J. Fd Hyg. Safety 14(2), 153-159 (1999)

수산자원으로부터 Human Low Density Lipoprotein (LDL)에 대한 항산화제의 탐색

류병호
경성대학교 식품공학과

Screening of Antioxidants to Human Low Density Lipoprotein (LDL) from Marine Resources

Beung Ho Ryu
Department of Food Science and Biotechnology Kyungsung University, Pusan 608-736 Korea

ABSTRACT – This study was undertaken to evaluate antioxidative activities of substances isolated from marine resources against human low density lipoprotein (LDL). Methanol-water extract (80 : 20, v/v) of *Sargassum ringgoldianum* had the highest antioxidant activity and the active substance was purified by silica gel column chromatography by eluting chlorform : methanol mixture (80 : 20, v/v). The active fraction was seperated to several spots on the TLC in chloroform : methanol (10 : 1, v/v) mixture. Antioxidative activity of band 4 of fraction 2 on TLC was highest than that of α-tocopherol against human LDL oxidation by the method of thiobarbituric acid reactive substance (TBARS). The band 4 of fraction 2 inhibited the copper mediated oxidation of human LDL with almost completely at 1 or 2 mg/ml.

Key word ☐ Low density lipoprotein, Antioxidants, TBARS

서 론

순환기계 질환은 미국과 서유럽에서 사망 원인의 제 1위를 차지할 만큼 사망의 주 요인이 된다. 우리 나라도 식생활이 서구화되면서 동맥경화, 심근경색, 심장마비, 뇌졸증 및 말초 혈관계 질환 등 심맥관계 질환이 날로 증가하고 있어 이를 예방하려면 이의 원인으로 알려진 혈관계의 LDL의 산화로 인한 cholesteryl ester로 변하는 지방층(fatty streak)의 축적을 막아야 한다.[1] 지방중의 LDL은 혈액 내에서 cholesterol ester의 운반체로서 그 조성은 3~5% triacylglyceride, 40~44% cholesteryl ester, 20~24% phospholipid, 9~10% cholesterol 및 20~26% apolipoprotein으로 구성되어 있다.[2]. LDL이 산화되어 동맥경화 등의 성인병이 일어난다는 것은 이미 알려진 사실이다.[3,4] LDL이 금속이온, macrophage 등에 의하여 산화되면 cholesteryl ester가 증가하여 유해산소, 자유기 및 과산화물이 생성되어 동맥경화 등을 유발한다.[2,3] 동맥경화의 첫단계는 과산화지질과 cholesterol이 macrophage 및 동맥의 내피 세포에 축적되어 거대 거품세포(foam cells)가 형성되며 이 과정에서 이들 일부 세포는 사멸되고, 이 거대한 거품세포가 점차 많아지면서 지방층(fatty streak)이 동맥 주위에 쌓여 동맥경화가 일어나게 된다.[5-7] 최근에 와서 이 거품세포의 생성 원인은 연구자들에 의해 밝혀졌는데 지방층중 산화 LDL이 원흉물질로 알려졌다.[8,9] 산화 LDL은 aldehyde 등의 지질 과산화물이 생성되고, 세포조직에 확산되어 독성을 나타낸다. 산화 LDL은 생리활성 물질을 분해하고, 내피세포에 염증을 일으켜 혈전 및 칼슘 침착으로 결국에는 동맥경화를 유발하게 된다. 동맥의 주요한 세포인 내피세포, 평활근 세포 및 macrophage에 금속 이온의 존재 하에서 배양하면 LDL이 산화된다.[9-11] 이 과정에서 항산화제인 α-tocopherol, β-carotene 혹은 flavonoids를 첨가하면 LDL의 산화가 억제된다.[12-15]

본 연구에서는 LDL의 산화로 인한 동맥경화를 예방할 목적으로 수산자원인 식용 해조류로부터 사람 LDL에 대한 항산화 활성이 있는 물질을 탐색하였다.

재료 및 방법

본 연구에서 항산화제 추출에 사용한 재료는 미역(*Undaria pinnatifida*), 넓미역(*Undaria peterseniana*), 곰피(*Ecklonia cava*), 다시마(*Laminaria japonica*), 감태(*Ecklonia stolonif-*

era), 모자반 (*Sargassum frivellum*), 방사무늬김(*Porphyra yeoensis*), 김(*Porphyra tenera*), 고리메(*Scytosiphon lomemtaria*), 지충이(*Sargassum thunbergii*), 톳(*Hizikia fusiformis*), 파래(*Enteromorpha compressa*), 잎파래(*Enteromorpha crinita*), 구멍쇠파래(*Ulva pertusa*), 구멍쇠미역(*Agarum cribrosum*), 큰잎모자반(*Sargassum ringgoldianum*), 셀반모자반(*Sargassum miyabei*), 지충이(*Sargassum thunbergii*), 둥우리서실(*Chondria nidifica*), 지누라이(*Grateloupia filicina*), 우뭇가사리(*Gelidium amansii*), 실우뭇가사리(*Gelidium pusillum*), 주름진두발(*Chondrus crispus*), 참빗풀(*Odonthalia corymbifera*), 산말(*Desmarestia ligulata*) 이였다. 이들 시료는 신선한 물로 씻은 후 진공동결 건조기에서 건조시킨 후 -20°C의 냉동실에 보관하여 두고 사용하였다.

항산화 물질의 추출 및 분리

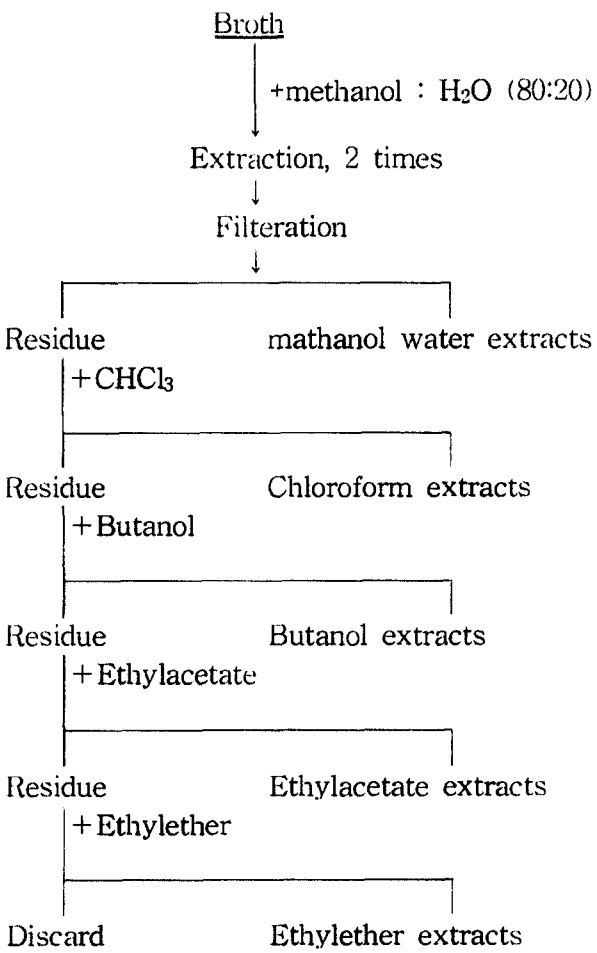

Fig. 1. Preparation of several extracts obtained from marine resources by solvent partitioning.

시료를 각각 100 g씩 취하여 삼각 플라스크에 넣고 methanol-H_2O용액(80 : 20 v/v) 2,000 m*l*를 가한 후 24시간 동안 추출 한 다음 원심 분리한 후 얻은 추출액을 진공 동결시켜 메타놀 추출액을 얻었다. 남아있는 잔사에 chloroform, butanol, ethylacetate 및 diethylether의 순으로 각각 1,000 m*l* 씩 넣어 교반하면서 추출한 후 여과하여 얻은 각 추출액을 진공 농축시켜 dimethylsulfoxide(DMSO)에 각각 1 mg/m*l*씩 녹여 항산화 활성의 측정에 사용하였다(Fig. 1).

추출액 중 항산화 성분의 분리 정제

위의 용매로 추출한 각 추출액 중 활성이 우수한 것을 chloroform에 녹여 다음과 같은 방법으로 항산화활성 성분을 정제하였다. 즉, 활성화된 silica gel(0.063~0.1 mm, 70~270 mesh, Merck Co.)을 chromatography용 column (column, 8 cm×100 cmcm)에 충진한 후 각 시료를 적용하고 chloroform, chloroform : methanol(80 : 20 v/v), chloroform : methanol(50 : 50), cholorofrom : methanol(80 : 20) 및 methanol 등의 전개용매로 단계별로 용출하였다. 이때 얻은 각 분획물을 감압 농축하고 각 분획에 대해 항산화 효과를 측정하였다(Fig. 2).

항산화 활성의 측정

각종 해조류의 methanol : H_2O (80 : 20 v/v)층을 soybean oil 또는 Lard에 고형물 기준으로 일정량 첨가하여 Rancimat test로 항산화력을 비교하였다.[16] Methanol : H_2O(70 : 20 v/v)의 분획물을 대두유와 돈지에 각각 0.5%씩 (w/w)첨가하고 이 시료를 200 m*l* 비커에 100 g씩 넣은 다음 차광된 60°C의 oven에서 보관하면서 경시적으로 일정량을 채취하여 과산화물값(POV)을 측정하였다. 이때 대조 시험구로서 분획물을 첨가하지 않은 실험구의 유도기간도 동일한 방법으로 측정하였다. 자동산화 유도기간은 POV가 100 meq/kg oil이 되는 시점으로 하였으며, 자동산화 유도기간의 항산화 상대효과(relative antioxidant effectiveness;

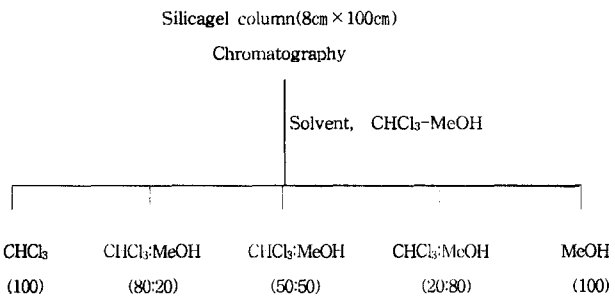

Fig. 2. Fractionation of various solvent extracts obtained from marine resources.

RAE)는 대조 시험구의 유도기간으로 나누어 계산하였다.

Thiocyanate법

항산화 효과를 측정하기 위하여 linoleic acid(25 mg/ml ethanol용액), NH_4SCN (0.39 g/ml 수용액), ferrous chloride(2.5 mg/ml 3.5% 염산용액)를 인산 완충용액(5×10-2 M $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 및 5×10^{-2} M $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)에 혼합하여 pH 7.0으로 조절한 후 각 시료 200ul in EtOH를 시험관(1.5×4.3 cm)에 넣고 linoleic acid용액(200 ul), 인산완충용액(200 ul)으로서 어두운 곳에서 40°C에서 방치한 다음 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

1, 1-Diphenyl 2-picryl hydrazyl(DPPH)법

소정농도의 각 시료(1 mg/ml) 100~200 μl에 100 μM DPPH 에타놀용액 3.0 ml를 각각 넣고 완전히 교반한 다음 10분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군에 대한 흡광도의 감소치를 DPPH radical의 소거 활성으로하여 항산화 활성을 나타내었다.[17]

Human LDL의 분리 및 Cell lines의 분리 및 배양

사람 Low Density Lipoprotein(LDL)의 분리 - 건강한 남자의 혈액 50 ml을 1 mg/ml EDTA을 함유한 plastic 시험관에 넣어 교반한 후 4°C에서 3시간 방치하였다. 혈액 속의 plasma는 상온에서 20분 동안 원심분리 (2000×g)한 다음 gentamicin sulfate (1 mg/25 ml)을 첨가하였다. LDL (d. 1.019~1.063 g/ml)은 초고속 원심분리기(46,000×g)로 24시간 동안 분리하여 얻었다. 분리된 LDL은 0.15 M NaCl, 0.01% EDTA가 함유된 0.01 M phosphate buffer (pH 7.4)로서 16~20시간 투석하였다.[18]

LDL의 Cu^{2+}에 의한 산화

Copper mediated 산화 - LDL(100 μg/ml)를 1~5 μM $CuSO_4$를 함유한 phosphate buffer saline(PBS)에 적당한 농도를 첨가하여 5% CO_2 존재 하에서 37°C에서 24시간 배양하여 LDL의 산화를 측정하였다. 별도로 대조군은 이 배양액에 시료를 첨가하지 않은 조건에서 배양하였다.[19]

Thiobarbituric acid reacting substances(TBARS)의 측정

LDL의 산화는 TBARS로 측정하였다. 100 μg protein/ml LDL이 함유된 배양 혼합액 0.5 ml에 20% TCA 1.5 ml를 가한 다음 여기에 0.05 M NaOH에 0.67% TBA 1.5 ml을 넣어 섞은 후 그 반응 혼합액을 90°C 수욕상에서 45분간 끓였다. 시료를 10분간 원심분리(2,000×g)한 다음 상등액의 형광 광도를 Perkin-Elmer fluorescence spectrophotometer (Model 650-10S)로서 510 및 553 nm 에서 측정하였다. 시료 중의 TBARS의 수는 malondialdehyde (MDA)로서 만들어진 MDA의 표준곡선으로 부터 MDA의 nmole로서 나타내었다.[20]

단백질의 정량

LDL의 단백질의 정량은 Lowry 등의 방법[21]에 따라 측정하였다.

결과 및 고찰

유기용매 추출물의 항산화력

해조류 중 옛날부터 먹어왔거나 건강에 좋다고 알려진 것을 대상으로 하여 항산화활성을 검색한 결과를 Table 1에 나타내었다. 각종 해조류를 methanol-H_2O(80 : 20)로 추출한 후 1 mg/ml씩을 soybean oil과 lard에 첨가하여 항산화력을 측정하였다.

Table 1에서 보는 바와 같이 soybean oil를 기질로 하여 항산화 활성을 측정한 결과 항산화 상대효과(relative

Table 1. Antioxidative activity of methanol-H_2O(80 : 20)fraction extracted from various Korean marine resources

Korean name	Scientific name	RAE	
		Soybean oil	Lard
다시마	*Laminaria sinclairii*	1.29	1.83
미역	*Undaria pinnatifida*	1.31	1.80
곰피	*Ecklonea stolonifera*	1.30	1.79
넓미역	*Undaria peterseniana*	1.24	1.68
구멍쇠미역	*Agarum cribrosum*	1.17	1.14
방사무늬김	*Porphyra yeoensis*	1.07	1.23
톳	*Hizikia fusiformis*	1.08	1.30
실파래	*Enteromorpha crinita*	1.08	1.04
잎파래	*Enteromorpha linza*	1.31	1.78
구멍쇠파래	*Ulva pertusa*	1.14	1.03
고리매	*Scytosiphon lomemtaria*	1.05	1.24
큰잎모자반	*Sargassum ringgoldianum*	1.30	1.40
쉘만모자반	*Sargassum miyabei*	1.16	1.03
지충이	*Sargassum thunbergii*	1.05	1.10
둥우리서실	*Chondria nidifica*	1.26	1.02
지누아리	*Grateloupia filicina*	1.04	1.80
우뭇가사리	*Gelidium amansii*	1.02	1.14
실우무가사리	*Gelidium pusillum*	1.08	1.05
주름진두발	*Chondrus crispus*	1.16	1.12
참빗풀	*Odonthalia couymbifera*	1.28	1.43
산말	*Desmarestia ligulata*	1.09	1.20

Relative Antioxidant Effective(RAE) (A.I.; Induction period of oil containing marine algae extracts divided by induction period of control oil).

antioxidant effectiveness ; RAE)는 다시마 1.29, 곰피 1.30, 넓미역 1.24, 잎파래 1.31, 큰잎모자반 1.30 및 참빗풀 1.28 등으로 다른 해조류보다 비교적 항산화력이 높았다. Lard를 기질로 하여 항산화력을 측정한 결과 RAE는 다시마 1.83, 넓미역 1.68, 잎파래 1.78, 큰잎모자반 1.40 및 참빗풀 1.80 등이 높았다. 그러나 모든 해조류는 soybean oil이나 lard에 대하여 약간의 항산화 활성을

나타내어 각종 해조류에는 항산화 성분들이 들어 있음을 알 수 있었다. 그 중에서도 다시마, 미역, 넓미역, 잎파래, 큰잎모자반 및 참빗풀 등은 다른 해조류에 비하여 높은 항산화 활성을 나타내었다.

DPPH법에 의한 항산화 활성의 측정

각종 해조류의 항산화 활성이 있는 성분을 분리정제 하기 위하여 methanol-H_2O, chloroform, butanol ethylacetate 및 diethylether 등을 사용하여 추출한 다음 DPPH 시약에 의한 자유 라디칼 소거 활성을 측정하였다. 해조류를 각종 유기용매로 추출한 후 감압농축한 다음 최종농도를 1mg/ml으로 만들어 항산화 활성을 측정한 결과 Table 2와 같다. 각종 해조류중 methanol-H_2O 획분의 항산화 활성을 보면 다시마 0.023, 곰피 0.030, 넓미역 0.031, 잎파래 0.036, 큰잎모자반 0.023 및 참빗풀 0.040으로 항산활성이 높았다. Ethylacetate 획분에서는 다시마 0.028, 미역 0.040, 곰피 0.037, 넓미역 0.036, 잎파래 0.030, 큰잎모자반 0.027 및 참빗풀 0.043 등이 역시 항산화 활성이 높았다. 그러나 chloroform 및 butanol 획분에서는 높은 활성은 찾아 볼 수 없었다. 현재 사용되고 있는 항산화제인 BHA 및 BHT와 비교해 본 결과 해조류의 methanol 분획물은 비슷한 항산화 활성을 나타내거나 우수한 것으로 나타내었고, α-tocopherol 보다는 약간 높은 활성이 있음을 알 수 있었다.

큰잎모자반의 항산화 물질의 분리 및 항산화 활성

각종 해조류를 이용한 항산화 활성의 실험 결과에서 큰잎모자반이 항산화력이 좋았으므로 4종의 해조류 중 큰잎모자반에 대한 silica gel column chromatography로 유기용매 획분에 대한 실험을 하였다.

먼저 큰잎모자반 100 g에 2,000 ml methanol-H_2O(80 : 20)을 넣은 후 추출하여 감압 농축한 다음 Fig. 2와 같은 방법으로 silica gel를 충진한 column(8 cm×100 cm)에 넣은 다음 chloroform : methanol의 비율을 획분별로 각각

Table 2 Scavenging effects of several solvent fractions extracted from marine algae by DPPH method

Korean name	Scientific name	Antioxidative activity of fractions (O.D. 517nm)				
		Methanol+H_2O	$CHCl_3$	n-Butanol	EtOAc	Ethylether
다시마	*Laminaria sinclairii*	0.023	0.094	0.120	0.028	0.050
미역	*Undaria pinnatifida*	0.038	0.097	0.098	0.040	0.047
곰피	*Ecklonea stolonifera*	0.030	0.086	0.093	0.037	0.048
넓미역	*Undaria peterseniana*	0.031	0.073	0.063	0.036	0.060
구멍쇠미역	*Agarum cribrosum*	0.078	0.094	0.120	0.074	0.052
방사무늬김	*Porphyra yeoensis*	0.068	0.102	0.143	0.080	0.083
톳	*Hizikia fusiformis*	0.032	0.083	0.060	0.035	0.044
실파래	*Enteromorpha crinita*	0.079	0.084	0.077	0.068	0.060
잎파래	*Enteromorpha linga*	0.036	0.100	0.093	0.030	0.072
구멍갈파래	*Ulva pertusa*	0.108	0.126	0.103	0.097	0.091
고리매	*Scytosiphon lomemtaria*	0.121	0.203	0.094	0.088	0.104
큰잎모자반	*Sargassum ringgoldianum*	0.023	0.073	0.061	0.027	0.053
쉘만모자반	*Sargassum miyabei*	0.054	0.082	0.080	0.049	0.060
지충이	*Sargassum thunbergii*	0.123	0.130	0.090	0.096	0.082
둥우리서실	*Chondria nidifica*	0.094	0.108	0.087	0.105	0.120
지누라이	*Grateloupia filicina*	0.083	0.090	0.104	0.092	0.108
우뭇가사리	*Gelidium amansii*	0.083	0.106	0.126	0.100	0.154
실우무가사리	*Gelidium pusillum*	0.140	0.124	0.130	0.103	0.137
주름진두발	*Chondrus crispus*	0.130	0.106	0.143	0.097	0.088
참빗풀	*Odonthalia couymbifera*	0.040	0.067	0.088	0.043	0.020
산말	*Desmarestia lihulata*	0.108	0.114	0.097	0.099	0.079
Control antioxidants	α - tocopherol	0.029				
	BHA	0.022				
	BHT	0.024				

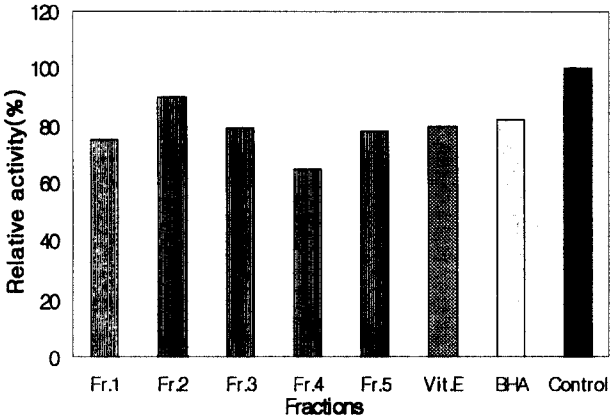

Fig. 3. Antioxidative activity of the various fractions of Sa-*rgassum riggoldianum* by silica gel column chromatography with chloroform and methanol ratio.
Fr. 1 ,$CHCl_3$: MeOH(100:0), Fr. 2, $CHCl_3$: MeOH (80:20), Fr. 3, $CHCl_3$: MeOH (50 : 50) Fr. 4, $CHCl_3$: MeOH (20:80), Fr. 5, $CHCl_3$: MeOH (0:100). All fractions are eluted with 200 ml mixed solvents of chloroform and enthanol.

Fraction 1 (100 : 10), Fraction 2 (80 : 20), Fraction 3 (50 : 50), Fraction 4 (20 : 80) 및 Fraction 5 (0 : 100)의 획분을 얻어 항산화 활성이 우수한 획분만 포집하여 농축하였다. Fig. 3은 각종 용매 비율로 분획 농축한 각 획분을 thiocyanate법으로 측정한 결과로서 Fraction 2가 항산화 활성이 있는 비극성의 성분임을 알 수 있었다. 따라서 분 연구에서는 큰잎모자반의 methanol : H_2O분획 중 Fraction 2를 silica gel을 입힌 TLC에 chlorofrom : methanol (10 :1)의 혼합용매로 전개한 결과 5개의 band가 나타났다. TLC에 나타난 5개의 band를 각각 긁어모아 다시 thiocyanate법으로 항산화 활성을 측정한 결과 band 4가 활성이 가장 높았다(Fig. 4).

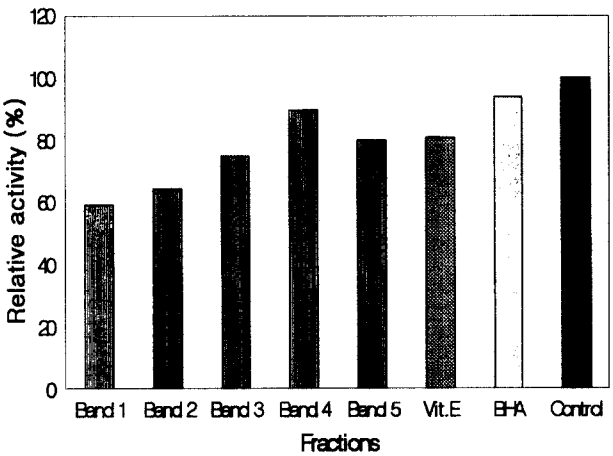

Fig 4. Antioxidative activity of band 1, 2, 3, 4 and 5 obtained from Fraction 4 of *Sagassum riggoldianum* by TLC and its comparison with Vit. E, BHA and BHT.

Human LDL에 대한 항산화 활성

Fig. 5에서 보는 바와 같이 Fraction 2의 band 4를 농도별 항산화 효과를 알아보기 위하여 LDL(100 μl/ml)에 band 4의 농도를 1 mg 및 2 mg/ml의 농도로 조절하여 5 M $CuSO_4$의 존재 하에서 37°C에서 18시간 동안 배양한 결과 LDL의 산화억제 효과를 나타내었다. 인위적으로 LDL을 산화시키기 위하여 LDL에 5 μM $CuSO_4$을 첨가하여 37°C에서 18시간 배양한 후 TBARS를 측정한 결과 native LDL에서 3.68 nmole MDA/mg LDL, protein이였으나 5 μM $CuSO_4$로 산화시킨 대조군의 경우 24.00 nmole MDA/mg LDL, protein이였고, LDL+5 μM $CuSO_4$의 대조군에 1 mg 및 2 mg/ml 첨가한 경우 TBARS의 수치를 각각 6.20 및 4.20 nmole MDA/mg LDL, protein으로 LDL의 산화억제 효과가 좋았다.

Fig. 6에서 보는 바와 같이 Fraction 2 의 band 4의 LDL에 대한 Cu^{2+}유도 항산화 활성은 native LDL이 3.43 nmole MDA/mg LDL protein이었으나, LDL에 5 μm $CuSO_4$를 첨가시킨 대조군에서는 28.1 nmole MDA/mg LDL protein이었다.

Fraction 2의 band 4 시료를 1 mg/ml 및 2 mg/ml 씩 각각 첨가한 시험구에서는 각각 7.8 및 4.7 nmole MDA/mg LDL protein으로 용량 의존형의 항산화 효과를 나타내었다.

LDL의 인위적인 산화는 Cu^{2+}를 촉매로 이용하여 산화시

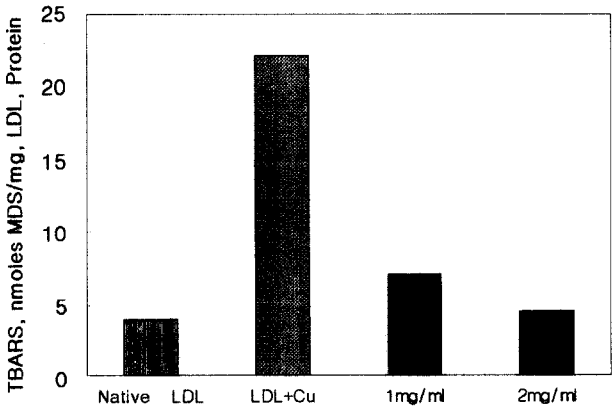

Fig. 5 Antioxidant effects of Band 4 of fraction 2 obtained from *Sargassum ringgoldianum* on the oxidation of LDL. 5 μM LDL (100 μg, protein/ml) was incubated for 18h at 37°C in the precence of 1 mg or 2 mg/ml Fraction 2 by the addition of 5 μM $CuSO_4$.

키면서 항산화제에 의한 효과를 측정하였다. LDL의 산화를 시키기 위하여 Cu^{2+}의 농도를 5 μM로 조절하는 것이 가장 타당하다는 보고에 따라 본 실험에서도 $CuSO_4$를 5 μM 농도로 조절하여 사용하였다.

감사의 말씀

본 논문은 보건복지부의 '97 보건의료기술연구개발사업의 지원과제로 이루어진 것으로 이에 깊이 감사드립니다.

국문요약

본 연구는 사람의 low density lipoprotein(LDL)의 산화에 대한 항산화 효과를 조사하기 위하여 각종 해조류로부터 유기용매로 추출하여 실험하였다. 각종 해조류중 항산화 활성이 우수한 큰잎모자반을 유기용매로 추출한 후 silica gel column chromatography로 분획한 결과 chloroform : methanol (80:20) 분획물이 항산화 활성이 높았다. 이 획분을 농축하여 TLC에 점적한 후 chloroform : methanol (10:1, v/v)로 전개하여 분리된 5개의 band 2 중에서 band 4가 항산화 활성이 α-tocopherol보다 높았다. 사람 LDL에 대한 $CuSO_4$유도 항산화 활성을 thiobarbituric acid reactive substance(TBARS)의 방법으로 측정한 결과 Band 4를 5 μM-$CuSO_4$ 존재하에서 LDL에 대한 항산화 활성을 실험한 결과 1 및 2 mg/ml 농도에서 항산화 효과가 우수하였다.

참고 문헌

1. Ross. R., The Pathogenesis of atherosclerosis: perspective for the 1990s, *Nature.*, **362**. 801-809 (1993).
2. Steinberg D., Parthasarathy S., Carew T. E., Khoo J. C., Witztum J. L., Beyond cholesterol. Modifications of low density lipoprotein that increases its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.*, **320**, 915-924 (1989).
3. Jessup, W., Dean, R. T., Whallet, C. V., The role of oxidative modification and antioxidants in LDL metabolism and atherosclerosis IN: Emerit, I., Parker, L., Auclair, C., eds. *Antioxidants in Therapy and preventive Medicine,* New York, plenum, **139** (1990).
4. Bruckdorfer K. R. Free radicals, lipid peroxidation and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.*, **1**, 529-535 (1990).
5. Roma P., Catapano AL., Bertulli, SM., Varesi L., Fumagalli R. and Bernini F. Oxidized LDL increase free cholesterol and fail to stimulate cholesterol esterification in murine macrophages. *Biochem. Biophys. Res.* **171**, 123-131 (1990).
6. Henriksen T., Mafoney EM., and Steinberg D. Enhanced macrophage degradation of biological modified low density lipoprotein. *Arteriosclerosis* **3**, 149-159 (1983).
7. Henriksen, T., Mahoney, E., Steinberg, D., Enhanced macrophage degradation of low density lipoportein previously incubated with cultured endothelial cells: Recognition by the receptor for acetylated low density lipoprotein. Proc. *Natl. Acad. Sci.*, USA, **78**, 6499-6503 (1981).
8. Greenspan, P., Ryu, B. H., Mao, F., Gutman, R, L., Association of negative charged phospholipids with low density lipoprotein (LDL) increases its take and the deposition of cholesteryl esters by macrophages. *Biochimica et Biophyusica Acta.* **1257**, 257-264 (1995).
9. Ryu, B. H., Mao, F, W., Lou, P., Gutman, R. L., Greenspan, P., Cholesteryl ester accumulation in macrophages treated with oxidized low density lipoprotein. *Biosci. Biotech Biochem*, **59**, 1619-1662 (1995).
10. Henriksen T., Mafoney EM., and Steinberg D., Enhanced macrophage degradation of biological modified low density lipoprotein. *Arteriosclerosis*, **3**, 149-159 (1983).
11. Esterbauer H., Puhl H., Dieber-Rotheneder M., Waeg G., Rabl H., Effect of antioxidants on oxidative modification of LDL. *Ann. Med.*, **23**, 573-581 (1991).
12. Esterbauer, H., Puhl, H., Dieber-Rotheneder, M., Waeg, G. and Rabl, H.:Effect of antioxidants on oxidative modification of LDL. *Ann. Med.*, **23**, 573-581 (1991).
13. Esterbauer, H., Puhl, H., Dieber-Rotheneder, M., Striegl, G. and Waeg, G.: Role of vitamin E in preventing the oxidation of low-density lipoprotein. *Am. J. Clin. Nutr.*, **53**, 314S-321S (1991).
14. Mao, S.J.T. and Yates, M.T.: Antioxidant activity of probucol and vitamin E (α-tocopherol) in plasma. *Artheriosclerosis* **9**, 751a, 1989(abstract).
15. Kaneda, T. and Ande, H.: Component lipids of purple laver and their antioxygenic activity. *Proc. Int. Seaweed Symp.*, **7**, 553-560 (1971).

16. Mitsuda, H., Yasumoto, K. and Iwami, K.: Antioxidative action of indole compounds during the antioxidation of linoleic acid. *Nutrition and Food (Japan)*, **19**, 60-65 (1966).
17. Blois, M.S.: Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, **4617**, 1198-1221 (1958).
18. Havel R.J., Eder, H.A. and Bragdon, J.H.: The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in guman serum. *J. Clin. Invest.*, **34**, 1345-1353 (1985)
19. Esterbauer, H., Striegl, G., Puhl, H. and Rotheneder, M.: Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Rad. Res. Commun.* **6**, 67-75 (1989).
20. Yagi, K. A., Simple fluornetric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem. Med.*, **15**, 212~216 (1976).
21. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randell, R.J.: Pretein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).