

CCl₄로 유도된 간 기능장애에 대한 갈파래 푸코이단 추출물의 보호효과

남 천 석 · 강 금 석 · † 하 배 진
신라대학교 의생명과학대학 제약공학과
(접수 : 2006. 6. 27., 게재승인 : 2006. 10. 10.)

Ulva lactuca Fucoidan Extract and its Protective Effects on CCl₄-induced Liver Dysfunction

Chun Suk Nam, Kum Suk Kang, and Bae Jin Ha†
Department of Pharmaceutical Engineering, College of Medical Life Science, Silla University,
1-1 San, Gwaebup-dong, Sasang-gu, Busan 617-736, Korea
(Received : 2006. 6. 27., Accepted : 2006. 10. 10.)

The effects of Fucoidan extracted from *Ulva lactuca* on carbon tetrachloride (CCl₄)-induced dysfunction in CCl₄-posttreated rats were investigated. *Ulva lactuca* fucoidan (ULF) of 100 mg/kg concentration was intraperitoneally administered into rats at dose of 1 ml/kg for 14 days. On the day 15, 3.3 ml/kg of CCl₄ dissolved in olive oil (1 : 1) was injected 12 hours before anesthetization. We examined the levels of glutamate oxaloacetate transaminase (GOT), glutamate pyruvate transaminase (GPT) in serum of rats, superoxide dismutase (SOD) in mitochondrial fraction and catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), malondialdehyde (MDA) in liver of rats. SOD, CAT, GPx decreased, and GOT, GPT, MDA increased in the CCl₄-treated group. But SOD, CAT, GPx increased, and GOP, GPT, MDA decreased in the ULF and CCl₄-treated group. These results showed that ULF had the protective effects on the liver dysfunction of CCl₄-treated rats.

Key Words : *Ulva lactuca*, fucoidan, liver dysfunction, carbon tetrachloride

서 론

간에 들어오는 모든 물질은 cytochrome P450 mono-oxygenase와 NADPH-cytochrome P450 reductase의 효소반응에 의해서 일차적으로 변환이 일어남으로써 독성물질이 되거나 무독성물질이 되어 인체에 영향을 미친다(1). 간 손상을 일으키는 물질에는 carbon tetrachloride (CCl₄), chloroform, phosphorus, dimethyl nitrosamine, thioacetamide 등이 있으며 형태학적인 급성 변화로는 간세포의 종창, 지방성 혹은 소엽 중심성 괴사 등을 초래하고, 만성적으로는 간경변증 등을 일으킨다(2). 대표적인 간 독성 물질 중 하나인 CCl₄는 가장 강한 독성을 가진 물질이며 효소반응에 의해 trichloromethyl radicals와 trichloromethyl peroxy radicals ($\cdot\text{OOCCL}_3$)을 생성하여 세포막의 인지질인 polyenoic fatty acid의 methyl carbon을 공격함으로써 지질이 산화되어 간

세포 용해를 일으킨다(3, 4). 이런 radicals는 세포소기관의 막 지질에 분포하는 불포화 지방산 측쇄의 methylene 결합을 공격하여 약물대사 효소 활성과 단백질 합성을 저하시키고 간에서의 급성 지방 변성을 일으키며 lipoprotein의 생성과 유리를 차단하여 급속한 지방축적을 야기한다(5). 따라서 CCl₄는 radicals를 생성하고 그것으로 인하여 간세포의 지질막 등이 파괴되고 세포가 활동성을 잃게 되어 간세포의 파괴로 이어지며 이것은 간 독성도와 비례하여 증가하는 것으로 파악된다.

해양성 조류는 예로부터 육상생물에 비하여 비타민, 미네랄 및 식이섬유의 함량이 높고 마그네슘, 철, 요오드, 아연 등의 필수 미네랄이 많이 존재하는 해양성식물이다(6). 또한 최근에는 이러한 식물들이 항암 및 항종양성, 항혈액응고 등의 생리 활성기능을 가지고 있는 것으로 밝혀지고 있다(7).

해양성 조류 중 갈조류에 존재하는 다당류는 세포내 골지체에서 합성되어 세포조직에 푸코이단으로 존재하며 세포를 보호하기 위한 물질로써 분비되는 것이다(8). 주로 갈조류에 존재하는 푸코이단은 헤파린과 구조가 비슷하며 황산기를 포함하는 다당체로 항혈액응고, 항암, 항염증 등의 생리활성물질로 연구가 되고 있다(9).

† Corresponding Author : Department of Pharmaceutical Engineering, College of Medical Life Science, Silla University, 1-1 San, Gwaebup-dong, Sasang-gu, Busan 617-736, Korea
Tel : +82-51-999-5466, Fax : +82-51-999-5684
E-mail : bjha@silla.ac.kr

국내 해안가에 자생하는 갈조류의 일종인 갈파래는 엽체는 옅은 녹색을 띄고 암반에 착생한다. 엽체는 분지하지 않고 폭 7~10 cm, 길이 10~15 cm cml 피침형이나 신장형으로 존재하고 가장자리는 파형으로 굴곡을 가지는 것이 특징이다(10).

본 연구는 갈파래에서 푸코이단을 추출하여 HPLC에 의해 표준품과 대조하여 확인하고 이 푸코이단 추출물이 간 독성에 대한 보호효과를 갖고 있는지를 간 독성 지표와 효소활성지표를 통해 밝히고자 한다.

재료 및 방법

재료

갈파래는 부산광역시 기장읍 앞바다 및 광안리 수변공원 주변에 서식하는 것을 채취하고 수 회 세척하여 소금 성분을 최대한 제거한 후 그늘에서 건조 하여 사용하였다.

실험동물 및 식이

실험동물은 체중 170~180 g 내외의 암컷 흰쥐 (Sprague-Dawley계 생후 7주)를 대구 효창 사이언스로부터 제공받았고 7일 동안 적응시켰다. 실험동물은 cage에 각각 분리시키고 고형사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다. 실험 동안 동물들은 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 온도와 $60 \pm 5\%$ 상대습도로 유지시켰고 총 21마리의 rat를 7마리씩 3군으로 나누었다 (Table 1). 정상군 (NOR group)과 대조군 (CON; CCl_4 -treated group)은 0.9% saline을, 시료군 (ULF; *Ulva lactuca* fucoidan extract + CCl_4 -treated group)은 갈파래 푸코이단 추출물 (100 mg/kg)을 1 ml/kg씩 복강 내에 14일간 매일 투여하고 15일째 되는 날에 대조군과 시료군에서 실험동물의 간 손상의 유도를 위해 사염화탄소를 olive oil에 1 : 1 비율로 용해시켜 3.3 ml/kg의 용량을 복강 내로 투여하여 간 독성을 유발시켰다. CCl_4 투여하고 절식 시킨 뒤 12시간 후에 ether로 마취하고 해부하여 혈액과 간을 채취하여 실험하였다.

Table 1. Experimental design of rats

Experiment group	Day 1-14	Day 15
	Dose of sample	Dose of sample
NOR (7)	1 ml/kg of 0.9% saline, i.p.	1 ml/kg of 0.9% saline, i.p.
CON (7)	1 ml/kg of 0.9% saline, i.p.	3.3 ml/kg of CCl_4 (dissolved in equal vol. olive oil,), i.p.
ULF (7)	1 ml/kg of <i>Ulva lactuca</i> fucoidan extract(100 mg/kg), i.p.	

NOR : normal group

CON : CCl_4 -treated group

ULF : *Ulva lactuca* fucoidan extract + CCl_4 -treated group

The number of experiment animals is given in parenthesis.

푸코이단 추출

푸코이단은 Tako(11) 방법을 변형하여 추출하고 동결 건조하여 사용하였다.

혈액 및 간 채취

시료 투여 기간 종료 후 실험동물을 ether 마취 하에서 개복한 후 심장에서 채혈하여 실온에서 30분간 방치한 후 3000 rpm, 4°C 에서 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하고 실험에 사용할 용량을 각각 분주하여 -70°C 냉동고에 보관하여 실험에 사용하였다. 간은 4엽을 전부 적출하여 0.9% 생리 식염수로 세척 여지로 흡착한 후 -70°C 냉동고에 보관하여 실험에 사용하였다.

간 무게 10배의 solution (10 mM tris, 0.07 M saccharose, 0.1 mM EDTA, 0.2 M mannitol, in dissolved 0.1 N HCl)을 넣어 균질화한 후, 600 ×g, 4°C 에서 10분간 원심분리하고 상등액은 다시 8,000 ×g, 4°C 에서 10분간 원심분리하여 얻은 pellet에 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) 5 ml 넣어 mitochondrial fraction으로 사용하였다.

갈파래 푸코이단 추출물과 푸코이단 표준품 (Sigma, USA)의 HPLC 측정

푸코이단의 추출방법대로 추출하여 얻어진 갈파래 푸코이단 추출물과 푸코이단 표준품을 서로 같은 조건하에서 HPLC로 측정하여 검토하였다. 본 측정은 부경대학교 해양과학공동연구소에 의뢰하여 실행하였다.

혈청 중의 GOT, GPT 활성 측정

혈청 중의 GOT, GPT의 양은 Fuji dri-chem clinical chemistry analyzer (Fuji dri-chem 3500, Fujifilm, Japan)로 측정하였다.

간 조직의 단백질 정량

단백질의 정량은 Lowry 등의 방법(12)에 의해서 750 nm에서 흡광도를 측정하고 표준 단백 시료를 bovine serum albumin (BSA)으로 정량하였다.

간 조직 중의 malondialdehyde (MDA) 함량 측정

간 1 g을 취하여 간 무게의 5배 용량인 5 ml의 1/20 M phosphate buffer (pH 7.4)에 homogenation 시킨 것과 mitochondrial fraction을 마개가 있는 시험관에 각각 0.5 ml씩 triple로 취하였다. Thiobarbituric acid (TBA) 변법(13)으로 7% SDS (sodium dodecyl sulfate)로 가용화시켜 여기에 0.67% (동량의 acetic acid 혼합시약) 2 ml를 가하여 95°C water bath에서 50분간 가온 후 즉시 급냉시켰다. butanol 5 ml를 첨가하여 800 ×g에서 10분간 원심분리 한 후 상등액을 취하여 535 nm에서 흡광도를 측정하였다.

간 조직 내 mitochondria 분획의 superoxide dismutase (SOD) 활성 측정

Beauchamp와 Fridovich의 방법(14)에 따라 0.2 M K-phosphate buffer (pH 7.4)를 672 μl , 1 mM xanthine 100 μl , 1% sodium deoxychlorate 30 μl , 1.5 mM KCN 30 μl , 0.2 mM

cytochrome C 150 µl 넣은 혼합에 sample 8 µl 넣고, xanthine oxidase 용액을 10 µl 넣어 mixing한 후 Elisa에 이용하여 550 nm에서의 흡광도 변화를 2분 동안 측정하였다. 효소의 활성도는 Sigma사의 superoxide dismutase standard를 표준액으로 비교 측정하였다.

간 조직 중 catalase (CAT)의 활성 측정

Aebi의 방법(15)을 이용하여 phosphate buffer (0.05 M pH 7.0) 1.9 ml에 sample (homogenate와 mitochondrial fraction을 800 ×g에서 20분간 원심분리한 상등액 100 µl를 buffer로 10, 20, 40, 80배 희석) 0.1 ml와 과산화수소 용액 1 ml를 혼합하여 240 nm에서 90초 동안 흡광도 감소를 측정하였다.

간 조직 중 glutathione peroxidase (GPx)의 활성 측정

Lawrence 등의 방법(16)에 준하여 0.1 M phosphate buffer (4 mM EDTA) 400 µl, 0.01 M NaN₃ 70 µl, 0.01 M GSH 70 µl, 1.5 mM NADPH 70 µl, H₂O 360 µl, GSSG-reductase (1.8 U/ml) 20 µl, sample 10 µl를 혼합하여 상온에서 1분간 방치한 후 5 mM H₂O₂ 100 µl를 가해 잘 섞은 후 340 nm에서 90초 동안 흡광도 감소를 측정하였다.

통계처리

본 실험에 대한 모든 실험 결과는 평균치와 표준편차로 나타내었고, 통계적 유의성은 SPSS를 이용 일원배치 분산 분석하여 검정하였다.

결과 및 고찰

갈파래 푸코이단 추출물과 푸코이단 표준품의 HPLC 측정

갈파래 푸코이단 추출물과 푸코이단 표준품 (Sigma, USA)을 같은 농도로 희석하여 HPLC를 사용하여 측정한 결과 Fig. 1과 같이 표준품과 일치하였다.

혈청 중 GOT 및 GPT의 활성 변화

간 조직의 손상은 세포 내부에 존재하는 효소가 혈액으로 유출되는 것을 측정하거나 pericentral necrosis를 관찰함으로써 확인할 수 있다. 따라서 간으로부터 혈액에 방출된 간의 효소 활성도 측정은 간 손상 연구에 있어서 가장 유용한 방법 중의 하나이며, 특히 혈장 중 GOT와 GPT 등의 효소 level의 상승은 간 손상으로 인한 간세포의 괴사와 간조직의 파괴가 진행됨에 따라 아미노기전이효소 (transaminase)가 혈중으로 유리되어 높게 나타나는 것이므로 간세포의 변성 및 괴사의 지표가 될 수 있다(17).

GOT는 글루탐산의 아미노기를 옥살로아세트산으로 전이시켜주는 효소로 아미노기가 전이되면 글루탐산은 α-케토글루타르산이 되고 옥살로아세트산은 아스파르트산이 된다. GPT는 글루탐산의 아미노기를 알라닌으로 전이시켜주는 효소로 아미노기가 전이되면 글루탐산은 α-케토글루타르산이 되고 알라닌은 피루브산이 된다(18).

#	파일명	제일 비율	x변차	y변차
1	STD.DAT	1	1.00	0
2	2.DAT	1	1.00	0

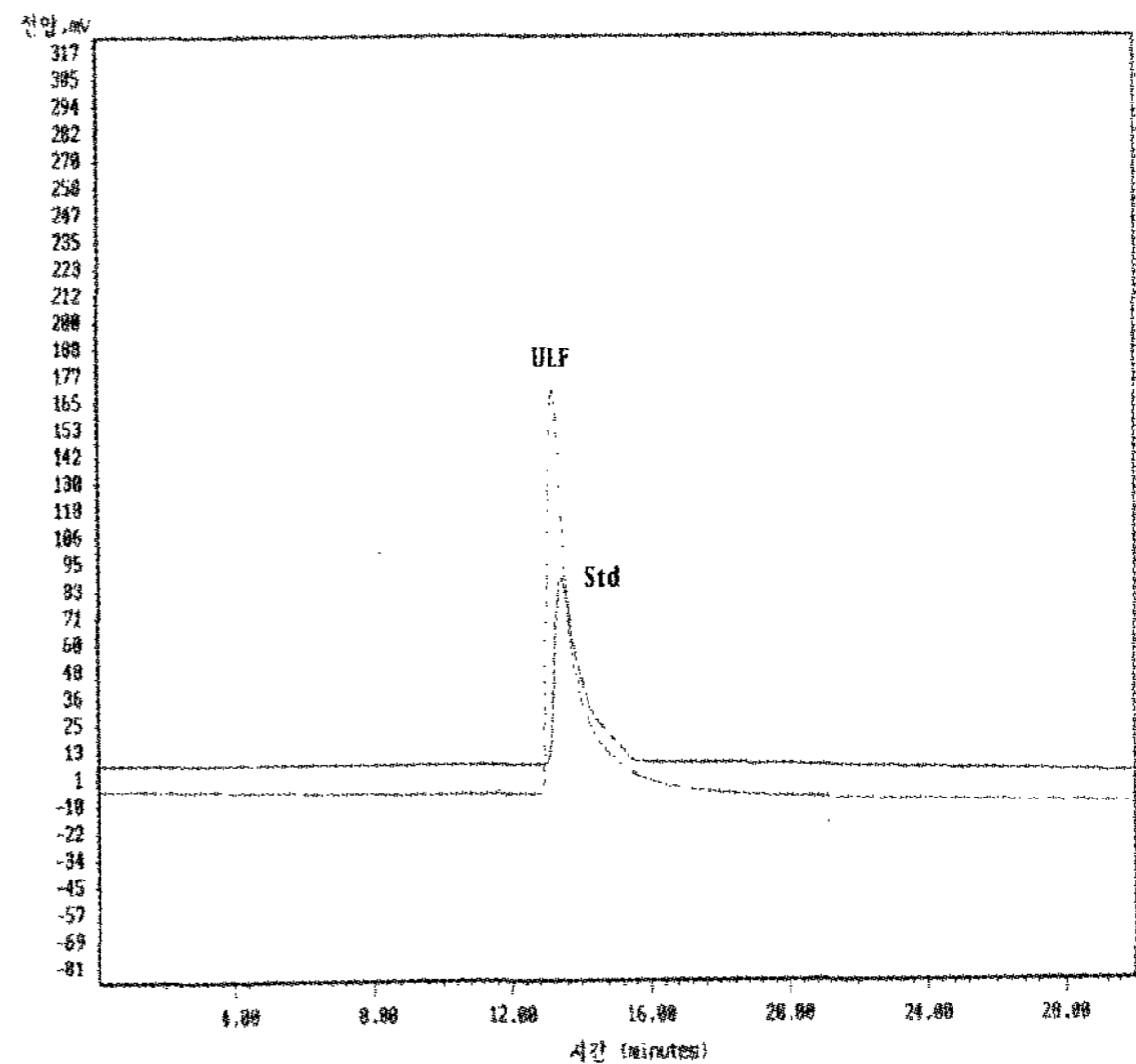


Figure 1. HPLC peak of *Ulva lactuca* fucoidan extract (ULF) and fucoidan standard (Sigma, USA), (Model: HP1100 series, Agilent (USA), RI detector, Column GF-250 (Zorbox PN884973.901, USA)).

GOT 및 GPT 활성의 결과는 Table 2와 같다. CCl₄를 투여하면 혈청 GOT 및 GPT 활성이 증가하는 경향은 CCl₄에 의한 간 손상 유발물질이 간의 세포손상을 초래하였기 때문인 것으로 사료된다고 보고하고 있다(19).

Table 2와 같이 GOT의 경우 정상군에 비해 대조군에서 CCl₄의 간 장애 유발로 인해 효소 level이 약 3.3배 증가하였고 시료군인 ULF군은 대조군과 비교 하였을 때 29.8% 감소하여 갈파래 푸코이단 추출물의 효과를 확인할 수 있었다. 또한 GPT의 경우에도 CCl₄를 투여한 대조군이 정상군에 비해 약 3.7배 정도 증가하여 간 장애 유발이 확인되었고, ULF군은 대조군에 비해 48.15% 감소하는 것으로 나타나 갈파래 푸코이단 추출물의 효소 level 감소 효과를 확인할 수 있었다.

Table 2. Effects of *Ulva lactuca* fucoidan extract on aminotransferase (GOT, GPT) levels in CCl₄-treated rat serum

experimental group	GOT (u/l)	GPT (u/l)
NOR	91.33±2.08***	23.2±2.77***
CON	305.5±9.19	87.75±7.08
ULF	241.66±8.82**	56.66±3.66**

NOR: normal group
 CON: CCl₄-treated group
 ULF: *Ulva lactuca* fucoidan extract + CCl₄-treated group
 ***p<0.001, **p<0.05 *p<0.1 values are mean ± SE (n=7).
 GOT: gultamate oxaloacetate transaminase
 GPT : glutamate pyruvate transaminase

간 조직 중 MDA의 정량

과산화지질은 oxygen radicals에 의한 불포화지방산에서 일어나는 산화반응이며 oxygen radicals의 직접적인 작용보다는 철 이온 존재 하에 superoxide와 H₂O₂의 상호작용에

의해 형성되는 OH에 의해 간접적으로 일어나며, 이의 주된 손상장소가 DNA나 세포막이다(20). 이와 같은 지질의 과산화는 여러 가지 독물에 의한 간 손상으로 이어지는 기전으로 인정되어진다(21).

Table 3과 같이 CCl₄로 간 손상이 초래된 대조군은 MDA 양이 정상군보다 약 2.97배 증가하는 경향을 나타내었고 ULF군은 37.64%의 감소율을 보여 갈파래 푸코이단 추출물의 과산화지질 감소 효과를 확인할 수 있었다.

Table 3. Effect of *Ulva lactuca* fucoidan extract on MDA contents in CCl₄-treated rat liver

experimental group	liver homogenate (nmol/mg protein)
NOR	3.8±0.43 ^{***}
CON	11.31±3.4
ULF	8.48±1.87 [*]

NOR: normal group

CON: CCl₄-treated group

ULF: *Ulva lactuca* fucoidan extract + CCl₄-treated group

^{***}p<0.001, ^{**}p<0.05 ^{*}p<0.1 values are mean ± SE (n=7).

MDA: malondialdehyde

간 조직 및 mitochondrial fraction 중 SOD, CAT 및 GPx 측정

생체에 활성 산소가 너무 많으면 암을 발생시키거나 노화를 촉진하는 등 나쁜 영향을 미친다. 이런 활성 산소는 과식, 스트레스, 흡연, 지나친 운동으로 인한 과호흡 등에 의해 그 양이 증가하는데, 이러한 활성산소를 제거시키는 역할을 하는 효소가 바로 SOD이다. 생체 내의 항산화 방어기구 중에서 효소적 방어 계의 하나로 주로 mitochondria에 존재하며 superoxide radical을 환원하여 H₂O₂를 생성하여 생체를 보호한다(22, 23).

생체 내 생명 현상에서 필수적인 산화환원반응의 일종으로 생성되는 H₂O₂를 H₂O와 O₂로 분해하는 효소 중 하나가 CAT이다. 이것은 다수의 H₂O₂ 생성효소들과 복합체를 형성하여 peroxisome에 주로 분포하고 H₂O₂ 증가에 따른 조직손상을 방어하는 효과가 있다고 알려져 있다(24, 25). 또한 SOD에 비해 산화적 손상에 다소 민감한 것으로 사료되며, 항산화계 효소들은 대사과정 중 발생하는 활성 산소 종에 의해 그 활성이 비가역적으로 불활성화 될 수 있으며, 또한 지방산화에 의해 생성된 유리기도 제거하는 능력이 있다고 보고하고 있다(26, 27).

Glutathione은 산화적인 손상으로부터 적혈구를 보호한다. 그것은 disulfide bond에 의해서 연결된 두개의 tripeptide에 의해서 환원된 형태 (GSH)와 산화된 형태 (GSSG) 사이를 순환한다. GSSG는 전자 근원과 같은 NADPH를 사용하는 flavoprotein인 glutathione reductase에 의해서 GSH로 환원된다. Glutathione은 호기적 생명체에서 해로운 부산물인 hydrogen peroxide와 organic peroxide와 함께 반응함으로써 해독 작용에서 중요한 역할을 수행한다. 이 반응에서 촉매 효소인 GPx는 selenium 원자가 공유 결합되어있는 것이 주목할 만하다. 이 효소는 H₂O₂와 lipid peroxide와 같은 peroxides의 다양한 종류들을 조절한다(22).

Table 4와 같이 SOD 활성정도는 대조군의 효소활성이 정상군에 비해서 1.38배 정도로 낮게 나타났고 ULF군은 대조군에 비해 343% 이상의 효과를 보였다. 또한 CAT는 대조군이 정상군에 비해 약 1.7배 감소하였고, ULF군에서의 효소 활성은 대조군 보다 30.2% 높게 나타났고 GPx의 경우 대조군은 정상군에 비해 약 3.5배의 감소율을 보였으며 ULF군은 대조군에 비해서 34.43%의 증가율을 보였다.

Table 4. Effects of *Ulva lactuca* fucoidan extract on SOD, CAT and GPx activities in CCl₄-treated rat liver homogenate and mitochondrial fraction

experimental group	SOD (U/mg protein)	CAT (mU/mg protein)	GPx (mU/mg protein)
	mitochondrial fraction	liver homogenate	liver homogenate
NOR	101.38±5.05 ^{***}	382.43±7.08 ^{***}	60.51±4.85 ^{***}
CON	73.17±3.61	220.18±8.23	16.98±6.24
ULF	170.25±2.54 ^{***}	269.20±6.23 ^{***}	31.97±0.89 ^{**}

NOR: normal group

CON: CCl₄-treated group

ULF: *Ulva lactuca* fucoidan extract + CCl₄-treated group

^{***}p<0.001, ^{**}p<0.05 ^{*}p<0.1 values are mean ± SE (n=7).

SOD: sodium dismutase, CAT: catalase, GPx: glutathione peroxidase

요 약

갈파래는 해양성 조류 중 녹조류의 일종으로 해양성 조류의 생리활성물질로 알려진 다당체인 푸코이단을 함유하고 있다. 갈파래로부터 추출된 푸코이단의 간 독성 보호효과를 검토하기 위해서 흰쥐를 사용하여 갈파래 푸코이단 추출물 (ULF)을 14일간 매일 1회 복강 내로 선 투여하고 15일째 되는 날에 CCl₄를 후투여한 후에 혈액 및 간 조직에서의 지질의 평가와 효소 활성의 변동을 통해 간 독성의 보호효과를 관찰하였다. GOT의 경우 정상군에 비해 대조군에서 CCl₄의 간 장애 유발로 인해 효소 활성이 약 3.3배 증가하였고 시료군인 ULF군은 대조군과 비교 하였을 때 29.8% 감소하여 갈파래 푸코이단 추출물의 효과를 확인할 수 있었다. 또한 GPT의 경우에도 CCl₄를 투여한 대조군이 정상군에 비해 약 3.7배 정도 증가하여 간 장애 유발이 확인되었고 ULF은 대조군에 비해 48.15% 감소하는 것으로 나타나 갈파래 푸코이단 추출물의 효소 활성 감소 효과를 확인할 수 있었다. CCl₄로 간 손상이 초래된 대조군은 MDA 양이 정상군보다 약 2.97배 증가하는 경향을 나타내었고 ULF군은 대조군에 비해 37.64%의 감소율을 보여 갈파래 푸코이단 추출물의 지질과산화 감소효과를 확인할 수 있었다. SOD 활성 정도는 대조군의 효소활성이 정상군에 비해서 1.38배 정도로 낮게 나타났고 ULF군은 대조군에 비해 343% 이상의 효과를 나타내었다. 또한 CAT는 대조군이 정상군에 비해 약 1.7배 감소하였으며 ULF군은 대조군 보다 30.2% 높게 나타났고 GPx의 경우 대조군은 정상군에 비해 약 3.5배의 감소율을 보였고 ULF군은 대조군에 비해서 34.43%의 증가율을 보여 효과가 매우 높음을 알 수 있었다.

이러한 측정 결과는 갈파래 추출 푸코이단이 간 독성을 예방하는 보호효과가 있음을 보여 주었다.

REFERENCES

1. Cho, M. H. (2004), The base of toxicology, Young Chi (ed.), 116-120.
2. Ashburn, L. L., Endicott, K. M., Daft, F. S., and R. D. Little (1947), The nonportal distribution of trabecule in dietary cirrhosis of mouse and huinea pigs, *Am. J. Path.* **23**, 159.
3. Butler, T. C. (1990), Reduction of carbon tetrachloride *in vivo* and reduction of carbon tetrachloride and chloroform *in vitro* by tissues and tissues constituents, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **134**, 311-319.
4. McCay, P. B., Lai, E. K., Poyer, J. L., Dubose, C. M., and E. G. Janzen (1984), Oxygen and carbon-centered free radical formation during carbon tetrachloride metabolism, *J. Biol. Chem.* **259**, 2135-2143.
5. C. S. Jeong, K. W. Jung, and J. S. Jeong (1999), Hepatoprotective Effect of Subfractions of *Carthamus tinctorius* L. Semen on the Reversal of Biotransformation Enzyme Activities in CCl₄-induced Hepatotoxic Rats, *J. Fd Hyg. Safety* **14**(2), 172-178.
6. Lee, J. H. and V. J. Sun (1980), The content of minerals in algae, *J. Korea Soc. Food Sci. Nutr.* **9**, 51-58.
7. Cho, K. J., Lee, Y. S., and B. IL. Ryu (1990), Antitumor effect and immunology activity of seaweeds toward sarcoma-180, *J. Korea Fish. Soc.* **23**, 315-352.
8. Schaeffer, D. J. and V. S. Krylov (2000), Anti-HIV activity of Extracts and compounds from algae and Cyanobacteria, *Ecotoxicol. Environ. Safety* **45**, 208-227.
9. Nagumo, T. and T. Nishino (1997), Fucan Sulfates and their anticoagulant activities. In S. Dumitriu.(ed.), *Polysaccharides in Medicinal Applications, New York-Basel-Hong Kong*, 545-574.
10. In Hyu Lee, Yong-Pil Lee, and Young Sheen Ahn (1986), Flora of Marine Algae in Cheju Island I. Ulvaceae, *The Korean Journal of Phycology* **1**(1), 157-167.
11. Tako, M., M. Uehara, Y. Kawashima, I. Chinen, and F. Hongo (1996), Isolation and identification of fucoidan from Okinawamozuku, Oyo Toshitsu Kagaku, *J. Appl. Glycosci.* **43**, 143-148.
12. Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. S., and R. J. Randall (1951), Protein Measurement with Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* **193**, 256-261.
13. Ohkawa, A., Ohishi, N., and K. Yagi (1979), Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochem.* **95**, 351-358.
14. Beauchamp, C. and I. Fridovich (1971), Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gel, *Anal. Biochem.* **44**, 276-287.
15. Aebi, H. (1984), Catalase *in vitro*, Methods, *Enzymology* **105**, 121-126.
16. Lawrence, R. A. and R. F. Burk (1976), Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **71**, 952-958.
17. Gabriel L. Plaa and William R. Hewitt (1982), Hayes: Principles and Methods of Toxicology, *Raben Press*, 407-445.
18. McPhalen, C. A., Vincent, M. G., and J. N. Jansonius (1992), X-ray structure refinement and comparison of three forms of mitochondrial aspartate aminotransferase, *J. Mol. Biol.* **225**, 495-517.
19. Takaharu Nomura and Kiyonori Yamaoka (1999), Low-dose γ -ray irradiation reduces oxidative damage induced by CCl₄ in mouse liver, *Free Radical Biology & Medicine* **27**(11/12), 1324-1333.
20. Fred, J., Yost, J., and I. Fridovich (1976), Superoxide and hydrogen peroxide in oxygen damage, *Arch. Biochem. Biophys.* **175**, 514-518.
21. H. R. Ling, H. Sirén, M. L. Riekkola, P. Vuorela, H. Vuorela, and R. Hiltunen (1996), Optimized separation of pharmacologically active flavonoids from Epimedium species by capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A* **746**, 123-129.
22. Rosen, D. R., et al. (1993), Mutations with familial amyotrophic lateral sclerosis, *Nature* **362**, 59-62.
23. Tainer, J. A., Getzoff, E. D., Richardson, J. S., and D. C. Richardson (1983), Structure and mechanism of Cu, Zn, superoxide dismutase, *Nature* **306**, 274-287.
24. Gutteridge, J. M. C., Beard, A. P. C., and G. J. Quinlan (1983), Superoxide-dependent lipid peroxidation. Problem with the use of catalase as a specific probe for Fenton-derived hydroxyl radicals, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **117**, 901-907.
25. Yosjikawa, T., Murakami, M., Yoshida, N., Seto, O., and M. Kondo (1983), Effects of superoxide dimutase and catalase on disseminated intravascular coagulation in rats, *Thromb. Haemostas* **50**, 869-872.
26. Fridovich, I. (1986), Biologic effects of the superoxide radicals, *Arch. Biochem. Biophys.* **247**, 1-15.
27. Von, Sonntag (1987), The Chemical Basis of Radiation of biology, Tylor and Francis.(ed.), London, 31.