

# RAW 264.7 대식세포에서 *Gelidium amansii*의 항염증 효과

최원식\* · 김영선 · 이상현<sup>1</sup> · 채규윤<sup>2</sup> · 이영행<sup>2\*</sup>

순천향대학교 생명공학과, 1: 원광대학교 한의과대학 방제학교실, 2: 원광대학교 생명나노화학부

## Anti-inflammatory Effects of *Gelidium amansii* in RAW 264.7 Macrophages

Won Sik Choi\*, Young Sun Kim, Sang-Hyun Lee<sup>1</sup>, Kyu Yun Chai<sup>2</sup>, Young Haeng Lee<sup>2\*</sup>

Department of Biotechnology, Soonchunhyang University,

1: Department of Oriental Medical Prescription, College of Oriental Medicine, 2: Division of Nanobiochemistry, Wonkwang University

In order to verify the anti-inflammatory effects of *Gelidium amansii*, RAW264.7 macrophages were incubated with the extract of 70% ethanol solution (Ex), and activated with the endotoxin lipopolysaccharide (LPS). Ex inhibited the expression of the pro-inflammatory enzymes, including inducible nitric oxide (NO) synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2), and the production of iNOS-mediated NO and COX-2-mediated prostglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) production in a dose-dependent manner. Ex also reduced the release of the pro-inflammatory cytokines, including tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and IL-6 in LPS-activated macrophages. The observed anti-inflammatory effects of Ex was associated with inactivation of the nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) that mediates the induction of iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6. Further studies showed that Ex inactivated NF- $\kappa$ B through inhibition of phosphorylation of the inhibitory  $\kappa$ B (I $\kappa$ B). Taken together, these results suggest that *Gelidium amansii* exerts anti-inflammatory effects by inhibiting the expression of pro-inflammatory enzymes and the secretion of pro-inflammatory cytokines via inactivation of NF- $\kappa$ B and/or I $\kappa$ B.

**Key words :** *Gelidium amansii*, macrophage, pro-inflammatory enzyme, pro-inflammatory cytokine, anti-inflammatory effect

### 서 론

대부분의 염증성 질환에는 non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID)와 steroidal anti-inflammatory drug (SAID)와 같은 약물이 사용되는데, 이들 약물을 장기적으로 사용할 경우 여러 가지 부작용이 빈번하게 일어난다. 따라서 최근에는 부작용이 적은 새로운 소재의 항염증제의 필요성이 대두되고 있다<sup>1)</sup>. 특히 최근에는 항염증제의 새로운 소재로써 그것의 약리적 효과가 한 의학에 기초를 두고 있는 여러 종류의 천연물에 대하여 관심이 집중되고 있다. 해조류는 식품으로서 뿐만 아니라 공업적 및 의학적인 다양한 용도로 사용되어 오고 있다. 해조류로부터 추출된

몇 가지 물질은 풍부한 약리화적인 활성을 지니고 있는 것으로 알려져 있다<sup>2-5)</sup>. 홍조류인 *Gelidium amansii*는 유용한 항염증제 소재로 사용될 수 있다.

대식세포 (macrophage)는 자연면역(innate immunity)뿐만 아니라 획득면역(adaptive immunity)에 의해서 유도되는 다양한 면역반응 (immune reaction)을 매개하여, 병원성 물질로부터 숙주를 방어하고 면역계 (immune system)의 항상성 유지에 중요한 대표적인 면역세포이다<sup>6)</sup>. 대식세포에 의해서 유도되는 면역반응 중에서 가장 중요한 면역반응은 염증반응 (inflammatory response)이다. 염증반응에서 대식세포는 주변세포의 면역기능 (immune function)을 활성화시키는 염증성 매개물질을 분비하고 병원성 물질을 탐식(phagocytosis)하여 제거한다<sup>6)</sup>. 대식세포 매개 염증성 물질에는 특정 세포를 활성화시키는 세포활성물질 (cytokine)이 있으며, 또한 염증반응에서 발견되어 면역반응을 조절하고 병원성 물질에 대하여 독성을 나타내는 염증성 효소

\* 교신저자 : 이영행, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 생명나노화학부

최원식, 충남 아산시 신창면 읍내리 646, 순천향대학교

· E-mail : yhlee@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-850-6226

· 접수 : 2009/03/10 · 수정 : 2009/05/28 · 채택 : 2009/06/09

(inflammatory enzyme)가 있다<sup>7,8)</sup>. 한편, 대식세포 매개 염증성 세포활성물질에는 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6 등이 있으며, 대표적인 염증성 효소에는 nitric oxide (NO)의 생성에 관여하는 유도성 NO synthase (iNOS)와 prostglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 생성을 관여하는 cyclooxygenase-2 (COX-2)가 있다<sup>7,8)</sup>. 이들 염증성 매개물질은 효과적인 염증반응을 유도할 수 있도록 면역계에 의해서 정밀하게 조절된다<sup>9)</sup>. 어떤 원인에 의해서 면역계가 대식세포 매개 염증성 물질의 분비 조절에 실패하는 경우, 숙주의 특정 기능에 장애를 초래할 수 있는 염증성 질환 (inflammatory disease)이 발생할 수 있다<sup>10)</sup>. 따라서 염증성 질환 치료에 있어서 대식세포의 과다 염증반응 제어는 필수적이며, 항염증제 (anti-inflammatory drug)의 중요한 약물 타겟(drug target)으로 작용할 수 있다<sup>1,8)</sup>. 대식세포의 과다 면역반응을 조절하는 대부분의 항염증제는 염증성 매개물질의 발현을 조절하는 핵 인자 nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)의 활성을 억제시켜 약물의 효과를 나타낸다<sup>11)</sup>. NF- $\kappa$ B는 두 개의 단백질 p65와 p50이 이합체 (dimer)를 형성하고 이들이 핵으로 전이 (nuclear translocation)되는 것을 제어하는 inhibitory protein- $\kappa$ B (I $\kappa$ B)와 복합체를 형성하여, 세포질 내에 존재한다. 이 상태를 NF- $\kappa$ B 비활성 상태라 한다. 한편 NF- $\kappa$ B의 활성은 I $\kappa$ B가 인산화되어 (phosphorylation) 각각의 p65 및 p50이 이합체에서 분리되면서 시작된다. I $\kappa$ B에서 분리된 p65 및 p50은 핵으로 전이되어 염증성 매개물질의 유전자를 전사할 수 있는 DNA의 특정 부위에 결합함으로써 NF- $\kappa$ B가 활성화된다<sup>12)</sup>.

본 연구는 대식세포 RAW264.7 세포에서 해조류인 *Gelidium amansii*의 70% 에탄올 추출물의 항염증 효과를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

*Gelidium amansii*는 제주도 김녕(33° 32' N, 126° 45' E) 지역에서 2005년 6월에 채집한 것을 재료로 사용하였다. 재료는 플라스틱 용기에 넣어 실험실로 옮긴 후 염분 및 기타물질을 제거하기 위하여 물로 세척하고 공기 중에서 건조시켰다. 건조된 *Gelidium amansii* (50 g)을 EtOH-H<sub>2</sub>O(70:30) 용액에 실온에서 일주일간 담가두었다. 에탄올 용액을 여과하고 낮은 온도에서 감압 증류한 후 일정량을 취하여 dimethyl sulfoxide 녹여 시료로 사용하였다.

### 2. 시약, 측정 키트, 항체 및 배양배지

세포 배양용 배지, 내독소 (endotoxin lipopolysaccharide; LPS), Tris-HCl, 단일 clone 항체, (3-[4,5-diphenylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 및 curcumin는 Sigma 사로부터 구입하였다. 우태아 혈청 (fetal bovine serum) 및 항생제는 Gibco/BRL 사로부터 구입하여 사용하였다. Mouse 단일 clone anti-iNOS, anti-COX-2, anti-phospho-I $\kappa$ B 및 anti-actin 항체는 BD Biosciences Pharmingen으로부터 그리고 horseradish peroxidase가 결합된

anti-rabbit IgG 항체는 Sigma-Aldrich 사로부터 구입하여 사용하였다. PGE<sub>2</sub> enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 키트 및 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6 키트는 R&D Systems에서 구입하였다. ELISA-based Trans-AMTM NF- $\kappa$ B p65 키트는 Active Motif에서 구입하였다.

### 3. 세포배양

Mouse 대식세포주 (RAW 264.7 macrophage)는 ATCC 사에서 구입하여, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>/95% 공기의 배양기에서 배양하였다. 세포는 열에 의해서 비활성화된 10% FBS 및 항생제 (100 U/mL penicillin G, 100 U/mL streptomycin, 250 ng/mL amphotericin B)가 포함된 세포 배양액에서 배양하여 실험 목적에 따라 사용하였다.

### 4. MTT 분석에 의한 세포 생존율 분석

세포 생존율은 MTT (Sigma 사) 분석방법을 이용하여 ELISA 분석기로 흡광도를 570 nm에서 측정하였다. MTT는 옅은 노란색의 물질로서 살아 있는 세포에 의해서 균청색의 formazan으로 변화되며 이러한 반응은 활동성 mitochondria에 의해서 일어난다. 96-칸 플레이트에 칸 당 5 × 10<sup>4</sup>의 세포가 되도록 분주하고 12시간 뒤에 여러 농도 범위로 시료를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 배지를 제거하고 100  $\mu$ L의 MTT 용액을 처리한 뒤 37°C 배양기에서 4시간 동안 추가 배양하였다. 형성된 formazan을 0.1 M HCl isopropanol에 용해하여 570 nm에서 광학밀도를 측정하여 세포 생존율을 간접적으로 측정하였다.

### 5. NO 측정

배양 배지에서 nitrite(NO<sub>2</sub>)의 농도는 생성된 NO의 농도를 반영하며 Griess 반응으로 측정할 수 있다. 배양 상정액 100  $\mu$ L를 동량의 Griess 시약 (1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine 및 5% phosphoric acid)과 혼합하여 10분 동안 반응시킨 뒤 550 nm의 파장에서 흡광도를 얻어 NO의 생성량을 정량하였다.

### 6. PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 및 IL-6 측정

자극된 대식세포에서 분비된 PGE<sub>2</sub>, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6는 100 mL 배양배지를 취하여 해당 cytokine ELSA 키트로 정량하였다. 측정방법은 키트제작사에서 제공하는 측정순서에 맞추어 수행하였다.

### 7. NF- $\kappa$ B/p65의 DNA 결합 활성도 측정

NF- $\kappa$ B의 활성은 이것을 구성하는 p65가 핵으로 전이되어 특정 DNA에 결합하는 정도를 ELISA 키트로 측정하여 NF- $\kappa$ B의 활성도를 측정하였다. 측정방법은 키트제작사에서 제공하는 측정순서에 맞추어 수행하였다.

### 8. iNOS 및 COX-2 발현 및 I $\kappa$ B 인산화 분석

실험목적에 따라 시료가 처리된 세포를 수집하여

SDS-PAGE 분석방법을 통해 단백질 분석을 수행하였다. 간단히 하면, 수집된 세포에 용혈 완충용액 (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% deoxy cholate, 및 1 mM EDTA) 을 처리하고 반응시킨 다음 14,000 g, 4°C에서 20분 동안 원심분리하여 단백질 추출액을 얻고 이것을 8%의 SDS-PAGE gel 상에서 전기영동하여 단백질을 크기 별로 분리하고 nitrocellulose 막으로 전위 이동시켰다. 막을 TBS-T 완충용액으로 세척하고 목적하는 1차 및 2차 항체로 표지한 다음 단백질의 발현 여부 및 인산화 정도를 Western blot 분석방법으로 결정하였다.

9. 통계 분석

실험결과는 평균±표준편차로 표시하였고, 실험 데이터는 one-way ANOVA를 사용하여 분석하였으며 유의수준은 P<0.05로 하였다. 보다 정확한 검증을 위해 사후검증은 Tukey post hoc test를 사용하였다.

결 과

1. 세포독성 효과

RAW265.7 대식세포에서 *Gelidium amansii* 에탄올 추출물의 세포독성을 검증하였다. 대식세포에 추출물을 5, 10, 50 µg/mL 농도로 처리한 다음, 24 시간 배양하여 세포생존율을 MTT 분석 방법으로 관찰하였다. *Gelidium amansii* 추출물에 대해서 유의한 세포독성이 관찰되지 않았다(Fig. 1).

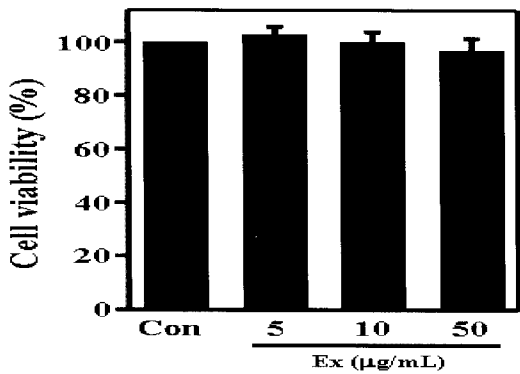


Fig. 1. Effects of *Gelidium amansii* ethanol extract (Ex) on cell viability in RAW265.7 macrophages. Cells were incubated for 24 h with indicated doses of Ex. Cell viability was determined by MTT analysis as described in materials and methods.

2. NO 및 PGE<sub>2</sub> 생성 억제 효과

*Gelidium amansii* 에탄올 추출물에 대하여 NO 및 PGE<sub>2</sub> 생성 억제 효과를 조사하였다. 추출물을 농도별로 RAW264.7 대식세포에 10분간 처리한 다음, LPS로 18시간 자극하여 NO 생성 양을 Gries 법으로 분석하고, PGE<sub>2</sub> 량은 ELISA 방법으로 측정하였다. 추출물을 처리하지 않은 경우, LPS 자극에 대하여 다량의 NO와 PGE<sub>2</sub> 생성이 관찰되었으나, *Gelidium amansii* 에탄올 추출물의 존재하에서 LPS에 의한 NO 및 PGE<sub>2</sub> 생성이 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 2). 동일한 조건에서 대조 시약 curcumin 역시 NO 및 PGE<sub>2</sub> 생성을 억제하였다.

3. iNOS 및 COX-2 발현 억제 효과

NO 및 PGE<sub>2</sub> 생성은 이들을 생성하는 효소의 발현과 밀접한 관계가 있다. 따라서 이들 효소의 발현 정도를 Western blot 방법으로 조사하였다. Fig. 3에 제시된 결과에 의하면, *Gelidium amansii* 에탄올 추출물과 curcumin은 농도 의존적으로 iNOS 및 COX-2 발현을 억제하였다.

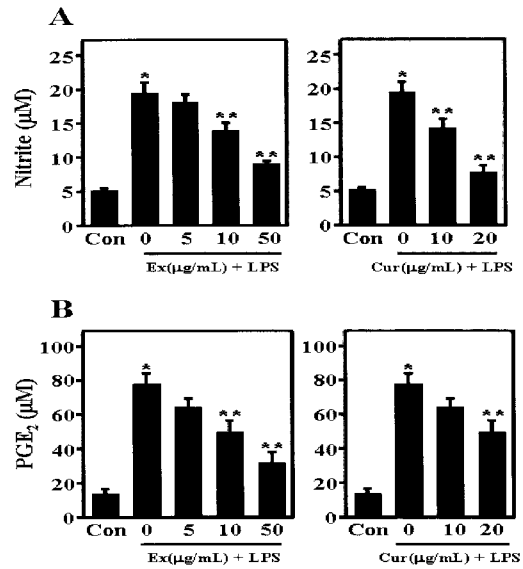


Fig. 2. Effects of *Gelidium amansii* ethanol extract (Ex) on NO and PGE<sub>2</sub> production in LPS-activated RAW265.7 macrophages. Cells were pre-incubated for 10 min with indicated doses of Ex or curcumin (Cur) and activated for 18 h by 1 µg/mL of LPS. Nitrite (A) and PGE<sub>2</sub> (B) levels were determined by Gries reagent and ELISA kit, respectively, as described in Materials and Methods. Data were calculated and analyzed by repeated one-way ANOVA, followed by the Tukey HSD post hoc test for further confirmation. \*P<0.05 as compared to control (CON) group. \*\*P<0.05 as compared to the groups treated with LPS alone.

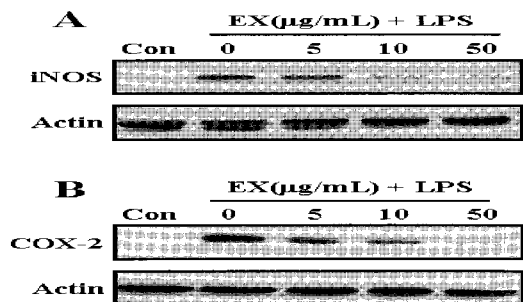
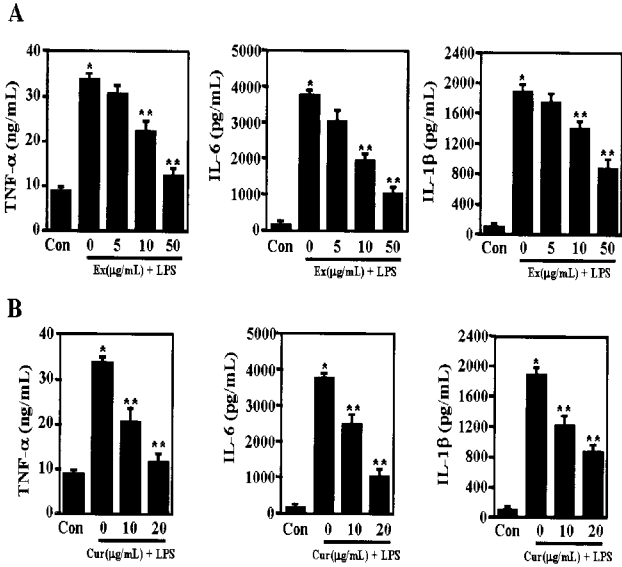


Fig. 3. Effects of *Gelidium amansii* ethanol extract (Ex) on iNOS and COX-2 expression in LPS-activated RAW265.7 macrophages. Cells were pre-incubated for 10 min with indicated doses of Ex or curcumin (Cur) and activated for 12 h by 1 µg/mL of LPS. Blots for iNOS (A) and COX-2 (B) were analyzed by Western blot assay as described in materials and methods. Experiments have been repeated four times with similar observations.

4. TNF-α, IL-1β 및 IL-6 생성 억제 효과

*Gelidium amansii* 에탄올 추출물에 대하여 TNF-α, IL-1β 및 IL-6 생성 억제 효과를 조사하였다. 추출물을 농도별로 RAW264.7 대식세포에 10분간 처리한 다음, LPS로 18시간 자극하여 TNF-α, IL-1β 및 IL-6 생성 양을 ELISA 방법으로 측정하였다. 추출물을 처리하지 않은 경우, LPS 자극에 대하여 다량의

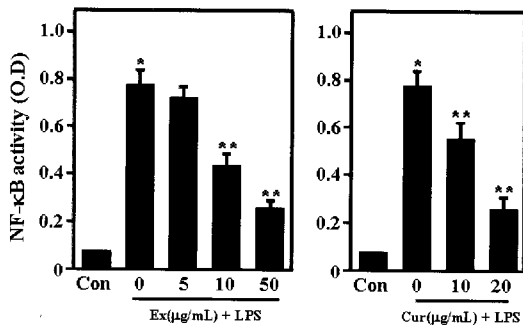
TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6 생성이 관찰되었으나, *Gelidium amansii* 에탄올 추출물 및 curcumin의 존재하에서 LPS에 의한 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6 생성은 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 4).



**Fig. 4.** Effects of *Gelidium amansii* ethanol extract (Ex) on TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 production in LPS-activated RAW265.7 macrophages. Cells were pre-incubated for 10 min with indicated doses of Ex or curcumin (Cur) and activated for 18 h by 1  $\mu$ g/mL of LPS. Levels of each cytokine were determined by ELISA as described in Materials and Methods. Data were calculated and analyzed by repeated one-way ANOVA, followed by the Tukey HSD post hoc test for further confirmation. \* $P$ <0.05 as compared to control (CON) group. \*\* $P$ <0.05 as compared to the groups treated with LPS alone.

**5. NF- $\kappa$ B 활성 억제 효과**

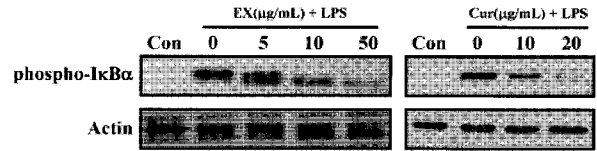
염증성 효소인 iNOS 및 COX-2의 발현과 염증성 세포활성물질인 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6 생성은 NF- $\kappa$ B의 활성 증가와 관련이 있다. 따라서 *Gelidium amansii* 에탄올 추출물이 LPS에 의한 NF- $\kappa$ B의 활성에 어떠한 영향을 주는지 조사하였다. 추출물 및 대조 시약은 NF- $\kappa$ B의 활성을 농도 의존적으로 억제하였다(Fig. 5).



**Fig. 5.** Effects of *Gelidium amansii* ethanol extract (Ex) on NF- $\kappa$ B activity in LPS-activated RAW265.7 macrophages. Cells were pre-incubated for 10 min with indicated doses of Ex or curcumin (Cur) and activated for 4 h by 1  $\mu$ g/mL of LPS. Nuclear extracts were isolated from the cells treated with medium, LPS, or Ex and LPS, and p65 translocation activity was measured by ELISA as described in materials and methods. Optical density (O.D) was measured at 450 nm. Data were calculated and analyzed by repeated one-way ANOVA, followed by the Tukey HSD post hoc test for further confirmation. \* $P$ <0.05 as compared to control (CON) group. \*\* $P$ <0.05 as compared to the groups treated with LPS alone.

**6. I $\kappa$ B 인산화 억제 효과**

NF- $\kappa$ B의 활성 증가는 I $\kappa$ B의 인산화에 의해서 활성도가 증가한다. 본 연구는 NF- $\kappa$ B의 활성 억제 효과가 I $\kappa$ B의 인산화 억제와 관련이 있는지를 조사하였다. *Gelidium amansii* 에탄올 추출물 및 curcumin은 I $\kappa$ B의 인산화를 유의하게 억제하였다(Fig. 6).



**Fig. 6.** Effects of *Gelidium amansii* ethanol extract (Ex) on I $\kappa$ B phosphorylation in LPS-activated RAW265.7 macrophages. Cells were pre-incubated for 10 min with indicated doses of Ex or curcumin (Cur) and activated for 2 h by 1  $\mu$ g/mL of LPS. Blot for I $\kappa$ B $\alpha$  was analyzed by Western blot assay as described in materials and methods. Experiments have been repeated four times with similar observations.

**고찰**

해조류는 육상의 식물과는 다르게 인간이 약용으로 사용해 본 경험이 적어서 특정 문헌으로부터 약효에 대한 예비지식을 얻기가 매우 어렵다. 따라서 현재 대부분의 해조류의 약리활성 연구는 어떤 효과를 예상하고 그 약효를 검색하기보다는 무작위적으로 평가하는 방법이 많이 사용하고 있다. 무작위적 약효 검색에는 항균, 항종양 및 항염증 효과 등이 있다<sup>1)</sup>. 본 연구는 항염증 효과가 있는 해조류를 1차적으로 검색하기 위하여 시도되었다.

염증반응에서 활성화된 대식세포는 염증성 효소인 iNOS 및 COX-2를 발현하고, iNOS를 매개체로 하는 NO와 COX-2를 매개체로 하는 PGE<sub>2</sub>를 다량 방출한다<sup>8)</sup>. 또한 활성화된 대식세포는 주변 세포의 면역반응을 보다 증가시키기 위하여 염증성 세포활성물질인 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6 등을 생성한다. 이와 같이 활성화된 대식세포에 의한 염증반응은 병원성 물질을 효과적으로 사멸시키는 유용한 면역반응이다<sup>7)</sup>. 활성화된 대식세포는 염증반응을 통해서 병원성 물질을 효율적으로 제거한 후에 염증해소 단계를 거치면서 반드시 비활성화 되어야한다. 만일 어떤 원인에 의해서 면역계가 활성화된 대식세포의 염증반응 조절에 실패하는 경우, 과량으로 생성된 대식세포 매개 염증성 물질들에 의해서 숙주의 특정 조직 및 장기가 손상될 수도 있으며, 이것의 좋지 않은 결과가 염증질환이다. 그러므로 염증질환의 치료의 일차 목표는 염증반응을 매개하는 대식세포 및 면역세포의 과다 활성을 신속하게 차단하는 것이다.

본 연구는 *Gelidium amansii* 에탄올 추출물이 내독소(endotoxin)인 LPS에 의해서 과다 활성화된 RAW264.7 대식세포 모델에서 염증성 효소의 발현 및 세포활성물질의 생성을 효과적으로 억제할 수 있는지 조사하여, 이 추출물의 항염증 효과를 평가하고자 하였다. 본 연구 결과 *Gelidium amansii* 에탄올 추출물은 LPS에 의한 iNOS 및 COX-2의 발현을 억제하였으며 또한 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6의 생성을 유의하게 억제할 수 있음을 알 수 있었다.

대부분의 천연물 또는 기존의 항염증제는 핵인자 NF- $\kappa$ B의 활성을 억제하여 항염증 효과를 나타낸다<sup>11,12</sup>. NF- $\kappa$ B는 DNA의 특정 부위에 결합하여 염증성 물질을 전사한다. 대식세포에서 NF- $\kappa$ B에 의해서 전사될 수 있는 염증성 물질에는 iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6 등이 있다<sup>11-16</sup>. 본 연구에 의하면, *Gelidium amansii* 에탄올 추출물은 NF- $\kappa$ B 활성을 억제시키는 I $\kappa$ B의 인산화를 저해시켜 NF- $\kappa$ B의 활성을 차단함으로써 iNOS 및 COX-2 발현을 억제시키고, 또한 동일한 메커니즘에 의해서 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6 생성을 억제시킬 수 있음을 알 수 있었다.

이상의 실험 결과는 *Gelidium amansii* 에탄올 추출물이 RAW264.7 세포에서 LPS로 유발한 염증모델에서 과다 염증반응을 억제하는 효과가 있다는 것을 보여 주었다. 이는 각종 염증질환 환자 치료에 *Gelidium amansii* 를 의학적 항염증제로 이용할 수 있다는 사실을 시사하는 것으로서 앞으로도 다양한 동물 모델이나 임상실험을 통해 *Gelidium amansii*의 소염 효능을 재검증하고 의학적 기능성소재로서 개발하기 위한 다각적인 시각의 연구가 지속되어야 할 것으로 사료된다.

## 감사의 글

이 논문은 2008년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행되었고 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Singh, S.B., Pelaez, F., Biodiversity, A. Chemical diversity and drug discovery. *Prog. Drug Res.* 65: 141, 143-174, 2008.
- Awad, N.E. Biologically active steroid from the green alga *Ulva lactuca*, *Phytother. Res.* 14: 641-643, 2000.
- Ganovski, K., Shipochliev, T., Bratova, K. Anti-inflammatory action of extracts from marine algae collected in the area of Burgas seacoast, *Vet. Med. Nauki.* 16: 54-61, 1979.
- Guzman, S., Gato, A., Calleja, J.M. Antiinflammatory, analgesic and free radical scavenging activities of the marine microalgae *Chlorella stigmatophora* and *Phaeodactylum tricornutum*, *Phytother. Res.* 15: 224-230, 2001.
- Li, X., Kwak, O.S., Jin, H. A survey of medicinal seaweed resources in Liaodong Peninsula, Chin. *Marine Pharm. Sci.* 51: 50-54, 1994.
- Allen, L.A., Aderem, A. Mechanisms of phagocytosis. *Curr. Opin. Immunol.* 8: 36-40, 1996.
- Murtaugh, M.P., Baarsch, M.J., Zhou, Y., Scamurra, R.W., Lin, G. Inflammatory cytokines in animal health and disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 54: 45-55, 1996.
- Murakami, A., Ohigashi, H. Targeting NOX, iNOS and COX-2 in inflammatory cells: chemoprevention using food phytochemicals. *Int. J. Cancer.* 121(11):2357-2363, 2007.
- van der Meide, P.H., Schellekens, H. Cytokines and the immune response. *Biotherapy.* 8: 243-249, 1996.
- Pae, H.O., Lee, Y.C., Chung, H.T. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide: emerging therapeutic targets in inflammation and allergy. *Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.* 2: 159-165, 2008.
- Namazi, M.R. Cetirizine and allopurinol as novel weapons against cellular autoimmune disorders. *Int. Immunopharmacol.* 4: 349-353, 2004.
- Pande, V., Ramos, M.J. NF- $\kappa$ B in human disease: current inhibitors and prospects for de novo structure based design of inhibitors. *Curr. Med. Chem.* 12: 357-374, 2005.
- Karpuzoglu, E., Ahmed, S.A. Estrogen regulation of nitric oxide and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in immune cells: implications for immunity, autoimmune diseases, and apoptosis. *Nitric Oxide.* 15: 177-186, 2006.
- Tinker, A.C., Wallace, A.V. Selective inhibitors of inducible nitric oxide synthase: potential agents for the treatment of inflammatory diseases? *Curr. Top. Med. Chem.* 6: 77-92, 2006.
- Guzik, T.J., Korbust, R., Adamek-Guzik, T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J. Physio. Pharmacol.* 54: 469-487, 2003.
- Kleinert, H., Schwarz, P.M., Forstermann, U. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biol. Chem.* 384: 1343-1364, 2003.