J. Fd Hyg. Safety 11(2), 83 - 87(1996)

녹차 카테킨류의 혈관장력 및 Ca^{2+}유입에 미치는 영향

안희열† · 이미애[1] · 윤여표[1]
†충북대학교 의과대학, [1]충북대학교 약학대학

The Effects of Green Tea Catechins on Vascular Smooth Muscle Tension and $^{45}Ca^{2+}$ Uptake

Hee-Yul Ahn†, Mi-Yae Lee[1] and Yeo-Pyo Yun[1]
†*College of Medicine and* [1]*College of Pharmacy,*
Chungbuk National University, Cheongju, 361-763, Korea

ABSTRACT — The objective of this study is to investigate the direct effects of green tea catechins(GTC) on vascular smooth muscle tension and $^{45}Ca^{2+}$ uptake in rat aorta. The methods used in this study are isometric tension measurements using physiograph, Lanthanum method for $^{45}Ca^{2+}$ (2 μCi/m*l*) uptake measurement in rat aorta. GTC modified tension induced by 40 mM KCl or 1 μM norepinephrine in rat aorta. Low concentrations of GTC(<0.5 mg/m*l*) increased tension by 40 mM KCl or 1 μM norepinephrine, individually. However, high concentrations of GTC(> 0.5 mg/m*l*) inhibited tension by 40 mM KCl or 1 μM norepinephrine, individually. GTC increased ^{45}Ca uptake induced by 40 mM KCl in a dose-dependent manner. From these results, GTC has the dual actions in vascular smooth muscle *in vitro*. Low concentrations of GTC augments tension by K or norepinephrine. However, high concentrations of GTC inhibits tension by K or norpeinephrine. GTC may have Ca^{2+} channel activation action, which may result in unphysiological vasodilation by Ca^{2+} overload in vascular smooth muscle.

Key words □ Green tea catechins(GTC), Vascular smooth muscle tension, $^{45}Ca^{2+}$ uptake, Rat aorta

녹차(Green tea)는 차나무(*Theae sinensis L.*, 차나무과)의 잎을 말린 것으로 최근 polyphenol 성분인 catechin의 혈압강하작용,[1] 항산화작용,[2] 혈소판 응집억제 작용[3] 등이 알려지면서 녹차가 단지 기호음료 뿐만이 아니라 심혈관계에 응용할 수 있는 약물로 주목받게 되었다.

녹차의 혈압강하작용의 기전으로는 angiotensin 변환효소 억제작용에 의한 것으로 알려져 있으나,[1] 혈관 장력에 대한 효과나 Ca^{2+} 이동에 관한 영향에 관하여는 아직 연구되어 있지 않다.

일반적으로 혈관의 장력은 탈분극과 같은 막의 전기적 흥분이나 또는 자극에 의한 교감신경 말단에서의 카테콜아민의 유리 및 아드레날린 수용체와의 결합에 의하여 시작된다. 이러한 일련의 자극에 의하여 혈관세포막외부에서 세포내부로 Ca^{2+}의 유입이 일어나며 이때 Ca^{2+}은 Ca^{2+} 통로를 통과하여 세포내에 진입하게 된다. 이렇게하여 증가된 Ca^{2+}은 calmodulin과의 결합, Ca^{2+}-calmodulin 복합체에 의한 myosin 인산화효소의 활성화 및 myosin의 인산화 그리고 actin과 myosin과의 상호작용에 의하여 혈관장력을 발생시키게 된다.[4,5] 임상적으로도 외부로부터 유입되는 Ca^{2+}을 억제함으로써 혈관의 장력을 억제하고 궁극적으로 혈압을 강하시키는 Ca^{2+} 통로 억제제인 Ca^{2+} 길항제는 현재 고혈압 치료의 중요한 위치를 차지하고 있다.

본 연구에서는 녹차추출물이 Ca^{2+} 길항제와 같은 약리작용이 있는 지를 알아보기 위하여 흰쥐의 대동맥을 재료로하여 장력, 방사성 Ca^{2+} 유입에 미치는 영향에 대하여 검토하였다.

재료 및 방법

흉대동맥 나선형 절편제작

체중 250~300 g의 건강한 숫컷 흰쥐(Sprague-Dawley)를 사용하였고, 두부를 강타하여 기절 시킨 후 경동맥을 절단하여 치사시켰다. 대동맥 표본의 제작은 영양액을 채운 샤

† Author to whom correspondence should be addressed.

알레내 에서 안과용 가위로 지방 및 결합조직을 제거한 후 약 2~3 mm의 폭으로 나선형 절편을 제작했다. 한편 endothelium-derived relaxing factor(EDRF)의 영향을 제거하기 위하여 가는 유리봉으로 내피세포 표면을 가볍게 문질렀다.[6]

영양액의 조제

정상영양액(Physiological Salt Solution, PSS)의 조성은 다음과 같다. NaCl 136.9, KCl 5.4, $NaHCO_3$ 23.8, glucose 5.5, $CaCl_2$ 1.5, $MgCl_2$ 1.0 (mM). 고농도 K액은 PSS에서 KCl과 NaCl을 각각 65.4 mM과 76.9 mM로 변환시키며 Ca^{2+} 제거액(Ca^{2+}-free solution)은 PSS 에서 $CaCl_2$를 제거한 후 2 mM EGTA를 첨가했다. 이들 용액은 37°C 에서 95% O_2와 5% CO_2의 혼합가스로 산소를 공급했다. 이때 용액의 pH는 7.4 이다.

혈관장력시험

용량 20 ml의 원주형 유리관(magnus chamber)안을 PSS로 채운 후, 각 표본의 한 끝을 실로 magnus chamber밑에 고정하고 다른 한 끝을 isometric transducer(Gould, USA)에 고정했다. 이때 발생하는 장력의 크기를 등척성으로 측정, 기록했다. 폭 2~3 mm, 길이 10 mm의 대동맥 나선형 절편에는 1 g의 정지장력을 부하했다. 이 시점으로 부터 실험을 시작하기 전 까지 약 1 시간 동안 근을 정치하여 평형상태가 되도록 했다. 실험은 우선 표본에 등장 65.4 mM KCl을 적용하여 기준이 되는 장력(K 수축)을 크기가 같아질 때까지 적용했다. 그 후 PSS로 세정한 후 등장 65.4 mM K, 0.1 μM norepinephrine을 적용하여 수축을 발생시키고 녹차 카테킨류의 억제작용을 관찰했다.[7]

방사성 $^{45}Ca^{2+}$ 유입시험

대동맥 조직에서의 $^{45}Ca^{2+}$ 유입량을 저온 란탄세정법(Lanthanum method)에 의하여 측정했다. 조직(5~10 mg)을 미리 평량한 후, 유리 holder에 실로 고정했다. 즉시 PSS에 incubation하여 37°C에서 60분 이상 평형시켰다. KCl로 탈분극 또는 norepinephrine으로 자극한 혈관조직을 방사성 칼슘 ($^{45}Ca^{2+}$, 2 μCi/ml)을 포함한 용액에 옮겼다. 그 후 조직을 0.5°C의 란탄세정액으로 30분간 세정했다. 란탄세정을 끝낸 조직을 scintillation vial에 넣어 20 mM EGTA를 1 cc 첨가하여 실온에서 하룻밤을 방치시킨 후 방사성 칼슘을 용출했다. 이 표본에 scintilltor(Beckman Ready-Solv, HP)를 2 ml 넣고 잘 섞은 후, 액체 scintillation counter(Beckman, USA)로 방사능을 측정하여 외액과의 비방사능을 계산했다. 이 값과 외액 칼슘량으로 부터 계산한 세포내의 칼슘량은 nmol/g wet weight로 표시하고 녹차 카테인류를 KCl이나 norepinephrine 투여 30분 전처치 함으로써 Ca^{2+} 채널억제작용을 확인하고 KCl이나 norepinephrine은 $^{45}Ca^{2+}$과 동시에 투여했다.[8]

결 과

흰쥐 대동맥혈관평활근의 장력에 미치는 영향

Fig. 1에서 보는 바와 같이 흰쥐의 대동맥표본에서 40 mM KCl은 탈분극을 발생시켜 수축을 야기한다. 수축이 안정상태에 도달 한 후 녹차 catechins를 0.1 mg/ml의 농도로 투여하면 수축의 증가가 관찰된다. 이때 농도를 0.5 mg/ml 로 증가시키면 억제되기 시작하여 1 mg/ml 농도에서 거의 완전히 억제 됨을 알 수 있다.

Norepinephrine에 의한 장력에 미치는 영향

1 μM NE 수축에 대한 녹차 catechins 효과는 0.25 mg/ml 농도에서 약간의 수축증가에 이은 억제가 관찰되며 1 mg/

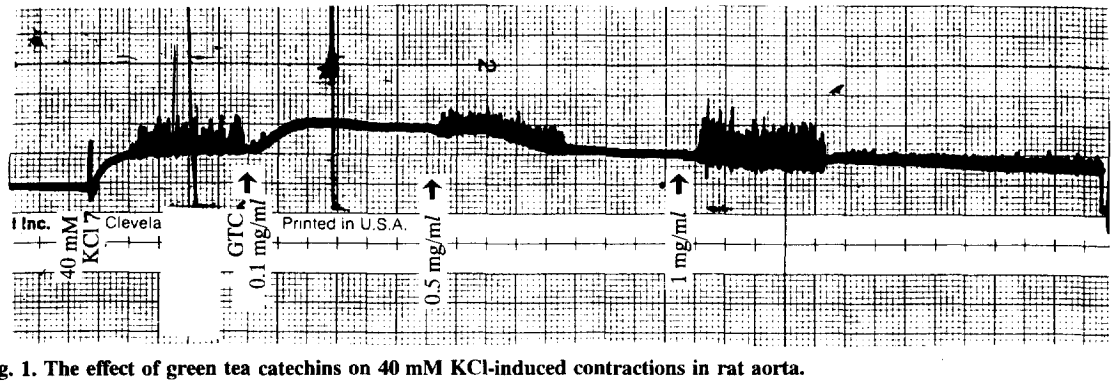

Fig. 1. The effect of green tea catechins on 40 mM KCl-induced contractions in rat aorta.

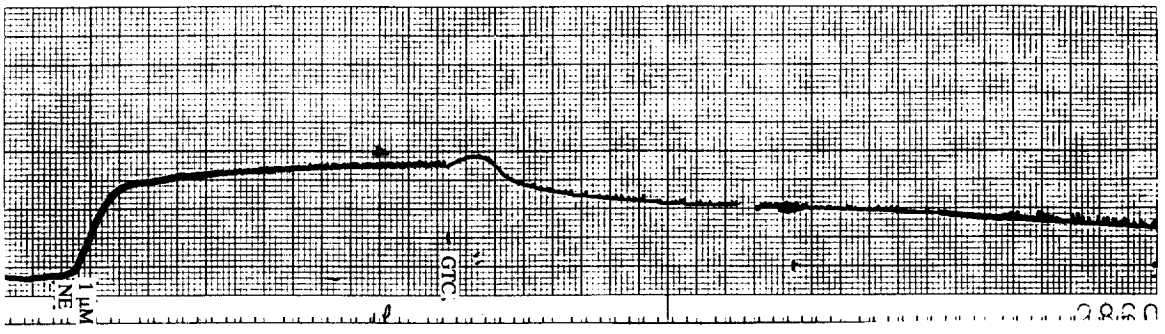

Fig. 2. The effect of green tea catechins on 1 μM norepinephrine-induced contractions in rat aorta.

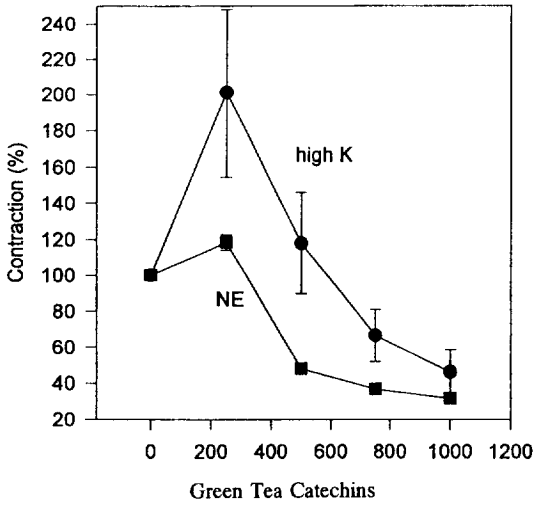

Fig. 3. The concentration-response curves of green tea catechins on 40 mM KCl-or 1 μM norepinephrine-induced contractions in rat aorta.

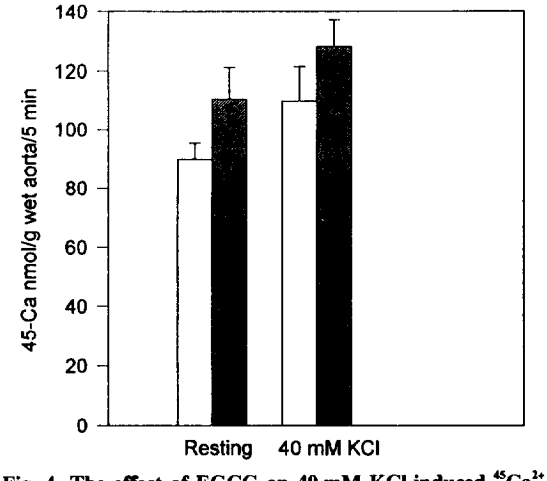

Fig. 4. The effect of EGCG on 40 mM KCl-induced $^{45}Ca^{2+}$ uptake in rat aorta.

m*l* 농도에서 최대 억제효과가 관찰되었다(Fig. 2).

위의 결과를 용량-반응곡선으로 나타내면 Fig. 3와 같다. 녹차 catechins는 고농도의 KCl 수축보다는 norepinephrine에 의한 수축에 더욱 민감히 반응하는데 어느 수축이건 저농도(<0.5 mg/m*l*)에서는 일과성의 수축이 발생하며 그 이상(>0.5 mg/m*l*)에서는 억제효과가 관찰되는 데 1.0 mg/m*l* 농도에서 거의 완전히 억제 되었다.

방사성 $^{45}Ca^{2+}$ 유입에 미치는 영향

Catechin의 유도체인 (-)-epigallocatechin gallate(EGCG)를 이용하여 흰쥐의 대동맥 혈관평활근에서 방사성 $^{45}Ca^{2+}$ 유입에 미치는 영향을 검토하였다.

40 mM KCl은 $^{45}Ca^{2+}$의 유입을 정지상태인 89.9±5.6 nmol/g wet aorta/5 min(n=4)에서 109.9±11.6 nmol/g wet aorta/5 min(n=4)으로 증가시켰다. 이때 EGCG(0.1 mg/m*l*)를 30분 전처치한 후 40 mM KCl과 동시에 투여한 결과 $^{45}Ca^{2+}$ 유입은 억제되지 않고 오히려 128.1±9.1 nmol/g wet aorta/5 min(n=4)으로 증가되었다. 한편, EGCG(0.1 mg/m*l*)는 정지상태에서의 $^{45}Ca^{2+}$ 유입을 110.6±10.6 nmol/g wet aorta/5 min(n=4)으로 증가시키는 경향을 나타내었다(Fig. 4).

녹차 catechins의 $^{45}Ca^{2+}$ 유입에 미치는 영향은 다음과 같다(Fig. 5). 즉 40 mM KCl은 정지상태에서의 $^{45}Ca^{2+}$ 유입을 67.0±7.5 nmol/g wet aorta/5 min (n=4)에서 86.9±5.8 nmol/g wet aorta/5 min (n =4)으로 증가시켰다. 이때 녹차 catechins 0.1 mg/m*l*을 30분 전처치하고 40 mM KCl과 동

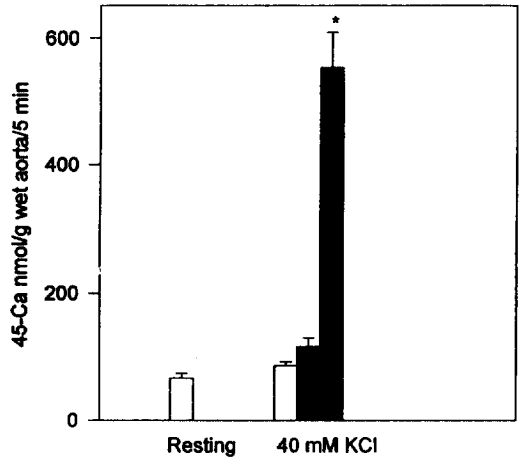

Fig. 5. The effect of green tea catechins on 40 mM KCl-induced $^{45}Ca^{2+}$ uptake in rat aorta.

시투여하면 116.2±13.3 nmol/g wet aorta/5 min (n=4)으로 증가되었다. 한편, 녹차 catechins 1 mg/m*l*을 30분 전처치하고 40 mM KCl과 동시에 투여하면 $^{45}Ca^{2+}$의 유입은 더욱 증가되어 553.8±55.2 nmol/g wet aorta/5 min (P<0.01 vs K, n=4)이었다.

고 찰

위의 실험결과에서 녹차 catechins는 혈관에 직접 작용하여 수축을 야기하거나 또는 수축을 억제하는 작용이 있음이 관찰되었다. 그 양상은 농도에 따라 다르게 나타나는 데 0.5 mg/m*l* 미만에서는 고농도 KCl 및 norepinephrine에 의한 수축을 더욱 항진시키는 양상을 나타내었고 0.5 mg/m*l* 이상의 고농도에서는 고농도 KCl 및 norepinephrine에 의한 수축을 억제하였다(Fig. 1, 2).

또한 Fig. 3의 용량-반응곡선에서 나타나듯이 catechins는 고농도의 KCl에 의한 수축보다는 norepinephrine에 의한 수축에 더욱 억제적으로 작용하였다. 또한 저농도에서의 수축항진효과는 norepinephrine에 의한 수축의 경우 고농도 KCl의 수축보다 덜 하였다.

일반적으로 혈관평활근의 수축기작은 고농도 KCl에 의한 탈분극이나 norepinephrine과 같은 신경전달물질에 의하여 자극을 받으면 수축이 발생하는 데, 탈분극의 경우에는 전위의존성 Ca^{2+} 통로의 활성화에 의하여 Ca^{2+}이 유입되어 세포내의 Ca^{2+}이 증가하며, norepinephrine의 경우에는 α-adrenoceptor-Gq-phospholipase C 복합체 활성화에 이은 diacylglycerol과 inositol triphosphate의 생성 및 diacylglycerol에 의한 protein kinase C의 활성화, inositol triphosphate에 의한 sarcoplasmic reticulum으로 부터의 Ca^{2+}의 유리로 세포내의 Ca^{2+}이 증가하게 된다.[4]

세포내의 Ca^{2+}이 증가하게 되면 Ca^{2+}은 calmodulin과 결합하게 되고 Ca^{2+}-calmodulin 복합체는 myosin light chain kinase에 결합하여 myosin light chain kinase를 활성화시키게 된다. 활성화된 myosin light chain kinase는 myosin light chian의 19번째의 serine 잔기를 인산화시키면 인산화된 myosin은 분자구조의 변화가 일어나게 되며 actin과 결합하게 되어 myosin head에 있는 Mg^{2+}-ATPase 활성이 증가되어 ATP를 가수분해하는 힘으로 actin과의 상호작용으로 수축을 발생시킨다.[5]

따라서, catechin에 의한 혈관의 수축 및 수축억제작용이 Ca^{2+}의 유입에 어떻게 영향을 미치는 지를 알아보기 위하여 방사성 $^{45}Ca^{2+}$을 조직에 레이블하여 40 mM KCl로 자극한 후 탈분극에 의한 ^{45}Ca 유입에 관한 효과를 조사하였다. 우선, catechins의 유도체인 EGCG를 이용하여 검토한 결과 EGCG 0.1 mg/m*l* 농도로 30분 전처치 한 후, 고농도 KCl에 의한 $^{45}Ca^{2+}$의 유입에 미치는 영향을 검토한 결과 통계적으로 유의한 차이는 없었지만 $^{45}Ca^{2+}$의 유입을 증가시키는 경향을 나타내고 있다(Fig. 4). 또한 EGCG는 0.1 mg/m*l*의 농도에서 자극이 없는 정지상태에서도 $^{45}Ca^{2+}$의 유입을 증가시키는 경향을 나타냈다.

한편, catechins은 40 mM KCl에 의한 $^{45}Ca^{2+}$의 유입을 농도의존적으로 증가시켰는 데, 0.1 mg/m*l*의 농도에서 약간 증가시키는 경향을 나타내었는데, 1 mg/m*l*의 농도에서는 $^{45}Ca^{2+}$의 유입을 통계학적으로 유의하게 현저히 증가시켰다(Fig. 5).

이와 같은 결과는 녹차 catechins가 저농도에서는 Ca^{2+}의 유입을 증가시켜 수축을 항진시키는 것으로 사료된다. 그러면 왜 catechins는 고농도에서 탈분극 및 norepinephrine에 의한 수축을 억제하는가 하는 의문이 생기게 된다. 이율배반적으로 catechins는 고농도에서 Ca^{2+}의 유입을 현저히 증가시키기 때문이다. 따라서 가능한 추론은 catechins는 고농도에서 Ca^{2+}의 overload를 혈관조직내에 초래하고 그 결과 조직세포의 damage를 초래하여 혈관수축이 억제되는 이른바 비생리적인 수축억제 현상이 일어나게 되는 것으로 생각된다.

이상과 같은 추론은 혈압강하실험에서 확인되는 데 녹차 catechins를 100 mg/kg, 300 mg/kg 각각 신혈관성 고혈압 흰쥐에 경구투여 한 후 24시간 관찰한 결과 혈압의 저하나 심박동수의 변화가 전혀 관찰되지 않았다(data not shown).

결론적으로, 녹차의 catechins는 *in vivo*에서 혈압강하작용이 없으며 *in vitro*에서는 혈관세포막의 Ca^{2+} channel을

활성화시켜 Ca^{2+}의 유입을 증가시켜 혈관의 수축을 증가시키며 고농도가 되면 과중한 Ca^{2+}의 유입으로 세포내에 과도하게 Ca^{2+}이 축적되어 조직세포에 장해를 초래하여 혈관의 수축이 억제되는 것으로 사료된다.

감사의 말씀

이 연구는 95년 보건복지부 신약개발 지원연구사업의 지원에 의해 수행된 것으로 깊이 감사드립니다.

국문요약

녹차 catechins이 Ca^{2+} 길항제와 같은 약리작용이 있는 지를 알아보기 위하여 흰쥐의 대동맥을 재료로 하여 장력과 방사성 Ca^{2+} 유입에 미치는 영향에 대하여 검토하였다. 실험결과, 녹차 catechins는 혈관에 직접 작용하여 수축을 야기하거나 또는 수축을 억제하는 작용이 있음이 관찰되었다. 그 양상은 농도에 따라 다르게 나타나는데, 0.5 mg/ml 미만에서는 고농도 KCl 및 norepinephrine에 의한 수축을 더욱 항진시키는 양상을 나타내었고, 0.5 mg/ml 이상의 고농도에서는 고농도 KCl 및 norepinephrine에 의한 수축을 억제하였다. 또한, 녹차 catechins는 고농도의 KCl에 의한 수축보다는 norepinephrine에 의한 수축에 더욱 억제적으로 작용하였다. 그리고, 저농도에서의 수축항진효과는 norepinephrine에 의한 수축의 경우 고농도 KCl의 수축보다 덜 하였다. 한편 녹차 Catechin류는 농도 의존적으로 탈분극에 의한 $^{45}Ca^{2+}$의 유입을 더욱 증가시켰다. 이와같은 결과로 볼때, 녹차 Catechin류는 혈관평활근의 Ca^{2+} 채널을 활성화시키는 작용이 있는 것으로 추측된다.

참고문헌

1. Hara, Y., Matsuzaji, T. and Suzuki, T.: Angiotensin I converting enzyme inhibiting activity of tea components, *Nippon Nogeikagaku Kaishi,* **61**, 803 (1987).
2. Matsuzaki, T. and Hara, Y. : Antioxidative activity of tea leaf catechins. *Nippon Nogeikagaku Kaishi,* **59**, 129 (1985).
3. Yamanaka, M. : Antiplatelet aggregation effects of tea extracts and catechins., *Proceedings of Annual Conference of Nippon Nogeikagaku* **62**, 627 (1988).
4. Walsh, M. P. : Regulation of vascular smooth muscle tone., *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **72**, 919 (1994).
5. Somlyo, A. P. and Somlyo, A. V. : Signal transduction and regulation in smooth muscle., *Nature* **372**, 231 (1994).
6. Furchgott, R. F. : Spiral-cut strips of rabbit aorta for in vitro studies of responses of arterial smooth muscle. *Methods Med. Res.* **8**, 177 (1960).
7. Ahn H. Y. : The vasodilating mechanism of sodium nitroprusside and forskolin on phorbol dibutyrate-induced contractions in rat aorta. *Kor. J. Pharmacol.* **31**, 291 (1995).
8. Karaki H and Weiss G. B. : Alterations in high and low affinity binding of ^{45}Ca in rabbit aortic smooth muscle by norepinephrine and potassium after exposure to lanthanum and low temperature. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **211**, 86 (1979).