한국영양학회지(*Korean J Nutr*) 2008; 41(7): 602~611

Pair Fed 흰쥐에 있어서 녹차의 항증체, 지질개선 및 항산화 효과

강정애* · 채인숙* · 송영보** · 강정숙*§

제주대학교 자연과학대학 식품영양학과,* 제주대학교 해양과학환경연구소**

Effects of Green Tea on Weight Gain, Plasma and Liver Lipids and Lipid Peroxidation in Pair Fed Rats

Kang, Jung Ae* · Chae, In Sook* · Song, Yong Bo · Kang, Jung Sook*§**

Department of Food & Nutrition Science, College of Natural Sciences Marine and Environment Researsh Institute,** Cheju National University, Jeju 692-756, Korea*

ABSTRACT

We compared antiobese, hypocholesterolemic, antiplatelet and antioxidant effect of 10% green tea powder and 3% green tea extract in rats pair fed 5% cholesterol diets. The final body weight was decreased significantly compared with the control ($p < 0.05$). Plasma and liver total cholesterol were lower in group of green tea powder or extract, but not statistically different. HDL cholesterol was increased significantly in group of green tea powder compared with the control or green tea extract ($p < 0.05$). Plasma triglyceride was significantly decreased in group of green tea extract compared with green tea powder, and green tea powder compared with the control respectively ($p < 0.05$). Liver triglyceride was significantly decreased in group of green tea powder or green tea extract compared with the control ($p < 0.01$). Platelet aggregations in the maximum and initial slope were not different among groups. Hemolysis was significantly lower in group of green tea powder compared with the control ($p < 0.05$). Plasma TBARS production was decreased in group of green tea extract compared with the control ($p < 0.05$). Na passive leak in intact cells was not different, but Na leak in AAPH treated cell was significantly decreased in group of green tea powder than the control ($p < 0.05$). The leak increase (△Na Leak) after AAPH treatment was significantly decreased in groups of green tea powder and extract compared with the control ($p < 0.05$). Isotope excretion after ^{14}C-cholesterol ingestion was significantly increased in group of green tea extract compared with the control or the green tea powder ($p < 0.05$). Consumption of green tea in powder or extract may give beneficial effects in weight control and plasma lipid profiles, impeding metabolic syndrome. More studies are needed to clarify what component of green tea and what mechanism are involved in antiobese and hypolipedemic actions of green tea. (*Korean J Nutr* 2008; 41(7): 602~611)

KEY WORDS : green tea, antiobese, hypolipidemic, antiplatelet aggregation RBC membrane stability, pair fed rats.

서 론

지금부터 5,000년 전에 몸에 독이 배었을 때 차를 먹고 풀었다는 염제 신농의 기록이 있고 전한의 명의 화타는 차의 효능에 대해 마음을 안정시키고 기를 돋우며 눕는 일을 적게 하고 노쇠를 늦추며 총명하게 한다고 하였는데 이렇게 차는 경험적인 약리 효능으로 민간요법에서 질병치료 목적으로 시작하였으나 차츰 그 특유한 맛과 향기와 함께 세계 인류의 50%가 즐겨 마시는 음료가 되었다. 동백나무과에 속하는 다년생의 상록관목인 차나무 (Camellia sineis)는 오랜기간 생태학적 변이를 통해 분포지역에 따라 구성성분이 약간 다른데 차의 화학적 성분인 카테킨류는 Flaan-3ol 구조로 주로 epicatechin형태로 존재하며 특히 epigallocatechin gallate (EGCG)가 건조무게의 9~13%로서 가장 많이 함유되어 있다.[1] 녹차 카테킨은 특유의 수렴성 쓴 맛을 제공하고 자연적인 항산화제로서 항염, 항알레르기 및 항암 등의 다양한 생리활성작용을 지닌 것으로 알려져 있으며, 최근에는 항증체을 포함하여 혈압강하 및 혈중 지질개선 등 심순환기 질환의 예방에 탁월한 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 동물실험과 임상실험을 통한 녹차나 추출물의 항 증체효과에 대한 기전은 대사율과 열량

접수일 : 2008년 8월 20일 / 수정일 : 2008년 9월 8일
채택일 : 2008년 9월 29일
§To whom correspondence should be addressed.
E-mail : jungkang@cheju.ac.kr

© 2008 The Korean Nutrition Society

소비량을 증가시키고[2,3] 소장에서의 지방흡수를 억제하며,[4,9] 지방합성은 억제하고 지방산화를 촉진하는 등 다양하다.[3,6] 역학조사에서 녹차의 음용은 뇌졸중과 심근경색 등 심순환기 질환의 에 의한 사망을 감소시키고 혈중 지질 및 지단백 구성에 보다 유리하게 작용하는 것으로 나타났다.[7,8] 동물실험에서 녹차나 녹차 카테킨은 micelle 형성을 억제함으로서 소장에서 지방과 함께 콜레스테롤 흡수를 억제하거나[9] LDL 수용체를 증가시키고 콜레스테롤 합성을 억제하고[10] 소장에서 담즙배설을 촉진한다.[11,26] 고콜레스테롤 혈중 환자는 높은 혈소판 응집성과 함께 혈전성 뇌졸증의 위험이 높은 것으로 알려져 있는데 항 콜레스테롤제제 스타틴류는 콜레스테롤 강하효과와 함께 이러한 위험을 감소시킨다.[12] PAF (platelet activating factor)는 강력한 염증유발 물질로 동맥경화를 촉진하는 것으로 알려져 있는데 고 콜레스테롤 환자의 혈소판은 정상인에 비해 PAF (platelet activating factor)에 민감하고[13] 녹차 폴리페놀은 PAF 생성을 억제함으로서 혈소판 응집성을 감소시킨다.[14] Deana 등[15]의 연구에서 녹차 카테킨이나 EGCG는 혈소판의 thromboxane 분비를 억제하고 따라서 2nd phase의 응집을 억제함으로서 혈소판 응집성을 감소시키는데 이렇게 녹차나 녹차 카테킨은 혈소판을 안정화시킴으로서 항 혈전효과와 함께 심순환기 질환에 대한 위험을 감소시킨다. 한편 녹차의 항산화 관련 연구를 살펴보면 사람에 있어서 하루 7컵의 녹차 음용을 2주간만 지속해도 혈장의 MDA-LDL생성이 현저히 감소되는 것으로 나타났다.[16] Hsu 등[17]의 연구에 의하면 신장 투석환자에 있어서 녹차 카테킨 (GTC) 복용은 투석 과정에서 과산화수소 생성을 감소시키고 염증유발 관련 cytokine의 생성을 억제하여 동맥경화의 진행을 완화한다. 활성산소에 의한 세포막의 손상은 세포막의 유동성을 증가시키고 ion channel의 변화나 세포의 전해질 손실로 이어지는데 Saffari 등[18]의 *invitro*연구에서 EGCG는 t-butylhydroperoxide에 의한 적혈구막의 Na-K ATPase의 손상을 방지한다. 또한 녹차 카테킨은 세포막의 유동성을 감소시키고 세포막 결합 단백질의 기능에 관여함으로서 물질의 세포막 이동을 정상화시켰는데[19] Biswas 등[20]의 연구에서 녹차나 녹차카테킨 섭취는 산화 스트레스로부터 적혈구를 보호하여 용혈성 빈혈의 예방에 효과적임을 암시하고 있다.

동물실험에 있어서 사료의 섭취량은 중체와 연결되고 체중의 증가는 지질대사나 혈소판 응집성 등의 심순환 관련 지표에 직접 영향을 줄 수 있으므로 녹차의 항 중체 효과나 지질개선 효과가 녹차의 어떤 성분에 의한 대사적 기전에서 오는 것인지 녹차의 부정적인 맛으로 인한 식이섭취량 감소 때문인지 분명하지 않다. 본 연구에서 녹차 추출물 식이군의 섭취량에 준해 대조군의 식이섭취량을 조절하여 pair feeding 함으로서 녹차의 항중체나 지질개선 및 혈소판 응집성에 대한 효과에 대해 보다 정확하게 이해하고자 하였고, 콜레스테롤 흡수를 비롯한 녹차의 생리활성 효과에 있어서 녹차분말이 녹차추출물에 상응하는지를 조사하기 위해 대조군 식이와 함께 녹차분말군, 녹차추출물군으로 나누어 비교하였다. 또한 녹차의 항산화효과에 초점을 맞추어 적혈구막의 안정성 및 TBARS생성 등 산화관련 몇가지 지표를 함께 조사하였다.

재료 및 방법

실험동물의 식이, 사육 및 시료채취

생후 7주된 체중 200~230 g 전후의 Sprague Dawley 숫쥐 30마리를 각 10마리씩 3 실험군으로 나누어 AIN-76을 근거로 0.5% cholesterol과 0.2% cholate를 함유한 대조군 (control)과 대조군 식이에 10% 녹차분말을 첨가한 녹차 분말군 (green tea powder) 또는 녹차의 에탄올 추출에 있어서 최대 회수율을 약 30%으로 추정하여 3% 녹차 추출물을 첨가한 녹차 추출물군 (green tea extract)의 2개 처리군으로 식이로 조제하였으며, 녹차 분말에 상응하는 5%의 섬유소를 대조군과 녹차 분말군에 첨가하였다 (Table 1). 쥐들은 각기 stainless steel cage에서 4주간 분리 · 사육하였으며, 동물 사육실의 명암주기는 12시간, 온도 20~25℃와 습도 40~60%는 일정하게 유지되도록 조절하였다. 실험기간동안 물은 무제한으로 공급하였으며 실험식이는 녹차 추출물군에 준한 제한식이를 하였다. 사양기간 동안 3일 간격으로 식이섭취량, 체중변화를 기록하였고, 4주 때 쥐들을 12시간 절식한 후 cardiac puncture에 의해 heparin 처리된 전혈 (whole blood)을 채취하였다. 간은 바로 적출하여 거름종이로 표면의 혈액을 제거하여 무게를 측정한 후, 간 조직 일부와 동맥을 분리하여 조직 검사를 위해 Bouin's solution용액에 고정시키고, 남은 간 조직은 총콜레스테롤, 중성지방 분석을 위해 −20℃ 냉동고에 보관하였다.

콜레스테롤 흡수율을 측정하기 위한 실험으로 생후 8주된 Sprague Dawley 숫쥐 12마리를 각각 4마리씩 3개 군으로 나누어, 동일한 사육실 환경에서 3일간 실험식이를 공급하고 20시간을 절식시킨 후 0.2 μCi 분량의 C14-cholesterol 용액 200 $\mu\ell$를 암흑주기 시작 10분 전에 실험 식이에 넣어 섭취시켰다.

혈소판 응집성

혈액 0.25 ml을 생리식염수로 희석하여 (1 : 4) 혈소판이

Table 1. Composition of experimental diets (%)

Ingredient	Control	Green tea powder	Green tea extract
	Cholesterol based diet		
Casein[a)]	20.0	20.0	20.0
L-methionine[a)]	0.3	0.3	0.3
Lard	9.0	9.0	9.0
Soybean oil	1.0	1.0	1.0
Choline chloride[b)]	0.2	0.2	0.2
Vitamin mix[a)]	1.0	1.0	1.0
Mineral mix[d)]	3.5	3.5	3.5
Sucrose	20.0	20.0	20.0
Corn starch	39.3	34.3	36.3
Cellulose[e)]	5	0	5
Cholesterol[e)]	0.5	0.5	0.5
Cholic acid[e)]	0.2	0.2	0.2
Green tea powder[f)]	0	10	0
Green tea extract[f)]	0	0	3
Total (%)	100.0	100.0	100.0

[a)]Teklad, Harlan Madison WI, USA
[b)]Junsei Chemical Co., Ltd.
[d)]Mineral mixtuer (g/100g) : $CaHPO_4$ 50.0, NaCl 7.4, $K_3C_6H_5O_7 \cdot H_2O$ 22.0, K_2SO_4 5.2, MgO 2.4, Manganous carbonate (43−48% Mn) 0.35, Ferric citrate (16.7%Fe) 0.6, Zinc carbonate (70% Zn) 0.16, Cupric carbonate (53−55%Cu) 0.03, KIO_3 0.001, $Na_2SeO_3 \cdot 5H_2O$ 0.001, $CrK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ 0.055, Sucrose 11.804
[e)]Sigma Chemical Co., USA
[f)]Jeju o'sulloc museum

대략 200,000/㎕로 조정한 후 ADP (2 μM)을 첨가하여 응집을 유도했고, 3회 반복한 평균치를 사용하였다. 혈소판 응집은 whole blood platelet aggregation을 측정하는 impedance 방법으로, 혈소판의 응집에 따라 형성되는 두 전극간의 저항 (ohm)의 증가로 나타나는데 Chronolog aggregometer (model 500, Havertown PA, USA)를 사용하여 측정하였다.

혈청의 지질함량 분석

혈청내의 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, 그리고 중성지방의 성분정량분석에는 En-zyme assay kit (Asan pharmaceutical Co., Ltd, Korea)을 사용하였다. 총 콜레스테롤과 중성지방 분석에는 혈청 10 ㎕을 사용하였고, HDL-콜레스테롤의 분석에는 200 ㎕을 사용하여 두 반복으로 진행하였다. HDL-콜레스테롤은 분리시액 200 ㎕를 넣고 vortex 하여, 10분 방치한 것을 1,000 × g에서 10분간 원심 분리한 후 상층액 50 ㎕를 가지고 분석하였다. 각각 Color reagent를 1.5 ml씩 넣은 후 37℃ water bath에서 총콜레스테롤과 HDL-콜레스테롤은 5분간, 중성지방은 10분간 배양하여 발색시켰다. 총 콜레스테롤과 HDL-콜레스테롤은 500 nm에서, 그리고 중성지방은 550 nm에서 spectrophotometer로 흡광도를 측정하였다.

간의 지질함량 분석

간 시료의 콜레스테롤과 중성지방의 추출은 Folch 등[21)]의 방법을 다소 수정한 것으로, 간 조직 1 g을 6 ml chloroform/methanol mixture (2 : 1, v/v)와 2 ml 증류수를 넣어 균질화한 후 3,000 × g에서 원심분리하였다. 하층액 500 ㎕을 취하여 clean bench에서 자연 건조한 후, 여기에 50 ㎕ Triton X-100/chloroform mixture (1 : 1, v/v)와 450 ㎕ chloroform을 넣어서 500 ㎕로 만들어 가볍게 흔들어 내용물을 용해시켰다. 이중 20~50 ㎕을 취하여 chloroform을 휘발시킨 후 Asan kit을 사용하여 간의 콜레스테롤을 측정하였다. 간 중성지방은 하층액 20~50 ㎕를 취하여 chloroform을 휘발시킨 후 50 ㎕ 메탄올을 넣고 용해시켜 Asan kit을 사용하여 측정하였다.

적혈구막의 Na leak

적혈구 용액의 준비 :

혈액을 1,000 × g에서 10분간 원심 분리하여 plasma와 buffy coat를 걷어낸 후 적혈구를 5배의 cold isotonic choline chloride washing solution (CWS) [150 mM choline chloride, 10 mM Tris-4-morpholinopropane sulfonic acid (MOPS) 4℃ pH 7.4]를 넣고 천천히 섞어 원심 분리하는 과정을 5회 반복하여 씻어주었다. 적혈구를 다시 CWS로 희석하여 hematocrit 40~50%의 적혈구 용액이 되게 조정한 후 hematocrit을 측정하였다. 적혈구 용액 50 ㎕를 5 ml의 0.02% acationox (metal free detergent, Scientific Product, USA) 넣은 것으로 intracellular Na을 측정하였다.

Na leak :

준비한 적혈구 용액 각 2 ml를 1 mM의 AAPH가 들어있거나 들어있지 않는 각 40 ml medium (150 mM choline chloride, 10 mM glucose, 1 mM furosemide, 1 mM ouabain, 10 mM Tris-MOPS, pH 7.4)에 넣고, 12 tubes에 할당하여 duplicate tube를 0, 10, 20, 30, 40, 50분간 배양 후 얼음으로 옮겨 efflux를 중단시켰다. 각 tube들을 원심 분리하여 상층을 다른 tube에 옮긴 후 상층액속의 Na 농도를 원자분광계로 측정하였다. Ouabain과 furosemide의 존재 하에서 농도차에 의해 흘러나오는 Na-passive leak은 라디칼 생성물질, AAPH [2, 2-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride]에 노출되었을 때 적혈구막의 손상과 함께 증가된다.

Na leak 계산: 읽혀진 각 tube의 Na농도로부터 Na efflux 기울기 [μg/(ml × min)]를 구하여 다음의 계산식으로부터

구하였다.[22]

$\mu g/(ml \times min) \times 60\ min \times \mu mole/23\ \mu g \times [44\ ml - (2\ ml \times hct)/(2\ ml \times hct)] = \mu mole/ml\ rbc/hour$ (mmole/l rbc/hour)

Acationox용액 5 ml로 희석된 50 ㎕적혈구 용액의 intracellular Na 농도값은

$\mu g/(ml \times min) \times 60\ min \times \mu mol/23\ \mu g \times 101/hct = \mu mole/ml\ rbc$ (mmole/l rbc)

적혈구 용혈

적혈구 용혈 정도는 Draper 등[23]의 autohemolysis 방법을 약간 변형시킨 방법으로 채혈즉시 20 ㎕ 혈액을 5 ml PBS(phosphate buffered saline)에 분산시킨 후 1,200 × g에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 제거하고 다시 5 ml PBS에 분산시켰다. 적혈구 분산액 2 ml를 4 ml 증류수 또는 PBS로 희석하여 37℃에서 4시간 배양한 후 원심분리하여 상층액의 흡광도를 증류수를 blank로 하여 spectrophotometer 415 nm에서 측정하였다. 증류수와 PBS에서 용혈된 적혈구용액의 흡광도 차이 값이 용혈정도를 나타낸다.

혈장 TBARS 분석

혈장 TBARS (thiobarbituric acid reactive substance)측정은 변형된 Yagi 방법[24]에 의한 것으로, 1/12N 황산과 10% phosphotungstic acid로 침전된 혈장내의 지방을 TBA와 반응시킨 후 n-butanol층으로 옮긴 TBARS (Thiobarbituric acid reactive substance)를 Spectrofluorometer (Kontron Instruments SFM-25)의 excitation 515 nm, emission 553 nm에서 정량하였고, 1, 1, 4, 4-tetramethoxy propane을 표준용액으로 사용하였다.

변의 ^{14}C-cholesterol 방사능 측정

녹차분말군의 10% 녹차분말에 상응하는 섬유질원으로 대조군과 녹차추출물 군에서 각 5%의 섬유소를 사용했는데, 변의 무게에서 사실상 차이가 없었다.

^{14}C-cholesterol (NEN, Boston MA, USA) 0.2 ㎕ci을 각각의 쥐에게 섭취시킨 후, 만 1일에서부터 6일까지의 변을 수집하여 상온에서 건조시켜 무게를 측정하였다. 분쇄한 각 시료 0.2 g를 20 ml scintillation cocktail (S¢INT-A XF, Packard)에 넣어 상온에서 3일간 보관한 후 Liquid scintillation counter (Packard 2700PR)를 이용하여 측정하였고 소량의 색도광은 외표준선원법 (ESCR)으로 보정하였다.

간 조직 및 동맥조직 검사

적출 즉시 손상을 최소화하기 위해 Bouin's solution에 고정하였고, 자동조직파라핀 유도장치를 이용해 paraffin 유도과정을 거쳐 파라핀 블록을 만들어 microtome을 이용하여감 및 동맥 조직의 종단면을 5~7 ㎛ 두께로 절편하였다. 조직표본은 Harris hematoxylin과 0.5%-eosin으로 비교염색을 하여 광학현미경 400배율에서 관찰하였다.

통계처리방법

본 실험의 결과는 평균 (mean)과 표준편차 (SD, standard deviation)로 표시하였고, 각 실험군간의 비교는 one-way ANOVA를 이용하여 분석한 후, $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test에 의해 각 식이에 따른 처리구간의 유의성을 검증하였다.

결 과

체중증가량, 식이섭취량 및 간/체중 무게비

일일 사료섭취량 (ADFI, average daily intake), 1일 평균증체량 (ADG, average daily gain) 및 사료효율(FER, food efficiency ratio)이 Table 2에 나타나 있다. 최종체중에 있어서 대조군에 비해 녹차 분말군이 다소 낮고 녹차추출물군이 가장 낮았으나 유의적 차이는 없었다. 그러나

Table 2. Effects of green tea powder or green tea extract on growth rate and feed intake

	Control	Green tea powder	Green tea extract
		Cholesterol based diet	
Initial B.W. (g)	213.3 ± 11.1	213.1 ± 11.2	213.1 ± 12.1
Final B.W. (g)	316.1 ± 18.7	305.1 ± 23.6	298.7 ± 8.4
ADG[1] (g/d)*	3.7 ± 0.3[a]	3.3 ± 0.7[ab]	3.0 ± 0.2[b]
ADFI[2] (g/d)	15.8 ± 6.2	15.8 ± 6.3	15.8 ± 6.8
FER[3] (g/d)*	0.22 ± 0.09[a]	0.20 ± 0.04[ab]	0.19 ± 0.01[b]
L.W/B.W[4] (%)	4.4 ± 0.2	4.5 ± 0.4	4.1 ± 0.5

[1]ADG: Average daily gain [2]ADFI: Average daily feed intake
[3]F.E.R: Feed Efficiency Ratio [4]L.W/B.W: Liver wight / Body weight ratio Values are means ± SD of 10 rats
*: Values in the same row not sharing the same superscript differ ($p < 0.05$)

1일 평균 증체량을 비교했을 때 낮은 표준편차로 인해 대조군에 비해 녹차 추출물군이 유의적 낮았다 ($p < 0.05$). 녹차추출물군의 사료 섭취량에 준해서 pair fed한 각 실험군의 1일 평균 사료섭취량은 15,8그램으로 사료섭취에 대한 증체 효율을 평가하는 사료효율은 녹차 추출물군이 대조군에 비해 유의적으로 낮았다 ($p < 0.05$). 간의 외형적 크기를 비교할 수 있는 간과 체충의 무게비 (LW/BW, Liver/Body weight ratio)는 녹차 추출물군이 다소 낮았으나 유의적 차이는 없었다.

혈장과 간의 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 및 중성지방

녹차 분말군과 녹차 추출물군에 있어서 혈장 총콜레스테롤이 다소 낮았으나 유의적 차이는 없었다 (Table 3). HDL-콜레스테롤에 있어서 녹차 추출물군은 대조군에 비해 다소 증가하였으나 유의적이질 못한 반면 녹차 분말군은 대조군에 비해 유의적으로 증가하였다 ($p < 0.05$). 혈장 중성지방은 녹차 분말과 녹차 추출물에 의해 감소되었는데 녹차 분말군이 대조군에 비해 그리고 녹차 추출물군은 녹차 분말군에 비해 각각 $p < 0.05$수준에서 유의적으로 감소했다. 간에 있어서 총콜레스테롤은 실험군간 차이를 볼 수 없었으나 중성지방은 녹차 분말군과 녹차 추출물군이 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다 ($p < 0.01$).

Table 3. Effects of green tea powder or green tea extract on plasma and liver lipids

	Control	Green tea powder	Green tea extract
	Cholesterol based diet		
Plasma (mg/ml)			
Total-cholesterol	199.4 ± 52.7	185.1 ± 47.1	186.7 ± 42.3
HDL-cholesterol*	25.1 ± 2.9[b]	31.9 ± 3.9[a]	26.7 ± 4.3[ab]
Triglyceride*	74.9 ± 11.8[a]	62.7 ± 12.9[b]	55.7 ± 11.4[c]
Liver (mg/g)			
Total-cholesterol	33.3 ± 5.7	30.9 ± 5.0	31.2 ± 7.0
Triglyceride**	18.9 ± 4.9[a]	7.1 ± 1.5[b]	7.8 ± 1.6[b]

Values are means ± SD of 10 rats
*: Values in the same row not sharing the same superscript differ ($p<0.05$)
**: Values in the same row not sharing the same superscript differ ($p<0.01$)

Hemolysis, TBARS생성, 적혈구막의 Na leak

과산화 지표로서 측정한 hemolysis, 혈장 TBARS 생성 및 적혈구막의 Na-leak에 대한 결과가 Table 4에 나타나 있다. Hemolysis는 녹차 분말군이 대조군에 비해 유의적으로 감소하였고 ($p < 0.05$) 녹차 추출물군에서 다소 감소하였으나 유의적 차이는 없었다. 혈장 TBARS생성은 녹차 분말군과 추출물군에서 감소되었으나 녹차 추출군만이 유의성을 보였다 ($p < 0.05$). Intracellular Na농도는 녹차 추출물군에서 다소 높게 나타났으나 유의적 차이는 없었다. 적혈구막의 Na-leak은 Na의 농도차이에 의해 이동하는 passive transport형태로 intact적혈구에 있어서 실험군 간에 큰 차이가 없었으나 활성산소 생성 물질인 AAPH에 노출된 적혈구의 경우 녹차 분말군이 대조군에 비해 유의적으로 낮게 나타났다 ($p < 0.05$). Intact 적혈구를 AAPH로

Table 4. Effects of green tea powder or green tea extract on platelet aggregation

	Control	Green tea powder	Green tea extract
	Cholesterol based diet		
Initial slope (Ω/min)[2]	7.8 ± 1.9	7.4 ± 1.6	7.4 ± 2.1
Maximum (Ω)[1]	7.9 ± 3.6	7.4 ± 2.2	7.2 ± 1.4

[1]Maximum aggregation is ohm at the point where aggregate dissociated
[2]Initial slope ohm change for the first one minute of aggregation
Values are means ± SD of 10 rats

Table 5. Effects of green tea powder or green tea extract on erythrocyte hemolysis, TBARS and erythrocyte Na leak

	Control	Green tea powder	Green tea extract
	Cholesterol based diet		
Hematocrit (%)	44.3 ± 5.0	43.7 ± 3.4	43.4 ± 2.4
Hemolysis (%)*	12.8 ± 1.6[a]	10.3 ± 1.1[b]	11.3 ± 1.6[ab]
TBARS (umole/ l plasma)*	0.41 ± 0.03[a]	0.38 ± 0.03[ab]	0.38 ± 0.01[b]
Intracellular Na[1] (Na mmole / l rbc)	2.5 ± 0.5	2.6 ± 0.4	2.8 ± 0.6
Erythrocyte Na-Leak[2] (Na mmole / l rbc/hr)			
Intact RBC	0.32 ± 0.09	0.27 ± 0.08	0.33 ± 0.23
AAPH treated	0.65 ± 0.06[a]	0.42 ± 0.14[b]	0.51 ± 0.20[ab]
△ Na Leak**	0.33 ± 0.03[a]	0.15 ± 0.06[b]	0.18 ± 0.09[a]

[1]Intracellular Na is for intact erythrocyte
[2]Na leak is erythrocyte passive Na efflux into medium containing ouabain and furosemide
Values are means ± SD of 10 rats
*: Values in the same row not sharing the same superscript differ ($p < 0.05$)
**: Values in the same row not sharing the same superscript differ ($p < 0.01$)

처리함으로서 산화적 손상에 의해 Na-leak이 증가되는데 각 샘플의 intact 적혈구와 AAPH처리한 적혈구의 Na-leak차이 (△Na-leak)를 통계적으로 분석했을 때 녹차 분말군과 녹차 추출물군이 대조군에 비해 유의적으로 낮았다 ($p<0.01$).

혈소판 응집성

Table 5의 혈소판 응집은 초기응집 (initial slope)과 최대응집(maximum aggregation)에 있어서 녹차 분말군과 녹차 추출물군이 대조군에 비해 다소 낮았으나 유의적 차이는 없었다.

변의 ^{14}C-cholesterol 방사능 측정

Table 6. ^{14}C-Cholesterol excretion

	Control	Green tea powder	Green tea extract
Total-feces[1)]	9.5 ± 0.8	9.6 ± 0.7	9.7 ± 1.3
Excretion (%)[2)]	8.9 ± 0.7[b]	9.5 ± 1.4[b]	31.5 ± 7.0[a]
Excretion (mg/50 mg diet cholesterol)	4.46 ± 0.3[b]	4.76 ± 0.7[b]	15.72 ± 3.5[a]

1) Average daily fecal weight after air dry, expressed in gram
2) Percent of total ^{14}C-isotope excreted for 6 days after ingestion of 0.2 u Ci ^{14}C-Cholesterol
Values are means ± SD of 4 rats
*: Values in the same row not sharing the same superscript differ ($p<0.05$)

사료제조에서 녹차분말군의 녹차 분말10%에 준해서 대조군과 녹차 추출군에 섬유소 5% 첨가하였는데 대조군, 녹차 분말군 그리고 녹차 추출물군의 6일간 수집된 변의 무게는 큰 차이 없었다 (Table 6). 섭취한 0.2 uCi 14C-Cholesterol에 대해 6일간 배설된 isotope총량에 대한 비율은 녹차분말군은 대조군에 큰 차이는 없었으나 녹차 추출물의 경우 31%의 배설율을 보였는데 샘플수가 충분하지 않음을 감안하더라도 통계적 유의성은 보였다 ($p<0.05$).

간 조직 및 동맥조직 검사

각 군당 4마리의 간과 대동맥을 같은 부위에서 채취하여 각 4견본을 만들어 관찰하였는데 대표성이 있는 조직사진을 Fig. 1에 제시하였다. 간의 크기에서는 그룹간 별 차이가 없었으나 육안으로 봤을 때 대조군의 간이 녹차 분말군과 녹차 추출물군에 비해 저색소 (hypochromic)임을 알 수 있었다. 현미경으로 관찰된 녹차 분말군과 녹차 추출물의 간 조직에서 작은 지방구 (fat drop)를 관찰할 수 있으나 대조군의 경우 지방구와 함께 더욱 진행된 형태인 지방공포 (fat vacuole)를 관찰할 수 있다. 대동맥의 경우 실험군 간에 크게 차이는 보이지 않고 동맥경화로 진행되는 흔적도 보이지 않고 있다.

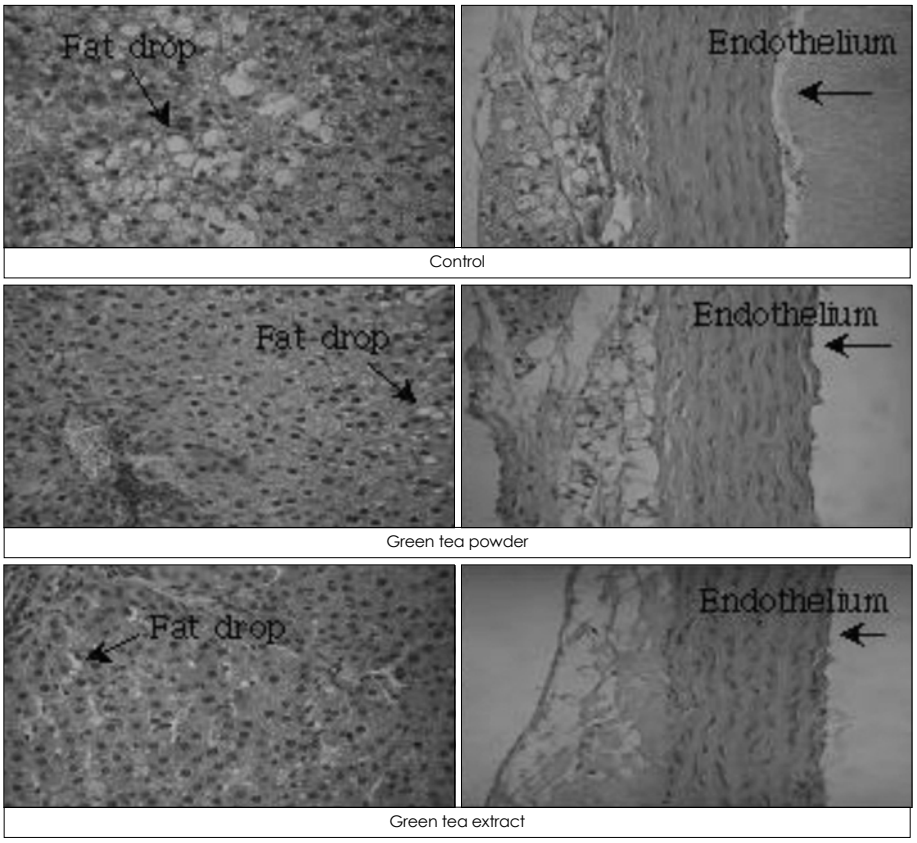

Fig. 1. Microscopic appearance of liver and aorta tissues (×400).

고 찰

비만이 퇴행성관절염, 순환기질환 및 특정의 암과 관련성이 제기되는 가운데 특히 복부지방은 인슐린 저항성, 고지혈 및 고혈압 등 이런바 대사증후군의 직접적인 원인으로 지목받고 있다. 녹차의 항비만, 지질개선효과에 대한 여러 연구보고 가운데 Kao 등[25]에 의하면 정맥으로 주입된 EGCG가 식이섭취량을 감소시키고 따라서 낮은 증체율과 함께 혈중 지질의 개선 효과를 보고하는데 이는 EGCG가 뇌하수체의 neuroendocrine system을 통한 식욕억제 작용을 그 기전으로 설명하고 있다. Suzuki 등[26]의 mouse 실험에서 1일 400 mg 녹차추출물을 물에 타서 섭취시키는 경우 사료섭취량의 감소와 함께 낮은 증체율과 더불어 혈중지질의 개선효과를 보였다. 이렇게 녹차나 녹차 카테킨은 그 특유의 수렴성 쓴맛으로 인해 식욕감소 효과가 있는 것으로 알려져 있는데, 본 연구에서는 예비실험에서 식이섭취량이 가장 낮은 녹차 추출물군에 맞추어 pair feeding 함으로서 섭취열량에 의한 요인을 배제한 녹차 자체의 항비만 효과나 지질 개선효과를 비교할 수 있었다. 각 군당 평균 사료섭취량을 15.8 그램으로 볼 때 체중 300~350 그램의 쥐들의 하루 섭취량은 녹차분말로 1.58 그램 (5 g/kg/day), 녹차추출물로 520 mg (1,500 mg/kg/day)에 해당하는 상당히 많은 분량인데 사용한 녹차분말에 대한 녹차추출물의 분량은 에탄놀에 의한 회수율 30%을 기준으로 설정한 것이다. 녹차실험결과에서 같은 량의 식이섭취에 대한 증체율과 사료효율이 녹차 추출물군과 녹차 분말군이 대조군에 비해 모두 낮았는데 이는 녹차의 항비만 효과에 대해 긍정적이라 생각할 수 있다. Diepvens등[2]은 사람에 있어서 녹차추출물은 phosphodiesterase를 억제하고 교감신경계를 활성화함으로서 대사율과 열량소비를 증가시키므로 과체중을 방지한다. Diepvens 등[27]은 또한 과체중의 여성에 있어서 1일 1,125 그램 녹차추출물은 기초대사량을 증가시키고 지방산화를 촉진함으로서 다이어트효과를 증대시킨다. 고지방 식이에 0.5% 녹차추출물 첨가는 지방산의 산화를 촉진시키고 복부지방 (mesentric과 retroperitoneal)을 감소시키므로 mice의 운동효과를 증가시켰으며[4] Lin 등[6]에 의하면 breast cancer cell에 있어서 EGCG나 theaflavin은 fatty acid synthetase를 gene 수준에서 억제하였는데 *invitro* 상태에서 EGCG의 지방산 합성저지력에 대한 분자적 기전을 설명하고 있다. 녹차의 혈중 콜레스테롤과 중성지방의 강하효과에 대한 연구는 이미 많이 보고되어 있다. Bursill 등[10]에 의하면 고 콜레스테롤혈증의 토끼에서 녹차추출물은 HMG coA reductase활성을 억제하고 LDL 수용체 합성을 증가시키므로 콜레스테롤 강하효과를 보였고, Raederstorff 등[4]은 EGCG가 창자에서 micelle형성을 방해함으로서 지방과 함께 콜레스테롤의 흡수를 저해하였으며, 녹차추출물 또한 ^{14}C-콜레스테롤이 림프로 유입됨을 억제시켰다.[9] 본 연구에서 혈장과 간의 총콜레스테롤에 있어서 실험군 간의 차이를 보이지 않음으로 녹차분말이나 녹차추출물이 0.5%의 고콜레스테롤 식이에 대한 콜레스테롤 강하효과는 크게 나타나지 않았다. 본 실험에서 섭취시킨 0.2 uCi의 ^{14}C-콜레스테롤에 대한 변 배설량을 비교하면 녹차분말은 대조군과 비슷하지만 녹차추출물의 경우 이들 수치보다 3배가 높은 섭취량의 31%가 6일간 배설된 것으로 여기에는 식이 콜레스테롤뿐만 아니라 재흡수 되지 않은 담즙의 일부도 포함되지 않았나 생각된다. 콜레스테롤은 12지장으로 infusion 된지 2시간이면 림프에 나타나서 8시간이면 최대 60%까지 흡수되지만 녹차추출물에 의해 억제되었다.[9] Mata-Bilbao Mde 등[28]에 의하면 EGCG나 ECG 등의 카테킨은 담즙과 결합하여 EGCG-glucuronide 또는 ECG-glucuronide 등을 형성하면서 장시간의 장내 미생물의 작용을 받으면서 담즙배설을 증가시키고 장-관순환을 억제하는데, 본 연구에서 분말상태의 녹차보다 catenchin류로 유리된 녹차추출물에 의해 isotope 배설이 높은 것은 이러한 설명과 상응하는 부분이다. 그러나 간과 혈액의 콜레스테롤에는 실험군 간에 큰 차이가 없음은 콜레스테롤 합성이나 담즙으로의 배설 등을 통해 일정한 체내 콜레스테롤 pool을 위한 복잡한 기전이 작용하지 않았나 생각된다. Hasegaawa 등[29] 또한 고지방식의 쥐에서 녹차분말은 콜레스테롤에는 큰 변화없이 간과 혈중 중성지방을 크게 감소시켰다. 한편 녹차 추출물과는 달리 녹차분말 식이는 HDL-콜레스테롤를 증가시켰는데 녹차 잎에는 카테킨 이외에 다양한 섬유질과 유기산, 유리 아미노산, 비타민 C 등 다른 생리활성 물질이 포함되어 있고, 예비실험에서 녹차 추출물보다 녹차분말 식이에 대한 쥐들의 선호도가 높았던 것도 HDL-콜레스테롤을 증가시킬 수 있는 기전적 요인이 될 수 있는지 생각해 볼 필요는 있다. 혈장과 간의 중성지방이 대조군에 비해 유의적으로 감소되어 녹차의 hypolipidemic 효과는 분명하게 나타나는데, 혈장에 대한 이러한 효과는 녹차추출물이 훨씬 강하게 나타났다. Raederstorff 등[4] 이나 Loest 등[9]의 실험에서 EGCG 나 녹차 추출물이 소장에서 micelle의 형성함으로서 지방과 콜레스테롤뿐만 아니라 지용성 비타민의 흡수도 감소시키는 것으로 보고하고 있는데 이점에서 분말보다 추출물이 보다 효율적으로 작용할 수 있지 않을까 생각된다. EGCG나 녹차추출물은 Fatty acid synthetase (FAS)에 대한 gene expression을 억제함으로서 지방합성을 감소시키고[5] 동시에 지방의 산

화를 촉진하여[3,6] 간과 혈액내의 중성지방을 감소시키고 크게는 체지방 감소와 함께 항비만 효과를 볼 수 있게 하지 않을까 생각된다. 본 실험의 현미경관찰에서 대조군에 비해 녹차추출물의 간 조직에서 지방구 형성이 훨씬 적게 나타났는데 이것은 낮은 간의 중성지방 수치와 일치한다. 그러나 대동맥의 조직관찰에서 고콜레스테롤 식이로 인한 fatty streak 등 기타 조직의 변화나 차이는 볼 수 없었는데 혈관조직에 변화를 초래하기에는 4주간의 실험기간이 충분하지 않을수 있다. 녹차추출물이나 EGCG의 혈소판의 응집 억제작용에 대해 발표된 연구결과[13,14]와는 달리 본 연구에서 녹차분말과 녹차추출물에 의해 응집성이 다소 낮아지는 경향은 보였으나 크게 낮추지는 못했다. Elisaf 등[13]의 *invitro* 실험에서 고콜레스테롤혈증 환자의 혈소판은 정상인에 비해 저농도의 PAF (platelet activating factor)에서도 민감하게 반응하며, Sugatani 등[14]의 *invitro* 실험에서 PAF생성효소, PAF-acetyltrasferase는 LDL-콜레스테롤에 의해 증가되고 녹차 카테킨에 의해 억제된다.

본 실험에서는 혈소판 응집에 대한 녹차의 *invivo* 효과를 본 반면 대부분의 실험이 *invitro*로 진행한 점은 다소 차이가 있는데, homeostsis 기전이 작용하는 생리적 환경의 *invivo* 실험과는 달리 *invitro*상태에서 혈소판이 녹차 추출물이나 PAF에 노출되는 경우 그 반응은 달라지리라 생각된다. 녹차의 항산화효과에 대한 지표로서 측정한 hemolysis는 녹차 분말군과 녹차 추출물군에서 감소되었는데 이는 녹차성분이 활성산소로부터 적혈구막의 손상을 막고 안정성을 증가시키는 것으로 해석할 수 있다. Biswas 등[20]의 연구에서 녹차나 녹차카테킨 섭취는 전자전달계나 자외선 등으로부터 생겨나는 라디칼에 의한 산화 스트레스로부터 적혈구를 보호하여 용혈성 빈혈의 예방에 효과적임을 암시하고 있다. Saffari 등[18]의 *invitro*실험에서 EGCG는 t-butylhydroperoxide에 의한 적혈구막의 Na channel의 손상을 방지한다.

이렇게 녹차 카테킨은 활성산소에 의한 세포막의 지질층을 보호함으로서 세포막의 유동성을 감소시키고 세포막 결합 단백질의 기능에 관여함으로서 물질의 세포막 이동을 정상화시켰는데[19] 이는 본 실험결과에서 intact RBC의 Na passive leak은 대조군에 비해 녹차분말과 녹차 추출물에서 감소되어 있는 것과 일치한다. 활성산소 생성물질인 AAPH를 처리함으로서 라디칼에 의한 세포손상 정도를 측정한 △Na leak 또한 녹차분말과 녹차 추출물군에서 낮게 나타났는데 이는 녹차가 적혈구막의 산화적 손상을 예방하는데 유효함을 보여준다. 녹차 카테킨은 EGCG와 ECG와 같은 gallate moiety를 가진 ester형태가 강한 활성산소 소거능을 갖는데[30] 녹차추출물의 81%가 catechin polyphenol이고 이중 84%가 catechin gallate로 구성되어 있다.[6]

본 실험에서 녹차분말과 추출물은 혈장의 TBARS 생성을 억제하였는데, TBA 반응 물질인 MDA는 지질과산화 물질로서 사람에 있어서 하루 7컵의 녹차음용을 2주간만 지속해도 LDL산화의 지표로서 혈장의 MDA-LDL생성이 현저히 감소된 것으로 나타났다.[16] 산화 LDL은 동맥경화의 유도물질로서 Hsu 등[17]의 연구에 의하면 신장 투석환자에 있어서 녹차 카테킨 (GTC) 복용은 투석과정에서 과산화수소 생성을 감소시킴으로서 LDL산화나 염증유발 관련 cytokine의 생성을 억제하여 동맥경화의 진행을 완화한다.

요 약

본 연구에서 pair feeding함으로서 사료 섭취량이 체중이나 지단백 대사에 미칠 요인을 제거한 상태에서 녹차분말이나 녹차추출물이 갖는 항 비만효과나 지질 강하효과를 비교 조사하였다.

녹차분말이나 추출물에서 증체 억제효과를 보였는데 이는 녹차성분이 소장에서의 지방흡수를 억제하거나 지방산화를 촉진하고 대사율을 올려 열량소비를 증가시킨다는 기존 연구결과와 이해를 같이 하는데, 예비실험에서 사료섭취량 자체가 억제됨을 감안 할 때 녹차 추출물이나 분말의 항비만 효과에 대해서 긍정적이다. 본 연구에서 녹차 추출물의 높은 콜레스테롤 흡수 억제력에도 불구하고 녹차의 콜레스테롤 강하효과는 나타나지 않았는데 이는 체 콜레스테롤 pool size에 강한 homeostasis 기질이 작용한 것이라고 생각할 수 있다.

식이 콜레스테롤과 지방의 흡수억제에 있어서 녹차분말과 녹차 추출물의 장내 유용성과 체 콜레스테롤의 합성과 담즙 생성에 있어서 EGCG를 포함한 차 카테킨 작용기전을 이해하기 위해서 보다 많은 연구가 필요하리라 생각된다. 녹차 분말과 추출물은 항산화 지표에도 정도에 다소 차이가 있으나 긍정적인 효과를 보였는데 녹차 카테킨은 수용성으로 bioavailability가 비교적 높은 polyphenol계 항산화 물질로서 녹차 잎의 건조중량 50% 이상이 카테킨이고 이중 80% 이상이 catechin gallate 형태로 강한 항산화 효력을 지닌 것으로 나타나 있다.

노화를 활성산소에 의한 세포의 손상과정이라 볼 때 식품으로서 녹차는 매우 중요한 입지에 있다. 차로 마시는 녹차의 섭취방법에서 분말이나 추출물로 섭취방법을 다양화하고 있는데 분말과 추출물의 영양적 효과를 비교해 볼 때 유리 (free)된 카테킨 형태로 추출물이 유리할 수 있지만 녹차분말이 식품으로서의 높은 선호도와 함께 HDL-콜레

스테롤을 증가시키는 효과가 있다면 분말차의 섭취도 좋은 방법이다. 음료로서 따져 볼 때 일회 분량 2 g의 녹차를 3회 우려 마시는 경우 이로부터 섭취할 수 있는 항산화물질은 EGCG기준으로 109~147 mg정도이고 이를 비타민 C로 환산하는 경우 142~168 mg이다.[31] 천연의 항산화 물질을 자연스럽게 섭취하는 방법으로서 차의 음용을 생활화하는 것은 비만이나 퇴행성 또는 노화관련 질환의 예방차원에서 바람직하리라 본다.

Literature cited

1) Trevisanato SI, Kim YI. Tea and health. *Nutrition Review* 2000; 58: 1-10
2) Diepvens K, Westerterp KR, Westerterp-Plantenga MS. Obesity and thermogenesis related to the consumption of caffeine, ephedrine, capsaicin, and green tea. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; 292(1): R77-85
3) Westerterp-Plantenga MS, Lejeune MP, Kovacs EM. Body weight loss and weight maintenance in relation to habitual caffeine intake and green tea supplementation. *Obes Res* 2005; 13(7): 1195-1204
4) Raederstorff DG, Schlachter MF, Elste V, Weber P. Effect of EGCG on lipid absorption and plasma lipid levels in rats. *J Nutr Biochem* 2003; 14(6): 326-332
5) Lin JK, Lin-Shiau SY. Mechanisms of hypolipidemic and anti-obesity effects of tea and tea polyphenols. *Mol Nutr Food Res* 2006; 50(2): 211-217
6) Shimotoyodome A, Haramizu S, Inaba M, Murase T, Tokimitsu I. Exercise and green tea extract stimulate fat oxidation and prevent obesity in mice. *Med Sci Sports Exerc* 2005; 37(11): 1884-1892
7) Kuriyama S. The relation between green tea consumption and cardiovascular disease as evidenced by epidemiological studies. *J Nutr* 2008; 138(8): 1548S-1553S
8) Kondo S, Shinchi K, Wakabayashi K, Honjo S, Ogawa S, Katsurada M. Relation of green tea consumption to serum lipids and lipoproteins in Japanese men. *J Epidemiol* 1996; 6: 128-133
9) Loest HB, Noh SK Koo SI. Green tea extract inhibits the lymphatic absorption of cholesterol and α-tocopherol in ovariectomized rats. *J Nutr* 2002; 132: 1282-1288
10) Bursill CA, Abbey M, Roach PD. A green tea extract lowers plasma cholesterol by inhibiting cholesterol synthesis and upregulating the LDL receptor in the cholesterol-fed rabbit. *Atherosclerosis* 2007; 193(1): 86-93
11) Yang TT, Koo MW. Chinese green tea lowers cholesterol level through an increase in fecal lipid excretion. *Life Sci* 2000; 66(5): 411-423.
12) Woo D, Kissela BM, Khoury JC, Sauerbeck LR, Kleindorf D, Broderick JP et al. Hypercholesterolemia, HMG coA reductase inhibitor, and risk of intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2004; 35: 1360-1364
13) Elisaf M, Karabina SA, Bairaktari E, Goudevenos JA, Tselepis AD. Increased platelet reactivity to the aggregatory effect of platelet activating factor, in vitro, in patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia. *Platelets* 1999; 10(2-3): 124-131
14) Sugatani J, Fukazawa N, Ujihara K, Yoshinari K, Abe I, Noguchi H, Miwa M. Tea polyphenols inhibit acetyl-CoA: 1-alkyl-sn-glycero-3-phosphocholine acetyltransferase (a key enzyme in platelet-activating factor biosynthesis) and platelet-activating factor-induced platelet aggregation. *Int Arch Allergy Immunol* 2004; 134(1): 17-28
15) Deana R, Turetta L, Dona M, Brunati AM, Garbisa S. Green tea epigallocatechin-3-gallate inhibits platelet signalling pathways triggered by both proteolytic and non-proteolytic agonists. *Thromb Haemost* 2003; 89(5): 866-874
16) Hirano-Ohmori R, Takahashi R, Momiyama Y, Yonemura A, Tamai S, Kondo K, Ohsuzu F. Green tea consumption and serum malondialdehyde-modified LDL concentrations in healthy subjects. *J Am Coll Nutr* 2005; 24(5): 342-346
17) Hsu SP, Wu MS, Yang CC, Huang KC, Liou SY, Hsu SM, Chien CT. Chronic green tea extract supplementation reduces hemodialysis-enhanced production of hydrogen peroxide and hypochlorous acid, atherosclerotic factors, and proinflammatory cytokines. *Am J Clin Nutr* 2007; 86(5): 1539-1547
18) Saffari Y, Sadrzadeh SM. Green tea metabolite EGCG protects membranes against oxidative damage in vitro. *Life Sci* 2004; 6: 74(12): 1513-1518
19) Tsuchiya H Effects of green tea catechins on membrane fluidity. *Pharmacology* 1999; 59(1): 34-44
20) Biswas S, Bhattacharyya J, Dutta AG. Oxidant induced injury of erythrocyte-role of green tea leaf and ascorbic acid. *Mol Cell Biochem* 2005; 276(1-2): 205-210
21) Folch J, Lee M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 2005; 226: 497-509
22) Kang JS, Cregor MD, Smith JB. Effect of calcium on blood pressure, platelet aggregation and erythrocyte sodium transport in Dahl salt sensitive rats. *J Hypetension* 1990; 8: 245-250
23) Draper HH & Callant AS (1969). A simplified hemolysis test for vitamin E deficiency. *J Nutr* 1969; 98: 390-394
24) Yagi K, A simple fluometric method for lipoperoxide in plasma. *Biochem Med* 1976; 15: 212-216
25) Kao YH, Hiipakka RA, Liao S. Modulation of endocrine systems and food intake by green tea epigallocatechi gallate. *Endocrinology* 2000; 141: 980-987
26) Suzuki J, Ogawa M, Izawa A, Sagesaka YM, Isobe M. Dietary consumption of green tea catechins attenuate hyperlipidaemia-induced atherosclerosis and systemic organ damage in mice. *Acta Cardiol* 2005; 60(3): 271-276
27) Diepvens K, Kovacs EMR, Nijs IMT, Vogels N, Westerterp-Platenga MS. Effect of green tea on resting energy expenditure and substrate oxidation during weight loss in overweight females. *Br J Nutr* 2005; 94: 1026-1034
28) Mata-Bilbao Mde L, Andrés-Lacueva C, Torre C, Lamuela-Raventós RM et al. Absorption and pharmacokinetics of green tea catechins in beagles. *Br J Nutr* 2008; 100(3): 496-502
29) Hasegaawa N, Yamda N, Mori M. Powdered green tea has antilipogenic effect on Zucker rats fed a high fat diet. *Phytother Res* 2003; 17(5): 477-480
30) Thephinlap C, Ounjaijean S, Porter JB, Srichairatanakool S. Epigallocatechin-3-gallate and epicatechin-3-gallate from green tea

decrease plasma non-transferrin bound iron and erythrocyte oxidative stress. *Med Chem* 2007; 3(3): 289-296

31) Oh JH, Kim EH, Kim JL, Moon YI, Kang YH, Kang JS. Study on antioxidant potency of green tea by DPPH method. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2004; 33(7): 1079-1084