

LPS로 유도된 RAW 264.7 대식세포에 대한 애기외톨개 모자반 (*Myagropsis yendoi*) 에틸아세테이트 분획물의 항염증 효과

김보운 · 김재일 · 김형락 · 변대석*

부경대학교 식품영양학과

Anti-inflammatory Effect of an Ethyl Acetate Fraction from *Myagropsis yendoi* on Lipopolysaccharides-stimulated RAW 264.7 Cells

Bowoon Kim, Jae-Il Kim, Hyeung-Rak Kim and Dae-Seok Byun*

Department of Food Science and Nutrition, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

An ethanolic extract from *Myagropsis yendoi* was fractionated using several solvents. Among these, an ethyl acetate fraction (*Myagropsis yendoi* ethyl acetate fraction: MYE) showed the highest anti-inflammatory activity based on inhibition of lipopolysaccharides (LPS)-induced nitric oxide (NO) production in RAW 264.7 cells. We thus investigated the molecular mechanisms underlying MYE's inhibitory effects. Pretreatment of cells with up to 30 $\mu\text{g/mL}$ of MYE significantly inhibited NO production and inducible nitric oxide synthase expression in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). Similarly, MYE markedly reduced the production of pro-inflammatory cytokines, such as interleukin (IL)-1 β , IL-6, and tumor necrosis factor (TNF)- α , as well as their mRNA levels. While the nuclear translocation of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) was strongly suppressed by MYE, the activation of a nuclear factor erythroid 2-related factor (Nrf2) was increased. Moreover, MYE significantly reduced the phosphorylation of JNK, p38 MAPK, and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt in LPS-stimulated cells. These results indicate that MYE contains anti-inflammatory compounds, and that it might be used as a dietary supplement for the prevention of inflammatory diseases.

Key words: *Myagropsis yendoi*, Anti-inflammatory effect, Pro-inflammatory cytokines, iNOS, NF- κ B

서론

체내의 염증 반응은 미생물 감염, 내독소, 조직 손상과 같은 위 해성 자극에 대한 방어기능으로, 이는 조직의 구조와 기능을 정상적으로 회복하기 위해 필수적으로 일어나는 반응이다. 정상적인 염증반응은 시간이 지남에 따라 염증촉진성 매개체(pro-inflammatory mediators)의 생성은 감소되고, 항염증성 매개체(anti-inflammatory mediators)는 증가됨으로써 스스로 염증반응이 제한되는 조절과정을 가지고 있다(Lawrence et al., 2002). 체내의 염증반응에 관여하는 세포 중 하나인 대식세포(macrophages)는 이러한 염증반응에 중요한 역할을 하고 있다. 대식세포는 interferon- γ (IFN- γ), interleukin (IL)-1 β , IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 같은 염증촉진성 사이토카인(cytokines), 그리고 세균 세포막성분인 lipopolysaccharides

(LPS) 등의 자극에 노출됨으로써 활성화된다(Xie et al., 1993). 활성화된 대식세포는 염증촉진성 사이토카인 이외에 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 및 cyclooxygenase-2 (COX-2)와 같은 효소의 발현을 통해 nitric oxide (NO) 및 prostaglandin E₂ (PGE₂)와 같은 다양한 염증매개 분자들을 생성하게 되고(Nathan, 1992; Zhang and Ghosh, 2000), 이들 매개체들의 과도한 생성은 다양한 만성염증성 질환의 발병에 기여하고 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 염증성 매개체들의 생성을 억제하는 천연화합물의 발견은 보다 부작용이 적은 항염증 치료제 개발을 위한 방편으로 관심을 끌고 있다.

대식세포에 있어 염증촉진성 사이토카인 및 단백질들의 발현은 nuclear factor kappa-B (NF- κ B)에 의해 전사수준에서 조절된다(Pahan et al., 2001). 자극이 없는 상태에서 NF- κ B는 inhibitor of kappa B (I κ B)와 결합한 상태로 불활성 형태로

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2014.0527>



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.

Kor J Fish Aquat Sci 47(5) 527-536, October 2014

Received 19 September 2014; Accepted 29 September 2014

*Corresponding author: Tel: +82. 51. 629. 5844 Fax: +82. 51. 629. 5842

E-mail address: dsbyun@pknu.ac.kr

세포질에 존재한다(D'Acquisto et al., 1997; Makarov, 2001). 그러나 LPS와 같은 자극이 주어지는 경우 I κ B는 I κ B kinase (Ikk)에 의해 인산화되어 proteasome에 의해 분해되고, 유리된 NF- κ B는 핵으로 이동하여 다양한 염증성 매개체와 같은 표적유전자의 발현을 유도하게 된다(Chen et al., 1995). 한편 NF- κ B의 활성화는 extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK), p38 kinase를 포함하는 mitogen-activated protein kinases (MAPKs) 그리고 PI3K/Akt (PKB)와 같은 kinase에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다(Marks-Konczalik et al., 1998; Jang et al., 2005).

Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)는 산화적 스트레스에 대응하는 세포 방어기전을 위한 일차적인 전사인자로 알려져 있다(Chen and Kunsch, 2004). 정상적인 상태에서 Nrf2는 Keap1에 의해 비활성화 상태로 세포질에 존재하지만, 산화적 손상을 받으면 Keap1과 해리되어 핵내로 이동하여 antioxidant response element (ARE)에 결합함으로써 HO-1과 같은 항산화 효소의 발현을 조절한다(Nguyen et al., 2000). 최근의 연구에 의하면, Nrf2는 패혈증을 유발시킨 생쥐의 모델실험에서 세포보호효과를 나타내었으며, 특히 Nrf2 knock-out 생쥐는 LPS로 유도된 염증반응에 과도하게 반응하는 것으로 보고되고 있다(Ha et al., 2011). Nrf2 활성화에 의해 생성된 HO-1은 RAW 264.7 세포에서 LPS에 의해 생성된 염증촉진성 사이토카인의 생성을 억제함으로써 항염증 효과를 나타낸다고 보고되고 있다(Lee et al., 2014).

연안에 널리 자생하는 해조류는 비타민과 무기질이 다량 함유되어 있으며 식이섬유가 풍부하다. 현재 많은 연구들이 해조류의 항균효과, 항진균효과, 그리고 항바이러스 활성을 가진다는 것을 밝혔으며(Del et al., 2001), 고지혈증 억제(Awad et al., 2003) 및 항암(Lee et al., 1992)과 같은 생리활성을 가진다는 결과들이 발표되었다. 그 중 갈조류는 저분자 생리활성 물질로써 fucoxanthin, fucosterol, phlorotannin 과 같은 다양한 생리활성 물질들을 가지고 있는 것으로 보고되고 있다(Kim et al., 2010b; Kim et al., 2013a; Lee et al., 2013; Jung et al., 2014). 특히 모자반류는 항염증효과를 가지고 있는 것으로 나타났고(Joung et al., 2012a; Joung et al., 2012b; Gwon et al., 2013; Kim et al., 2013b), phlorotannin, sargaquinoic acid과 같은 다양한 화합물들이 함유되어 있는 것으로 보고되고 있다(Kang et al., 2013; Kim et al., 2014).

다양한 해조류들 중에서 애기외톨개모자반(*Myagropsis yendoi*)은 일본과 우리나라 동남해 연안에 서식하는 모자반과(Sargassaceae)의 개모자반속(*Myagropsis*)에 속하는 갈조류로(NFRDI, 2009), 저조선 부근에 생육하며 다년생 해조류로 봄에 성숙하고 뿌리를 포함한 개체가 섬세하고 유연하다(Daekyo, 2008). 식용이 가능한 것으로 알려져 있는 애기외톨개모자반은 이전 연구에서 뛰어난 항균활성이 밝혀진 바 있으며(Park et al., 2010), 최근에는 이외의 생리활성에 관한 연구들

이 활발히 진행 중이다. 최근 본 연구실에서 수행한 예비실험에서 애기외톨개모자반의 에탄올(95%, v/v) 추출물로부터 유기용매(hexane, ethyl acetate, butanol)를 이용하여 각 분획물들을 분리하였고 그 활성을 분석한 결과, EtOAc 분획물에서 항염증 효과가 강하게 나타남을 확인하였다. 따라서 본 연구에서는 이러한 애기외톨개모자반의 EtOAc 분획물(*M. yendoi* ethyl acetate extract, MYE)의 항염증 효과 및 관련 분자적 기전을 LPS로 자극한 RAW 264.7 cell을 이용하여 분석함으로써, 염증성 질환의 발병을 예방 또는 지연시킬 수 있는 건강기능성 소재로서의 이용가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

추출과 분획

부산 기장에서 채취한 *M. yendoi*의 건조분말 2 kg을 환류냉각기가 부착된 집기병에 담고 95% 주정(EtOH, v/v) 4 L를 넣어 가열, 추출하고(50°C, 3시간) 추출액을 여과하여 회전진공농축기를 사용하여 농축하였다. 이를 3회 반복하여 총 182 g의 주정추출물을 얻었다. 이를 H₂O:EtOH (9:1, v/v)의 혼합용매로 녹인 후 동량의 n-헥산을 넣어 분액깔대기에 평형화시켜 상층액의 n-헥산 가용부를 분리하였다. 동일한 방법으로 수용층에 동량의 에틸아세테이트(ethyl acetate, EtOAc)를 넣어 평형화한 다음 EtOAc 회분을 분리하여 농축하여 MYE를 얻었다.

세포 배양 및 처리

RAW 264.7 세포(ATCC, Rockville, MD, USA)는 10% fetal bovine serum (FBS)와 penicillin (100 units/mL), streptomycin sulfate (100 µg/mL)을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)을 사용하였고, 5% CO₂, 37°C 배양기에서 배양하였다. Cell culture plate에 RAW 264.7 cell이 70~80% 정도 채워지면 phosphate-buffered saline (PBS)로 한번 씻어낸 후, 계대 배양하였다. MYE는 100% dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 사용하였고, 배양세포 처리 전에 배지에 희석하여 처리하였다.

세포 독성 시험

RAW 264.7 cell을 96-well plate에 5 × 10⁵ cells/well로 분주하고 37°C에서 24시간 동안 배양한 후, MYE가 0, 10, 20, 30 µg/mL 농도로 희석된 DMEM 배지로 교체하여 1시간 배양하였고, 이후에 LPS (1 µg/mL)를 함유한 DMEM 배지에 다시 24시간 배양하였다. 이후 CellTiter96[®]Aqueous 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) 시험 키트(Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 제조사의 방법에 따라 세포생존율을 측정하였다. MTS 용액은 FBS-free DMEM에 5% (v/v)의 농도로 섞어 100 µL씩 처리하였다. 1시간 후에 microplate

reader (Glomax Multi Detection System, Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 490 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 세포독성을 분석하였다.

NO 및 염증성 사이토카인 생성 억제 효과

MYE의 항염증효과 비교를 위해 RAW 264.7 세포에서의 NO 생성에 대한 억제효과를 분석하였다. MYE를 1시간동안 전처리 한 다음 LPS (1 µg/mL)로 24시간동안 자극하고, 그 배지를 원심분리(2,000 g, 4°C, 10분)하여 회수하였다. NO의 농도는 배지(100 µL)와 Griess 시약(0.1% naphthylethylene diamine dihydrochloride + 1% sulfanilamide + 5% phosphoric acid)을 동일한 비율로 반응시켜 microplate reader 로 540 nm 의 파장에서 흡광도를 측정하였다(Kim et al., 2009). 배지 중의 IL-1β, IL-6, TNF-α의 양은 enzyme-linked immunosorbent assay kit (ELISA, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 측정하였다.

mRNA 발현량의 분석

RAW 264.7 세포(1×10⁶ cells/well)를 0, 10, 20, 30 µg/mL의 농도로 MYE를 1시간 동안 처리한 후, LPS 1 µg/mL의 농도로 6시간 동안 자극시켰다. 이후 Quiazol 시약(Quiaagen Science, Valencia, CA, USA)을 이용하여 total RNA를 분리하였다(Kim et al., 2009). Total RNA로부터 역전사 증합효소 연쇄반응(RT-PCR) 분석에 의한 mRNA 발현량의 분석은 이전의 보고(Kim et al., 2009)에서 사용한 방법을 이용하였고, 유전자 발현량의 상대적인 비교를 위해서 housekeeping gene인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 함께 분석하였다. PCR 반응에 이용된 각각의 primer는 Table 1에 나타내었다. 전기영동상 DNA 밴드의 정량 분석은 cooled CCD

camera system EZ-Capture II (ATTO & Rise Co., Tokyo, Japan)과 CS analyzer ver. 3.00 software (ATTO)를 이용하여 최소 3번의 반복 실험을 통해 얻었다.

세포질 및 핵 단백질 추출물의 제조

NF-κB의 활성화 정도를 분석하기 위해 MYE 및 LPS를 각각 처리한 RAW 264.7 세포로부터 세포질 및 핵 단백질 추출물을 각각 분리 제조하였다(Kim et al., 2009). 즉, MYE로 처리된 세포(2×10⁶ cells/dish)를 PBS로 세척하여 회수하고, 180 µL의 hypotonic buffer [10 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0.02% NaN₃, 0.5 mM dithiothreitol (DTT), 1mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), pH 7.4]를 넣고, 20 µL의 5% nonidet NP-40을 첨가하여 5분 동안 반응시켰다. 이후 원심분리(1,800 g, 4°C, 5분)한 후 상층액을 세포질 추출물로 이용하였다. 침전물은 hypotonic buffer로 한번 세척하고, hypertonic buffer [20 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, 25% glycerol, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 0.02% NaN₃, 0.5 mM DTT, 1 mM PMSF, pH 7.4]를 넣고 1시간 동안 얼음 위에 방치시킨 다음 원심분리(13,000 g, 4°C, 10분)하여 상층액을 회수하여 핵단백질 추출물로 이용하였다.

Western blot 분석에 의한 단백질 분석

염증관련 단백질과 신호전단 단백질의 인산화 정도는 세포를 MYE 및 LPS로 처리한 이후 whole cell lysate를 제조하여 시료로, NF-κB 및 IκB의 활성화 및 인산화 정도는 상기의 핵 및 세포질 추출물을 시료로 이용하였고, 단백질의 양은 이전의 보고(Kim et al., 2009)와 마찬가지로 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)분리된 단백질을 nitrocellulose membrane에 이전시켜 Western blot으로 분석하였다. 검출된 밴드의 정량 분석은 mRNA 분석과 마찬가지로 cooled CCD camera system EZ-Capture II 와 CS analyzer ver. 3.00 software를 이용하여 최소 3번의 반복 실험을 통해 얻었고, 그 결과를 각 blot의 하단에 수치로 표기하였다. 그리고, Western blot에 사용된 각각의 1차 항체들은 다음과 같다: iNOS (sc-650), β-actin (sc-47778), phospho-Akt (sc-4060), Akt (sc-1618), phospho-ERK (sc-7883), ERK (sc-94), phospho-JNK (sc-6254), JNK (sc-7345), NF-κB/p65 subunit (sc-8008), HO-1 (sc-7696), Nrf2 (sc-722), poly (ADP-ribose) polymerase (PARP, sc-7150)는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였고, phospho-IκB-α (4814), IκB-α (9246), phospho-p38 (4511), p38 (9212)는 Cell Signaling Technology (Danvers, MD, USA)에서 각각 구입하였다. Horseradish peroxidase (HRP)가 conjugate되어 있는 각각의 2차 항체들[rabbit anti-goat IgG (LF-SA5004), goat anti-mouse IgG (LF-SA5001), goat anti-rabbit IgG (LF-SA5002)]은 AbFrontier (Seoul, Korea)에서 구입하였고, Enhanced

Table 1. Primer sequences used in this study

Primers	Sequences
iNOS	Forward 5'-TCT TTG ACG CTC GGA ACT GT-3' Reverse 5'-CCA TGA TGG TCA CAT TCT GC-3'
COX-2	Forward 5'-TGG GCA AAG AAT GCA AAC AT-3' Reverse 5'-CAG CAA ATC CTT GCT GTT CC-3'
HO-1	Forward 5'-AAG ATT GCC CAG AAA GCC CTG GAC-3' Reverse 5'-AAC TGT CGC CAC CAG AAA GCT GAG-3'
TNF-α	Forward 5'-CAA GGG ACA AGG CTG CCC CG-3' Reverse 5'-GGT CAG AGT GGG GGC TGG GT-3'
IL-1β	Forward 5'-ATG GCA ACT GTT CCT GAA CTC AAC T-3' Reverse 5'-CAG GAC AGG TAT AGA TTC TTT CCT TT-3'
IL-6	Forward 5'-GTA TGA ACA ACG ATG ATG CAC TTC CAG-3' Reverse 5'-GCA TTG GAA ATT GGG TAG GAA GG-3'
β-actin	Forward 5'-CCT CAT GAA GAT CCT GAC CG-3' Reverse 5'-TCC ACA TCT GCT GGA AGG TG-3'

chemiluminescence (ECL) detection kit은 GE Healthcare Bio-Science (Piscataway, NJ, USA)를 사용하였다. β -actin과 PARP는 각각 세포질과 핵의 control 단백질로서 분석에 포함시켰다.

면역형광분석법

RAW 264.7 세포를 glass coverslips (SPL Lifesciences Co., Gyeonggi-do, Korea) 위에 24시간 배양한 뒤, MYE로 1시간 전처리 하고, LPS (1 μ g/mL)로 30분 자극시켰다. 세포를 4.0% paraformaldehyde가 첨가된 PBS로 실온에서 15분 동안 반응시켜 고정시키고, 0.5% Triton X-100이 첨가된 PBS를 넣어 10분 동안 반응시켰다. PBS로 세척한 뒤에 3% BSA/PBS를 넣고 30분 동안 blocking시킨 후, anti-NF- κ B polyclonal antibody가 희석된 3% BSA/PBS를 넣어 2시간 동안 반응시켰다. 그 다음, Alexa Fluor[®] 488-conjugated secondary antibody (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)가 희석된 3% BSA/PBS를 넣고 1시간 동안 반응시킨 뒤, 2 μ g/mL의 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)로 핵을 염색하고 LSM700 laser scanning confocal microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)로 관찰하였다.

NF- κ B Promoter/Luciferase assay

RAW 264.7 세포(2×10^5 cells/well)가 들어있는 24-well plate의 각 well에 1 μ g의 pNF- κ B firefly luciferase DNA와 20 ng의 pRL-TK renilla luciferase DNA를 lipofectamine/plus reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)와 함께 처리하여 40시간 동안 transfection시켰다. 그 다음, MYE를 1시간 전처리 하고, LPS (1 μ g/mL)로 6시간 자극시켰다. 이후 PBS로 세척하고 100 μ L의 lysis buffer (0.5 mM HEPES, pH 7.8, 1% Triton N-101, 1 mM CaCl₂, and 1 mM MgCl₂)로 용해물을 만들고, luciferase assay kit를 사용하여 firefly luciferase activity와 renilla luciferase 활성을 측정하였다. Renilla luciferase의 발현은 지속적으로 일어나는 반면, firefly luciferase는 NF- κ B에 의해서만 발현이 되므로 세포 수에 의한 오차를 보정할 수 있다.

통계 처리

본 연구의 모든 실험은 세 번 이상 반복하였으며, 얻어진 결과들을 평균값과 표준편차(mean \pm SD)를 계산하여 나타내었다. 실험군 간의 유의성 검증은 Student's t-test로 검증하였다.

결과 및 고찰

LPS로 유도되는 NO 생성 및 iNOS 발현에 대한 MYE의 억제 효과

LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 생성되는 NO에 대한 MYE의 억제효과를 알아보기 위해서 세포를 다양한 농도(0-30 μ g/mL)의 MYE로 1시간 전처리하고, LPS로 24시간 자극하여

상층의 배지로 방출되는 nitrite 생성량을 측정하여 NO 생성량을 분석하였다. LPS 처리에 의해 증가된 NO는 MYE의 전처리에 의해 농도의존적으로 현저하게 감소하는 것으로 나타났다 (Fig. 1A, $P < 0.05$). 이러한 NO 생성의 억제효과는 MYE에 의한 세포독성으로 RAW 264.7 세포가 사멸되는 것에 의해서도 나타날 수 있으므로, 이러한 가능성을 배제하고자 동일한 MYE 처리 조건하에서 세포생존율의 변화를 MTS assay로 분석하였다. Fig. 1B에 나타내었듯이 세포의 생존율은 MYE 처리에 의해 뚜렷한 변화가 없었다. 이러한 세포독성 실험결과에서 MYE 처리에 의한 NO 생성의 억제효과는 세포독성에 의한 것이 아니라는 것을 확인할 수 있었다.

다음은 NO를 생성하는 효소인 iNOS의 발현에 대한 MYE의 효과를 알아보려고 하였다. 전술과 같이 RAW 264.7 세포에 MYE를 0-30 μ g/L의 농도로 전처리한 이후 LPS로 자극하였고, 이후 세포 단백질과 total RNA를 분리하여 각각 iNOS의 단백질과 유전자의 발현수준을 분석하였다. Fig. 2에 나타내었듯이 iNOS 단백질의 발현양은 LPS 처리에 의해 현저하게 높게 유도되는 것을 알 수 있었고, MYE 처리에 의해 농도의존적으로 감소하는 경향을 나타내었다. iNOS mRNA 발현양도 단백질과 유사한 경향으로 MYE 처리에 의해 현저하게 감소하는 것으로 나타났으며, 그 억제효과는 전사수준에서 효과적으로 조절되고 있음을 나타낸다(Fig. 2).

NO는 NOS에 의해 L-arginine으로부터 생성된다. iNOS는 세균의 내독소 및 염증성 사이토카인에 의해 강하게 유도된다 (Guha and Mackman, 2001). 병리적인 조건 하에서 iNOS에 의한 NO의 현저한 증가는 다른 염증성 매개체들과 함께 과도한 염증을 유발하게 되고 조직의 손상을 유발하는 것으로 알려져 있어 염증성 손상의 주요 매개체이다(Nathan, 1992; Pan et al., 2011). 따라서 iNOS의 발현 또는 활성을 억제함으로써 NO의 생성을 억제할 수 있는 화합물은 항염증 물질로 이용될 수 있을 것이다.

LPS로 유도되는 염증성 사이토카인의 생성에 대한 MYE의 억제효과

LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 생성되는 염증촉진성 사이토카인의 생성에 대한 MYE의 효과를 ELISA 방법으로 분석하였다. LPS 자극에 의해 TNF- α (Fig. 3A), IL-1 β (Fig. 3B) 및 IL-6 (Fig. 3C)와 같은 염증촉진성 사이토카인의 생성량은 크게 증가하는 것으로 나타났고, 이러한 증가는 다소 차이는 있지만 MYE 처리에 의해 현저하게 감소하는 것으로 관찰되었다 ($P < 0.05 \sim 0.01$). 또한 처리된 세포로부터 mRNA를 분리하여 RT-PCR로 분석한 결과 ELISA 경과와 유사하게 나타났다 (Fig. 3D).

염증촉진성 사이토카인들은 체내에서 다양한 면역 및 염증 반응을 조절하는 역할을 한다. 세균의 LPS에 의해 자극된 대식세포는 TNF- α 를 생성하고 분비된 TNF- α 및 LPS는 IL-1 β

와 IL-6의 생성을 유도함으로써 염증반응을 지속시키게 된다 (Beutler and Cerami, 1989). LPS에 의해 유도된 TNF- α 는 염증반응의 개시를 촉진하며 지속적인 생성은 만성염증을 유발하며 결국에는 패혈성 쇼크, 염증, 세포상해성 등의 다양한 생리학적 과정에 관여하고 있다(Balkwill, 2006; Dinarello, 1999). IL-1 β 는 대식세포에서 생성되는 주요 염증촉진성 사이토카인으로서, 세균 감염에 대한 염증성 응답의 개시 및 강화에 중요한

사이토카인이다(Lebovic et al., 2000). IL-6도 대식세포에서 생성되는 중요한 염증촉진성 사이토카인으로서 급성 면역응답에 작용한다(Yoshimura, 2006). 본 연구에서 관찰된 결과는 MYE가 LPS-자극에 의해 유도되는 IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 생성을 억제시키는 것으로 나타났고, 이는 MYE가 LPS-자극에 의한 염증성 응답의 초기 단계를 억제하고 있음을 의미한다.

LPS로 유도되는 NF- κ B의 활성화에 대한 MYE의 억제 효과

앞에서 서술하였듯이 여러 염증촉진성 사이토카인 및 iNOS의 발현은 주요 전사인자인 NF- κ B에 의해 조절된다(Zhang and Ghosh, 2000). 따라서 LPS로 자극한 RAW 264.7 세포를 이용하여 NF- κ B의 활성화에 대한 MYE의 처리 효과를 분석하였다. 먼저 면역형광법으로 염색을 하고 confocal microscopy로 분석한 결과를 Fig. 4A에 나타내었다. 아무런 자극이 가해지지 않은 상태에서 NF- κ B/p65 subunit (녹색)는 DAPI로 염색된 핵(청색) 주변에 대부분 분포하는 것이 관찰되지만, LPS로 자극한 경우 녹색인 NF- κ B p65의 대부분은 청색인 핵과 함께 분포하는 것으로 나타났고 이는 NF- κ B가 활성화되어 핵으로 이동했음을 보여주는 결과이다. 이러한 세포에 MYE (30 μ g/mL)를 전처리한 경우 NF- κ B/p65는 다시 핵 주변의 세포질에 대부분 분포하는 것으로 관찰되었고, 이는 MYE에 의해 NF- κ B의 활성화가 현저하게 억제되고 있음을 보여주고 있다 (Fig. 4A).

NF- κ B의 활성화에 따른 핵으로의 이동은 이를 억제하는 단백질인 I κ B- α 의 인산화에 의한 분해에 의한다(Chen et al.,

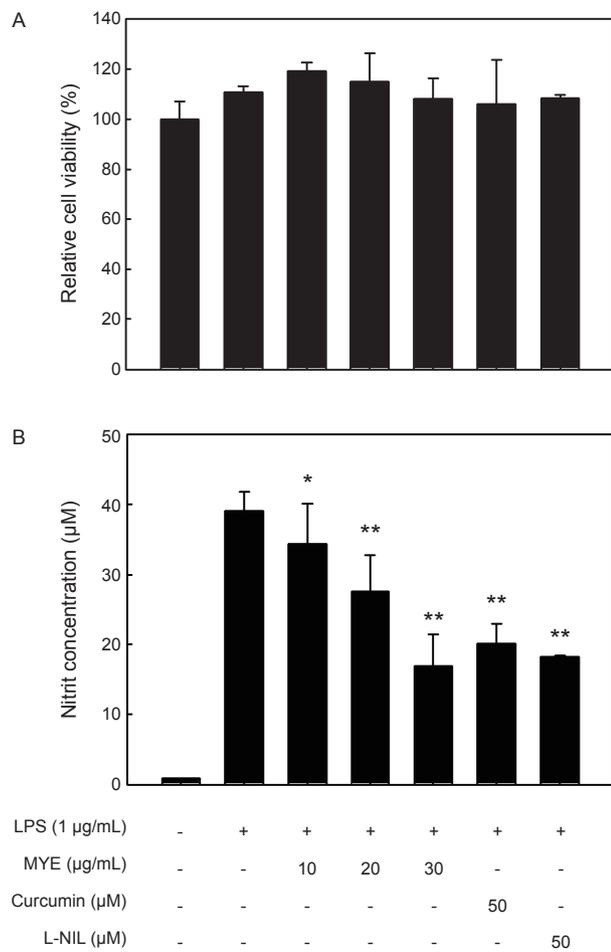


Fig. 1. Effect of MYE on cell viability and nitric oxide (NO) production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Cells pretreated with various concentrations of MYE for 1 h were stimulated with LPS (1 μ g/mL) for 24 h (A, B). (A) Effect of MYE on cell viability analyzed by MTS assay. (B) Effect of MYE on NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The culture media of the treated cells were used to measure the amount of nitrite to evaluate NO level. Curcumin and N6-(1-iminoethyl)-L-lysine (L-NIL) were used as positive controls for the inhibitory effect. All data are presented as mean \pm SD of three independent experiments. * P <0.05 and ** P <0.01 indicate significant differences compared to LPS-only group.

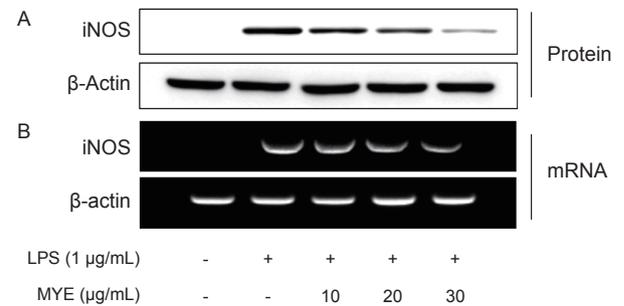


Fig. 2. Effect of MYE on LPS-induced inducible nitric oxide synthase (iNOS) protein and mRNA expression in RAW 264.7 cells. (A) Western blot analysis of iNOS protein expression. Cells pretreated with various concentrations of MYE for 1h were stimulated with or without LPS (1 μ g/mL) for 16 h. (B) RT-PCR analysis of iNOS mRNA expression. Cells were incubated with various concentrations of MYE for 1 h, and then stimulated with LPS (1 μ g/mL) for 6 h. mRNA levels of iNOS and β -actin were determined by RT-PCR analysis using respective gene-specific primers. The results presented are representatives of three independent experiments.

1995). 따라서 MYE로 처리된 세포의 세포질과 핵을 분획하여 이들에서 NF- κ B 및 I κ B- α 의 양 및 인산화 정도를 Western blot으로 분석하였다. Fig. 4B에 나타난 것과 같이, LPS 자극에 의해 세포질의 p-I κ B- α 의 증가로 인하여 p-I κ B- α 의 양은 증가하는 반면 I κ B- α 양은 유의적 감소하는 것으로 나타남으로써 인산화 증가에 의한 I κ B- α 의 분해가 일어났음을 나타내고 있다. MYE 처리에 의해 p-I κ B- α 의 경우 그 양이 현저하게 감소하는 것으로 나타남으로써 I κ B- α 의 인산화가 억제되었고, 이러한 결과는 핵에서 NF- κ B의 수준이 농도의존적으로 감소하는 결과를 초래하였다. 이상의 결과는 Fig. 4A의 면역형광염색 결과와도 일치하는 것이다.

다음은 LPS로 자극된 대식세포주에 있어 NF- κ B의 promoter 활성에 대한 MYE의 효과를 분석하였다. 이를 위해 RAW 264.7 세포에 NF- κ B promoter를 가진 luciferase construct를 일시적으로 transfection하고, 이 세포를 다양한 농도의 MYE로 2시간 전처리하고 이어서 LPS로 6시간동안 자극하였다. Fig.

4C에 나타내었듯이 luciferase 활성은 LPS 자극에 의해 현저하게 증가하였으며, 이는 LPS 자극에 의해 활성화된 NF- κ B가 NF- κ B의 promoter를 가진 luciferase의 발현을 크게 증가시켰음을 의미한다. 이에 대한 MYE의 억제효과는 10 μ g/mL의 낮은 농도뿐만 아니라 30 μ g/mL 농도에 이르기까지 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다. 이들 결과는 대식세포주에서 LPS 자극에 의해 유도되는 NF- κ B의 활성화가 MYE에 의해 효과적으로 억제되고 있음을 보여주고 있고, 이는 MYE에 의한 상기의 염증성 사이토카인 및 iNOS의 발현 억제는 부분적으로 NF- κ B 활성화 경로에 의해 조절되고 있음을 의미하는 것이다.

MYE에 의한 Nrf2 활성화 효과

최근의 많은 연구를 통하여 HO-1는 뛰어난 항염증 효과가 있는 것으로 보고되고 있다. 이러한 사실을 입증하기 위하여 LPS로 처리된 대식세포주에 MYE를 처리하여 HO-1와 HO-1의 발현을 조절하는 전사인자인 Nrf2의 발현을 분석하였다. Fig. 5

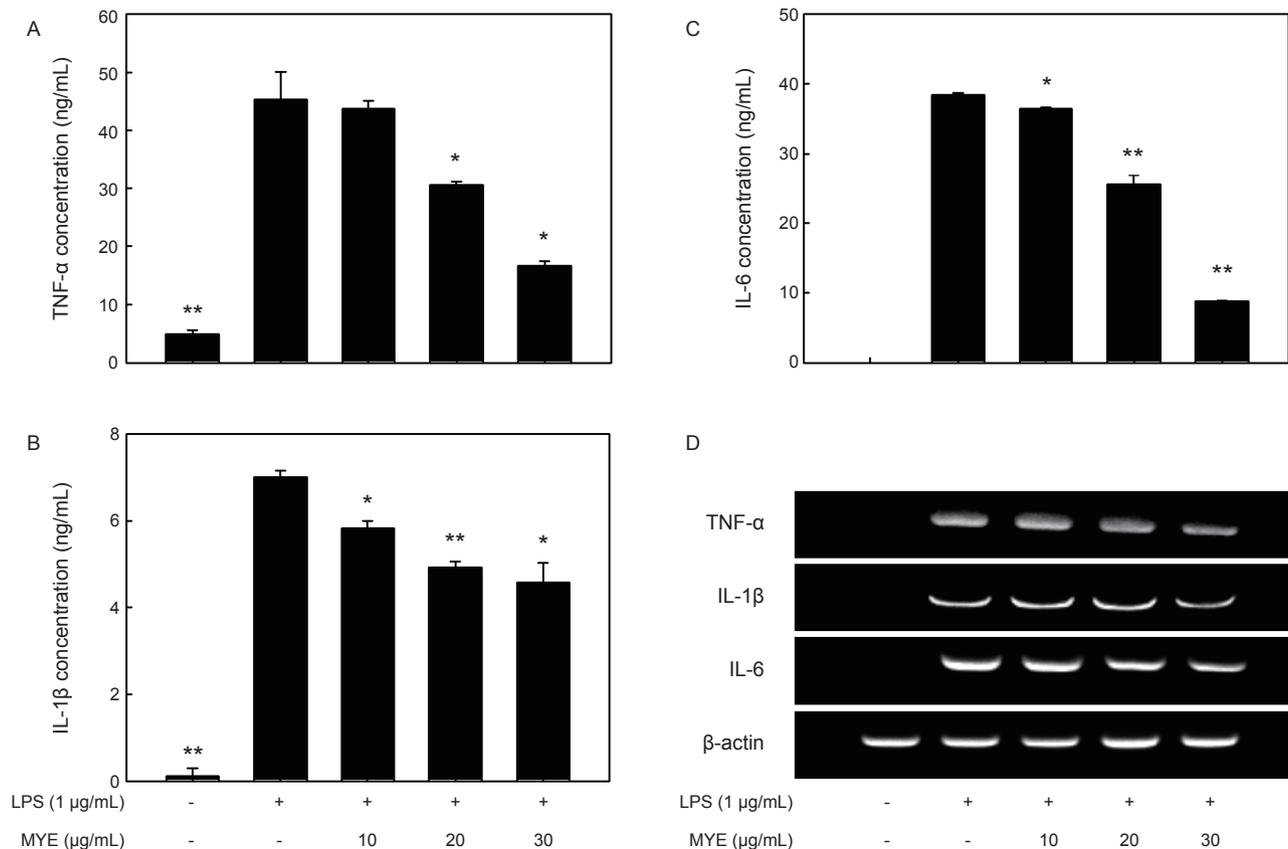


Fig. 3. Effect of MYE on the production of pro-inflammatory cytokines in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

Cells pretreated with various concentrations of MYE were stimulated with or without LPS (1 μ g/mL) for 24 h. TNF- α , IL-1 β , and IL-6 protein levels in the cell culture media were measured by ELISA (A, B and C, respectively) or their mRNA levels in the cells by RT-PCR analysis (D). Data represent mean \pm SD of three independent experiments. * P <0.05 and ** P <0.01 indicate significant differences compared to LPS-only group.

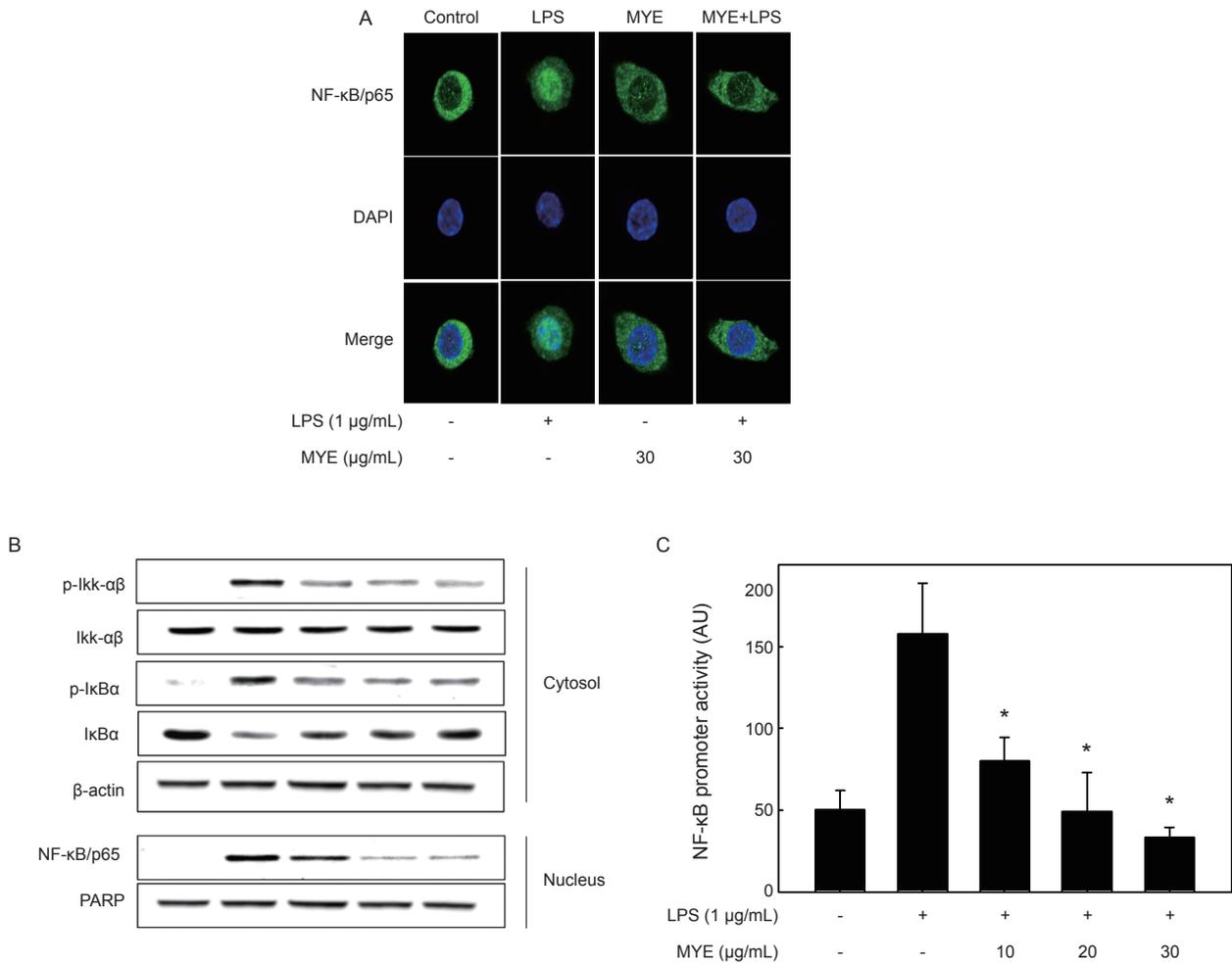


Fig. 4. Inhibitory effect of MYE on the degradation of IκB-α and the activation of NF-κB in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. (A) Cellular distribution of p65 subunit of NF-κB (green) protein analyzed by immunofluorescence staining with confocal microscopy. Cells were pretreated with MYE (100 μg/mL) for 1 h, followed by LPS stimulation for 30 min. DAPI (blue) was used for nuclear staining. (B) Nuclear localization of NF-κB and the regulation of IκB-α phosphorylation analyzed by Western blot. Cells pretreated with MYE for 1 h were stimulated with LPS for 30 min. (C) Effect of MYE on NF-κB promoter activity. Cells were transfected with 1 μg of NF-κB promoter-containing luciferase DNA for 40 h. Transfected cells pretreated with MYE for 1 h were stimulated with LPS for additional 6 h. The results presented are representatives of three independent experiments. **P*<0.05 indicates significant difference compared to LPS-only group.

에 나타난 바와 같이 MYE 처리에 의하여 HO-1의 단백질과 mRNA는 농도 의존적으로 증가함을 알 수 있었다. 또한 HO-1의 발현을 조절하는 전사인자인 Nrf2 또한 농도 의존적으로 발현량이 증가함을 알 수 있었다.

HO-1은 산화적 스트레스에 대응하는 주요한 방어효소이다. HO-1은 헴(heme)을 빌리베르딘(biliverdin), 유리 철분 및 일산화탄소로 분해하며 속도제한 효소로서 작용한다. 빌리베르딘은 빌리베르딘 환원효소에 의하여 빌리루빈(bilirubin)으로 전환된다. 헴의 대사산물인 빌리루빈은 항산화 활성을 지니며 일산화탄소는 항염증 활성을 지닌다(Otterbein et al., 1999; Ryter et al., 2006). 따라서 HO-1은 염증반응의 억제는 물론 산

화적 스트레스를 감소시킴으로써 세포의 항상성을 유지시키는 것으로 알려져 있다. 게다가 HO-1의 항염증 작용은 LPS에 의한 NF-κB의 활성화를 억제함으로써 TNF-α, IL-1β, IL-6 및 NO와 같은 염증성 인자들의 생성을 저해하여 나타낸다고 보고되고 있다(Park et al., 2010). 따라서 MYE의 항염증효과는 NF-κB 경로는 물론 Nrf2 경로를 통하여 나타내는 것으로 판단된다.

LPS로 유도되는 MAPKs와 Akt의 활성화에 대한 MYE의 억제 효과

MYE에 의한 NF-κB와 Nrf2 신호경로에 어떠한 신호단백

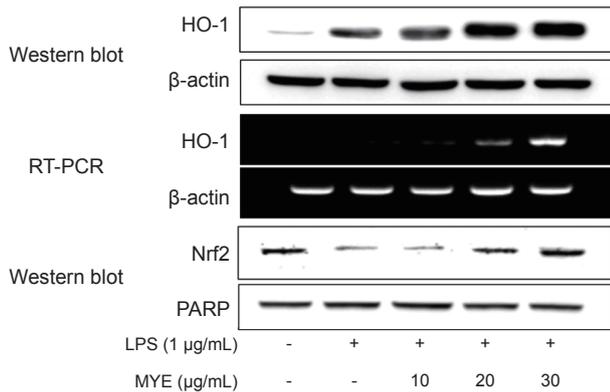


Fig. 5. Effect of MYE on the expression of heme oxygenase-1 (HO-1) and the activation of nuclear factor erythroid 2-related factor (Nrf2) in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

Cells were incubated with various concentrations of MYE for 1 h, and then stimulated with LPS (1 μ g/mL) for 30 min. Protein and mRNA levels of HO-1 were analyzed by Western blot and RT-PCR analysis, respectively. Whole cell lysate and nuclear fraction was used for Western blot of HO-1 and Nrf-2 activation, respectively. β -actin and poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) were used for housekeeping controls of HO-1 and Nrf-2, respectively. The results presented are representatives of three independent experiments.

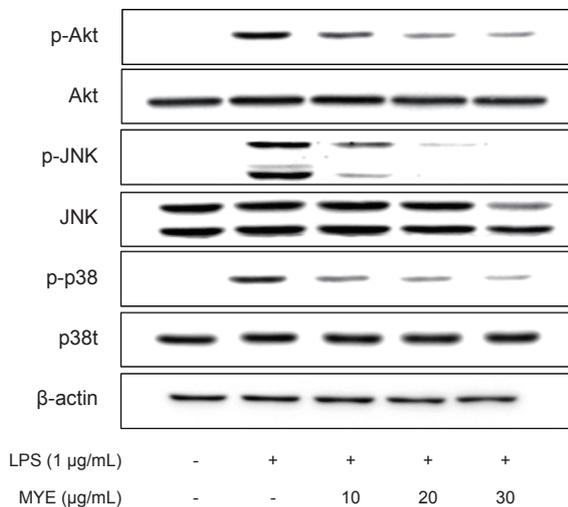


Fig. 6. Effect of MYE on the phosphorylations of MAPKs and Akt in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

Western blot analysis of MAPK and Akt phosphorylation. Cells were incubated with various concentrations of MYE for 1 h, and then stimulated with LPS (1 μ g/mL) for 30 min. Whole cell lysates were prepared and analyzed by Western blot for total and phosphorylated proteins of Akt, JNK, or p38 MAPK using respective primary antibody. The results presented are representatives of three independent experiments.

질들이 관여하는지를 알기 위하여 MAPKs (ERK, JNK, p38 MAPK)와 Akt의 인산화를 Western blot으로 분석하였다. Fig. 6에 나타난 바와 같이, LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 MYE 처리에 의하여 Akt, JNK, p38 MAPK의 인산화가 농도의존적으로 감소하였으나, ERK의 인산화에는 영향을 미치지 않았다(결과 생략). 이러한 결과는 MYE가 $I\kappa B\alpha$ 의 인산화는 물론 NF- κB 와 Nrf2 경로의 상위 단백질의 인산화를 조절함으로써 항염증 활성을 나타낸다는 것을 의미한다.

NF- κB 와 Nrf2 경로는 세포내 다양한 신호전달에 관여하는 MAPKs나 Akt와 같은 단백질 인산기 전이효소들에 의해 조절된다(Pahl, 1999; Zhang and Ghosh, 2000; Kim et al., 2010a). 많은 연구들에서 p38, JNK, ERK와 같은 MAPKs가 설치류의 대식세포에서 LPS에 의한 NF- κB 의 활성화에 중요한 역할을 한다고 밝히고 있다(Kim et al., 2010b; Guha and Mackman, 2001). 그리고 Akt 또한 NF- κB 의 활성화를 조절함으로써 여러 염증 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다(Hattori et al., 2003). 본 연구의 결과에서 LPS 자극에 의해 유도되는 NF- κB 의 활성화에 대한 MYE의 억제효과는 MAPKs 및 Akt와 같은 인산기 전이효소의 인산화 과정과 관련되어 있음을 나타낸다. 더불어 MYE에 의한 Nrf2 경로의 불활성화 또한 MYE의 항염증 작용 기전으로 작용하고 있음을 보여주고 있다.

앞서 설명한 것처럼 모자반류에서 분리된 fucoxanthin (Kim et al., 2010b), fucosterol (Jung et al., 2013), chromene (Kang et al., 2013; Kim et al., 2014)과 같은 화합물들의 항염증 활성에 대해 활발한 연구가 진행되었다. 본 실험에 사용된 MYE에 이들 화합물이 유효성분으로 포함되어 있는지, 또는 이외의 화합물에 의해 항염증활성이 나타나는가에 대해서는 후속적인 연구가 필요하다.

이상의 결과에서, LPS로 자극한 RAW 264.7 세포에 있어 NO와 같은 염증성 매개체뿐만 아니라 염증촉진성 사이토카인의 생성 및 발현이 MYE에 의해 억제된다는 것을 증명하였다. 이러한 MYE의 억제효과는 $I\kappa B$ 의 분해를 저해함으로써 NF- κB 경로를 불활성화시키는 한편 Nrf2 경로는 활성화시키는 것과 관련이 있는 것으로 나타났다. 또한 MYE는 NF- κB 활성화의 상위 신호전달 경로인 MAPKs 및 Akt에도 영향을 미치는 것으로 확인되었다. 여러 만성염증성 질환에 과도한 염증성 매개체들의 발현 및 생성이 중요한 병인적 역할을 하고 있음을 고려했을 때, 본 연구 결과는 MYE가 항염증 효능을 가진 기능성 식품의 소재로 이용될 수 있다는 가능성을 제시하고 있다. 향후 MYE의 항염증 효과를 나타내는 유효화합물의 분리동정 및 활성분석에 대한 향후 연구가 진행되어야 할 것으로 판단된다.

사 사

이 논문은 부경대학교 자율창의학술연구비(2014년)에 의하여 연구되었음.

References

- Awad NE, Selim MA, Saleh MM and Matloub AA. 2003. Seasonal variation of the lipoidal matters and hypolipidaemic activity of the red alga *Corallina officinalis* L. *Phytother Res* 17, 19-25
- Balkwill F. 2006. TNF-alpha in promotion and progression of cancer. *Cancer Metastasis Reviews* 25, 409-416.
- Beutler B and Cerami A. 1989. The biology of cachectin/TNF- α primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol* 7, 625-655.
- Chen XL and Kunsch C. 2004. Induction of cytoprotective genes through Nrf2/antioxidant response element pathway: a new therapeutic approach for the treatment of inflammatory diseases. *Curr Pharm Des* 10, 879-891.
- Chen Z, Hagler J, Palombella VJ, Melandri F, Scherer D, Ballard D and Maniatis T. 1995. Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev* 9, 1586-1597.
- D'Acquisto F, Iuvone T, Rombola L, Sautebin L, Di Rosa M and Carnuccio R. 1997. Involvement of NF-kappaB in the regulation of cyclooxygenase-2 protein expression in LPS-stimulated J774 macrophages. *FEBS Lett* 418, 175-178.
- Daekyo. 2008. The characteristics and kinds of Sargassum. Retrieved from <http://newdle.noonnoppi.com/xmlView.aspx?xmldid=17649> on Sep. 25.
- Dinareello and CA. 1999. Cytokines as endogenous pyrogens. *J Infect Dis* 179 Suppl 2, S294-304.
- González del Val A, Platas G, Basilio A, Cabello A, Gorrochategui J, Suay I, Vicente F, Portillo E, Jiménez del Río M, Reina GG and Peláez F. 2001. Screening of antimicrobial activities in red, green and brown macroalgae from Gran Canaria (Canary Islands, Spain). *Int Microbiol* 4, 35-40.
- Guha, M, Mackman and N. 2001. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell signal* 13, 85-94.
- Gwon WG, Lee MS, Kim JS, Kim JI, Lim CW, Kim NG and Kim HR. 2013. Hexane Fraction from *Sargassum fulvellum* Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Inducible Nitric Oxide Synthase Expression in RAW 264.7 Cells via NF-kappaB Pathways. *Am J Chin Med* 41, 565-584. <http://dx.doi.org/10.1142/S0192415X13500407>.
- Ha YM, Ham SA, Kim YM, Lee YS, Kim HJ, Seo HG, Lee JH, Park MK and Chang KC. 2011. Beta(1)-adrenergic receptor-mediated HO-1 induction, via PI3K and p38 MAPK, by isoproterenol in RAW 264.7 cells leads to inhibition of HMGB1 release in LPS-activated RAW 264.7 cells and increases in survival rate of CLP-induced septic mice. *Biochem Pharmacol* 82, 769-777. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2011.06.041>.
- Hattori Y, Hattori S and Kasai K. 2003. Lipopolysaccharide activates Akt in vascular smooth muscle cells resulting in induction of inducible nitric oxide synthase through nuclear factor-kappa B activation. *Eur J Pharmacol* 481, 153-158.
- Jang BC, Paik JH, Kim SP, Shin DH, Song DK, Park JG, Suh MH, Park JW and Suh SI. 2005. Catalase induced expression of inflammatory mediators via activation of NF-kappaB, PI3K/AKT, p70S6K, and JNKs in BV2 microglia. *Cell Signal* 17, 625-633.
- Joung EJ, Lee MS, Choi JW, Kim JS, Shin T, Jung BM, Kim JI and Kim HR. 2012a. Anti-inflammatory effects of phlorofucofuroeckol B-rich ethyl acetate fraction obtained from *Myagropsis myagroides* on lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells and mouse edema. *Int Immunopharmacol* 14, 471-480. <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2012.08.021>.
- Joung EJ, Lee MS, Choi JW, Kim JS, Shin T, Jung BM, Yoon NY, Lim CW, Kim JI and Kim HR. 2012b. Anti-inflammatory effect of ethanolic extract from *Myagropsis myagroides* on murine macrophages and mouse ear edema. *BMC Complement Altern Med* 12, 171. <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6882-12-171>.
- Jung HA, Jin SE, Ahn BR, Lee CM and Choi JS. 2013. Anti-inflammatory activity of edible brown alga *Eisenia bicyclis* and its constituents fucosterol and phlorotannins in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. *Food Chem Toxicol: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 59, 199-206. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.05.061>.
- Jung HA, Jung HJ, Jeong HY, Kwon HJ, Kim MS and Choi JS. 2014. Anti-adipogenic activity of the edible brown alga *Ecklonia stolonifera* and its constituent fucosterol in 3T3-L1 adipocytes. *Arch Pharm Res* 37, 713-720. <http://dx.doi.org/10.1007/s12272-013-0237-9>.
- Kang GJ, Han SC, Yoon WJ, Koh YS, Hyun JW, Kang HK, Youl Cho J and Yoo ES. 2013. Sargaquinoic acid isolated from *Sargassum siliquastrum* inhibits lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in macrophages via modulation of nuclear factor-kappaB and c-Jun N-terminal kinase pathways. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 35, 80-87. <http://dx.doi.org/10.3109/08923973.2012.698622>.
- Kim AR, Lee MS, Choi JW, Utsuki T, Kim JI, Jang BC and Kim HR. 2013a. Phlorofucofuroeckol A suppresses expression of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2, and pro-inflammatory cytokines via inhibition of nuclear factor-kappaB, c-Jun NH2-terminal kinases, and Akt in microglial cells. *Inflammation* 36, 259-271. <http://dx.doi.org/10.1007/s10753-012-9542-6>.
- Kim KC, Kang KA, Zhang R, Piao MJ, Kim GY, Kang MY, Lee SJ, Lee NH, Surh YJ and Hyun JW. 2010a. Up-regulation of Nrf2-mediated heme oxygenase-1 expression by eckol, a phlorotannin compound, through activation of Erk and PI3K/Akt. *Int J Biochem Cell Biol* 42, 297-305. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2009.11.009>.
- Kim KN, Heo SJ, Yoon WJ, Kang SM, Ahn G, Yi TH and Jeon YJ. 2010b. Fucoxanthin inhibits the inflammatory response

- by suppressing the activation of NF-kappaB and MAPKs in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. *Eur J Pharmacol* 649, 369-375. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.09.032>.
- Kim S, Kim JI, Choi JW, Kim M, Yoon NY, Choi CG, Choi JS and Kim HR. 2013b. Anti-inflammatory effect of hexane fraction from *Myagropsis myagroides* ethanolic extract in lipopolysaccharide-stimulated BV-2 microglial cells. *J Pharm Pharmacol* 65, 895-906. <http://dx.doi.org/10.1111/jphp.12049>.
- Kim S, Lee MS, Lee B, Gwon WG, Joung EJ, Yoon N and Kim HR. 2014. Anti-inflammatory effects of sargachromenol-rich ethanolic extract of *Myagropsis myagroides* on lipopolysaccharide-stimulated BV-2 cells. *BMC Complement Altern Med* 14, 231. <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6882-14-231>.
- Lawrence T, Willoughby DA and Gilroy DW 2002. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nature reviews. Nat Rev Immunol* 2, 787-795.
- Lebovic DI, Bentzien F, Chao VA, Garrett EN, Meng YG and Taylor RN. 2000. Induction of an angiogenic phenotype in endometriotic stromal cell cultures by interleukin-1beta. *Mol Hum Reprod* 6, 269-275.
- Lee JW, Bae CJ, Choi YJ, Kim SI, Kwon YS, Lee HJ, Kim SS and Chun W. 2014. 3,4,5-trihydroxycinnamic acid inhibits lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation by Nrf2 activation in vitro and improves survival of mice in LPS-induced endotoxemia model in vivo. *Mol Cell Biochem* 390, 143-153. <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-014-1965-y>.
- Lee JY, Lee MS, Choi HJ, Choi JW, Shin T, Woo HC, Kim JI and Kim HR. 2013. 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. <http://dx.doi.org/10.1007/s00394-012-0345-1>.
- Lee YS, Kim DS, Ryu BH and Lee SH. 1992. Antitumor and immunomodulation effects of seaweeds toward sarcoma-180 cell. *J Korean Soc Food Nutr* 21, 544-550.
- Makarov SS. 2001. NF-kappa B in rheumatoid arthritis: a pivotal regulator of inflammation, hyperplasia, and tissue destruction. *Arthritis Res* 3, 200-206.
- Marks-Konczalik J, Chu SC and Moss J. 1998. Cytokine-mediated transcriptional induction of the human inducible nitric oxide synthase gene requires both activator protein 1 and nuclear factor kappaB-binding sites. *J Biol Chem* 273, 22201-22208.
- Nathan C. 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6, 3051-3064.
- NF&DI. 2009. National Fisheries Research & Development Institute. Retrieved from [http://portal.nfrdi.re.kr/oceanlife/search/fecotox.jsp?sci_name=Myagropsis yendoii](http://portal.nfrdi.re.kr/oceanlife/search/fecotox.jsp?sci_name=Myagropsis_yendoii) on Sep. 25.
- Nguyen T, Huang, HC and Pickett CB. 2000. Transcriptional regulation of the antioxidant response element. Activation by Nrf2 and repression by MafK. *J Biol Chem* 275, 15466-15473.
- Otterbein LE, Mantell LL and Choi AM 1999. Carbon monoxide provides protection against hyperoxic lung injury. *Am J Physiol* 276, L688-694.
- Pahan K, Sheikh FG, Liu X, Hilger S, McKinney M and Petro TM. 2001. Induction of nitric-oxide synthase and activation of NF-kappaB by interleukin-12 p40 in microglial cells. *J Biol Chem* 276, 7899-7905.
- Pahl HL. 1999. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18, 6853-6866.
- Pan MH, Hong HM, Lin CL, Jhang AZ, Tsai JH, Badmaev V, Nagabhushanam K, Ho CT and Chen WJ. 2011. Se-methylselenocysteine inhibits lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation and iNOS induction in RAW 264.7 murine macrophages. *Mol Nutr Food Res* 55, 723-732. <http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.201000481>.
- Park NB, Song EJ, Kim KBWR and Lee CJ. 2010. Antimicrobial activity of *Myagropsis yendoii* extract. *Kor J Fish Aquat Sci* 43, 642-647.
- Park SY, Kim YH, Kim EK, Ryu EY and Lee SJ. 2010. Heme oxygenase-1 signals are involved in preferential inhibition of pro-inflammatory cytokine release by surfactin in cells activated with *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *Chem Biol Interact* 188, 437-445. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2010.09.007>.
- Ryter SW, Alam J and Choi AM 2006. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev* 86, 583-650.
- Xie QW, Whisnant R and Nathan C. 1993. Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* 177, 1779-1784.
- Zhang G and Ghosh S 2000. Molecular mechanisms of NF-kappaB activation induced by bacterial lipopolysaccharide through Toll-like receptors. *J Endotoxin Res* 6, 453-457.