
21. Park YM, Won JH, Yun KJ, Ryu JH, Han YN, Choi SK, Lee KT. Preventive effect of *Ginkgo biloba* extract (GBB) on the lipopolysaccharide-induced expressions of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 via suppression nuclear factor-κB in RAW 264.7 cells. Biol. Pharm. Bull. 29: 985-990 (2006)
22. Lee ST, Jeong YR, Ha MH, Kim SH, Byun MW, Jo SK. Induction of nitric oxide and TNF-α by herbal plant extract in mouse macrophage. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 29: 342-348 (2000)
23. Lee YH, Lim EM. Anti-inflammatory effect of *Ligustri lucidi fructus* water extract in RAW 264.7 cells induced by LPS. J. Korean Obstet. Gynecol. 26: 66-81 (2013)
24. Yoon SB, Han HS, Lee YJ. Effect of Scutellariae radix extract on the proinflammatory mediators in RAW 264.7 cells induced by LPS. Korean J. Herbology 26: 75-81 (2011)
25. Weisz A, Cicatiello L, Esumi H. Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon-gamma, bacterial lipopolysaccharide and NG-monomethyl-L-arginine. Biochem. J. 316: 209-215 (1996)
26. An SM, Kim HG, Choi EJ, Hwang HH, Lee ES, Baek JH, Boo YC, Koh JS. Screening for anti-inflammatory activities in extracts from Korean herb medicines. J. Soc. Cosmet. Scientists Korea 40: 95-108 (2014)
27. Kang CH, Choi YH, Choi IW, Lee JD, Kim GY. Inhibition of lipopolysaccharide-induced iNOS, COX-2, and TNF-α expression by aqueous extract of *Orixa Japonica* in RAW 264.7 cells via suppression of NF-κB activity. Trop. J. Pharm. Res. 10: 161-168 (2011)
28. Miyataka M, Rich KA, Ingram M, Yamamoto T, Bing RJ. Nitric oxide, anti-inflammatory drugs on renal prostaglandins and cyclooxygenase-2. Hypertension 39: 785-789 (2002)
29. Choi JS, Shin SH, Ha YM, Kim YC, Kim TB, Park SM, Choi IS, Song HJ, Choi YJ. Mineral contents and physiological activities of dried sea tangle (*Laminaria japonica*) collected from Gijang and Wando in Korea. Korean J. Life Sci. 18: 474-481 (2008)
30. Adams JL, Czuprynski CJ. Mycobacterial cell wall components induce the production of TNF-α, IL-1, and IL-6 by bovine monocytes and the murine macrophage cell line RAW 264.7. Microb. Pathogenesis 16: 401-411 (1994)
31. Iwamoto M, Kurachi M, Nakashima T, Kim DK, Yamaguchi K, Oda T, Iwamoto Y, Muramatsu T. Structure-activity relationship of alginate oligosaccharides in the induction of cytokine production from RAW 264.7 cells. FEBS Lett. 579: 4423-4429 (2005)
32. Choi SB, Bae GS, Jo IJ, Park KC, Seo SH, Kim DG, Shin JY, Gwak TS, Lee JH, Lee GS, Park SJ, Song HJ. The anti-inflammatory effect of *Lithospermum Erythrorhizon* on lipopolysaccharide-induced inflammatory response in RAW 264.7 cells. Korean J. Herbology 28: 67-73 (2013)
33. Bhattacharyya A, Pathak S, Datta S, Chattopadhyay S, Basu J, Kundu M. Mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-kappaB regulate *helicobacter pylori*-mediated interleukin-8 release from macrophages. Biochem. J. 368: 121-129 (2002)
34. Kim BW, Kim JI, Kim HR, Byun DS. Anti-inflammatory effect of an ethyl acetate fraction from *Myagropsis yendoi* on lipopolysaccharides-stimulated RAW 264.7 cells. Korean J. Fish. Aquat. Sci. 47: 527-536 (2014)
35. Hibi M, Nakajima T, Hirano T. IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system. J. Mol. Med. 74: 1-12 (1996)
36. Kim HJ, Park TS, Jung MS, Son JH. Study on the anti-oxidant and anti-inflammatory activities of sarcocarp and calyx of persimmon (Cheongdo Bansi). J. Appl. Biol. Chem. 54: 71-78 (2011)
37. Wang X, Luo Y, Liao WB, Zhang J, Chen TM. Effect of osteoprotegerin in combination with interleukin-6 on inhibition of osteoclast differentiation. Chin. J. Traumatol. 16: 277-280 (2013)
38. Kim YJ, Son DY. Antioxidant and inhibitory effects of korean *Panax ginseng* extract on pro-inflammatory mediators in LPS-induced RAW 264.7 macrophages. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 41: 1371-1377 (2012)
39. Park SG, Jegal KH, Jung JY, Back YD, Byun SH, Kim YW, Cho IJ, Park SM, Kim SC. Leonuri fructus ameliorates acute inflammation via the inhibition of NF-κB-mediated nitric oxide and pro-inflammatory cytokine production. Korean J. Orient. Physiol. Pathol. 28: 178-185 (2014)
40. Moon JH, Go H, Shin SM, Kim KT. Anti-inflammatory effect of extracts from *Ligustrum obtusifolium* S. fruits in RAW 264.7 macrophages. J. Soc. Korean Med. Diagn. 17: 263-273 (2013)
41. Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. Pharmacol. Ther. 117: 244-279 (2008)
42. Giuliani C, Napolitano G, Bucci I, Montani V, Monaco F. NF-κB transcription factor: role in the pathogenesis of inflammatory, autoimmune, and neoplastic diseases and therapy implications. Clin. Ter. 152: 249-253 (2001)
43. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. Nature 454: 428-435 (2008)
44. Tak PP, Firestein GS. NF-κB: a key role in inflammatory diseases. J. Clin. Invest. 107: 7-11 (2001)
45. Lee AK, Sung SH, Kim YC, Kim SG. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF-α and COX-2 expression by sauchinone effects on I-κBα phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. Br. J. Pharmacol. 139: 11-20 (2003)
46. Delgado AV, McManus AT, Chambers JP. Production of tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1-beta, interleukin 2, and interleukin 6 by rat leukocyte subpopulations after exposure to substance P. Neuropeptides 37: 355-361 (2003)
47. Masters SL, Simon A, Aksentijevich I, Kastner DL. Horror autoinflammaticus: the molecular pathophysiology of autoinflammatory disease. Ann. Rev. Immunol. 27: 621-668 (2009)