

넓패추출물에 의한 RAW 264.7 세포에서의 항염효과

심 중 현[†]

서울여자대학교 바이오헬스융합학과, 부교수
(2023년 10월 17일 접수, 2023년 12월 12일 수정, 2023년 12월 21일 채택)

Anti-inflammatory Effect of *Ishige foliacea* in RAW 264.7 Cells

Joonghyun Shim[†]

Department of Biohealth-Convergence, Seoul Women's University,
621 Hwarang-ro, Nowon-gu, Seoul 01797, Korea
(Received October 17, 2023; Revised December 12, 2023; Accepted December 21, 2023)

요약: 본 연구는 RAW 264.7 세포를 이용하여 넓패추출물(*Ishige foliacea*, *I. foliacea*)의 피부 항염 효과를 확인하고자 하였다. RAW 264.7 세포에 대한 넓패추출물의 항염증 효과는 세포 생존력 분석, mRNA 발현 및 산화질소(NO)/프로스타글란딘 E₂ (PGE₂) 생성을 통해 확인하였다. 넓패추출물의 항염증 효과는 IL-1 α /IL-1 β /IL-6/TNF α mRNA 발현 및 NO/PGE₂ 생성을 분석하여 규명하였고, 정량적 실시간 중합효소 연쇄반응을 통해 넓패추출물은 iNOS/COX2/IL-1 α /IL-1 β 및 IL-6의 mRNA 발현을 감소시키는 것을 확인하였다. 또한 PGE₂와 NO 생성의 비교를 통해 넓패추출물이 항염증 효과가 있음을 확인하였다. 넓패추출물의 항염 효과를 바탕으로 코스메슈티컬 소재로 활용될 수 있는 가능성을 확인하였다. 넓패추출물의 항염증 메커니즘에 대한 후속 연구를 바탕으로 코스메슈티컬뿐만 아니라 염증과 관련된 약리학적인 메커니즘 발굴에도 도움이 될 것으로 보인다.

Abstract: This study was carried out to identify the anti-inflammatory effects of *Ishige foliacea* (*I. foliacea*) extract on skin using RAW 264.7 cells. The anti-inflammatory effects of *I. foliacea* extract on RAW 264.7 cells were assessed by cell viability assay, mRNA expressions, and nitric oxide (NO)/prostaglandin E₂ (PGE₂) productions. The anti-inflammatory effects of *I. foliacea* extract were elucidated by analysis of IL-1 α /IL-1 β /IL-6/TNF α gene expressions and PGE₂/NO production. Quantitative real-time polymerase chain reaction showed that *I. foliacea* extract decreased the gene expression levels of iNOS/COX2/IL-1 α /IL-1 β and IL-6. Furthermore, PGE₂/NO production also revealed that *I. foliacea* extract exhibited anti-inflammatory properties. These results suggest that *I. foliacea* extract is an anti-inflammatory compound. It could be a potent cosmeceutical material for anti-inflammatory effects. Further studies on the anti-inflammatory mechanisms of broadleaf extracts are expected to help identify pharmacological mechanisms related to inflammation in addition to cosmeceuticals.

Keywords: *Ishige foliacea*, inflammation, PGE₂, nitric oxide, interleukin

[†] 주 저자 (e-mail: shimjh@swu.ac.kr)
call: 02-970-1142

1. 서론

염증(inflammation)은 외부 자극, 박테리아 및 손상된 세포 등을 포함한 생체 내외부의 유해한 자극에 대한 면역 반응이다[1]. 생체를 보호하기 위한 면역 반응이지만, 과도한 염증은 고혈압, 당뇨병아테로마성 동맥경화증, 신경 퇴행성 장애 및 암 등의 질환이나 피부노화를 유도할 수 있다고 알려져 있다[1,2].

Lipopolysaccharide (LPS)는 세균의 세포벽을 구성하고 있는 물질로, 대식세포(macrophage)가 소유한 세포막 단백질인 toll-like receptor (TLR)에 결합하여 세포 내부로의 신호 전달체계 중 하나인 mitogen-activated protein kinase (MAPK)와 nuclear factor kappa beta (NFκB) 신호의 활성화를 유발한다. 또한 LPS에 의해 대식세포는 nitric oxide (NO)와 prostaglandin E₂ (PGE₂) 같은 염증 매개인자를 분비하고 interleukin-1 (IL1), IL6, 그리고 tumor necrosis factor-α (TNF-α) 등의 염증성 사이토카인의 분비를 유발한다[3,4]. 대식세포는 면역과정 중에서 중요한 역할을 하며, 특히 면역조절, 식균작용, 적응면역세포로의 항원제시와 같은 주요 기능을 담당하고, 이를 위해 다양한 염증성 사이토카인 및 염증매개인자를 방출한다[3,4]. 이러한 과정에서 생성된 염증성 매개인자는 면역기능을 강화시키거나 염증 부위의 주변세포를 보호하는 역할도 하지만, 과도한 PGE₂와 NO 등은 오히려 염증을 악화시키는 요인이 되기도 한다. NO는 염증의 대표적 지표물질로 알려져 있으며, 박테리아 등의 미생물을 죽이거나 종양을 억제하는 등의 유익한 역할을 하지만 과도한 NO는 조직손상, 유전자 변이 및 신경손상 등을 유발하기도 한다[1,5-7]. 또한 아라키돈산은 cyclo-oxygenase 2 (COX2) 효소에 의해 염증유발물질인 프로스타글란딘(prostaglandin E₂; PGE₂)로 변화하고 iNOS와 함께 염증반응에서 중요한 인자로 알려져 있다. LPS에 의해 대식세포가 활성화되면, 대식세포는 TNF-α, IL-1, 6와 같은 염증성 사이토카인을 생산한다[8,9]. 따라서 PGE₂와 NO, 염증성 사이토카인 등의 억제는 염증성 질환의 예방이나 치료에 있어 매우 중요한 목표가 된다.

넙패(*Ishige foliacea*, *I. foliacea*)는 갈조식물문, 민가지말목, 패과에 속하는 갈조류로 국내에서는 남해안, 서해안, 제주도에 분포하고, 해외에서는 미국과 일본에 서식하고 있다. 넙패에 대한 연구는 신장세포의 보호, 자궁암세포 사멸, 항균 및 항산화, 항혈전, 항고혈압에 대해 보고된바 있다[10-15]. 2009년 이전까지는 넙패가 *Ishige sinocola* (*I.*

sinocola)와 *I. foliacea* 등 2가지 이명으로 혼용되어 왔다. 하지만 *I. foliacea*는 멕시코 연안에서 생육하는 *I. sinocola*와는 다른 종임이 *rbcL* 및 *COX3* 유전자 분석과 형태적 재검토를 밝혀졌고, 한국 및 일본에서 생육하는 넙패는 *I. foliacea*로 불러야 함을 보고하였다[16,17]. *I. sinocola* 에탄올 추출물이 항염증 효과가 있다는 보고가 되어 있는 반면, *I. foliacea*의 항염증 효과에 대한 연구는 전무한 실정이다[18].

본 연구에서 LPS에 의해 염증반응이 유발된 RAW 264.7 세포에 넙패(*I. foliacea*)추출물을 처리하였을 때의 항염증 효과를 확인하였다. 넙패추출물에 의한 RAW 264.7 세포에서의 생존률, 대식세포 표지유전자의 발현과 PGE₂, NO의 생성을 CCK-8 assay, real-time qRT-PCR 및 ELISA assay 등으로 각각 확인하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료 및 RAW 264.7 세포주 배양

본 실험에 사용된 넙패추출물(*I. foliacea* extract)은 2021년 5월 8일에 전라남도 진도군(Korea)에서 채집된 시료이며, 국립해양생물자원관의 해양바이오뱅크(<https://www.mbris.kr/biobank/main/index.do>)에서 분양받아 사용하였다. 넙패(NP30210029)는 동결건조한 후 30 g의 시료를 70% 에탄올(300 mL)을 용매로 하여 1 h씩 3 회 소니케이션(WUC N30H, Daihan Science, Korea)하여 추출하였고, 에탄올(ethanol) : DMSO (1 : 1 vol/vol)을 용매로 하여 10 mg/mL의 농도로 용해시켜 실험에 사용하였다.

본 실험에서 쓰인 RAW 264.7 macrophage (대식세포)는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, Korea)로부터 분양 받았다. RAW 264.7 대식세포 배양에 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS, Welgene, Korea), penicillin/streptomycin (Life Technologies, USA)이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Welgene, Korea)을 사용했다. RAW 264.7 대식세포는 37 °C, 5 % CO₂, 습도 100 %의 인큐베이터에서 배양하였다.

2.2. 세포 생존율 검증

넙패추출물에 대한 세포의 생존율은 cell counting kit-8 (CCK-8, Dojindo, Japan)를 사용하여 측정하였다. RAW 264.7 대식세포를 조직 배양 접시에 접종한 후 24 h 동안 안정화시킨 후, 넙패추출물을 농도 별로 24 h 처리하였다.

이후 phenol-red가 없는 DMEM 배지에 CCK-8을 10 : 1의 비율로 희석하여 5 % CO₂, 37 °C, 습도 100 % 습윤조건에서 1 h 동안 반응시켰다. Spectrophotometer (BioTek, USA)의 450 nm 파장에서 시약의 흡광도를 측정하였고, 세포 무첨가 배지를 blank로 하여 세포 생존율을 계산하였다. 세포의 생존율은 대조군(뿔땃추출물 무처리군)에 대한 백분율로 표시하였다.

2.3. 실시간 유전자 중합효소 연쇄반응(Real-time RT-PCR)

Life technologies사의 TRIzol[®] Reagent (USA)로 RAW 264.7 대식세포로부터 total RNA를 추출하였다. SuperiorScript[™] III reverse-transcriptase (Enzynomics, Korea)를 사용하여 RNA로부터 cDNA를 합성하였으며, RAW 264.7 대식세포 표지마커의 발현양상을 확인하기 위하여 StepOnePlus real-time qPCR machine (Applied Biosystems, USA)을 이용하여 유전자 발현을 분석하였다. 본 실험에 쓰인 Taqman[®] Gene expression assay (Applied Biosystems, USA)는 Table 1에 따로 정리하였다.

2.4. Nitric Oxide (NO) 측정

35 mm 조직 배양 접시에 RAW 264.7 대식세포를 2 × 10⁵ 개의 세포로 접종하고 24 h 동안 37 °C, 5 % CO₂, 습도 100 %의 인큐베이터에서 안정화시킨 후, lipopolysaccharide (LPS, Sigma, USA, 100 ng/mL)와 뿔땃추출물을 농도 별로 처리하여 24 h 동안 배양한 후, 상층액을 수확하여 상등액 100 μL를 NO Plus detection kit (iNtRON, Korea)를 사용하였고, 제조사가 제공하는 프로토콜을 기반으로 NO 생성량을 측정하였다. 실험법을 간략히 요약하면, 상등액 100 μL에 N1 buffer (50 μL) 첨가하여 10 min간 상온에서 반응시킨 후

50 μL의 N2 buffer를 추가하여 10 min 간 반응시키고 spectrophotometer (520 ~ 560 nm)로 흡광도를 측정하였다.

2.5. PGE₂-Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

뿔땃추출물이 PGE₂의 생성에 끼치는 영향을 확인하기 위하여 RAW 264.7 대식세포를 24 h 동안 선배양한 후, LPS (100 ng/mL)와 뿔땃추출물을 농도 별로 첨가하여 6 h 동안 세포배양기에서 처리하였다. PGE₂-ELISA kit는 Pierce Endogen (USA)에서 구입하였고, 이를 이용하여 제조사의 프로토콜을 기반으로 RAW 264.7 대식세포가 분비하는 PGE₂를 측정하였다.

2.6. 통계분석

통계처리는 student's t-test분석법을 이용하여 유의수준 0.05 이하 (p < 0.05)로 하여 검정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 뿔땃추출물의 농도별 RAW 264.7 세포 생존율 분석

대식세포는 생체 내 전신에 분포하고 있으며 염증유발 물질을 방어하는 면역세포로, 후천성 면역을 개시하는 항원제시세포로의 역할과 다양한 염증 사이토카인을 분비하는 세포로 알려져 있다[21]. 본 실험에서 사용한 RAW 264.7 대식세포는, lipopolysaccharide (LPS)에 반응하여 염

Table 1. Gene Name and Assay ID Number in Real-time RT-PCR Analysis

Symbol	Gene name	Assay ID
NOS2	Nitric oxide synthase 2, inducible	Mm00440502_m1
COX2	Cyclooxygenase 2	Mm03294838_g1
IL1α	Interleukin 1 alpha	Mm00439620_m1
IL1β	Interleukin 1 beta	Mm00434228_m1
IL6	Interleukin 6	Mm00446190_m1
TNFα	Tumor necrosis factor alpha	Mm00443258_m1
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Mm99999915_g1

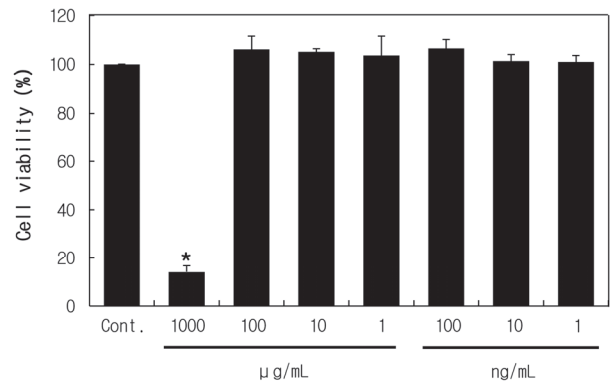


Figure 1. Cytotoxicity of *Ishige foliacea* (*I. foliacea*) extract in RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells (1 × 10⁴ cells/well) were seeded in 96 well cell culture plates and treated with *I. foliacea* extract for 24 h. The CCK-8 assay was used to perform the cell viability. These results are presented as mean ± SD of the percentage of control optical density in triplicate. * value relative to the control; *p < 0.05.

증성 사이토카인을 생성한다. 뽕패추출물의 항염효과를 확인하기에 앞서, 실험에 적용하고자 하는 뽕패추출물의 농도를 확인하고자 CCK-8 assay로 세포의 생존율을 계산하였다. 대조군은 시료를 처리하지 않았고 뽕패추출물은 1,000, 100, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$, 100, 10, 1 ng/mL 의 농도 별로 처리하여 세포의 생존율을 분석하였다(Figure 1). 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 뽕패추출물을 처리한 RAW 264.7 대식세포의 생존율이 무처리군과 비교하여 유의성있게 감소한 반면, 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도 이하에서 RAW 264.7 대식세포의 생존율은 무처리군과 유사하여 추후 진행되는 실험에서는 100, 10, 1 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 뽕패추출물을 처리하여 실험을 진행하였다.

3.2. 뽕패추출물이 NO 생성에 미치는 영향

생체에서 nitric oxide (NO)는 혈압을 조절하기도 하고

세균과 종양을 제거하고 신호전달을 매개하는 등의 다양한 역할을 하는 중요한 인자로 알려져 있다[8]. 하지만 과도하게 생성되는 NO는 신경 조직 등의 손상을 유발하고 세포내 유전자 변이를 유도하거나, 부종을 야기하거나 시스테인의 황에 NO가 결합하여 변질된 S-nitrosothiols (SNOs)을 생성하여 노화를 유발하기도 한다[1,5-7,19,20]. 본 실험에서 뽕패추출물의 NO 생성에 관여하는 효과를 확인하였을 때, LPS에 의해 23.2 μM 농도로 증가된 NO의 생성이 100, 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 뽕패추출물을 처리하였을 시 각각 5.7, 13.3 μM 로 유의성있게 감소된 것으로 나타났다 (Figure 2A).

대식세포에서 LPS는 inducible NO synthase (iNOS)라는 NO 합성 효소를 촉진하여 NO의 생성을 증가시킨다고 알려져 있다[23]. 뽕패추출물이 NO를 합성하는 효소인 iNOS

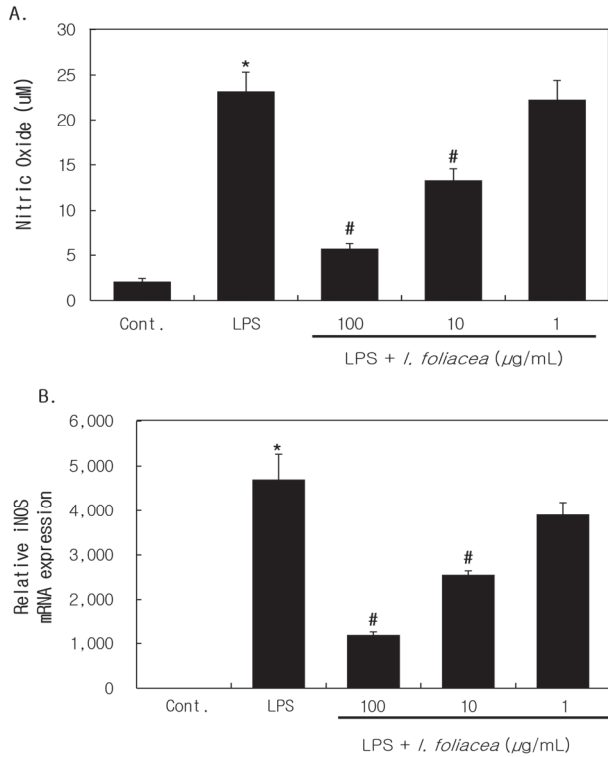


Figure 2. Effects of *I. foliacea* extract on NO synthesis in RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells were seeded in 35 mm cell culture dishes and treated with *I. foliacea* extract for 24 h. (A) The conditioned media were analyzed for NO levels using a NO detection kit. (B) Real-time qPCR analysis of iNOS mRNA. The data represents the mean \pm SD of three independent experiments. * value relative to the control; # value relative to the LPS-treated condition; *, # $p < 0.05$.

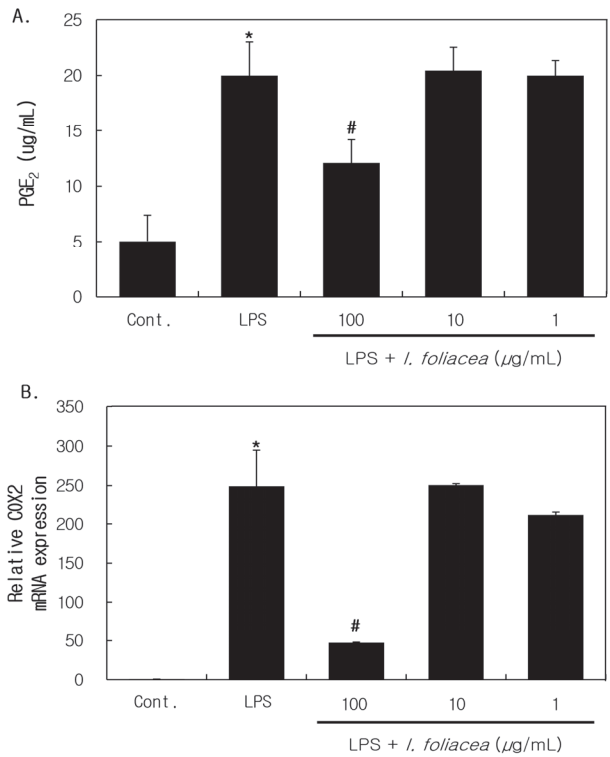


Figure 3. Effects of *I. foliacea* extract on PGE₂ production in RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells were seeded in 35 mm cell culture dishes and treated with *I. foliacea* extract for 24 h. (A) The conditioned media were analyzed for PGE₂ by PGE₂-ELISA. (B) Real-time qPCR analysis of COX2 mRNA. The data represents the mean \pm SD of three independent experiments. * value relative to the control; # value relative to the LPS-treated condition; *, # $p < 0.05$.

유전자 발현에 영향을 끼치는지 확인하기 위하여 실시간 유전자 증합효소 연쇄반응으로 유전자발현을 분석하였다. LPS 처리군에서 대조군 대비 iNOS의 발현이 현저히 증가하였으나, 100, 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 뽕패추출물을 처리한 RAW 264.7 세포에서 LPS 처리군 대비 iNOS의 발현이 각각 75, 46% 감소함을 확인하였다(Figure 2B).

3.3. 뽕패추출물이 PGE₂의 생성에 끼치는 영향

Prostaglandin (PG)는 아라키돈산으로부터 생성되는 불포화지방산으로, 염증반응을 매개하는 호르몬으로 알려져 있다 [24]. PG의 하나인 Prostaglandin E₂ (PGE₂)는 cyclooxygenase-2 (COX2) 효소에 의하여 생성되어 염증반응을 매개한다. COX2 유전자가 과도하게 활성화되거나 발현이 되는 경우에는 발열, 통증 및 염증이 유발된다[21,22]. 뽕패추출물에 의한 PGE₂ 증감 여부를 확인한 결과, LPS 처리군에서 PGE₂의 생성이 19.98 $\mu\text{g/mL}$ 로, 대조군에 비해 유의성있게

증가하였다. 반면 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 뽕패추출물을 처리하였을 때에는 PGE₂의 생성이 12.1 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타나 LPS 처리군 대비 PGE₂ 생성이 유의성있게 감소하였다(Figure 3A). 또한 PGE₂를 합성하는 효소인 COX2 유전자의 발현은 대조군 대비 LPS 처리군에서 249.2 배 증가하였으나 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 뽕패추출물을 처리한 조건에서는 LPS 처리군 대비 81% 감소하였다(Figure 3B).

3.4. 뽕패추출물이 염증성 사이토카인의 생성에 끼치는 영향

피부에서 염증은 피부 질환 뿐만 아니라 피부의 노화를 촉진할 수 있다고 알려져 있다[2,7,19]. IL1 α , IL1 β 는 염증과정, 면역반응 및 조혈 등에 관여하는 사이토카인으로, 대식세포와 면역반응이 유도된 B세포 및 진피층 내 섬유아세포에서 생성되는 염증매개 인자이다[20,23,24]. 특히 IL1 β 는 염증부위에 림프구와 호중구 등의 염증성 세포의

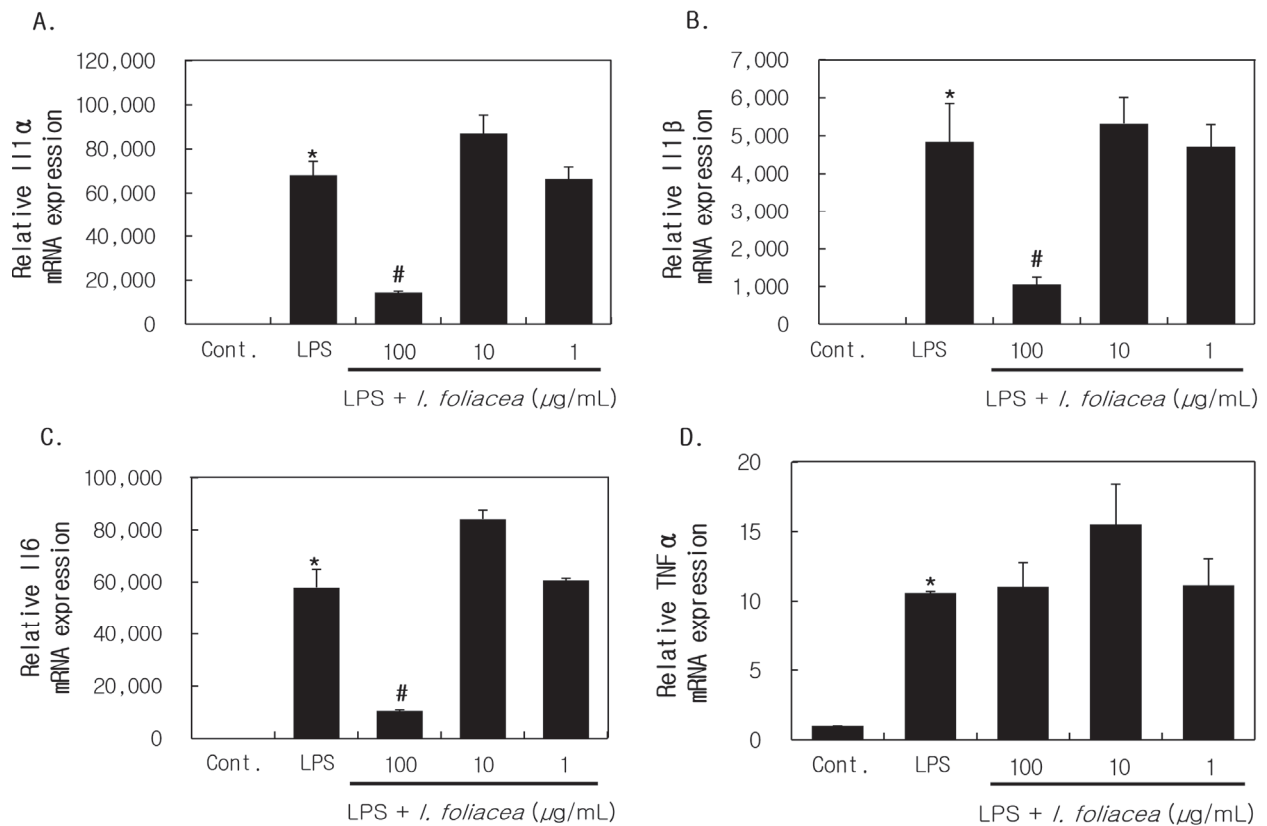


Figure 4. Effects of *I. foliacea* extract on the expression of inflammatory cytokines. Real-time qPCR analysis of inflammatory transcription factors was carried out for IL-1 α (A), IL-1 β (B), IL-6 (C), and TNF α (D). The graphs are shown as mean \pm SD of three independent experiments. * value relative to the control; # value relative to the LPS-treated condition; *, # $p < 0.05$

침윤을 유도하는 사이토카인으로 보고되어 있다[23,24]. IL6는 B세포의 분화와 성장을 유도하고, 알리지 등의 만성 염증질환을 야기한다고 보고되어 있다[5,8]. 또한, TNF α 는 초기 염증반응시 염증부위로 호중구를 유도하여 부종, 발열 및 급성 면역반응을 유발하는 인자이다[25].

LPS는 RAW 264.7대식세포에서 다양한 인터류킨, iNOS와 TNF α 등의 염증관련 인자의 생산을 촉진시킨다. 본 연구에서는 RAW 264.7대식세포에 100 ng/mL의 LPS를 처리하여 염증반응을 유도한 후 넓패추출물의 염증성 사이토카인 증감여부를 확인한 결과, IL1 α 는 100 μ g/mL의 넓패추출물을 처리하였을 때 LPS 처리군 대비 79% 가량 발현이 감소하였다(Figure 4A). IL1 β 는 100 μ g/mL의 넓패추출물을 처리하였을 때 LPS 처리군 대비 78% 가량 발현이 감소하였다(Figure 4B). IL6는 100 μ g/mL의 넓패추출물을 처리하였을 때 LPS 처리군과 비교하여 72% 가량 발현이 감소하였다(Figure 4C). TNF α 는 LPS처리에 의해 대조군 대비 10.6배 증가하였으나 넓패추출물처리에 의해서는 유전자발현이 유의성있게 차이나지 않았다(Figure 4D). 본 연구에서 넓패추출물이 염증에 관여하는 3종의 인터류킨(IL-1 α , IL-1 β , IL-6)의 발현을 억제시켰으며, PGE $_2$ 와 NO의 생성 모두 100 μ g/mL 농도의 넓패추출물 처리군에서 감소됨을 통해 항염 효과를 확인하였고, 피부노화 혹은 염증을 완화시키는 화장품 원료로서 넓패추출물이 활용될 수 있음을 보여주는 가능성을 확인하였다. 특별히 Figure 2, 3와 Figure 4에서 100 μ g/mL의 넓패추출물이 LPS에 의해 염증반응이 유발된 대식세포의 NO, PGE $_2$, IL6, 인터류킨의 발현 및 생성을 특이적으로 감소시키는 농도라고 보이며, 의약품 및 기능성 화장품 등의 조성에 적절히 활용될 수 있을 것이다. 10 μ g/mL 이하의 농도에 의해 COX2/iNOS 유전자의 발현이 감소하지 않고 그에 의한 PGE $_2$ /NO의 생성도 LPS 처리군과 비교하여 감소하지 않았다(Figure 2, 3). 그리고 염증성 사이토카인의 발현 역시 LPS 처리군에 비해 유의성있는 차이점을 보이지 않았다(Figure 4A, B). 이는 넓패추출물이 염증을 완화시키는 소재로 사용될 시 적절한 농도를 처리하여 제품에 적용해야 함을 암시하고 있다.

4. 결 론

내외부의 노화인자에 의해 피부는 탄력을 잃고 주름이 생성되며 피부의 두께가 두터워지고 염증 등의 현상이 난

다. 미세먼지, 자외선, 세균 등과 같은 외부인자에 의해 피부는 NO와 활성산소종의 연쇄 반응을 통해 노화가 더욱 촉진되고 염증 등이 발생한다[19,26,27]. 또한 노화는 인체를 구성하는 세포의 감소, 혹은 조직의 손상과 기능저하에 의해 정상적인 기능을 하도록 회복시키는 재생의 기능을 하지 못하게 한다[28].

본 연구에서 넓패추출물을 RAW 264.7 대식세포에 처리할 적절한 농도를 파악할 수 있었다. 100 μ g/mL 이하의 농도에서 RAW 264.7 대식세포의 생존율에 영향을 미치지 않음을 Figure 1을 통하여 확인하였다. iNOS, COX2, 인터류킨의 유전자 발현양상 측정과 NO 생성량 및 PGE $_2$ 발현 측정에서 넓패추출물이 유의성 있게 LPS에 의해 증가된 염증매개 인자와 염증성 사이토카인의 발현을 감소시키는 결과를 나타내었다(Figure 2 ~ 4). 이는 넓패추출물이 새로운 염증개선 후보 물질로서의 가능성을 보여주었다.

넓패(*I. folicea*)추출물의 염증 개선 가능성을 확인한 결과는 본 결과가 최초로, 추후 피부질환 등의 치료제로 활용될 수 있고, 염증에 의해 유발되는 피부트러블을 억제할 수 있는 가능성을 제공한 결과라 사료된다. 또한 향후 넓패추출물의 지표물질 분석 및 넓패추출물이 피부세포에 미치는 세포내 기전에 관한 임상연구 및 후속연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

References

1. J. Albina and J. Reichner, Nitric oxide in inflammation and immunity, *New Horiz.*, **3**(1), 46 (1995).
2. H. J. Kim and Y. C. Chang, Suppression of TNF- α -induced inflammation by extract from different parts of *Moringa* in HaCaT cells, *J. Life Sci.*, **22**(9), 1254 (2012).
3. S. Akira and K. Takeda, Toll-like receptor signaling, *Nat. Rev. Immunol.*, **4**(7), 499 (2004).
4. P. F. Gomez, M. H. Pillinger, M. Attur, N. Marjanovic, M. Dave, J. Park, C. O. Binagham, H. Al-Mussawir, and S. B. Abramson, Resolution of inflammation: prostaglandin E $_2$ dissociates nuclear trafficking of individual NF-kappa B subunits (p65, p50) in stimulated rheumatoid synovial fibroblasts, *J. Immunol.*, **175**(10), 6924 (2005).
5. C. Gabay, Interleukin-6 and chronic inflammation, *Arthritis Res. Ther.*, **8**(Suppl 2), S3 (2006).
6. J. J. Triel, J. H. E. Arts, H. Muijser, and C. F. Kuper,

- Allergic inflammation in the upper respiratory tract of the rat upon repeated inhalation exposure to the contact allergen dinitrochlorobenzene (DNCB), *Toxicol.*, **269**(1), 73 (2010).
7. H. J. Lee, B. Y. Sim, J. W. Bak, and D. H. Kim, Effect of Gami-sopungsan on inflammatory and DNCB-induced dermatitis in NC/Nga in mice, *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*, **28**(2), 146 (2014).
 8. N. J. Horwood, T. H. Page, J. P. McDaid, C. D. Palmer, J. Campbell, T. Mahon, F. M. Brennan, D. Webster, and B.M. Foxwell, Bruton's tyrosine kinase is required for TLR2 and TLR4-induced TNF, but not IL-6, production, *J. Immunol.*, **176**(6), 3635 (2006).
 9. N. Hirohashi and D. C. Morrison, Low-dose lipopolysaccharide (LPS) pretreatment of mouse macrophages modulates LPS-dependent interleukin-6 production in vitro, *Infect. Immun.*, **64**(3), 1011 (1996).
 10. C. H. Cho, M. Y. Kim, G. H. Youm, S. Kim, Y. K. Park, and S. H. Lee, Advanced glycation end-products inhibitory activities and renoprotective effects of *Ishige foliacea* ethanolic extract, *J. Chitin Chitosan*, **25**(3), 134 (2020).
 11. B. O. Cho, H. W. Ryu, Y. K. So, C. H. Jin, M. W. Byun, W. G. Kim, and I. Y. Jeong, *Ishige sinicola* extracts induce apoptosis via activation of a caspase cascade in human HeLa cell, *J Korean Soc Food Sci Nutr*, **41**(7), 901 (2012).
 12. M. S. Kim, K. J. Kwon, M. J. Lee, S. M. Ahn, and H. Y. Sohn, Evaluation of the antimicrobial activities of 35 seaweed extracts against pathogenic bacteria and *Candida* sp, *Korean J. Microbiol. Biotechnol.*, **40**(2), 144 (2012).
 13. S. M. Ahn, Y. K. Hong, G. S. Kwon, and H. Y. Sohn, Evaluation of antioxidant and nitrite scavenging activity of seaweed extracts, *Journal of Life Science*, **21**(4), 576 (2011).
 14. J. H. Lim, K. S. Jung, J. S. Lee, E. S. Jung, D. K. Kim, Y. S. Kim, Y. W. Kim, and D. H. Park, The study on antimicrobial and antifungal activity of the wild seaweeds of Jeju island, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **34**(3), 201 (2008).
 15. S. H. Cha, G. N. Ahn, S. J. Heo, K. N. Kim, K. W. Lee, C. B. Song, S. K. Cho, and Y.J. Jeon, Screening of extracts from marine green and brown algae in Jeju for potential marine angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory activity, *J Korean Soc Food Sci Nutr*, **35**(3), 307 (2006).
 16. *Ishige foliacea* voucher CNUK PI046 cytochrome oxidase subunit III (cox3) gene, partial cds; mitochondrial. GenBank: FJ427587.1
 17. *Ishige foliacea* voucher CNUK PI046 ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene, partial cds; plastid. GenBank: FJ427692.1
 18. J. H. Kim, M. J. Kim, K. B. W. R. Kim, S. H. Pa, K. S. Cho, G. U Kim, X. Xiaotong, D. H. Lee, G. R. Park. and D.H. Ahn, Anti-inflammatory effects of *Ishige sinicola* ethanol extract in SLP-induced RAW 264.7 cell and mouse model, *Korean J. Food Preserv.*, **24**(8), 1149 (2017).
 19. A. N. Paunel, A. Dejam, S. Thelen, M. Kirsch, M. Horstjann, P. Gharini, M. Murtz, M. Kelm, H. de Groot, V. Kolb-Bachofen, and C. V. Suschek, Enzyme-independent nitric oxide formation during UVA challenge of human skin: characterization, molecular sources, and mechanisms, *Free Radic. Biol. Med.*, **38**(5), 606 (2005).
 20. K. J. Yun, J. Y. Kim, J. B. Kim, K. W. Lee, S. Y. Jeong, H. J. Park, H. J. Jung, Y. W. Cho, K. Yun, and K. T. Lee, Inhibition of LPS-induced NO and PGE₂ production by asiatic acid via NF-κB inactivation in RAW 264.7 macrophages: Possible involvement of the IKK and MAPK pathways, *Internation. Immunopharmacol.*, **8**(3), 431 (2008).
 21. S. G. Harris, J. Padilla, L. Koumas, D. Ray, and R. P. Phipps, Prostaglandins as modulators of immunity, *Trends Immunol.*, **23**(3), 144 (2002).
 22. A. S. M. Noman, N. Koide, F. Hassan, I. I-E-Khuda, J. Dagvadorj, G. Tumurkhuu, S. Islam, Y. Naiki, T. Yoshida, and T. Yokochi, Thalidomide inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-α production via down-regulation of MyD88 expression, *Innate Immun.*, **15**(1), 33 (2009).
 23. P. C. Lord, L. M. Wilmoth, S. B. Mizel, and C.E. McCall, Expression of interleukin-1 alpha and beta genes by human blood polymorphonuclear leukocytes, *J. Clin Invest.*, **87**(4), 1312 (1991).

24. I. Roitt, J. Brostoff and D. Male, Immunology sixth edition, p119,128,441, Mosby, London, U.K. (2002).
25. Y. Zhang, B. F. Ramos, and B. A. Jakschik, Neutrophil recruitment by tumor necrosis factor from mast cells in immune complex peritonitis, *Science*, **258**(5090), 1957 (1992).
26. H. S. Talwar, C. E. Griffiths, G. J. Fisher, T. A. Hamilton, and J. J. Voorhees, Reduced type I and type III procollagens in photodamaged adult human skin, *J. Invest. Dermatol.*, **105**(2), 285 (1995).
27. J. Kim, C. W. Lee, E. K. Kim, S. J. Lee, N. H. Park, H. S. Kim, H. K. Kim, K. Char, Y. P. Jang, and J. W. Kim, Inhibition effect of *Gynura procumbens* extract on UV-B-induced matrix-metalloproteinase expression in human dermal fibroblasts, *J. Ethnopharmacol.*, **137**(1), 427 (2011).
28. T. B. L. Kirkwood, Understanding the odd science of aging, *Cell*, **120**(4), 437 (2005).