J. Korean Fish. Soc. 32(6), 758~763, 1999 한수지, 32(6), 758~763, 1999

신장의 활성산소 공격에 대한 다시마 (*Laminaria japonica*)와 후코이단 성분의 영향

최진호 · 김대익 · 박수현 · 김동우 · 구재근*
부경대학교 식품생명공학부, 생화학연구실, *군산대학교 식품공학과

Effects of Sea Tangle (*Laminaria japonica*) and Fucoidan Components on the Attack of Oxygen Radicals in Kidney

Jin-Ho CHOI, Dae-Ik KIM, Soo-Hyun PARK, Dong-Woo KIM and Jae-Geun KOO
Lab. of Biochemistry, Faculty of Food Science and Biotechnology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea
**Dept. of Food Science and Technology, Kunsan National University, Kunsan 573-702, Korea*

The protective effects of sea tangle (*Laminaria japonica*) extract and fucoidan components on the attack of oxygen radicals in kidney were studied. Sprague-Dawley (SD) male rats (210 ± 5 g) were with fed experimental diets of 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%, respectively, added to Dasi-Ex group) for 45 days. Hydroxyl radical formations were significantly decreased (10~15% and 15~30%) in mitochondria and microsomes of Dasi-Ex and Fuco-I, II, III groups compared with control group. Hydrogen peroxide formations were also significantly decreased (10~15%) in microsomes of Dasi-Ex and Fuco-I, II, III groups compared with control group. Significant differences in mitochondrial basal oxygen radical (BOR) and microsomal induced oxygen radical (IOR) formations of Dasi-Ex and Fuco-I groups could not be obtained, but mitochondrial BOR and microsomal IOR formations were significantly decreased (12~15% and 13~14 %) in Fuco-II and III groups compared with control group. BOR formations were significantly decreased (12~25%) in microsomes of Dasi-Ex and Fuco-I, II, III groups, and IOR formations were also significantly decreased (10~15%) in mitochondria of Fuco-I, II, III groups compared with control group. Significant differences in mitochondrial Mn-SOD activities of Dasi-Ex group could not be obtained, but mitochondrial Mn-SOD activities were dose-dependently increased by 8%, 16% and 36% in Fuco-I, II and III groups compared with control group. Mn-SOD activities in microsome were significantly increased about 20% in Daxi-Ex group, while they were remarkably increased about 40% in Fuco-I, II and III groups compared with control group. Lipid peroxide contents were significantly decreased about 15% and 15~25% in mitochondria and microsomes of Fuco-II and III groups. Membrane fluidities resulted in marked increases (20~35% and 17~24%) in mitochondria and microsomes of Dasi-Ex and Fuco-I, II and III groups. These results suggest that administrations of fucoidan added to sea tangle may play a pivotal role in attenuating attack of oxygen radicals in kidney.

Key words: sea tangle (*Laminaria japonica*), fucoidan, oxygen radicals, membrane fluidity, superoxide dismutase (SOD), Mn-SOD, Cu-, Zn-SOD.

서 론

지금까지 거의 20년동안 해양생물중에서 주로 미역 (*Undaria pinnatifida*)의 주성분인 알긴산의 생리활성을 중심으로 성인병 (chronic degenerative diseases)의 방지효과 및 노화 억제효과에 대해서는 전보 (Choi et al., 1999a, 1999b)에서 지적한 바 있다. 최근들어 미역, 다시마 등 갈조류 성분의 새로운 생리활성성분으로 각광을 받고 있는 후코이단 (fucoidan)은 가능성이 매우 높은 성분으로 밝혀지고 있다 (Choi et al., 1999a).

지금까지 미역, 다시마 등의 갈조류에는 생리활성성분으로서 알긴산의 생리활성연구가 주종을 이루어 왔지만, 점성이 매우 커서 음료개발에는 여러 가지 문제점을 갖고 있다. 그렇지만, 후코이단 성분은 중성다당인 라미나란 (laminaran)과는 달리 황산기를 가진 산성의 수용성 다당류로서 가수분해하면 L-fucose가 다량 함유되어 있는 것이 밝혀지면서 처음에는 fucoidin으로 명명하였다가 지금의 다당 (多糖) 명명법에 따라 fucoidan으로 불려지게 되었다.

후코이단은 혈액중에 존재하는 함황 산성다당인 헤파린과 구조 및 생리적 특성이 유사하여 항혈액응고작용 (Bernardi and Springer, 1962)을 갖고 있다는 사실이 처음으로 밝혀지게 되었다. 그 후 Usui et al. (1980)은 *Eisenia bicyclis*로부터 추출한 후코이단 획분의 항혈액응고 활성이 54 I.U.로서 헤파린의 40%정도의 높은 활성을 갖고 있다는 사실이 증명되었다. 특히 후코이단의 항혈액응고작용은 같은 혈전용해작용을 나타내는 다른 다당인 헤파린과 dermatin sulfate와 같은 트롬빈의 활성을 억제하여 혈액응고를 저지한다는 사실이 밝혀져 있다. 사람의 혈액내에 존재하는 트롬빈의 활성억제인자인 antithrombin 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

본 연구는 해양식량자원특성화연구사업의 일부 경비 지원으로 수행되었음.

잘 알려져 있으며, 해조 열수 추출물의 항종양 활성은 Nakazawa 등(1974)에 의하여 처음으로 밝혀졌고, Ito and Sugiura (1974)가 Ehrlich 암종양세포에 항종양 활성을 나타내는 *S. 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 et al., 1987).

본 연구는 전보(Choi et al., 1999a)의 관련연구로서 실험용 기본사료에 다시마(*Laminaria japonica*) 추출물 건조분말 4.0% 첨가사료와 다시마 추출물 건조분말 4.0% 첨가사료에 후코이단 건조분말을 각각 1.0%, 2.0%, 3.0%씩 첨가 조제한 사료를 사용하여 45일간 사육하여 심장에서 채혈하고, 다시 개복하여 신장를 절취하여 가장 중요한 배설기능을 갖고 있는 신장의 산소 라디칼 공격에 대한 다시마 및 후코이단 성분의 영향을 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 사육조건

한국화학연구소에서 구입한 Sprague Dawley rats (male, 210 ± 10 g)를 구입하여 본 대학 동물사육실에서 2주간 예비사육한 다음 각각 7마리씩 5군으로 나누어 각각의 조제사료로서 45일동안 투여한 다음, 채혈하고 다시 신장을 절취하여 HEPES완충용액에 넣은 다음, −70℃의 동결고에 넣어두고 실험에 사용하였다. 동물사육실은 항온항습(22 ± 2℃, 65 ± 2% RH)하에서 12시간 싸이클(06:00~18:00)로 명암이 자동 조절되었다.

2. 조제사료의 조성

본 실험에 사용한 사료조성은 전보(Choi et al., 1999a)와 마찬가지로 기본사료의 조성은 탄수화물 59.0% (α-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%을 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* Sing)의 에탄올-추출 건조분말 0.05%씩 합계 0.55%씩을 첨가하여 조제하였다.

3. 후코이단(Fucoidan)의 분리 정제

본 실험에 사용한 다시마-추출 건조분말은 한림제약(주)로부터 할애받아 사용하였고, 후코이단은 전보(Choi et al., 1999a)와 같은 방법으로 미역 포자엽(Sporophylls of *Undaria pinnatifida*)에서 추출 농축한 조후코이단을 다시 정제한 다음, 동결건조하여 얻은 정제된 후코이단을 사용하였다. 또한 활성산소 분석용 시약과 Kit시약 및 SOD 등 제거효소의 측정에는 Sigma제 특급시약을 사용하였다.

4. 세포획분의 분획

신장세포의 분획은 Choi 등(1990)의 방법에 따라 HEPES완충용액(10mM HEPES, 10mM KCl, 280mM sucrose, pH 7.4)을 사용하여 미토콘드리아, 마이크로솜 및 시토솔획분을 분획하여 사용하였다. 이들 획분의 단백질의 함량은 Lowry et al. (1951)의 방법에 따라 측정하였다.

5. 기초 및 유도산소라디칼의 정량

신장획분중에 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 측정은 Lebel et al. (1989)의 방법에 따라 측정하였다. IOR의 측정은 기저상태와 라디칼 생성을 유도하기 위해 ascorbic acid와 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$로 자극한 유도상태의 두 가지 조건에서 비교 측정하였다. 기저상태와 라디칼 유도의 경우 모두 시료 500 μℓ를 완충용액(40 mM Tris-HCl buffer pH 7.4)으로 10배 희석하고, probe인 5uM DCF-DA (Molecular probe, USA) 12 μℓ를 첨가, 10,000rpm 8분간 원심분리한다.

잔사를 40 mM Tris-HCl 3.0 mℓ에 녹인 후 라디칼 유도 상태의 경우에는 1 mM ascorbic acid (300 μℓ)와 100uM $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (150 μℓ)를 혼합하였고 기저상태의 경우는 아무것도 첨가하지 않았다. 이후 37℃에서 30분간 반응시킨 후 37℃를 유지하면서 형광강도의 변화를 형광광도계를 이용하여 488 nm (excitation)와 525 nm (emission)에서 측정하였다. 이 때 분광형광광도의 변화를 DCF-DA를 표준품으로 해서 표준검량선에 의하여 생성된 DCF의 양(nmol/mg protein/min)으로 환산하고, 이 양으로써 BOR 및 유도산소라디칼(induced oxygen radical : IOR)의 산소 라디칼의 생성량으로 정량하였다.

6. 활성산소의 생성량 측정

(1) 히드록시 라디칼의 함량

Deoxyribose의 파괴 정도로 hydroxyl radical (·OH)의 생성량을 측정하는 방법으로서 반응성 산소대사물에 의해 deoxyribose가 파괴되어 aldehyde가 생성되며 이 aldehyde는 산성용액에서 thiobabituric acid와 반응하여 발색되는 것을 이용한 Halliwell 등(1981)의 방법에 따라 측정하였다.

(2) 과산화수소의 함량

과산화수소(H_2O_2)의 생성량은 Thurman 등(1972)의 방법에 따라 신장세포의 microsome획분에서 생성된 H_2O_2에 의하여 생성되는 붉은 색의 ferrithiocyanate 복합체를 기초로 400 mM 인산완충용액(pH 7.4) 400 μℓ, 200 mM nicotinamide 200 μℓ, 100 mM $MgCl_2$ 200 μℓ, 50 mM NaN_3 200 μℓ와 시료 64.1 μℓ, 물 735.9 μℓ 첨가·혼합한

뒤 60 mM NADPH 200 μℓ를 첨가하여 총 2.0 mℓ가 되게 하여 37℃ 항온 수조에서 15분간 가온시킨 후에 1.2 M TCA (trichloroacetic acid)를 1.0 mℓ 첨가, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 1.0 mℓ 취하였다. 상층액에 ferrous ammonium 200 μℓ 첨가 후 2.5 M KSCN을 100 μℓ 넣어 혼합하여 실온에 10분 방치하였다. 분광광도계를 이용하여 파장 480 nm에서 흡광도를 측정하여 표준검량선에 의해 H_2O_2의 함량 (nmol/mg protein/min)을 정량하였다.

7. 활성산소 방어시스템의 측정

(1) 수퍼옥시드 디스무타아제의 측정

Oyanagui et al. (1984)의 방법에 따라 수퍼옥시드 디스무타아제 (superoxide dismutase: SOD)의 활성은 신장획분을 인산완충용액 (pH 8.2)으로 30배로 희석한 용액 0.1 mℓ에 증류수 0.5 mℓ, A시약 (52.125 mg of hydoxylamine+102.1 mg of hypoxanthine/250 mℓ D.W) 0.2 mℓ, B시약 (20 μℓ of xanthine oxidase+0.9939 mg ethylene diaminetetraacetic acid/26.7 mℓ phosphate buffer, pH 8.2) 0.2 mℓ를 첨가 혼합하여 37℃ 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 분광광도계를 사용, 550 nm에서 흡광도를 측정하여 표준검량선에 의해 SOD 활성 (unit/mg protein)을 측정하였다.

8. 산화 스트레스의 평가

(1) 지질과산화물의 정량

혈청 및 신장세포 획분중의 과산화지질의 함량은 Choi et al. (1990)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 et al. (1987)의 방법에 따라 형광도계로써 형광강도를 515 nm (excitation)와 553 nm (emission)의 파장에서 측정하여 과산화지질 의 함량 (nmol/mℓ serum)을 정량하였다.

(2) 세포막 유동성의 측정

신장세포의 mitochondria 및 microsome 분획중의 세포막 유동성은 형광 probe로서의 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatrine (DPH)을 사용한 Choi et al. (1995)에 따라 측정하였다. 50 mM 인산완충용액 (pH 7.2, 2750 μℓ), 증류수 (250 μℓ), 시료 (100 μℓ)를 첨가 혼합하여 37℃ 항온 수조에서 5분간 방치한 다음 probe인 0.167 mM TMA-DPH [1-(4-trimethylammoniumphenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatriene, p-toluenesulfonate] 용액을 6.67 μℓ를 첨가 혼합하여 37℃ 항온 수조에서 shaking하면서 30분간 반응시킨 후 37℃을 유지하면서 형광광도계를 이용하여 360 nm (excitation)와 430 nm (emission)에서 측정하였다.

9. 분석결과의 통계처리

본 연구의 모든 실험결과는 통계 처리하여 평균치와 표준편차를 계산하였으며, 각 실험군간의 유의성 검정은 t-test (Steel et al., 1960)로 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 산소라디칼 생성 억제효과

Free radical로 알려진 활성산소 (oxygen radicals)로서 ·OH, 수퍼옥시드 라디칼 (O_2^-), H_2O_2 등은 조직세포를 공격하여 세포막을 파괴하고 효소를 불활성화하여 질병을 유발하고 노화를 촉진하는 것으로 밝혀져 있으므로 (Choi et al., 1991a-b, 1994, 1995), 다시마 추출물 (Dasi-Ex) 및 후코이단 (Fuco-I, II, III) 투여가 신장 mitochondria 및 microsome중의 ·OH의 생성 및 microsome 중의 H_2O_2의 생성에 미치는 영향을 조사하는 것이 중요할 것으로 생각되어 실험결과를 Table 1에 나타냈다.

신장 mitochondria획분중의 ·OH의 생성 억제효과를 비교하여 보면 Dasi-Ex 및 Fuco-I, II, III 투여그룹이 다같이 대조그룹 대비 10~15%의 ·OH 생성량의 유의적인 억제효과가 인정되었다. 그렇지만, Dasi-Ex 및 Fuco-I, II, III 투여그룹에 있어서 신장 microsome분획중의 ·OH 생성량은 mitochomdria분획보다 더욱 뚜렷한 ·OH의 생성량 억제효과가 나타나서, 대조그룹 대비 15~30%의 현저한 억제효과가 인정되었다. 신장의 mitochondria분획은 후코이단의 첨가효과가 인정되지 않았지만, microsome분획에서는 ·OH 생성량 억제효과가 뚜렷할 뿐만 아니라 후코이단의 첨가량에 따른 용량 의존성도 나타났다. 이러한 사실은 전보 (Choi et al., 1999b)의 뇌조직의 연구결과와는 반대되는 경향으로서, 장기에 따라 후코이단의 작용이 다르게 나타났다. 이러한 사실은 장기의 조성과 기능에 따른 차이로 생각된다.

또한 Table 1에서 신장 microsome분획중의 H_2O_2의 생성 억제효과를 비교하여 보면 Dasi-Ex 및 Fuco-I, II, III 투여그룹의 H_2O_2의 생성 억제효과가 mitochondria의 ·OH의 생성 억제효과와 마찬가지로 10~15%의 유의적인 억제효과가 인정되었다. 그리고 microsome분획의 H_2O_2의 생성 억제효과도 후코이단 첨가량의 증가에 따른 용량 의존적이 인정됨을 알 수 있었다. 다시마 및 후코이단의 H_2O_2의 생성 억제효과도 신장의 microsome에서는 유의적으로 H_2O_2의 생성 억제효과가 인정된다는 사실은 매우 흥미로운 사실이다 (Choi et al., 1999b).

Table 1. Effects of sea tangle and fucoidan on the attack of oxygen radicals in kidney membranes in SD rats for 45 days

Groups	·OH level (nmol/mg protein/min)		H_2O_2 level (nmol/mg protein)
	Mitochondria	Microsome	Microsome
Control	4.60 ± 0.08* –	3.66 ± 0.12* –	3.15 ± 0.02 –
Dasi-Ex	4.10 ± 0.12[a] (89.1%)**	3.21 ± 0.14[a] (87.7%)**	2.84 ± 0.12[a] (90.2%)
Fuco-I	4.05 ± 0.09[a] (88.0%)	2.79 ± 0.07[c] (76.2%)	2.88 ± 0.06[a] (91.4%)
Fuco-II	4.04 ± 0.02[a] (87.8%)	2.59 ± 0.10[c] (70.8%)	2.75 ± 0.09[b] (87.3%)
Fuco-III	4.05 ± 0.07[a] (88.0%)	2.65 ± 0.17[c] (72.4%)	2.62 ± 0.07[c] (83.2%)

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 mice per group; **Percent of control values; [a]$p<0.05$; [b]$p<0.01$; [c]$p<0.001$ compared with control group.

2. 기초 및 유도 산소라디칼의 평가

신장조직의 산화적 스트레스로서 기초 및 유도산소 라디칼의 생성 억제효과를 평가하기 위하여 DCF-DA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate)를 probe로 이용하여 신장의 mitochondria 및 microsome분획의 활성산소 생성능에 미치는 다시마 추출물 (Dasi-Ex) 및 후코이단 (Fuco-I, II, III)의 투여효과를 분석하여 평가하였다.

Dasi-Ex 및 Fuco-I, II, III 투여그룹이 신장중의 산소 라디칼의 생성에 미치는 영향을 기초산소라디칼 (BOR) 및 유도산소라디칼 (IOR)로 구분하여 비교 평가하여 보면 Table 2와 같다. 우선 BOR의 생성 억제효과를 비교하여 보면 mitochondria획분에서는 Dasi-Ex 및 Fuco-I 투여그룹은 거의 유의적인 효과가 인정되지 않았지만, Fuco-II 및 III 투여그룹은 12~16%의 유의적으로 BOR의 생성 억제효과가 인정되었다. Microsome분획은 Dasi-Ex 및 Fuco-I, II, III 투여그룹이 12~25%의 범위내에서 유의적으로 BOR의 생성 억제효과가 인정되었다.

또한 IOR의 생성 억제효과를 비교하여 보면 mitochondria분획에서는 Dasi-Ex 투여그룹은 전혀 유의성을 인정할 수 없었지만, Fuco-I, II, III 투여그룹은 10~15%의 유의적인 IOR의 생성 억제효과가 인정되었다. 신장 microsome분획은 Fuco-II, III 투여그룹만이 13~14%의 유의적으로 IOR의 생성 억제효과가 인정되었다. 따라서 후코이단의 첨가량에 따른 용량 의존성이 뚜렷하게 나타났다. 지금까지의 노화의 메카니즘에 관련학설은 Harman의 가설로서, 'Free Radical Theory'이 일반화되면서 지질과산화 중심의 연구가 진행되어 왔지만 (Choi et al., 1995), 최근들어 산화적 스트레스설 (oxidative stress theory)이 성인병을 유발하고 노화를 촉진한다는 사실이 세력을 확장해 가고 있다 (Yu et al., 1998a-b).

Table 2. Effects of sea tangle and fucoidan on oxygen radical formation of kidney membranes in SD rats for 45 days

Groups	Oxygen radical formation (nmol/mg protein/min)			
	Mitochondria		Microsome	
Basal oxygen radical (BOR)				
Control	5.45 ± 0.23*	–	1.58 ± 0.01*	–
Dasi-Ex	5.26 ± 0.44	(96.5%)**	1.37 ± 0.08[a]	(86.7%)**
Fuco-I	5.11 ± 0.48	(93.8%)	1.39 ± 0.09[a]	(88.0%)
Fuco-II	4.84 ± 0.30[a]	(88.8%)	1.27 ± 0.05[c]	(80.4%)
Fuco-III	4.57 ± 0.39[a]	(83.9%)	1.19 ± 0.01[c]	(75.3%)
Induced oxygen radical (IOR)				
Control	23.59 ± 1.65*	–	13.95 ± 0.53*	–
Dasi-Ex	23.12 ± 1.97	(98.0%)**	13.74 ± 0.33	(98.5%)**
Fuco-I	21.07 ± 1.39[a]	(89.3%)	13.89 ± 0.29	(99.6%)
Fuco-II	21.60 ± 5.77[a]	(91.6%)	12.20 ± 0.10[c]	(87.5%)
Fuco-III	20.42 ± 0.97[b]	(85.6%)	12.03 ± 0.05[c]	(86.2%)

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 mice per group; **Percent of control values; [a]p<0.05; [b]p<0.01; [c]p<0.001 compared with control group.

3. 수퍼옥시드 디스무타아제의 활성 평가

생체 방어효소로서 SOD, GSHPx 및 CAT가 알려져 있다. 이들 활성산소 제거효소중에서 가장 중요한 SOD의 활성에 미치는 다시마 추출물 (Dasi-Ex) 및 후코이단 (Fuco-I, II, III) 투여의 영향을 평가하기 위하여 신장 mitochondria, microsome 및 cytosol획분중의 SOD활성을 분석 평가하여 보면 Table 3과 같다.

신장 mitochondria획분에서는 Dasi-Ex 투여그룹의 Mn-SOD활성은 대조그룹 대비 유의성을 전혀 인정할 수 없었지만, Fuco-I, II, III 투여그룹의 Mn-SOD활성은 대조그룹 대비 각각 8%, 16%, 36%의 유의적인 Mn-SOD활성 증가효과가 인정되었다. 또한 microsome분획에서는 Dasi-Ex 투여그룹의 Mn-SOD활성이 20%나 증가한 반면 Fuco-I, II, III 투여그룹의 Mn-SOD활성이 대조그룹 대비 약 40%의 현저한 증가효과가 인정되어, microsome의 Mn-SOD활성은 후코이단 투여그룹이 다시마 추출물 투여그룹보다 2배의 증가효과가 인정되었다.

또한 신장 cytosol분획의 Cu,Zn-SOD활성은 Dasi-Ex 투여그룹은 약 15%로 증가한 반면 Fuco-I, II, III 투여그룹은 20~25%의 현저한 증가효과가 인정되었다. 전보 (Choi et al., 1999b)에서 보는 바와 같이 SOD활성의 증가효과도 활성산소의 생성 억제효과와 마찬가지로 신장과 뇌라는 두 가지 장기의 SOD 활성의 증가효과에 현저한 차이가 있음을 알 수 있었다.

4. 산화 스트레스의 평가

(1) 과산화지질의 억제효과

활성산소의 공격에 따라 세포막의 지질성분이 과산화반응에 의하여 생성되는 말론디알데히드 (MDA)를 측정하여 과산화지질 (LPO)의 함량을 계산하여 비교한다. 이 LPO는 강력한 세포독성으로 작용하기 때문에 성인병의 발병지표 및 노화과정의 진행지표로서 널리 사용되고 있다.

신장획분중의 LPO 생성에 미치는 다시마 추출물 (Dasi-Ex) 및 후코이단 (Fuco-I, II, III)의 투여효과를 분석하여 평가하여 보면 Table 4와 같다. Table 4에서 보는 바와 같이 신장 mitochondria나 microsome분획중의 LPO의 생성이 Fucoidan-II 및 Fucoidan-III의 투여부터 각각 15% 및 15~25%정도의 효과적인 억제효과

Table 3. Effects of sea tangle and fucoidan on superoxide dismutase (SOD) activity of kidney membranes in SD rats for 45 days

Groups	Superoxide dismutase activity (unit/mg protein)					
	Mitochondria		Microsome		Cytosol	
Control	9.84 ± 0.83*	–	6.59 ± 0.68	–	7.03 ± 0.84	–
Dasi-Ex	9.92 ± 0.73	(100.8%)**	8.05 ± 0.72[b]	(122.2%)	8.03 ± 0.84[a]	(114.2%)
Fuco-I	10.63 ± 0.65	(108.0%)	9.16 ± 0.88[c]	(139.0%)	8.55 ± 0.71[b]	(121.6%)
Fuco-II	11.38 ± 0.72[a]	(115.7%)	9.18 ± 0.81[c]	(139.3%)	8.47 ± 0.76[b]	(120.5%)
Fuco-III	13.38 ± 0.68[c]	(136.0%)	9.29 ± 0.52[c]	(141.0%)	8.83 ± 0.83[c]	(125.6%)

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 mice per group; **Percent of control values; [a]p<0.05; [b]p<0.01; [c]p<0.001 compared with control group.

가 나타나서 후코이단의 첨가가 LPO의 생성을 효과적으로 억제한다는 사실이 인정되었다.

5. 세포막 유동성의 평가

후코이단의 투여가 신장 세포막의 유동성에 어떤 영향을 미칠 수 있을까? 다시마 추출물(Dasi-Ex) 및 후코이단(Fuco-I, II, III) 투여가 신장 mitochondria 및 microsome중의 세포막 유동성에 미치는 영향을 비교하여 보면 Table 5와 같다.

Table 5에서 보는 바와 같이 mitochondria획분중의 세포막 유동성을 비교하여 보면 Dasi-Ex 및 Fuco-I, II, III 투여그룹의 유동성은 각각 8.53 ± 0.28, 9.24 ± 0.51, 9.57 ± 0.61, 9.11 ± 0.45%로서 대조그룹의 유동성(7.16 ± 0.32%: 100%) 대비 20~35%의 유의적인 유동성의 증가효과가 인정되었다. Fuco-I, II, III 투여그룹의 유동성은 Dasi-Ex의 유동성 대비 거의 2배의 현저한 증가효과가 인정되었다. 또한 신장 microsome분획의 세포막 유동성은 Dasi-Ex 및 Fuco-I, II, III 투여그룹의 유동성은 각각 1.95 ± 0.11, 2.00 ± 0.24, 2.03 ± 0.15, 2.05 ± 0.14%로서 대조그룹의 유동성(1.66 ± 0.31%: 100%) 대비 각각 117.5%, 120.5%, 122.3%, 123.5%로서 약 17~24%의 유의적인 유동성의 증가효과가 인정되었다. 따라서 후코이단의 투여가 세포막 유동성을 매우 효과적으로 증가시킬 것으로 기대된다.

Table 4. Effects of sea tangle and fucoidan on lipid peroxide (LPO) levels of kidney membranes in SD rats for 45 days

Groups	LPO levels (nmol/mg protein)			
	Mitochondria		Microsome	
Control	4.48 ± 0.27*	–	2.29 ± 0.07*	–
Dasi-Ex	4.17 ± 0.30	(93.1%)**	2.09 ± 0.07	(91.3%)
Fucoidan-I	4.13 ± 0.13	(92.2%)	2.16 ± 0.08	(94.3%)
Fucoidan-II	3.96 ± 0.15[a]	(88.4%)	2.03 ± 0.05[a]	(88.7%)
Fucoidan-III	3.97 ± 0.12[a]	(88.6%)	1.78 ± 0.12[b]	(77.7%)

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 mice per group; **Percent of control values; [a]p<0.05; [b]p<0.001 compared with control group.

Table 5. Effects of sea tangle and fucoidan on membrane fluidity of kidney membranes in SD rats for 45 days

Groups	Membrane fluidity (% polarization)			
	Mitochondria		Microsome	
Control	7.16 ± 0.32*	–	1.66 ± 0.31*	–
Dasi-Ex	8.53 ± 0.28[c]	(119.1%)**	1.95 ± 0.11[a]	(117.5%)**
Fuco-I	9.24 ± 0.51[c]	(129.1%)	2.00 ± 0.24[a]	(120.5%)**
Fuco-II	9.57 ± 0.61[c]	(133.7%)	2.03 ± 0.15[b]	(122.3%)**
Fuco-III	9.11 ± 0.45[c]	(127.2%)	2.05 ± 0.14[b]	(123.5%)**

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 mice per group; **Percent of control values; [a]p<0.05; [b]p<0.01; [c]p<0.001 compared with control group.

요 약

다시마(*Laminaria japonica*) 추출물 건조분말 4.0% 첨가사료(Dasi-Ex)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 투여그룹의 신장 mitochondria 및 microsome의 ·OH의 생성은 대조그룹 대비 각각 10~15% 및 15~30%의 유의적인 억제효과가 인정되었다. Dasi-Ex 및 Fuco-I, II, III 투여그룹의 신장 microsome의 H_2O_2의 생성도 대조그룹 대비 10~15%의 유의적인 억제효과가 인정되었다. 따라서 신장의 ·OH 및 H_2O_2의 생성 억제효과는 다시마 추출물보다는 후코이단의 투여가 효과적일 뿐만 아니라 후코이단 첨가량에 따른 용량 의존성도 인정되었다.

신장 mitochondria에서 Dasi-Ex 및 Fuco-I 투여그룹의 BOR 생성은 전혀 유의적인 효과가 인정할 수 없었지만, Fuco-II 및 III 투여그룹의 BOR 생성은 12~16%의 유의적인 억제효과가 인정되었다. 신장 microsome에서는 Dasi-Ex 및 Fuco-I, II, III 투여그룹의 BOR의 생성이 12~25%의 유의적인 억제효과가 인정되었을 뿐만 아니라 후코이단의 첨가량에 따른 용량 의존성이 인정되었다. 또한 신장 mitochondria에서 Dasi-Ex 투여그룹의 IOR의 생성은 유의적인 억제효과가 인정할 수 없었지만, Fuco-I, II, III 투여그룹의 IOR 생성은 10~15%의 유의적인 억제효과가 인정되었다. 신장 microsome에서는 Fuco-II 및 III 투여그룹만이 13~14%의 유의적인 IOR의 생성 억제효과가 인정되었다. 신장 mitochondria 및 microsome분획중의 LPO의 생성은 Fuco-II, III의 투여부터 각각 15% 및 15~25%정도의 효과적인 억제효과가 인정되었다. mitochondria획분에서 Dasi-Ex 및 Fuco-I, II, III 투여그룹의 유동성은 대조그룹의 유동성 대비 20~35%의 유의적인 유동성의 증가효과가 인정되었다. microsome분획에서 Dasi-Ex 및 Fuco-I, II, III 투여그룹의 유동성은 대조그룹 대비 17~24%의 유의적인 증가효과가 인정되었다.

따라서 다시마 추출물(Dasi-Ex) 단독 투여보다 후코이단(Fuco-I, II, III)의 투여가 생체 방어효소의 활성을 촉진할 뿐만 아니라 활성산소의 공격으로부터 신장의 기능을 효과적으로 보호할 수 있을 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

Bernardi, G. and G.F. Springer, 1962. Properties of highly purified Fucan. J. Biol. Chem., 273, 75~81.

Chan, P.C. and B.H.T. Bielski, 1974. Enzyme catalyzed free radical reactions with nicotinamide adenine nucleotide. Chem. J. Biol. 249, 1317~1320.

Choi, J.H., D.I. Kim, S.H. Park, D.W. Kim, J.S. Lee, J.H. Ryu and Y. S. Chung, 1999a. Effects of sea tangle (*Laminaria japonica*) and fucoidan components on chronic degenerative diseases. Kor. J. Life Sci., 9 (4), 430~438 (in Korean).

Choi, J.H., D.I. Kim, S.H. Park, D.W. Kim, J.S. Lee, J.H. Ryu, and Y. S. Chung, 1999b. Effects of sea tangle (*Laminaria japonica*)

and fucoidan components on anti-aging action. Kor. J. Life Sci., 9 (4), 439~452 (in Korean).

Choi, J.H. and B.P. Yu. 1996. Dietary restriction as a modulator of age-related changes in prostaglandin biosynthseis in rat kidney microsomes. Kor. J. Gerontol. 6 (2) 22~27 (in Korean).

Choi, J.H. and B.P. Yu. 1997. Anti-peroxidative action of dietary restriction on serum lipids and their fatty acids. Kor. J. Gerontol. 7 (1), 25~30 (in Korean).

Choi, J.H. and B.P. Yu. 1989. The effect of food restriction on kidney membrane structures of aging rats. Age 12, 133~136.

Choi, J.H. and B.P. Yu. 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 (in Korean).

Choi, J.H. 1991. Modulation of the aging process by food restriction. J. Kor. Soc. Food Nutr., 20 (2), 187~196 (in Korean).

Choi, J.H. and B.P. Yu. 1994. Studies on age-related physiological changes in brain of senescence accelerated mouse (SAM). Kor. J. Gerontol., 4 (2), 61~70 (in Korean).

Choi, J.H. and B.P. Yu. 1995. Brain synaptosomal aging : Free radicals and membrane fluidity. Free Rad. Biol. & Med. 18 (2), 133~139.

Choi, J.H., J.I. Kim, K.W. Kim, Y.S. Moon, H.Y. Chung and B.P. Yu. 1996. Analysis of lipid composition and hydroxyl radicals in brain membranes of senescence-accelerated mice. Age, 19, 1~5.

Choi, J.H. and B.P. Yu. 1998. The effects of dietary restriction on age-related changes in rat serum prostaglandins. J. Nutr. Health & Aging 2 (3). 451~455.

Choi, J.H. and B.P. Yu. 1998. Dietary restriction as a modulator of age-related changes in rat kidney prostagladin production. J. Nutr. Health & Aging 2 (3). 456~460.

Choi, J.H., D.W. Kim. and B.P. Yu. 1998. Modulation of age-related alterations of iron, ferritin, and lipid peroxidation in rat brain synaptosomes. J. Nutr. Health & Aging 2 (3), 461~465.

Choi, J.H. and B.P. Yu. 1999. The effects of dietary restriction on age-related changes in rat serum prostaglandins. Age & Nutrition 10 (1), 47~51.

Halliwell, B. and J.M.C. Gutteridge. 1981. Formation of a thiobarbituric acidreactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts. FEBS. Lett., 128, 347~350.

Ito, H. and M. Sugiura. 1976. Antitumor polysaccharide fraction from *Sargassum thumbergii*. Chem. Pharm. Biull. 24, 114~118.

Lebel, C.P., I.N. Odunze. A. Jr and S.C. Bondy. 1989. Perturbations in cerebral oxygen radical formation and membrane order following vitamin E deficiency. Biochem. & Biophysic, Res. Com. 163 (2), 860~866.

Lowry, O.H., N.J. Roseborough, L.A. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin-phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265~275.

Nakazawa, Y., H. Kuroda, F. Abe, T. Nishino, M. Otsuki and I. Umezaki. 1974. Antitumor effect of water-extracts from marine algae (I). Chemotherapy 22, 1435~1440.

Oyanagui, Y. 1984 Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. Anal, Biochem., 42, 290~296.

Steel, R.G.D. and J.H. Torrie. 1960. Principles and procedures of statistics. McGrawhill, New York.

Thurman, R.G., H.G. Ley and R. Scholz. 1972 Hepatic microsomal ethanol oxidation. Eur. J. Biochem., 25, 420~430.

Yagi, K. 1987. Lipid peroxides and human diseases. Chemistry and Physics of Lipids, 45, 337~351.

Yamamoto, I., T. Nagumo, M. Takahasi, M. Fujihara, Y. Suzuki and I. Iizima. 1981. Antitumor effect of seaweeds III. Antitumor effects of an extract from *Sargassum kjellmanianum*. J. Exp. Med., 51, 187~192.

Yu, B.P., D.W. Lee, C.G. Marler and J.H. Choi. 1990. Mechanism of food restriction: Protection of cellular homeostasis. Soc. Exp. Biol. Med. 193, 13~15.

Yu, B.P. 1996. Aging and oxidative stress: Modulation by dietary restriction. Free Rad. Biol. Med., 21, 651~668.

Yu, B.P. and R. Yang. 1996. Critical evaluation of free radical theory of aging: A proposal of oxidative stress hypothesis. Ann. N. Y. Acad. Sci. 786: 1~11.

Usui, T., K. Asari and T. Mizuno. 1980. Isolation of highly fucoidan from *Eisenia bicyclis* and its anticoagulant and antitumor activities. Agric. Biol. Chem., 44, 1965~1970.

1999년 8월 7일 접수
1999년 10월 29일 수리