

## 노화억제작용에 미치는 다시마(*Laminaria japonica*)와 후코이단 성분의 영향

최진호<sup>†</sup> · 김대익 · 박수현 · 김동우 · 이종수 · 유종현\* · 정유섭\*

부경대학교 식품생명공학부 생화학연구실

\*한림제약(주) 중앙연구소

## Effects of Sea Tangle (*Laminaria japonica*) and Fucoidan Components on Anti-aging Action

Jin-Ho Choi<sup>†</sup>, Dae-Ik Kim, Soo-Hyun Park, Dong-Woo Kim, Jong-Soo Lee,  
Jong-Hyeon Ryu\* and You-Sup Chung\*

Lab. of Biochemistry, Faculty of Food Science & Biotechnology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

\*Central Research Institute, Hanlim Pharm. Co., Ltd, Yongin 449-080, Korea

### Abstract

This study was designed to investigate the effects of sea tangle (*Laminaria japonica*) extract and fucoidan components on anti-aging action. Sprague-Dawley(SD) male rats (210±5g) were fed experimental diets Dasi-Ex group: sea tangle extract powder of 4.0% added to control diet; Fuco- I, II and III groups: fucoidan powder of 1, 2 and 3% added to Dasi-Ex group for 45 days. Hydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$ ) formations were significantly inhibited (10-20% and 25-30%) in serum and brain mitochondria of Dasi-Ex and Fuco- I, II and III groups compared with control group. Significant differences in  $\cdot\text{OH}$  formations of brain mitochondria in Dasi-Ex and Fuco- I groups could not be obtained, but  $\cdot\text{OH}$  formations of brain microsomes resulted in a significant decrease (15-20%) in Fuco-II and III groups compared with control group. Basal oxygen radical (BOR) formations were significantly decreased about 10% and 13-15% in brain mitochondria of Dasi-Ex and Fuco- I group, and Fuco-II, III groups, and also decreased about 10% and 15-20% in brain microsomes of Dasi-Ex and Fuco- I groups, and Fuco-II, III groups. Lipid peroxide (LPO) levels resulted in a marked inhibit (15-25%) in serum of Dasi-Ex and Fuco- I, II, III groups. LPO levels of brain mitochondria and microsomes were significantly inhibited about 10% in Dasi-Ex and Fuco- I, II groups and 15% in Fuco-III groups. Oxidized proteins ( $>\text{C}=\text{O}$ ) were significantly inhibited about 10% in serum of Dasi-Ex and Fuco- I, II, III groups and brain mitochondria of Dasi-Ex group, while remarkably inhibited (30~35%) in brain mitochondria of Fuco- I, II and III groups. Nitric oxide (NO) levels were significantly inhibited (12~15%) in serum of Fuco- I, II and III groups, but there were no significant difference in serum NO levels of Dasi-Ex group. Superoxide dismutase (SOD) activities

<sup>†</sup> Corresponding author

were remarkably increased (30~60%) in serum of Fuco- I, II and III groups, but there were no significant differences in SOD activities in serum of Dasi-Ex group. Catalase (CAT) activities were significantly increased about 20% in serum of Dasi-Ex and Fuco- I, II, III groups. Mn-SOD activities in brain mitochondria were significantly increased about 17% in Dasi-Ex group, while remarkably increased 26~36% in Fuco- I, II, III groups. Cu,Zn-SOD activities in brain cytosol were dose-dependently of fucoidan increased 10%, 12% and 18%, respectively, compared with control group. These results suggest that anti-aging effects of fucoidan may play a pivotal role in attenuating a various age-related changes such as chronic degenerative disease and senile dementia.

**Key words** – Sea tangle (*Laminaria japonica*), Fucoidan, Anti-aging action, Cu,Zn-SOD, Mn-SOD, Catalase, Oxygen radical, Oxidized protein, Nitric oxide

## 서 론

지금까지 거의 20년동안 해양생물중에서 주로 미역 (*Undaria pinnatifida*)의 주성분인 알긴산(alginic acid)의 생리활성을 중심으로 성인병(chronic degenerative diseases)의 예방과 억제효과에 대한 수산식품의 연구에 대해서는 전보(최 등, 1999)[47]에서 언급한 바 있다. 본 연구는 수산식품의 노화(aging) 억제효과연구[7,8,13-15,18-23,38]와 생약성분의 노화억제효과[9-12,25-42]을 포함한 칼로리 제한 등 노화에 관한 연구[3-6,16,17,24,43-46]를 수행하여 전문 학회지에 게재하였다.

최근들어 미역, 다시마 등 갈조류 성분의 새로운 생리활성성분으로 각광을 받고 있는 후코이단(fuoidan)은 가능성이 매우 높은 성분으로 밝혀지고 있다. 지금까지 미역, 다시마 등의 갈조류에는 생리활성성분으로서 알긴산의 생리활성연구가 주종을 이루어 왔지만, 점성(viscosity)이 매우 커서 음료개발에는 여러 가지 문제점을 갖고 있다. 그렇지만, 후코이단 성분은 중성다당인 라미나란(laminaran)과는 달리 황산기(sulfate group)를 가진 산성의 수용성 다당류로서 가수분해하면 L-fucose가 다량 함유되어 있는 것이 밝혀지면서 처음에는 fucoidin으로 명명하였다가 지금의 다당(多糖) 명명법에 따라 fuoidan으로 불리게 되었다(최, 1999)[47].

후코이단은 혈액중에 존재하는 함황 산성다당인 헤파린(heparin)과 구조 및 생리적 특성이 유사하여 항혈액응고작용(Bernardi and Springer, 1962)[1]을 갖고 있다는 사실이 처음으로 밝혀지게 되었다. 그후 Usui 등(1980)[74]은 *Eisenia bicyclis*로부터 추출한 후코이단 획득의 항혈액응고활성이 54 I.U.로서 헤파린의 40%정도의 높은 활성을 갖

고 있다는 사실이 증명되었다. 특히 후코이단의 항혈액응고작용은 같은 혈전용해작용을 나타내는 다른 다당인 헤파린과 dermatin sulfate와 같은 트롬빈(thrombin)의 활성을 억제하여 혈액응고를 저지한다는 사실이 밝혀져 있다. 사람의 혈액내에 존재하는 트롬빈의 활성억제인자인 anti-thrombin III(AT III)과 heparin cofactor II(HC II)는 분자량이 각각 62,000 및 65,600인 당단백질로서 비슷한 아미노산 조성을 가지고 있다는 것이 특징이다.

또한 담자균의 다당류가 항종양 활성을 나타낸다는 것은 이미 잘 알려져 있다. 특히 *Coriolus versicolor*로부터 추출한 다당은 <Krestein> 이란 상품명으로서 항암제로 시판되고 있다. 해조 열수추출물의 항종양 활성은 Nakazawa 등(1974)[61]에 의하여 처음으로 밝혀졌고, Ito와 Sugiura (1974)[53]가 Ehrlich 암종양세포에 항종양 활성을 나타내는 *Sargassum thunbergii*의 열수 추출액의 활성획분이 다당으로 밝혀짐으로서 해조다당의 항종양 활성에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 여러 가지 연구결과, 후코이단의 항종양 활성의 메카니즘은 종양세포의 표면전하를 음전하를 띄게하여 전이를 억제하거나 숙주의 면역방어기능을 활성화시킴으로서 항암(抗癌) 활성을 나타낸다는 사실을 구명하였다(Yamamoto, 1987)[70].

본 연구는 전보(최 등, 1999)[47]의 관련연구로서 실험용 기본사료(Control group)에 다시마(*Laminaria japonica*)추출물 건조분말 4.0%-첨가사료(Dasi-Ex group)와 다시마추출물 건조분말 4.0%-첨가사료(Dasi-Ex group)에 후코이단 건조분말을 각각 1.0%, 2.0%, 3.0%씩 첨가·조제한 사료(Fuco- I, II, III groups)를 사용하여 45일간 사육하여 심장에서 채혈하고, 다시 회복하여 뇌를 절취하여 다시마 추출물 및 후코이단 성분의 활성산소(oxygen radicals)의 생

성억제와 지질 및 단백질의 산화적 스트레스, 그리고 제거 효소(scavenger enzymes) 활성 등을 분석하여 생체의 노화 억제효과에 미치는 영향을 평가하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험동물 및 사육조건

한국화학연구소에서 구입한 Sprague Dawley rats(male, 210±10g)를 구입하여 본 대학 동물사육실에서 2주간 예비사육한 다음 각각 7마리씩 5군으로 나누어 각각의 조제 사료로서 45일동안 투여한 다음, 채혈하고 다시 뇌를 절취하여 해당 완충용액에 넣은 다음, -70℃의 동결고에 넣어 두고 실험에 사용하였다. 그리고 동물사육실은 항온항습(22±2℃, 65±2% RH)하에서 12시간 사이클(06:00~18:00)로 명암이 자동 조절된다.

### 조제사료의 조성

본 실험에 사용한 사료조성은 전보(최 등, 1999)[47]와 마찬가지로 기본사료의 조성은 탄수화물 59.0%( $\alpha$ -corn starch: 44.0% + sucrose 15.0%), 단백질 18.0%(sodium-free casein), 지질 15.0%(lard 10.0% + corn oil 5.0%)가 되도록 제조하였고, 비타민과 무기질(AIN-76 mixture)은 각각 1.0%, 3.5%를 첨가하였으며, 섬유질은 3.0% 첨가하여 조제하였다(Control group). 다시마 추출물-첨가사료(Dasi-Ex group: dry base 4.0%), 후코이단-첨가사료(Fuco- I, II, III group)는 Dasi-Ex group에 후코이단 건조분말을 각각 1.0%, 2.0%, 3.0%가 되도록 첨가하여 45일간 사육실험을 행하였다. 특히 Fuco- I, II, III group은 공통적으로 arginine 0.1%, taurine 0.2%, tyrosine과 tryptophan을 각각 0.05%씩 첨가하고, 여기에 다시 죽순(bamboo shoot), 대두배아(soybean germ) 및 표고(*P'yogo: Lentinus edodes* SINC)의 에탄올-추출 건조분말 0.05%씩 합계 0.55%씩을 첨가하여 조제하였다.

### 후코이단(Fucoidan)의 분리·정제

본 실험에 사용한 다시마-추출 건조분말은 한림제약(주)로부터 할애받아 사용하였고, 후코이단은 전보(최 등, 1999)[47]와 같은 방법으로 미역 포자엽(*Sporophylls of Undaria pinnatifida*)에서 추출·농축한 조후코이단(crude

fucoidan)을 다시 정제한 다음, 동결건조하여 얻은 정제된 후코이단을 사용하였다. 또한 활성산소(oxygen radical) 분석용 시약과 Kit시약 및 superoxide dismutase (SOD) 등 제거효소의 측정에는 Sigma제 특급시약을 사용하였고, 그 밖의 추출시약은 1급시약을 사용하여 분석하였다.

### 세포획분의 분획

뇌세포의 분획은 저자 등(1994)[16]의 방법에 따라 균질 완충용액(1.15% KCl/10mM phosphate buffer/5mM EDTA, pH 7.4)을 사용하여 미토콘드리아 및 마이크로솜획분을 분획하여 사용하였다. 이들 획분의 단백질의 함량은 Lowry 등(1951)의 방법[56]에 따라 정량하였다.

### 기초 및 유도산소라디칼의 정량

뇌세포 획분중에 있어 산화적 스트레스(oxidative stress)의 유무를 확인하기 위해서 DCF-DA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate)을 probe로 이용한 뇌세포의 mitochondria와 microsome획분의 기초활성산소(basal oxygen radical : BOR)의 생성량의 측정에는 Lebel 등(1989)의 방법[54]에 따라 측정하였다. BOR의 측정은 기저상태와 라디칼 생성을 유도하기 위해 ascorbic acid와 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O로 자극한 유도상태의 두 가지 조건에서 비교 측정하였다. 기저상태와 라디칼 유도의 경우 모두 시료 500  $\mu$ l를 완충용액(40 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)으로 10배 희석하고, probe인 5uM DCF-DA(Molecular probe, USA) 12  $\mu$ l를 첨가, 10,000rpm 8분간 원심분리한다. 잔사를 40 mM Tris-HCl 3.0 ml에 녹인 후 라디칼 유도 상태의 경우에는 1mM ascorbic acid(300ul)와 100  $\mu$ M FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O(150  $\mu$ l)를 혼합하였고 기저상태의 경우는 아무것도 첨가하지 않았다.

이후 37℃에서 30분간 반응시킨 후 37℃ 유지하면서 형광 강도의 변화를 형광광도계를 이용하여 488 nm(excitation)와 525 nm(emission)에서 측정하였다. 이 때 분광형광광도의 변화를 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCF-DA)을 표준품으로 해서 표준검량선에 의하여 생성된 DCF의 양(nmole/mg protein/min)으로 환산하고, 이 양으로써 기초산소라디칼(basal oxygen radical : BOR) 및 유도산소라디칼(induced oxygen radical : IOR)의 산소 라디칼의 생성량으로 정량하였다.

**활성산소종(ROS) 생성량의 측정**

히드록시 라디칼( $\cdot\text{OH}$ )의 함량 측정

Deoxyribose의 파괴 정도로 hydroxyl radical 생성 정도를 측정하는 방법으로서 반응성 산소대사물에 의해 deoxyribose가 파괴되어 aldehyde가 생성되며 이 aldehyde는 산성용액에서 thiobabutaric acid와 반응하여 발색되는 것을 이용한 Halliwell 등(1981)의 방법[49]에 따라 측정하였다.

과산화수소( $\text{H}_2\text{O}_2$ )의 함량 측정

과산화수소(hydrogen peroxide)의 생성량은 Thurman 등(1972)의 방법[69]에 따라 뇌세포의 microsome획분에서 생성된 hydrogen peroxide에 의하여 생성되는 붉은 색의 ferrithiocyanate 복합체를 기초로 400 mM 인산완충용액(pH 7.4) 400  $\mu\text{l}$ , 200 mM nicotinamide 200  $\mu\text{l}$ , 100 mM  $\text{MgCl}_2$  200  $\mu\text{l}$ , 50 mM  $\text{NaN}_3$  200  $\mu\text{l}$ 와 시료 64.1  $\mu\text{l}$ , 물 735.9  $\mu\text{l}$  첨가 · 혼합한 뒤 60 mM NADPH 200  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 총 2.0 ml가 되게 하여 37°C 항온 수조에서 15분간 가온시킨 후에 1.2 M TCA (trichloroacetic acid)를 1.0 ml 첨가, 3,000rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 1.0 ml 취하였다.

상층액에 ferrous ammonium 200  $\mu\text{l}$  첨가 후 2.5 M KSCN (potassium thiocyanate)을 100  $\mu\text{l}$  넣어 혼합하여 실온에 10분 방치하였다. 분광광도계를 이용하여 파장 480 nm에서 흡광도를 측정하여 표준검량선에 의해 과산화수소 (nmol/mg protein/min)의 함량을 정량하였다.

**활성산소종 제거효소의 활성 측정**

수퍼옥시드 디스무타아제(SOD)의 활성 측정

Oyanagui 등(1984)의 방법[62]에 따라 수퍼옥시드 디스무타아제(superoxide dismutase : SOD)의 활성은 혈청 및 뇌세포획분을 인산완충용액(pH 8.2)으로 30배로 희석한 용액 0.1 ml에 증류수 0.5ml, A시약 (52.125 mg of hydroxylamine + 102.1 mg of hypoxanthine/250 ml D.W) 0.2 ml, B시약 (20  $\mu\text{l}$  of xanthine oxidase + 0.9939 mg ethylene diaminetetraacetic acid/26.7 ml phosphate buffer, pH 8.2) 0.2 ml를 첨가 · 혼합하여 37°C 항온수조에서 40분간 가온한 후 C시약 (300 mg of sulfanilic acid + N-1-naphthylethyene diamine acid/500 ml of 16.7% acetic acid) 2.0 ml를 첨가 · 혼합하여 실온에서 20분간 방치한 후 분광광도

계를 사용, 550nm에서 흡광도를 측정하여 표준검량선에 의해 SOD 활성 (unit/mg protein)을 측정하였다.

카탈라아제(CAT)의 활성 측정

Rigo 등(1977)의 방법[64]에 의해 뇌세포분획에서 카탈라아제(catalase : CAT)활성의 측정은 시험관에 인산완충용액 (130mM, pH 7.0) 250  $\mu\text{l}$ , 증류수 330  $\mu\text{l}$ , 희분 20  $\mu\text{l}$  15 mM의 과산화수소용액 900  $\mu\text{l}$ 을 첨가, 5초간 잘 섞은 다음, 즉시 분광광도계를 사용하여 240 nm에서 시간에 대한 흡광도의 변화를 2분간 측정하여 1unit는 1분간 과산화수소 1  $\mu\text{mol}$ 의 분해로 계산하였다.

**산화 스트레스(Oxidative Stress)의 분석**

지질과산화물의 정량

혈청 및 뇌세포 획분중의 과산화지질의 함량은 Choi 등(1990)[16]이 사용한 방법에 따라 분광광도계를 사용하여 TBA법으로 말론디알데히드(malondialdehyde : MDA)의 함량을 측정하여 과산화지질(lipid peroxide : LPO)의 함량을 측정하였다. 또다른 방법으로 혈청중의 과산화지질의 함량은 Yagi 등(1987)의 방법[69]에 따라 형광도계로써 반응액의형광강도를 515 nm (excitation)와 553 nm (emission)의 파장에서 측정하여 과산화지질 함량(nmole/ml serum)을 정량하였다.

Carbonyl Group의 정량

뇌세포의 획분인 mitochondria와 microsome의 산화된 단백질의 함량은 Levine 등(1990)의 방법[55]에 따라 carbonyl group의 생성량을 측정하였다. 0.1 ml의 시료에 30% TCA (trichloroacetic acid)를 0.5 ml 혼합, 3000rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 제거한 뒤 잔사에 10 mM DNPH(dinitrophenyl hydrazine) 0.5 ml 첨가, 15분마다 혼합하며 1시간 동안 실온에 방치 후 3,000rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후 잔사에 ethanol/ethyl acetate (v/v 1:1) 3.0 ml를 첨가하여 실온에서 10분 방치한다. 다시 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 잔사를 얻은 뒤, 6 M guanidine(20mM potassium phosphate buffer pH 2.3) 1.0 ml 첨가 · 혼합하여 37°C의 항온 수조에서 15분간 가온한 후, 3500rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 이때 carbonyl기의 양은 360 nm와 370 nm사이에 있는 흡광봉의 파장에서 분자흡광계수( $E=22,000$ )를 이용

하여 계산하였다.

질소산화물(NO)의 정량

NO는 순간적으로 존재하는 기체성분으로서, 자발적으로 산화되어 NO<sub>2</sub>와 NO<sub>3</sub> 상태로 전환되어 축적된다. 따라서 생성되는 양은 NO<sub>3</sub>는 환원시켜 NO<sub>2</sub>로 전환시켜 총 NO의 함량을 Miesel 등(1996)의 방법[58]을 이용하여 정량하였다. 혈청 100 μl를 준비한 시험관에 6.5M HCl 25 μl, 37.5 mM sulfanilic acid 25 μl을 각각 첨가하였다. 10분간 방치한 후 12.5 mM N-(1-naphthyl)-ethylenediamine 25 μl을 첨가한 후 실온에서 30분간 방치한 후에 10,000×g에서 5분간 원심분리하였다. 단백질성분이 제거된 상층액을 540nm에서 흡광도를 측정하여 sodium nitrate에 의한 표준검량선으로 정량하였다. 뇌 조직중의 NO함량은 Yu 등(1994)의 방법[72]에 의하여 뇌 조직을 0.1 potassium phosphate buffer(pH 7.5) 1ml로 균질화한 후에 600×g에서 5분간 원심분리한 후 얻어진 상층액 200 μl에 90mUnit nitrate reductase 100 μl, 0.28 mM NADPH 100 μl, 3.5 μM FAD 100 μl, 0.1 potassium phosphate buffer(pH 7.5) 200 μl를 각각 첨가하여 25℃에서 1시간동안 incubation한다. 그 다음 3분간 끓인후 Griss시약(2% sulfanilic acid/5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>: 0.2% N-(1-naphthyl)-ethylene-diamine/water)을 1:1의 비율로 제조하여 700 μl을 첨가한다. 다시 60℃에서 10분간 가온 후 546 nm에서 흡광도를 측정하여 sodium nitrate에 의한 표준검량선으로 정량하였다.

리포푸신 함량의 측정

노화색소로서 리포푸신(lipofuscin)의 측정은 Fletcher 등(1973)의 방법[48]에 따라 조직의 표면에 과도한 수분과 오물을 제거한 후 뇌 조직 0.2 g에 chloroform-methanol (2:1, v/v) 혼합용액 4.0 ml에 첨가 후 1분간 균질화시킨후 원심분리하여 chloroform층 2.0 ml를 분취하여 형광광도계를 사용, 345 nm(excitation)와 435 nm(emission)에서 표준용액(quinine sulfate ug/ml of 0.1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)을 대조군으로 형광도를 측정하여 리포푸신의 함량(ug/mg protein)을 정량하였다.

분석결과의 통계처리

본 연구의 모든 실험결과는 통계 처리하여 평균치와 표

준편차를 계산하였으며, 각 실험군간의 유의성 검정은 Student's t-test(Steel 등, 1960)[67]로 실시하였다.

결과 및 고찰

활성산소의 생성 억제효과

Free radical로 알려진 활성산소(oxygen radicals)로서 히드록시 라디칼(·OH), 슈퍼옥시드 라디칼(O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hydrogen peroxide 등은 조직세포를 공격하여 세포막을 파괴하고 효소를 불활성화하여 질병을 유발하고 노화를 촉진하는 것으로 밝혀져 있다[5,17,24]. 다시마 추출물(Dasi-Ex) 및 후코이단(Fuco- I, II, III) 투여가 혈액중의 히드록시 라디칼 (·OH)의 생성에 미치는 영향을 비교하여 보면 Table 1 과 같다. 혈액중의 ·OH의 생성은 Dasi-Ex그룹을 포함하여 Fuco- I, Fuco-II 및 Fuco-III그룹이 2.86±0.28~3.21±0.13 nmol/mg protein/min으로서 대조그룹의 ·OH의 생성량(3.57±0.20 nmol/mg protein/min: 100%) 대비 10~20%의 유의적인 ·OH의 생성 억제효과가 인정되었다.

뇌세포의 mitochondria 및 microsome획분중의 hydroxyl radical(·OH) 및 microsome획분중의 hydrogen peroxide의 생성에 미치는 다시마 추출물(Dasi-Ex) 및 후코이단 투여의 영향을 비교하여 보면 Table 2와 같다. 뇌세포의 mitochondria획분중의 ·OH의 생성량을 비교하여 보면 Dasi-Ex그룹이나 여기에 후코이단을 1, 2, 3%-첨가-조제한 Fuco- I, Fuco-II, Fuco-III그룹의 뇌세포의 mitochondria 획분중의 ·OH의 생성량이 거의 25~30%의 현저한 억제

Table 1. Effects of sea tangle and fucoidan on hydroxyl radical (·OH) formations in serum of SD rats for 45 days

Group	Hydroxyl radical (·OH) formation (nmol/mg protein/min)	
Control	3.57±0.20 <sup>*</sup>	-
Dasi-Ex	3.14±0.23 <sup>a</sup>	(88.0%) <sup>**</sup>
Fuco- I	3.21±0.13 <sup>a</sup>	(89.9%)
Fuco- II	2.86±0.28 <sup>b</sup>	(80.1%)
Fuco- III	3.11±0.25 <sup>a</sup>	(87.1%)

Dasi-Ex : Sea tangle extract powder of 4.0% added to control diet; Fuco- I, II and III: Fucoidan powder of 1, 2 and 3% added to Dasi-Ex diet; <sup>\*</sup>Mean±SD with 7 mice per group; <sup>\*\*</sup>Percent of control values; <sup>a</sup>p<0.05; <sup>b</sup>p<0.01 compared with control group.

Table 2. Effects of sea tangle and fucoidan on hydroxyl radical and hydrogen peroxide in brain membranes of SD rats for 45 days

Groups	·OH level (nmol/mg protein/min)				H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> level(nmol/mg protein)	
	Mitochondria		Microsome		Microsome	
Control	3.10 ± 0.08 <sup>a</sup>	-	3.50 ± 0.16 <sup>a</sup>	-	5.24 ± 0.15	-
Dasi-Ex	2.27 ± 0.06 <sup>b</sup>	(73.2%) <sup>**</sup>	3.25 ± 0.10	(92.9%) <sup>**</sup>	4.79 ± 0.16 <sup>a</sup>	(91.4%)
Fuco- I	2.32 ± 0.02 <sup>b</sup>	(74.8%)	3.33 ± 0.12	(95.1%)	5.01 ± 0.13	(95.6%)
Fuco- II	2.28 ± 0.03 <sup>b</sup>	(73.6%)	2.63 ± 0.09 <sup>b</sup>	(75.1%)	4.96 ± 0.18	(94.7%)
Fuco- III	2.25 ± 0.05 <sup>b</sup>	(72.6%)	2.73 ± 0.11 <sup>b</sup>	(78.0%)	4.88 ± 0.13	(93.1%)

Dasi-Ex : Sea tangle extract powder of 4.0% added to control diet; Fuco- I, II and III: Fucoidan powder of 1, 2 and 3% added to Dasi-Ex diet; <sup>a</sup>Mean ± SD with 7 rats per group; <sup>\*\*</sup>Percent of control values; <sup>a</sup>p<0.05; <sup>b</sup>p<0.001 compared with control group.

효과가 인정되었다.

또한 뇌세포의 microsome획분중의 ·OH의 생성량을 비교하여 보면 Dasi-Ex그룹이나 Fuco- I 그룹은 대조그룹 대비 유의적인 ·OH의 생성량 억제효과를 인정할 수 없었지만, Fuco- II 및 Fuco- III 그룹은 대조그룹 대비 20~25%의 현저한 ·OH의 생성 억제효과가 인정되었다. 그렇지만, microsome획분의 hydrogen peroxide의 생성에 미치는 다시마 및 후코이단의 영향은 인정할 수 없었다.

기초 및 유도산소 라디칼의 평가

지금까지의 노화의 메카니즘에 관련학설은 Harman (1956)의 'Free Radical Theory'이 일반화되면서 지질과산화 중심의 연구가 진행되어 왔지만[17], 최근들어 산화적 스트레스설(oxidative stress theory)이 성인병을 유발하고 노화를 촉진한다는 사실이 널리 통용되기 시작하고 있다 (Yu 등, 1998)[73-74]. 혈청 및 뇌조직 세포의 산화적 스트레스(oxidative stress)로서 기초 및 유도산소 라디칼의 생성 억제효과를 평가하기 위하여 DCF-DA(2',7'-dichlorofluorescein diacetate)를 probe로 이용하여 혈청 및 뇌세포의 mitochondria 및 microsome획분의 활성산소 생성능(oxygen radical formation)에 미치는 다시마 추출물(Dasi-Ex) 및 후코이단(Fuco- I, II, III)의 투여효과를 분석하여 평가하였다. 다시마 추출물(Dasi-Ex) 및 후코이단(Fuco- I, II, III) 투여가 뇌세포중의 산소 라디칼(oxygen radicals)의 생성에 미치는 영향을 기초산소라디칼(basal oxygen radical: BOR) 및 유도산소라디칼(induced oxygen radical: IOR)로 구분하여 비교·평가하여 보면 Table 3과 같다. BOR의 생성억제효과를 비교하여 보면 mitochondria획분에서는 다시

마 추출물인 Dasi-Ex 및 Fuco- I group은 약 10%정도의 BOR의 생성억제효과가 인정되었지만(p<0.05), Fuco- II 및 III group은 13~15%의 범위내에서 유의적으로 BOR의 생성억제효과가 인정되었다(p<0.01). 거의 같은 경향으로 뇌세포의 microsome획분도 Dasi-Ex 및 Fuco- I group은 약 10%정도의 BOR의 생성억제효과가 인정되었지만(p<0.05), Fuco- II 및 III group은 거의 15~20%의 범위내에서 유의

Table 3. Effects of sea tangle and fucoidan on oxygen radical formations in brain membranes of SD rats for 45 days

Groups	Oxygen radical formation (nmol/mg protein/min)			
	Mitochondria		Microsome	
<b>Basal oxygen radical(BOR)</b>				
Control	4.02 ± 0.04 <sup>a</sup>	-	2.31 ± 0.02 <sup>a</sup>	-
Dasi-Ex	3.65 ± 0.02 <sup>a</sup>	(90.8%) <sup>**</sup>	2.05 ± 0.03 <sup>a</sup>	(88.7%) <sup>**</sup>
Fuco- I	3.60 ± 0.01 <sup>a</sup>	(89.6%)	2.01 ± 0.05 <sup>a</sup>	(87.0%)
Fuco- II	3.56 ± 0.04 <sup>b</sup>	(88.6%)	1.88 ± 0.05 <sup>c</sup>	(81.4%)
Fuco- III	3.55 ± 0.07 <sup>b</sup>	(83.3%)	1.70 ± 0.04 <sup>c</sup>	(73.4%)
<b>Induced oxygen radical(IOR)</b>				
Control	32.36 ± 1.57 <sup>a</sup>	-	14.50 ± 1.01 <sup>a</sup>	-
Dasi-Ex	28.83 ± 1.81 <sup>a</sup>	(89.1%) <sup>**</sup>	12.77 ± 1.12 <sup>a</sup>	(88.1%) <sup>**</sup>
Fuco- I	28.46 ± 1.05 <sup>a</sup>	(88.0%)	13.22 ± 1.26	(91.2%)
Fuco- II	28.20 ± 2.13 <sup>a</sup>	(87.1%)	12.57 ± 0.99 <sup>a</sup>	(86.7%)
Fuco- III	28.05 ± 1.21 <sup>b</sup>	(86.7%)	11.87 ± 1.02 <sup>b</sup>	(81.9%)

Dasi-Ex: Sea tangle extract powder of 4.0% added to control diet; Fuco- I, II and III: Fucoidan powder of 1, 2 and 3% added to Dasi-Ex diet; <sup>a</sup>Mean ± SD with 7 rats per group; <sup>\*\*</sup>Percent of control values; <sup>a</sup>p<0.05; <sup>b</sup>p<0.01; <sup>c</sup>p<0.001 compared with control group.

적으로 BOR의 생성억제효과가 인정되었다( $p < 0.001$ ).

한편 IOR의 생성억제효과를 비교하여 보면 mitochondria획분에서는 다시마 추출물인 Dasi-Ex 및 Fuco-II group까지 약 10~12%정도의 IOR의 생성억제효과가 인정되었지만( $p < 0.05$ ), Fuco-III group만 13%의 범위내에서 유의적으로 IOR의 생성억제효과가 인정되었다( $p < 0.01$ ). microsome획분도 Dasi-Ex 및 Fuco-I group까지는 약 10%의 IOR의 생성억제효과가 인정되었지만( $p < 0.05$ ), Fuco-II 및 III group은 15~20%의 범위내에서 현저한 IOR의 생성억제효과가 인정되었다( $p < 0.01$ ).

또한 혈액에서 뇌조직세포의 산화적 스트레스(oxidative stress)의 유무를 확인하기 위하여 DCF-DA(2',7'-dichlorofluorescein diacetate)를 probe로 이용한 활성산소 생성능에 미치는 다시마 추출물(Dasi-Ex group) 및 후코이단(Fuco-I, II, III group)의 투여효과를 비교하여 보면 Table 4와 같다.

Table 4에서 보는 바와 같이 BOR나 IOR의 생성억제효과가 거의 같은 경향으로서 Dasi-Ex 및 Fuco-I, II 그룹은 거의 10%의 산소 라디칼 생성억제효과가 인정되었지만, Fuco-III 그룹만 20~25%의 현저한 BOR 및 ICR의 생성억제효과가 인정되었다. 따라서 후코이단 성분이 산소 라디칼의 생성을 효과적으로 억제함으로써 생체노화를 매우 효과적으로 억제할 수 있을 것으로 기대된다.

Table 4. Effects of sea tangle and fucoidan on oxygen radical formations in serum of SD rats for 45 days

Groups	Oxygen radical (nmol/mg protein/min)			
	Basal oxygen radical (BOR)		Induced oxygen radical (IOR)	
Control	7.86 ± 0.38 <sup>*</sup>	-	63.48 ± 1.53 <sup>*</sup>	-
Dasi-Ex	7.25 ± 0.19 <sup>a</sup>	(92.2%) <sup>**</sup>	57.68 ± 1.90 <sup>b</sup>	(90.9%) <sup>**</sup>
Fuco-I	7.24 ± 0.28 <sup>a</sup>	(92.1%)	58.26 ± 1.89 <sup>a</sup>	(91.8%)
Fuco-II	7.26 ± 0.20 <sup>a</sup>	(92.4%)	58.55 ± 1.90 <sup>a</sup>	(92.3%)
Fuco-III	6.25 ± 0.57 <sup>b</sup>	(79.5%)	48.57 ± 3.88 <sup>c</sup>	(76.5%)

Dasi-Ex: Sea tangle extract powder of 4.0% added to control diet; Fuco-I, II and III: Fucoidan powder of 1, 2 and 3% added to Dasi-Ex diet; \*Mean ± SD with 7 rats per group; \*\*Percent of control values; <sup>a</sup> $p < 0.05$ ; <sup>b</sup> $p < 0.01$ ; <sup>c</sup> $p < 0.001$  compared with control group.

### 산화적 스트레스의 평가

#### 과산화지질(LPO) 생성 억제효과

활성산소의 공격에 따라 세포막의 지질성분이 과산화 반응에 의하여 생성되는 말론디알데히드(malondialdehyde : MDA)를 측정하여 과산화지질(lipid peroxide : LPO)의 함량을 계산하여 비교하였다. 이 LPO는 강력한 세포독성으로 작용하기 때문에 성인병의 발병지표 및 노화의 지표로서 널리 사용되고 있다. 혈청 및 뇌세포획분중의 LPO 생성에 미치는 다시마 추출물(Dasi-Ex) 및 후코이단(Fuco-I, II, III)의 영향을 분석하여 비교·평가하여 보면 Table 5와 같다. 우선 혈중의 LPO 생성에 미치는 영향을 Table 5에서 비교하여 보면 다시마 추출물(Dasi-Ex)이나 후코이단-첨가그룹(Fuco-I, II, III)이 다같이 대조그룹 대비 대략 15~25%까지 매우 효과적으로 LPO의 생성을 억제한다는 사실을 확인할 수 있었다.

한편 Table 5에서 뇌세포 획분중의 지질성분에 공격하여 생성되는 LPO의 생성량에 미치는 다시마 추출물(Dasi-Ex) 및 후코이단(Fuco-I, II, III)의 영향을 평가하기 위하여 뇌세포의 mitochondria 및 microsome획분중의 LPO의 함량을 분석·비교하여 보면, mitochondria획분의 다시마 추출물(Dasi-Ex) 및 후코이단-첨가그룹중의 Fuco-I 과 II에서는 대조그룹 대비 거의 10%정도의 LPO의 생성 억제효과가 인정되었지만, Fuco-III에서는 15%나 유의적인 LPO의 생성 억제효과가 인정되었다. 또한 microsome획분에서도 mitochondria획분과 거의 유사한 경향으로 LPO의 생성 억제효과가 인정되었지만, 이것도 mitochondria획분과 마찬가지로 Fuco-III 그룹이 대조그룹 대비 15% 정도의 가장 유의적인 LPO의 생성 억제효과가 인정되었다. 산화적 스트레스중에서 세포막 지질의 산화에 미치는 혈청 및 뇌세포획분에 미치는 다시마 추출물(Dasi-Ex) 및 후코이단(Fuco-I, II, III)의 첨가에 미치는 영향을 평가하여 본 결과, 다시마 추출물만으로는 뚜렷한 산화적 스트레스 억제효과를 기대할 수 없었지만, 여기에 후코이단의 첨가량을 높일수록 지질의 산화적 스트레스를 매우 효과적으로 억제함으로써 노화를 매우 효과적으로 억제할 수 있을 것으로 기대된다.

#### 산화단백질의 생성 억제효과

활성산소(oxygen radicals)의 공격에 따라 혈청이나 세

Table 5. Effects of sea tangle and fucoidan on lipid peroxide (LPO) levels in serum and brain membranes of SD rats for 45 days

Groups	Lipid peroxide (LPO) levels (nmol/mg protein)					
	Serum (nmol/ml)		Mitochondria		Microsome	
Control	5.40 ± 0.64 <sup>a</sup>	-	2.45 ± 0.07	-	2.97 ± 0.15	-
Dasi-Ex	4.70 ± 0.21 <sup>a</sup>	(87.0%) <sup>**</sup>	2.17 ± 0.06 <sup>b</sup>	(88.6%)	2.58 ± 0.22 <sup>a</sup>	(86.9%)
Fuco- I	4.30 ± 0.15 <sup>b</sup>	(79.6%)	2.20 ± 0.04 <sup>b</sup>	(89.8%)	2.89 ± 0.08	(97.3%)
Fuco- II	4.11 ± 0.13 <sup>c</sup>	(76.1%)	2.18 ± 0.03 <sup>b</sup>	(89.0%)	2.60 ± 0.07 <sup>b</sup>	(87.5%)
Fuco- III	4.16 ± 0.12 <sup>c</sup>	(77.0%)	2.14 ± 0.06 <sup>c</sup>	(87.4%)	2.55 ± 0.06 <sup>c</sup>	(85.9%)

Dasi-Ex: Sea tangle extract powder of 4.0% added to control diet; Fuco- I, II and III: Fucoidan powder of 1, 2 and 3% added to Dasi-Ex diet; <sup>a</sup>Mean ± SD with 7 rats per group; <sup>\*\*</sup>Percent of control values; <sup>a</sup>p<0.05; <sup>b</sup>p<0.01; <sup>c</sup>p<0.001 compared with control group.

포막중의 단백질 성분의 산화를 촉진하여 산화단백질 (oxidized protein)을 생성하는 것으로 알려져 있다. 혈청 및 뇌세포막을 기질로 하여 2,4-dinitrophenyl hydrazine을 사용하여 산화단백질의 생성량을 측정·평가하기 위하여 다시마 추출물(Dasi-Ex) 및 후코이단-첨가(Fuco- I, II, III)에 의한 carbonyl group의 생성량을 측정하여 보면 Table 6과 같다.

Table 6에서 혈청중의 carbonyl group의 생성량을 비교하여 보면 다시마 추출물(Dasi-Ex)이나 후코이단(Fuco- I, II, III)의 첨가가 다같이 대조그룹 대비 약 10%의 단백질 산화 억제효과가 인정되었다. 한편 Table 6에서 뇌세포의 mitochondria획분중의 carbonyl group의 생성량을 비교하여 보면 다시마 추출물(Dasi-Ex group)은 대조군 대비 10%의 단백질 산화가 억제되었지만, 후코이단(Fuco- I, II, III group)은 대조그룹 대비 30~35%나 현저한 단백질 산화의 억제효과가 인정되었다. 또한 microsome획분중의 carbonyl group 생성량도 비교하여 보면 다시마 추출물(Dasi-Ex group)이나 후코이단 1.0%-첨가(Fuco- I group)

는 단백질 산화를 억제하지 못했지만, 후코이단 2.0%이상의 첨가(Fuco- II 및 Fuco- III group)는 10%정도 단백질 산화를 유의적으로 억제함을 알 수 있었다. 따라서 carbonyl group의 생성량으로 평가한 단백질 산화 억제효과는 후코이단 2.0%이상의 첨가가 바람직할 것으로 기대된다.

#### 산화질소(NO)의 생성 억제효과

NO는 순간적으로 존재하는 기체성분으로서, 자발적으로 산화되어 NO<sub>2</sub>와 NO<sub>3</sub> 상태로 전환되어 조직세포에 축적된다. NO는 NOS(NO synthase)에 의해 합성되는 가스상의 radical로서 매우 강력한 반응성을 갖고 있기 때문에 조직구성성분과의 반응에 의하여 강력한 독성을 발현(Hibbs 등, 1988; Meldrum 등., 1990)[52, 58]하는 반면, 정보전달 분자로서 혈관이완(Moncada 등., 1991)[61]이나 혈소판 응집억제(Palmer 등, 1987)[64], 그리고 신경전달(Schuman 등., 1991; Snyder 등., 1991)[66-67], 살균, 면역 등 다양한 생리 기능을 갖고 있다. NO는 가스이므로 조직 속이나 세포막을 통해 자유롭게 확산될 수 있기 때문에 수용체

Table 6. Effects of sea tangle and fucoidan on carbonyl group formations in serum and brain membranes of SD rats

Groups	Carbonyl group level (nmol/mg protein)					
	Serum		Mitochondria		Microsome	
Control	25.96 ± 1.19 <sup>a</sup>	-	12.48 ± 0.79	-	15.30 ± 0.42	-
Dasi-Ex	23.06 ± 1.35 <sup>b</sup>	(88.8%) <sup>**</sup>	11.01 ± 0.62 <sup>a</sup>	(88.2%)	14.99 ± 0.74	(98.0%)
Fuco- I	23.35 ± 2.12 <sup>a</sup>	(90.0%)	8.25 ± 0.88 <sup>c</sup>	(66.1%)	14.57 ± 0.58	(95.2%)
Fuco- II	23.74 ± 1.56 <sup>a</sup>	(91.5%)	8.58 ± 0.57 <sup>c</sup>	(68.8%)	14.05 ± 0.45 <sup>a</sup>	(91.8%)
Fuco- III	23.20 ± 1.00 <sup>b</sup>	(89.4%)	8.96 ± 0.35 <sup>c</sup>	(71.8%)	13.66 ± 0.66 <sup>a</sup>	(89.3%)

Dasi-Ex : Sea tangle extract powder of 4.0% added to control diet; Fuco- I, II and III: Fucoidan powder of 1,2 and 3% added to Dasi-Ex diet; <sup>a</sup>Mean ± SD with 7 rats per group; <sup>\*\*</sup>Percent of control values; <sup>a</sup>p<0.05; <sup>b</sup>p<0.01; <sup>c</sup>p<0.001 compared with control group.



를 매개로 하지 않고도 직접 세포사이의 정보 전달이 가능하다.

혈청중의 NO 생성에 미치는 다시마 추출물(Dasi-Ex) 및 후코이단-첨가(Fuco- I, II, III)의 영향을 분석하여 보면 Table 7과 같다. Table 7에서 보는 바와 같이 다시마 추출물(Dasi-Ex)은 NO의 생성에 대한 아무런 억제효과도 인정할 수 없었다. 그렇지만, 후코이단 첨가그룹(Fuco- I, II, III)은 다같이 대조그룹 대비 12~15%나 NO의 생성을 매우 효과적으로 억제한다는 사실이 증명되었다. 정말 후코이단의 멋진 생리효과다.

**활성산소 제거효소의 활성 비교**

혈청중의 제거효소 활성 평가

혈액중에서 활성산소에 대한 제거효소(scavenger enzymes)로서 가장 중요한 슈퍼옥시드 디스무타아제(superoxide dismutase : SOD) 및 카탈라아제(catalase : CAT)의 활성에 미치는 다시마 추출물(Dasi-Ex) 및 후코이단(Fuco- I, II, III) 투여의 영향을 평가하기 위하여 혈청중의 SOD 및 CAT의 활성을 분석하여 평가하여 보면 Table 8과 같다.

Table 8에서 보는 바와 같이 SOD의 활성을 분석하여 보면 다시마 추출물(Dasi-Ex group)의 투여는 전혀 유의적인 SOD 활성의 증가현상을 인정할 수 없었다. 그렇지만, 후코이단-첨가그룹(Fuco- I, II, III group)은 30~60%의 현저한 SOD 활성의 증가현상이 나타났다. 후코이단의 정말 놀라운 SOD 활성 증가효과라 하지 않을 수 없다. 한편 카탈라아제(CAT)의 활성은 Dasi-Ex 투여그룹을 포함하여 후코이단(Fuco- I, II, III group) 투여그룹이 다같이

Table 7. Effects of sea tangle and fucoidan on nitric oxide (NO) levels in serum of SD rats for 45 days

Groups	NO level (nmol/mg protein)	
Control	1.52 ± 0.06 <sup>a</sup>	-
Dasi-Ex	1.43 ± 0.13	(94.1%)**
Fuco- I	1.34 ± 0.05 <sup>a</sup>	(88.2%)
Fuco- II	1.32 ± 0.05 <sup>b</sup>	(86.8%)
Fuco- III	1.32 ± 0.04 <sup>b</sup>	(86.8%)

Dasi-Ex : Sea tangle extract powder of 4.0% added to control diet; Fuco- I, II and III: Fucoidan powder of 1, 2 and 3% added to Dasi-Ex diet; \*Mean ± SD with 7 rats per group; \*\*Percent of control values; <sup>a</sup>p<0.05; <sup>b</sup>p<0.01 compared with control group.

Table 8. Effects of sea tangle and fucoidan on scavenger enzyme activities in serum of SD rats for 45 days

Groups	SOD activity (unit/mg protein)	CAT activity (umol/serum/min)
Control	1.34 ± 0.13 <sup>a</sup>	101.84 ± 10.95 <sup>a</sup>
Dasi-Ex	1.33 ± 0.28 (99.3%)**	121.54 ± 8.44 <sup>a</sup> (119.3%)**
Fuco- I	1.77 ± 0.20 <sup>b</sup> (132.1%)	122.46 ± 12.96 <sup>a</sup> (120.3%)
Fuco- II	1.88 ± 0.13 <sup>c</sup> (140.3%)	120.04 ± 12.83 <sup>a</sup> (117.9%)
Fuco- III	2.14 ± 0.34 <sup>c</sup> (159.7%)	123.55 ± 14.95 <sup>a</sup> (121.3%)

Dasi-Ex : Sea tangle extract powder of 4.0% added to control diet; Fuco- I, II and III: Fucoidan powder of 1, 2 and 3% added to Dasi-Ex diet; \*Mean ± SD with 7 rats per group; \*\*Percent of control values; <sup>a</sup>p<0.05; <sup>b</sup>p<0.01; <sup>c</sup>p<0.001 compared with control group. SOD: superoxide dismutase; CAT: catalase.

20%의 CAT 활성의 증가현상이 나타나서 CAT활성에는 후코이단은 아무런 작용도 하지 않는다고 판단된다. 따라서 다시마 추출물은 SOD 활성에는 아무런 효과가 인정되지 않았지만, CAT 활성에는 20%정도의 CAT 활성 증가현상을 나타내는 선택적인 작용을 갖고 있다는 사실을 알 수 있다. 따라서 혈청중의 방어활성을 나타내기 위해서는 다시마 추출물에 후코이단을 첨가하는 것이 바람직하다는 사실이 입증되었다.

한편 뇌세포에서 분획한 mitochondria, microsome 및 cytosol획분중의 SOD의 활성에 미치는 다시마 추출물(Dasi-Ex) 및 후코이단(Fuco- I, II, III) 투여그룹의 영향을 분석하여 보면 Table 9와 같다. 뇌세포의 mitochondria획분에서는 다시마 추출물(Dasi-Ex group)의 Mn-SOD활성은 대조그룹 대비 17%의 활성증가가 인정된 반면 후코이단-첨가(Fuco- I, II, III group)의 Mn-SOD활성은 26~36%의 범위 증가로서 다시마 추출물 대비 거의 2배에서 현저한 Mn-SOD활성의 증가현상이 인정되었다. 또한 microsome획분에서는 다시마 추출물(Dasi-Ex)과 후코이단-첨가그룹 Fuco- I 은 약 10%의 Mn-SOD활성이 증가하였지만, Fuco- II 및 III group은 15% 및 20%의 Mn-SOD활성이 매우 효과적으로 증가함을 알 수 있었다. 역시 Mn-SOD활성에서 평가하여 볼 때 다시마 추출물보다는 여기에 후코이단을 첨가하는 것이 매우 바람직하다는 사실이 입증되었다. 또한 뇌세포의 cytosol획분에서는 다시마 추출물 투여그룹은 Cu, Zn-SOD활성의 증가를 전혀 인정할

Table 9. Effects of sea tangle and fucoidan on superoxide dismutase (SOD) activity in brain membranes of SD rats

Groups	Superoxide dismutase activity (unit/mg protein)					
	Mitochondria		Microsome		Cytosol	
Control	6.61 ± 0.16 <sup>a</sup>	-	7.52 ± 0.41	-	6.73 ± 0.09	-
Dasi-Ex	7.76 ± 0.25 <sup>b</sup>	(117.4%)**	8.48 ± 0.39 <sup>b</sup>	(112.8%)	7.05 ± 0.76	(104.6%)
Fuco- I	8.33 ± 0.31 <sup>c</sup>	(126.0%)	8.25 ± 0.88 <sup>a</sup>	(109.7%)	7.43 ± 0.34 <sup>a</sup>	(110.4%)
Fuco- II	8.74 ± 0.47 <sup>c</sup>	(132.2%)	8.58 ± 0.57 <sup>b</sup>	(114.1%)	7.56 ± 0.19 <sup>b</sup>	(112.3%)
Fuco-III	9.01 ± 0.24 <sup>c</sup>	(136.3%)	8.96 ± 0.35 <sup>c</sup>	(119.2%)	7.97 ± 0.31 <sup>b</sup>	(118.4%)

Dasi-Ex : Sea tangle extract powder of 4.0% added to control diet; Fuco- I, II and III: Fucoidan powder of 1, 2 and 3% added to Dasi-Ex diet; \*Mean±SD with 7 rats per group; \*\*Percent of control values; <sup>a</sup>p<0.05; <sup>b</sup>p<0.01; <sup>c</sup>p<0.001 compared with control group.

수 없었지만, 후코이단 1, 2, 3%-첨가(Fuco- I, II, III group)에 따라 Cu, Zn-SOD활성이 대조그룹 대비 각각 10%, 12%, 18%로서 후코이단의 첨가량에 따라 Cu, Zn-SOD활성이 용량의존적으로 유의적인 증가효과가 입증되었다.

따라서 후코이단은 SOD나 CAT같은 제거효소의 활성을 매우 효과적으로 증가함으로써 생체방어효소로서 역할을 충실히 수행함으로써 성인병의 예방은 말할 필요도 없고 노화를 매우 효과적으로 방지할 수 있을 것으로 기대된다.

리포푸신(Lipofuscin)의 축적량 평가

생체 노화의 뚜렷한 한 가지 지표로서 노화색소로 알려진 리포푸신(lipofuscin)이란 소모성 색소가 있다. 여러 가지 조직세포의 기능에 막대한 지장을 초래하는 것으로 알려진 리포푸신의 뇌조직중의 침착에 미치는 다시마 추출물(Dasi-Ex group) 및 후코이단-첨가(Fuco- I, II, III group)의 영향을 분석하여 보면 Table 10과 같다.

Table 10에서 보는 바와 같이 다시마 추출물(Dasi-Ex group) 및 후코이단(Fuco- I, II, III group)의 투여는 다같이 대조그룹 대비 40~60%까지 매우 효과적으로 리포푸신의 침착을 효과적으로 억제한다는 사실이 입증되었다. Dasi-Ex는 38%, Fuco- I은 48%, Fuco- II은 53%, Fuco- III은 57%의 순으로 후코이단의 첨가량에 따라 리포푸신의 침착 억제효과가 용량의존적으로 증가하고 있다는 사실이다. 정말 후코이단의 놀라운 생리효과라 하지 않을 수 없다. 따라서 후코이단은 노화색소로서 노화의 지표로서 사용되는 리포푸신의 조직세포내 침착을 효과적으로 억제함으로써 노화를 매우 효과적으로 방어할 수 있을 것으로 기대된다.

Table 10. Effects of sea tangle and fucoidan on lipofuscin levels in brain homogenates of SD rats for 45 days

Groups	Lipofuscin level (nmol/mg protein)	
Control	2.34 ± 0.04*	-
Dasi-Ex	1.45 ± 0.05 <sup>a</sup>	(62.0%)**
Fuco- I	1.21 ± 0.06 <sup>a</sup>	(51.7%)
Fuco- II	1.10 ± 0.03 <sup>a</sup>	(47.0%)
Fuco- III	1.00 ± 0.04 <sup>a</sup>	(42.7%)

Dasi-Ex : Sea tangle *Dasima* extract powder of 4.0% added to control diet; Fuco- I, II and III: Fucoidan powder of 1, 2 and 3% added to Dasi-Ex diet; \*Mean±SD with 7 rats per group; \*\*Percent of control values; <sup>a</sup>p<0.001 compared with control group.

요 약

다시마(*Laminaria japonica*) 추출물 건조분말 4.0%-첨가 사료(Dasi-Ex group)와 여기에 후코이단 1.0%, 2.0%, 3.0%-첨가사료(Fuco- I, II, III group)를 SD계 랫트에 45일간 투여하여 노화억제작용에 미치는 영향을 평가하였다. Dasi-Ex 및 Fuco- I, II, III group의 혈액 및 뇌 mitochondria의 hydroxyl radical(·OH)의 생성은 대조그룹 대비 10~20% 및 25~30%의 유의적인 ·OH의 생성 억제효과가 인정되었지만, 뇌 microsome은 후코이단 2%이상의 첨가(Fuco- II, III group)에서만 15~20%의 유의적인 ·OH의 생성 억제효과가 인정되었다. 뇌조직중의 mitochondria에서 Dasi-Ex 및 Fuco- I group은 10%정도, Fuco- II 및 III group은 13~15%의 유의적인 BOR의 생성 억제효과가 인정되었고, 뇌조직중의 microsome도 Dasi-Ex 및 Fuco- I

group은 10%정도, Fuco-Ⅱ 및 Ⅲ group은 15~20%의 유의적인 BOR의 생성 억제효과가 인정되었다. 후코이단의 첨가량에 따라 용량 의존적으로 활성산소의 생성 억제효과가 증가되고 있기 때문에 후코이단의 노화 억제작용이 매우 효과적으로 기대된다.

Dasi-Ex나 Fuco-Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ group의 혈청 과산화지질(LPO)의 생성은 대조그룹 대비 15~25%나 유의적인 억제효과가 인정되었다. 뇌조직중의 mitochondria 및 microsome의 LPO의 생성은 Dasi-Ex 및 Fuco-Ⅰ, Ⅱ group은 대조그룹 대비 약 10%, Fuco-Ⅲ group에서는 약 15%나 유의적으로 억제되었다. 혈청중의 Dasi-Ex 및 Fuco-Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ group의 단백질 산화 억제효과도 대조그룹 대비 약 10% 정도의 유의성이 인정되었다. 뇌조직의 mitochondria에서 Dasi-Ex group은 대조그룹 대비 10% 정도의 단백질 산화 억제효과가 인정되었지만, Fuco-Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ group은 대조그룹 대비 30~35%나 현저한 단백질 산화의 억제효과가 인정되었다. microsome에서는 Fuco-Ⅱ, Ⅲ group만이 10% 정도의 단백질 산화 억제효과가 인정될 뿐이었다. Dasi-Ex group은 NO의 생성에 대한 아무런 억제효과도 인정할 수 없었지만, Fuco-Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ group은 대조그룹 대비 12~15%나 유의적인 NO의 생성 억제효과가 인정되었다.

Dasi-Ex group은 혈청중의 SOD활성을 인정할 수 없었지만, Fuco-Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ group은 30~60%의 현저한 SOD활성의 증가효과가 나타났다. 혈청중의 CAT활성은 Dasi-Ex 및 Fuco-Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ group이 모두 약 20% 정도 유의적으로 증가하였다. 따라서 SOD활성에는 후코이단이 깊이 관여하는데 반해 CAT활성에는 후코이단이 아무런 역할도 할 수 없다는 선택성이 있을 것으로 기대된다. 뇌조직의 mitochondria의 Mn-SOD활성이 대조그룹 대비 약 17% (Dasi-Ex group) 및 26%~36%(Fuco-Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ group)의 증가효과가 인정되었다. 따라서 Mn-SOD활성은 후코이단 첨가(Fuco-Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ)가 다시마 단독(Dasi-Ex)보다 2배나 유의적인 효과가 인정되었다. 또한 뇌조직의 cytosol의 Cu,Zn-SOD활성은 Dasi-Ex group에서는 전혀 그 활성을 인정할 수 없었지만, Fuco-Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ group에서는 대조그룹 대비 각각 10%, 12%, 18%로서 후코이단의 첨가량에 따라 용량 의존적으로 Cu, Zn-SOD활성의 유의적인 증가효과가 입증되었다. 뇌조직중의 리포푸신의 침착은 Dasi-Ex는 38%, Fuco-Ⅰ은 48%, Fuco-Ⅱ은 53%, Fuco-Ⅲ은 57%의 순으로

후코이단의 첨가량에 따라 리포푸신의 침착 억제효과가 용량 의존적으로 현저히 증가하였다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 다시마 추출물(Dasi-Ex) 단독 투여보다는 후코이단의 첨가가 거의 2배정도 노화 억제효과가 증가하였고, 후코이단 첨가도 용량 의존적으로 생체의 노화를 효과적으로 억제할 수 있을 것으로 판단된다.

## 감사의 글

본 연구는 1999년도 한림제약(주)의 연구비 지원으로 이루어졌습니다. 귀사의 연구비 지원에 감사드립니다.

## 참고 문헌

- Bernardi, G. and Springer, G. F. 1962. Properties of highly purified Fucan. *J. Biol. Chem.*, **273**, 75-81.
- Chan, P. C. and Bielski, B. H. T. 1974. Enzyme catalyzed free radical reactions with nicotinamide adenine nucleotide. *Chem. J. Biol.* **249**, 1317-1320.
- Choi, J. H. and Yu, B. P. 1989. The effect of food restriction on kidney membrane structures of aging rats. *Age* **12**, 133-136.
- Choi, J. H. and Yu, B. P. 1990. Unsuitability of TBA test as a lipid peroxidation marker due to prostaglandin synthesis in the aging kidney. *Age* **13**, 61-64.
- Choi, J. H. 1991. Lipid peroxidation, aging and food restriction. *Kor. J. Biochem.*, **23**(1), 61-70.
- Choi, J. H. 1991. Modulation of the aging process by food restriction. *J. Kor.Soc. Food Nutr.*, **20**(2), 187-196.
- Choi, J. H., I. S. Kim, J. I. Kim and T. H. Yoon. 1991. Studies on Anti-aging action of brown algae (*Undaria pinnatifida*) 1. Dose effect of alginic acid as a modulator of anti-aging action in serum lipids. *Korean. J. Gerontol.*, **1**(2), 173-178.
- Choi, J. H., I. S. Kim, J. I. Kim and T. H. Yoon. 1992. Studies on Anti-aging action of brown algae (*Undaria pinnatifida*) 2. Dose effect of alginic acid as a modulator of anti-aging action in liver membranes. *Bull. Korean Fish. Soc.*, **25**(3), 181-188.
- Choi, J. H., I. S. Kim, J. I. Kim, D. W. Kim and Y. S. Moon. 1993. The synergistic effect of ginseng/ eicosapentaenoic acid on improvement of lipid metabolism. *Korean J. Gerontol.* **3**(1), 28-32.
- Choi, J. H., I. S. Kim, J. I. Kim, D. W. Kim and T. H. Yoon. 1993. Effect of reed (*Phragmites communis*)

- root extract on physiological activity of SD rats. *Korean J. Gerontol.* 3(2), 109-115.
11. Choi, J. H., J. I. Kim, D. W. Kim, Y. S. Moon and T. H. Yoon. 1993. Effect of wild dropwort (*Oenanthe stolonifera*) extract on physiological activity of rats. *Korean J. Gerontol.* 3(1), 116-122.
  12. Choi, J. H., J. I. Kim, D. W. Kim, Y. S. Kim and D. H. Oh. 1994. Effect of aloe-added yoghurt on inhibition of obesity and biological activity of rats. *Korean J. Gerontol.* 4(2), 100-106.
  13. Choi, J. H., J. I. Kim, D. W. Kim, Y. S. Moon and H. S. Yoon. 1994. Study on anti-aging action of docosahexaenoic acid (DHA) in rats I. Effect of docosahexaenoic acid (DHA)-rich fish oil on body weight, lipid component and fatty acid compositions in rats. *Korean J. Gerontol.*, 4(1), 32-38.
  14. Choi, J. H., J. I. Kim, D. W. Kim, Y. S. Moon and H. S. Yoon. 1994. Study on anti-aging action of docosahexaenoic acid (DHA) in rats I. Effect of docosahexaenoic acid (DHA)-rich fish oil on oxygen radicals and their scavenger enzymes in rats. *Korean J. Gerontol.*, 4(1), 39-45.
  15. Choi, J. H., J. I. Kim, D. W. Kim, Y. S. Moon and D. H. Oh. 1994. Effect of docosahexaenoic acid (DHA)-added yoghurt on inhibition of obesity and biological activity of rats. *Korean J. Gerontol.*, 4(2), 93-99.
  16. Choi, J. H. and Yu, B. P. 1994. Studies on age-related physiological changes in brain of senescence accelerated mouse(SAM). *Kor. J. Gerontol.*, 4(2), 61-70.
  17. Choi, J. H. and B. P. Yu. 1995. Brain synaptosomal aging : Free radicals and membrane fluidity. *Free Rad. Biol. & Med.* 18(2), 133-139.
  18. Choi, J. H., D. W. Kim, Y. S. Moon, J. I. Kim, K. S. Kim, Y. S. Kim and H. S. Yoon. 1995. Effect of docosahexaenoic acid (DHA) in fish oil on experimental induced dementia, Alzheimer-type 1. Effect of DHA on lipid metabolism in rabbit. *Korean J. Gerontol.* 5(2), 111-116.
  19. Choi, J. H., D. W. Kim, Y. S. Moon, J. I. Kim, Y. S. Kim and H. S. Yoon. 1995. Effect of docosahexaenoic acid (DHA) in fish oil on experimental induced dementia, Alzheimer-type 1. Effect of DHA on reactive oxygen species (ROS) and their scavenger enzymes in rabbits. *Korean J. Gerontol.* 5(2), 117-121.
  20. Choi, J. H., D. W. Kim, Y. S. Moon, J. I. Kim, K. S. Kim, Y. S. Kim and H. S. Yoon. 1995. Effect of docosahexaenoic acid (DHA) in fish oil on experimental induced dementia, Alzheimer-type 1. Effect of DHA on neurotransmitters and their metabolites in rabbit. *Korean J. Gerontol.* 5(2), 122-126.
  21. Choi, J. H., D. W. Kim, Y. S. Han and S. S. Han. 1996. Effect of docosahexaenoic acid (DHA) on learning and memory impairment animal model SAMP8 I. Feeding effect of DHA on lipid metabolism of SAMP8 brain. *Korean J. Gerontol.*, 6(3), 14-19.
  22. Choi, J. H., D. W. Kim, J. I. Kim and S. S. Han. 1996. Effect of docosahexaenoic acid (DHA) on learning and memory impairment animal model SAMP8 II. Feeding effect of DHA on oxygen radicals and their scavenger enzymes of SAMP8 brain. *Korean J. Gerontol.* 6(3), 20-24.
  23. Choi, J. H., D. W. Kim, J. I. Kim and H. S. Yoon. 1996. Effect of docosahexaenoic acid (DHA) on learning and memory impairment animal model SAMP8 brain III. Feeding effect of DHA on neurotransmitters and their metabolites in SAMP8 brain. *Korean J. Gerontol.* 6(3), 25-30.
  24. Choi, J. H., Kim, J. I., Kim, D. W., Moon, Y. S., Chung, H. Y. and Yu, B. P. 1996. Analysis of lipid composition and hydroxyl radicals in brain membranes of senescence-accelerated mice. *Age*, 19, 1-5.
  25. Choi, J. H., D. W. Kim, J. K. Yoo, S. S. Han and Shim, C. S. 1996. Effect of aloe (*Aloe vera* Linne) on learning and memory impairment animal model SAMP8 I. Effect of aloe on anti-aging action of SAMP8. *Korean J. Gerontol.* 6(1), 28-34.
  26. Choi, J. H., D. W. Kim, J. K. Yoo, S. S. Han and Shim, C. S. 1996. Effect of aloe (*Aloe vera* Linne) on learning and memory impairment animal model SAMP8 II. Feeding effect of aloe on lipid metabolism of SAMP8. *Korean J. Life Sci.* 6(1), 178-184.
  27. Choi, J. H., D. W. Kim, S. S. Han and Shim, C. S. 1996. Effect of aloe (*Aloe vera* Linne) on learning and memory impairment animal model SAMP8 III. Effect of aloe on neurotransmitters and their metabolites of SAMP8. *Korean J. Life Sci.* 6(2), 142-148.
  28. Choi, J. H. and B. P. Yu. 1996. Dietary restriction as a modulator of age-related changes in prostaglandin biosynthesis in rat kidney microsomes. *Kor. J. Gerontol.* 6(2), 22-27.
  29. Choi, J. H. and B. P. Yu. 1997. Anti-peroxidative action of dietary restriction on serum lipids and their fatty acids. *Korean J. Gerontol.* 7(1), 25-30.
  30. Kim, I.S., Choi, J. H. and Hong, J. H. 1997. Changes in functional properties of casein by different chemical modifications. *J. Food Sci. Nutr.* 2(1), 17-22.
  31. Choi, J. H., J. I. Kim, J. S. Lee, Y. S. Han and S. S. Han. 1997. Effect of reed (*Phragmites communis*) root

- extract (RRE) on learning and memory impairment animal model SAMP8 I. Feeding effect of RRE on lipid metabolism of SAMP8. *Korean J. Gerontol.* 7(3), 17-22.
32. Choi, J. H., J. I. Kim, K. S. Kim, C. M. Kim and Y. H. Baek. 1997. Effect of reed (*Phragmites communis*) root extract (RRE) on learning and memory impairment animal model SAMP8. II. Feeding effect of RRE on oxygen radicals and their scavenger enzymes of SAMP8 brain. *Korean J. Gerontol.* 7(3), 23-28.
  33. Choi, J. H., D. W. Kim, J. S. Choi, Y. S. Han and Y. H. Baek. 1997. Effect of reed (*Phragmites communis*) root extract (RRE) on learning and memory impairment animal model SAMP8 III. Feeding effect of RRE on neurotransmitters and their metabolites in SAMP8 brain. *Korean J. Gerontol.* 7(3), 29-36.
  34. Choi, J. H., D. W. Kim, Y. S. Han and S. S. Han. 1997. Effect of red ginseng extract (RGE) on learning and memory impairment animal model SAMP8 I. Feeding effect of RGE on lipid metabolism of SAMP8 brain. *Korean J. Gerontol.* 7(2), 64-70.
  35. Choi, J. H., D. W. Kim, J. H. Kim and Y. S. Kim. 1997. Effect of red ginseng extract (RGE) on learning and memory impairment animal model SAMP8. II. Feeding effect of RGE on oxygen radicals and their scavenger enzymes of SAMP8 brain. *Korean J. Gerontol.* 7(3), 71-75.
  36. Choi, J. H., D. W. Kim, Y. S. Han and S. S. Han. 1997. Effect of red ginseng extract (RGE) on learning and memory impairment animal model SAMP8. III. Feeding effect of RGE on neurotransmitters and their metabolites in SAMP8 brain. *Korean J. Gerontol.* 7(3), 76-83.
  37. Choi, J. H., D. W. Kim, J. H. Kim, K. S. Kim and J. S. Lee. 1997. Effect of pine needle extract (PNE) on physiological activity of SD rats I. Feeding effect of PNE on lipid and oxygen radical metabolisms in serum of SD rats. *Korean J. Life Sci.* 7(4), 371-376.
  38. Choi, J. H., D. W. Kim, J. H. Kim and H. S. Kim. 1997. Effects of yoghurt (Super-100) administration on the obesity and biological activity of SD rats. *Korean J. Gerontol.* 7(3), 84-91.
  39. Choi, J. H., J. H. Kim, D. W. Kim, K. S. Kim and J. S. Lee. 1998. Effect of pine needle extract (PNE) on physiological activity of SD rats. II. Feeding effect of PNE on oxygen radicals and their scavenger enzymes in brain membranes of SD rats. *Korean J. Life Sci.* 8(1), 91-96.
  40. Choi, J. H., J. H. Kim, D. W. Kim, C. H. Hwang and J. S. Lee. 1998. Effect of pine needle extract (PNE) on physiological activity of SD rats. III. Feeding effect of PNE on fluidity and neurotransmitter-related enzymes in brain membranes of SD rats. *Korean J. Life Sci.* 8(2), 162-172.
  41. Choi, J. H., D. W. Kim, Y. S. Han, H. S. Kim, C. M. Kim and W. K. Cho. 1998. Biological activity of functional tonic beverage (FTB) using with cargasork tea. *Korean J. Gerontol.* 8(1), 77-82.
  42. Choi, J. H., D. W. Kim, J. S. Lee, Y. S. Han and S. S. Han. 1998. Effect of reed root extract (RRE) on learning and memory impairment animal model SAMP8 I. Feeding effect of p-coumaric acid on lipid metabolism of SAMP8. *Korean J. Gerontol.* 8(1), 99-104.
  43. Choi, J. H. and Yu, B. P. 1998. The effects of dietary restriction on age-related changes in rat serum prostaglandins. *J. Nutr. Health & Aging* 2(3), 451-455.
  44. Choi, J. H. and Yu, B. P. 1998. Dietary restriction as a modulator of age-related changes in rat kidney prostaglandin production. *J. Nutr. Health & Aging* 2(3), 456-460.
  45. Choi, J. H., Kim, D. W. and Yu, B. P. 1998. Modulation of age-related alterations of iron, ferritin, and lipid peroxidation in rat brain synaptosomes. *J. Nutr. Health & Aging* 2(3), 461-465.
  46. Choi, J. H. and Yu, B. P. 1999. The effects of dietary restriction on age-related changes in rat serum prostaglandins. *Age & Nutrition* 10(1), 47-51.
  47. Choi, J. H., D. I. Kim, S. H. Park, D. W. Kim, J. S. Lee, J. H. Ryu and Y. S. Chung. 1999. Effects of sea tangle (*Laminaria japonica*) and fucoidan components on chronic degenerative diseases. *Korean J. Life Sci.* 9(4), 427-435.
  48. Fletcher, B. L., Dillard, C. J. and Tappel, S. A. L. 1973. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues. *Anal Biochem* 52, 1-9.
  49. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. 1981. Formation of a thiobarbituric acid-reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts. *FEBS. Lett.*, 128, 347-350.
  50. Heron, D. S., Shinitzky, M., Hershkowitz, M. and Samuel, D. 1980. Lipid fluidity markedly modulates the binding of serotonin to mouse brain membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 12, 7463-7467.
  51. Hibbs, J. B. Jr, Taitor, R. R., Vavrin, Z. and Rachlin, C. 1988. Nitric oxide: A cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157, 87-94.

52. Ito, H. and Sugiura, M. 1976. Antitumor polysaccharide fraction from *Sargassum thumbergii*. *Chem. Pharm. Biull.* **24**, 114-118.
53. Lawrence, R. A. and Burk, R. F. 1978. Species, tissue and subcellular distribution of non-Se-dependent glutathione peroxidase activity. *Lipid*, **19**, 444-452.
54. Lebel, C. P., Odunze, I. N., Jr. A. and Bondy, S. C. 1989. Perturbations in cerebral oxygen radical formation and membrane order following vitamin E deficiency. *Biochem. & Biophysic. Res. Com.* **163**(2), 860-866.
55. Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A. G., Ahn, B., Shaltiel, S. and Stadtman, E. R. 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.*, **198**, 464-478.
56. Lowry, O. H., Roseborough, N. J., Farr, L. A., and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
57. Meldrum, B. and Garthwaite, J. 1990. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol. Sci.*, **11**, 379-387.
58. Miesel, R., Kurpisz, M. and Kroger, H. 1996. Suppression of inflammatory arthritis by simultaneous inhibition of nitric oxide synthase and NADPH oxidase. *Free Radical Biology & medicine*, **20**(1), 75-81.
59. McCord, J. M. and Fridovich, I. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythro cuprein (hemò cuprein). *Chem. J. Biol.* **244**, 6049-6054.
60. Moncada, S., Palmer, R. M. J. and Higgs, E. A. 1991. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, **43**, 109-142.
61. Nakazawa, Y., Kuroda, H., Abe, F., Nishino, T., Otsuki, M. and Umezaki, I. 1974. Antitumor effect of water-extracts from marine algae(I). *Chemotherapy* **22**, 1435-1440.
62. Oyanagui, Y. 1984. Reevaluation of assay methods and establishment of Kit for superoxide dismutase activity. *Anal Biochem* **42**, 290-296.
63. Palmer, R. M. J., Ferrige, A. G. and Mocada, S. 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, **327**, 524-526.
64. Rigo, A. and Rotilio, G. 1977. Simultaneous determination of superoxide dismutase and catalase in biological materials by polarography. *Anal. Biochem.*, **81**, 157-166.
65. Schuman, E. M. and Madison, D. V. 1991. A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science*, **254**, 1503-1506.
66. Snyder, S. and Bredt, D. S. 1991. Nitric oxide as a neuronal messenger. *Trends Pharmacol. Sci.*, **12**, 125-128.
67. Steel, R. G. D. and Torrie, J. H. 1960. Principles and procedures of statistics. McGrawhill, New York.
68. Thurman, R. G., Ley, H. G. and Scholz, R. 1972. Hepatic microsomal ethanol oxidation. *Eur. J. Biochem.*, **25**, 420-430.
69. Yagi, K. 1987. Lipid peroxides and human diseases. *Chemistry and Physics of Lipids* **45**, 337-351.
70. Yamamoto, I., Nagumo, T., Takahasi, M., Fujihara, M., Suzuki, Y. and Iizima, I. 1981. Antitumor effect of seaweeds III. Antitumor effects of an extract from *Sargassum Kjellmanianum*. *J. Exp. Med.*, **51**, 187-192.
71. Yu, B. P., Lee, D. W., Marler, C. G. and Choi, J. H. 1990. Mechanism of food restriction: Protection of cellular homeostasis. *Soc. Exp. Biol. Med.* **193**, 13-15.
72. Yu, B. P. 1996. Aging and oxidative stress: Modulation by dietary restriction. *Free Rad. Biol. Med.* **21**, 651-668.
73. Yu, B. P. and Yang, R. 1996. Critical evaluation of free radical theory of aging: A proposal of oxidative stress hypothesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **786**, 1-11.
74. Usui, T., Asari, K. and Mizuno, T. 1980. Isolation of highly fucoidan from *Eisenia bicyclis* and its anticoagulant and antitumor activities. *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1965-1970.