

마이크로웨이브를 조사한 흰쥐 폐조직의 Phospholipase A₂ 활성과 Arachidonic Acid Cascade계에 미치는 녹차 Catechin의 영향

김 미 지

대구보건대학교 호텔외식조리학부

Effects of Green Tea Catechin on Microsomal Phospholipase A₂ Activity and Arachidonic Acid Cascade in Rat Lung Exposed to Microwave

Mi-Ji Kim

Dept. of Hotel, Restaurant and Culinary Arts, Daegu Health College, Daegu 702-722, Korea

Abstract

In the present study, the effects of green tea catechin on microsomal phospholipase A₂ (PLA₂) activity and the arachidonic acid (AA) cascade in the lungs of microwave exposed rats were investigated. One Sprague-Dawley male rats weighting 100 ± 10 g was randomly assigned to the normal group and three were assigned to the microwave exposed groups. The microwave exposed groups were subdivided into three groups according to the levels of dietary catechin supplementation: catechin free diet (MW) group, 0.25% catechin (MW-0.25C) group and 0.5% catechin (MW-0.5C) group. Rats were sacrificed on the 6th day after microwave irradiation (2.45 GHz, 15 min). The lung microsomal PLA₂ activity in the MW and MW-0.25C groups was 30% and 15% greater than that of the normal group, respectively, whereas no significant difference between the normal group and MW-0.5C group was observed. The percentage of phosphatidylethanolamine (PE) hydrolyzed in the lung microsome in the MW, MW-0.25C and MW-0.5C group increased by 47%, 18% and 20%, respectively, due to microwave irradiation. The formation of thromboxane A₂ (TXA₂) in the lung microsome was 50% greater in the MW group than in the normal group. However, the levels of TXA₂ in the MW-0.25C and MW-0.5C group were normal. The formation of prostacyclin (PGI₂) in the lung microsome was 31% lower in the MW group than in the normal group, while the levels of PGI₂ in the MW-0.25C and MW-0.5C group were similar to the normal group. The lung microsomal thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) concentration, which can be used as an index of lipid peroxide was 34% greater in the MW group, when compared with the normal group. However, there was no difference between the MW-0.25C, MW-0.5C and normal groups. In conclusion, lung function appeared to be improved by green tea catechin supplementation due to its antithrombus action, which in turn controls the AA cascade system.

Key words: microwave, green tea catechin, antithrombus, phospholipase A₂, lipid peroxidation

서 론

핸드폰 사용을 비롯한 일상생활 주변에서 전자파를 발생 하는 기계들의 사용이 증가됨에 따라 전자기파에 노출될 기 회가 빈번해지고 있으며 그에 따라 전자파의 유해에 대해 많은 관심이 집중되고 있다. 특히 마이크로웨이브와 같은 고주파의 경우에는 상당한 양의 에너지를 함유하여 노출될 경우 인체의 조직온도를 상승시키고 특히 세포증식이 활발 한 생식기관, 심폐조직 및 혈액구 등의 세포에 유해한 것으 로 알려지고 있다(1-4). 지금까지 타의 연구보고나(5) 선행 된 기초 연구결과(6,7)를 종합해 볼 때 이러한 전자파의 독성 은 활성산소종의 발생에 의한 산화적 독성작용에 기인할 가 능성이 높다.

Superoxide radical($O_2^{\cdot-}$)이나 hydroxyl radical($\cdot OH$)을 비롯한 여러 가지 활성산소는 생체내의 정상적인 대사과정 중에서도 생성되지만 UV, X-ray, 중금속 등과 같은 외인적 요인에 의해 생성이 증가되어 조직의 노화와 질병을 촉진시 킨다. Harman 등의 유해산소론 에서는 암이나 동맥경화증 과 같은 성인병 유발의 원인은 초기단계에서 superoxide radical($O_2^{\cdot-}$), hydroxy radical($\cdot OH$)과 같은 free radical에 의한 조직의 손상으로부터 시작되어 여러 생리적 기능이 저 하됨으로써 발견되는 것으로 보고되고 있다(8). 특히 폐조직 은 미세혈관의 분포도가 높고 산소의 유출입이 높기 때문에 free radical 생성 가능성이 높은 조직이므로 free radical에 의한 산화적 손상의 발생도 증가할 것으로 생각된다. 실제로 Giulivi 등(9)은 paraquat나 hyperbarbic oxygen에 노출 시

폐 조직에서 free radical 발생과 같은 산화적 스트레스의 증가를 보고한 바 있다. 이러한 산화적 스트레스의 증가는 phospholipase A₂(PLA₂) 활성화와 arachidonic acid(AA) cascade 활성을 변화시켜 혈전생성을 유도할 수 있다(10-12). PLA₂는 AA cascade 전단계의 key enzyme으로써 조직의 free radical의 농도나 지질과산화물 농도의 상승에 의해 활성화되어 cyclooxygenase pathway의 활성을 촉진시켜 나아가 PGI₂/TXA₂ ratio의 불균형을 초래함으로써 혈전생성이 촉진된다. 또 혈전생성 지표인 PGI₂/TXA₂의 불균형도 역시 산화적 스트레스와 깊은 관련이 있다. 즉 PGI₂ 합성효소인 prostacyclin synthetase가 thromboxane A₂(TXA₂) 합성효소인 thromboxane synthetase보다 훨씬 낮은 지질과산화물의 농도에서 그 활성이 저해받기 때문이다(13,14). 그러므로 혈전생성의 유도를 막기 위해서는 AA cascade계의 율속 효소인 PLA₂ 활성을 조절하고 그 생성물인 PGI₂/TXA₂ 비율개선이 필요하며 이를 위해서는 free radical의 생성과 과산화지질량의 축적을 감소시키는 것이 최우선이라고 할 수 있다. 따라서 천연의 강력한 항산화적 기능을 가지고 있는 항 혈전물질을 전자파 방어에 이용함이 필요하겠다.

한편 녹차 중에 존재하는 폴리페놀성 화합물인 catechin은 여러 가지 약리 작용이 보고되고 있고(15-21) 특히 항산화 작용 및 항 혈소판응집 능의 기능이 뛰어난 것으로 보고되고 있다(4-6,22-24). 실제로 카드뮴중독 쥐나 당뇨 쥐의 혈소판 및 신장조직에서의 항 혈전작용이 vitamin E보다 우수함이 규명된 바 있다(25,26).

따라서 본 연구에서는 흰쥐에 마이크로웨이를 조사한 후 혈액순환 및 호흡장애의 주요 장기인 폐조직을 대상으로 폐 기능장애를 일으키는데 주된 역할을 하는 폐혈관의 혈전생성능을 AA cascade계를 통해 관찰하여 전자파에 의한 폐혈관의 혈전생성능과 그에 대한 녹차 catechin의 개선 효과를 규명하고자 한다.

재료 및 방법

실험동물 및 식이

실험군은 마이크로웨이를 조사하지 않은 정상 군과 마이크로웨이를 조사한 군으로 나누고 마이크로웨이브 조사 군은 다시 식이 중 catechin 공급수준에 따라 catechin을 넣지 않은 군(MW group), catechin을 2.5 g/kg diet 급여한 군(MW-0.25C group), catechin을 5 g/kg diet을 급여한 군(MW-0.5C group)으로 나누었다(Table 1). 식이와 음료는 자유섭식 시키면서 2주간 사육한 후 2.45 GHz 대역의 주파수를 15분간 1회 조사하였으며 마이크로웨이브 조사 후 6일째 동물을 희생시켜 본 실험에 사용하였다. 실험군의 실험동물수는 각각 10마리로 실험하였다. 식이용 catechin은 Matsuzaki와 Hata(22)의 방법으로 crude catechin 분말을 조제하여 사용하였으며 순도는 87.5%였다. 이것을 100%로 환산하

Table 1. Classification of experimental groups

Groups	Catechin % of diet	Microwave
Normal	0	—
MW	0	+
MW-0.25C	0.25	+
MW-0.5C	0.5	+

Irradiated 2.45 GHz microwave for 15 min.

Normal: microwave no irradiation.

MW: microwave irradiation, catechin free diet.

MW-0.25C: microwave irradiation, 0.25% catechin supplementation.

MW-0.5C: microwave irradiation, 0.5% catechin supplementation.

였을 때 catechin 종류별 함량은 epigallo catechin gallate (EGCG) 51.86%, epicatechin gallate(EGCg) 12.48%, epigallocatechin(EGC) 27.65%, epicatechin(EC) 8.0% 순이었으며 이것을 0.25%(MW-0.25C group), 0.5%(MW-0.5C group)씩 첨가하였다.

실험동물의 마이크로웨이브 조사장치 및 방법

실험장비로는 고주파 발생장치로 2.45 GHz로 발진 주파수를 가진 가정용 전자레인지의 개조하여 출력 환 및 노출시간을 임의로 설정할 수 있도록 원격조정을 가능하게 제작하였으며 마이크로웨이브 발생장치의 출력측정은 Hewlett Packard사(Palo Alto, CA, USA)의 EMC analyzer를 이용하여 측정하였다. 방사능의 출력의 측정은 최대 노출시간 15분이상이 되도록 수차례 거리를 조절하여 출력발생장치의 35 cm 거리를 노출 점으로 잡고 이점에서의 출력을 측정한 결과 40 mW/cm²(17 dBuV/m)였다.

시료채취 및 효소원의 조제

실험이 종료된 동물은 가벼운 ether 마취 하에서 혈액을 채취한 후 폐조직을 절제하고 0.9% NaCl로 세척한 후 액체 질소로 급속 냉동시킨 후 -80°C에 냉동 보관한 후 실험에 사용하였다. 폐의 microsome 분획은 전보(6)와 같은 방법으로 행하였다.

폐조직 microsome에서의 phospholipase A₂의 활성 측정

기질로는 1-pal-2-[1-¹⁴C]linoleoyl PE를 사용하였고 유리되어진 linoleic acid를 측정하는 Dole과 Meinertz 방법(27)을 사용하였다. 효소로는 분리해 놓은 microsome을 1 mg protein/mL로 희석한 것을 20 μ L를 사용하며 0.05 M Tris-HCl(pH 7.0) 20, 40 μ L, 40 mM CaCl₂ 10 μ L, 기질은 1-pal-2-[1-¹⁴C]linoleic PE(1000 cpm/nmol) 20 nmol, 증류수 30 μ L를 넣은 후 37°C에서 20분간 incubation 시켰다. 여기에 Dole시약(N-H₂SO₂ 1 mL+isopropanol 39 mL+N-heptane 4 mL) 560 μ L와 증류수 110 μ L를 넣고 1분간 교반한 후 3,000 rpm에서 원심분리 하여 얻어진 상층액 150 μ L를 heptane 0.8 mL에 넣는다. 1분간 교반한 후 3분간 원심분리 하여 얻어진 상층액 0.8 mL를 toluene계 cocktail solution 0.5

mL에 넣은 후 liquid scintillation counter에서 유리되어진 linoleic acid를 측정하였다.

폐 microsome에서의 인지질분자종 측정

인지질 추출법: 폐 microsome을 5 mg protein/mL로 희석한 것 1 mL를 시료로 하여 chloroform 1.2 mL와 methanol 2.4 mL를 넣은 후 격렬하게 교반하였다. 여기에 chloroform 1.2 mL와 증류수 1.4 mL를 넣어 격렬하게 교반한 후 3,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 이때 하층액을 취하고 상층액에 chloroform 2.4 mL를 넣어 교반하여 얻은 하층액을 합하여 유기용매를 N₂ gas로 날린 후 lipid film을 형성하였다.

인의 정량법: Marinetti 방법(28)으로 lipid film에 200 μ L chloroform을 넣은 후 20 μ L를 취한 것을 시료로 하고 3 mM KH₂PO₄를 standard로 하며 digestion reagent(60% HClO₄ : c-/H₂SO₄=1:1) 0.35 mL를 넣은 후 황색에서 무색, 무색에서 다시 회색으로 변할 때까지 태웠다. 실온에서 식힌 증류수 0.25 mL ammoniummolybdate 2 mL reducing reagent (1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid 1 g을 유발에서 혼화시킨 후 15% 황산나트륨 100 mL와 섞은 후) 0.1 mL를 넣어 95°C에서 10분간 heating 시켰다. 다시 실온에서 식힌 후 750 nm에서 흡광도를 측정하였다.

인지질분자종의 분리: 인지질분자종의 분리는 2차원의 TLC plate로 분리하며 1차 전개용매로는 chloroform : methanol : acetic acid=65:25:10을 사용하였다. TLC plate는 MERCK사(Darmstadt, Germany)의 5721번(20 cm×20 cm, silicagel 60, without fluroscent inducator)을 사용하였고 I₂로 발색시킨 후 다시 ninhydrin으로 발색하였다. TLC plate 상에 나타난 인지질분자종은 각각 긁어내어 전술한 방법으로 인 정량하였다. 인지질분자종중 phosphatidylcholine(PC), lysophosphatidyl-choline(Lyso PC)phosphatidylethanolamine(PE), lysophosphatidylethanolamine(Lyso PE)의 인 정량 값을 이용하여 PC와 PE의 가수 분해율을 구하였다.

PC 가수분해율(%)=[Lyso PC/ (Lyso PC+PC)]×100

PE 가수분해율(%)=[Lyso PE/ (Lyso PE+PE)]×100

폐조직 microsome에서의 prostacyclin(PGI₂) 생성 측정

PGI₂는 반감기가 매우 짧으므로 생리적으로 안정된 대사 물질인 6-keto prostaglandin F_{1 α} 를 측정하여 PGI₂ 생성량을 대신하였다. Amersham Bioscience(Piscataway, NJ, USA)에서 구입한 6-keto prostaglandin F_{1 α} RIA kit(RPA515)를 사용하여 전보(6)에서와 같은 방법으로 실시하였다. 즉 미리 조제해놓은 반응 상등액은 phosphate buffered saline gel로 희석하여 이 희석액 100 μ L에 ¹²⁵I-PGI₂에 100 μ L와 anti-serum 100 μ L를 가하여 잘 혼합하고 4°C cold chamber 내에 16시간 방치하여 반응액 중의 PGI₂와 ¹²⁵I-PGI₂가 antiserum과 결합하도록 하였다. 냉욕상에 반응액을 방치하면서 여기에 잘 흔들어 균질화 시킨 Amerlex-M second antibody 용액 500 μ L를 가해 잘 섞은 후 냉욕상에서 10분간 방치함으로

써 유리상태의 trace를 첨가한 ¹²⁵I-PGI₂와 시료중의 PGI₂가 antibody와 경쟁적으로 결합하게 하였다. 그 다음 4°C에서 10분간 1,500×g로 원심분리한 후 상층액을 버리고 pellet층에 결합된 상태로 ¹²⁵I-PGI₂를 gamma counter(PerkinElmer, Waltham, MA, USA)로 측정하였다. 시료중의 PGI₂의 농도는 표준곡선으로부터 얻었다.

폐조직 microsome에서의 thromboxane A₂(TXA₂) 생성 측정

폐조직 microsome의 TXA₂ 생성량은 Amersham Bioscience에서 구입한 TXB₂용 RIA kit(RPA516)를 사용하였다. 미리 조제해놓은 반응 상등액은 phosphate buffered saline gel로 희석하여 이 희석액 100 μ L에 ¹²⁵I-TXA₂에 100 μ L와 antiserum 100 μ L를 가하여 잘 혼합하고 4°C cold chamber 내에 16시간 방치하여 반응액 중의 TXA₂와 ¹²⁵I-TXA₂가 antiserum과 결합하도록 하였다. 냉욕상에 반응액을 방치하면서 여기에 잘 흔들어 균질화 시킨 Amerlex-M second antibody 용액 500 μ L를 가해 잘 섞은 후 냉욕상에서 10분간 방치함으로써 유리상태의 trace를 첨가한 ¹²⁵I-TXA₂와 시료 중의 TXA₂가 antibody와 경쟁적으로 결합하게 하였다. 그 다음 4°C에서 10분간 1,500×g로 원심 분리한 후 상층액을 버리고 pellet층에 결합된 상태로 ¹²⁵I-TXA₂를 gamma counter로 측정하였다. 시료중의 TXA₂의 농도는 표준곡선으로부터 얻었다

과산화지질정량

과산화지질의 정량은 thiobarbituric acid(TBA)와 반응하는 물질을 측정하는 Omura와 Sato 방법(29)을 이용하였다.

단백질 정량

폐조직 microsome의 단백질 정량은 bovine serum albumin을 표준용액으로 하여 Lowry 등의 방법(30)에 의해 측정하였다.

통계처리

모든 실험결과에 대한 통계처리는 각 실험 군별로 평균차이가 있는가를 검증하기 위하여 분산분석(ANOVA 검증)을 실시하였으며 분산분석의 결과 유의성이 발견된 경우 Tukey's-HSD test(honestly significantly difference test)에 의해 처리되었다.

결 과

폐조직중의 PLA₂ 활성

Arachidonic acid cascade 계의 율속 효소로 알려진 PLA₂의 활성을 폐조직에서 관찰한 결과는 Fig. 1과 같다. PLA₂ 활성은 정상군에 비해 MW군에서 30%로 가장 많이 증가되었고 MW-0.25C군에서는 15% 증가되었으며 catechin 0.5% 공급군인 MW-0.5C군은 정상군 수준이었다. 이와 같이 폐조직에서 PLA₂ 활성은 마이크로웨이브 조사 시 그 활성이

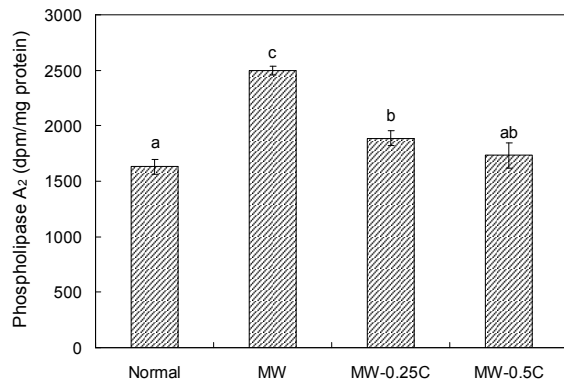


Fig. 1. Effects of green tea catechin on phospholipase A₂ activities in rat lung microsome of exposed to microwave. All values are mean±SE (n=10). Values within a column with different superscript letters are significantly different each group at p<0.05 by Tukey's test.

Table 2. Effects of green tea catechin on changes in micro-somal phosphatidylcholine and phosphatidyl ethanolamine hydrolysis in rat lung of exposed to microwave (%)

Group	PC hydrolysis	PE hydrolysis
Normal	11.595±2.61 ^{NS}	12.797±1.37 ^a
MW	14.388±5.94	18.870±1.48 ^c
MW-0.25C	14.101±3.31	15.895±1.29 ^b
MW-0.5C	13.58 ±3.85	15.671±3.12 ^b

All values are mean±SE (n=10). Values within a same column with different superscript letters are significantly different each group at p<0.05 by Tukey's test.

증가되고 catechin 공급으로 그 활성이 저하됨으로써 catechin 공급수준과 PLA₂ 활성은 역 비례함을 알 수 있었다.

폐조직 인지질분해효소의 변화

폐조직 microsome분획에서 각 인지질분해효소의 변화를 관찰한 결과는 Table 2와 같다. 인지질분해효소의 PE의 분해로 생긴 lyso PE가 정상군에 비해 MW군에서 47% 증가하였으나 MW-0.25C군 및 MW-0.5C군에서는 각각 18%와 20% 증가하였다. PC의 분해로 생성되는 lyso PC는 군 간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

폐조직 microsome의 TXA₂, PGI₂ 생성

혈소판의 응집과 혈관수축을 촉진하는 TXA₂ 생성은 정상군에 비해 MW군에서 50%의 현저한 증가를 보였으나 catechin 공급군인 MW-0.25C군, MW-0.5C군은 정상군 수준이었다(Fig. 2). 이와 같이 혈소판 응집과 혈관수축지표인 TXA₂ 농도는 catechin 공급 시 그 생성량이 현저하게 감소되었다. TXA₂와는 길항적인 작용을 하며 혈관이완 및 항혈소판 응집작용물질인 PGI₂는 정상군에 비해 MW군에서는 31%의 유의적인 감소를 보였으나 catechin 공급군인 MW-0.25C 및 MW-0.5C군은 정상군 수준이었다(Fig. 2). 한편 혈전생성지표인 PGI₂/TXA₂ ratio는 MW군은 정상군에 비해 43% 유의적으로 감소되었으나 MW-0.25C 및 MW-0.5C군은 정상군 수준으로 증가되었다(Fig. 2). 이와 같이 녹차

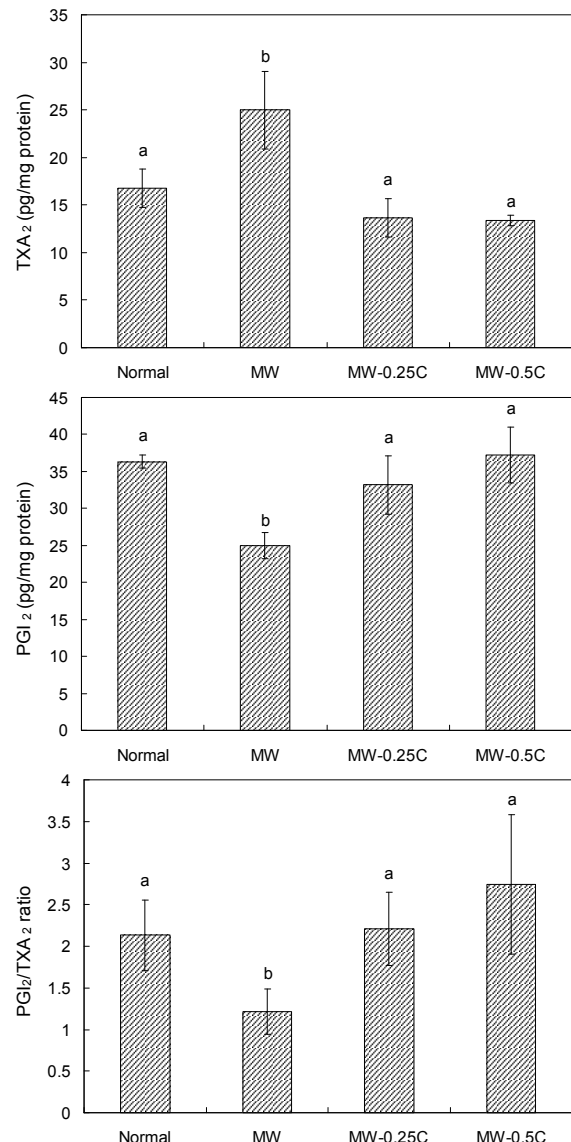


Fig. 2. Effects of green tea catechin on thromboxane A₂ (TXA₂), prostacyclin (PGI₂) contents and PGI₂/TXA₂ ratio in rat lung microsome of exposed to microwave. All values are mean±SE (n=10). Values within a column with different superscript letters are significantly different each group at p<0.05 by Tukey's test.

catechin의 공급군은 TXA₂ 합성은 감소시키고 PGI₂ 합성은 증가시켜 catechin의 공급수준과 비례적으로 PGI₂/TXA₂ ratio를 증가시켰다.

폐조직중의 과산화지질 함량

조직의 산화적 손상의 지표로 삼고 있는 지질과산화물의 함량을 측정한 결과는 Fig. 3과 같다. 정상군에 비해 MW군에서는 34% 유의적으로 증가하였으며 catechin공급군은 정상군 수준이었다.

고 찰

본 연구는 마이크로웨이브를 조사한 흰쥐의 혈전생성능

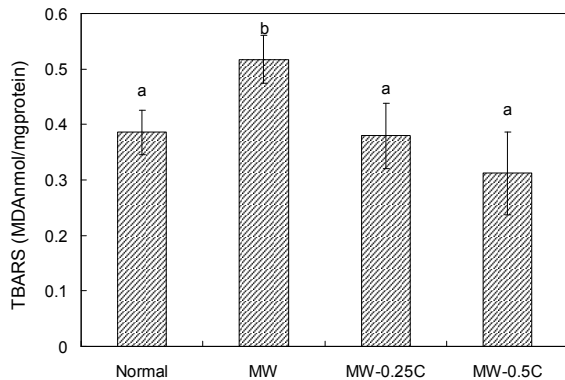


Fig. 3. Effects of green tea catechin on thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) concentrations in rat lung microsome of exposed to microwave. All values are mean \pm SE (n=10). Values within a column with different superscript letters are significantly different each group at $p < 0.05$ by Tukey's test.

에 미치는 녹차 catechin의 영향을 규명하기 위하여 AA cascade계를 중심으로 연구하였다. AA cascade계는 이의 율속 효소인 PLA₂가 glycerol-3-phospholipid의 sn-2위치의 fatty acid ester 결합을 가수분해하여 arachidonic acid와 같은 유리지방산과 lysophospholipid를 생성함으로써 개시되며 이러한 반응은 다양한 산화적 스트레스에 의해 활성화된다고 알려져 있다. 생체의 병리상태나 화학적 물리적 스트레스와 같은 내인적 혹은 외인적 요인에 의해 과잉 생성된 free radical이나 축적된 지질과산화물의 작용에 의해 활성화되어 세포막 인지질 이중막으로부터 arachidonic acid가 유리됨으로써 arachidonic acid 대사반응이 촉진된다. PLA₂는 이 인지질의 2번 위치는 대개 고도의 불포화지방산만이 ester 결합을 하고 있으므로 자유라디칼의 공격을 받을 경우 쉽게 과산화물이 생성된다. 분해된 산물 중 산화된 유리지방산은 결국 염증부위에서 혈관투과성의 증가, 혈관확장 작용 등을 나타내며 lysophospholipid는 용혈작용 및 혈소판 응집작용 등의 생리활성을 나타낸다.

본 연구에서 PLA₂의 활성을 폐조직에서 관찰한 결과 PLA₂ 활성은 정상군에 비해 MW군에서 30% 현저하게 증가되었으나 MW-0.25C군에서는 15% 증가되었으며 catechin 0.5% 공급군인 MW-0.5C군은 정상군 수준이었다. 이러한 결과는 본 연구에서 나타난 바와 같이 마이크로웨이브 조사에 의한 지질과산화의 증가로 인해 PLA₂가 활성화되었음을 의미하며 강력한 항산화제인 catechin 공급으로 완화됨을 보였다. 이러한 결과는 자외선 노출 시 PLA₂ 합성이 증가하고 membrane에서 arachidonate deacylation을 향상시키는 prostaglandin E₂(PGE₂) 합성을 증가시킴으로써 염증반응을 유도한다는 결과와 유사하다(31). 또한 당뇨 쥐에서 증가된 혈소판 PLA₂ 활성이 catechin 급여로 그 활성이 억제되었다는 Yang 등(24)의 보고나 Kwag 등(13)의 vitamin E의 다량급여로 지질과산화물이 저하되면서 PLA₂ 활성이 감소되었다는 보고와 일치하며 이들 연구에서처럼 이러한 결과들은 catechin이나 vitamin E의 항산화 기능에 의한 지질과

산화물의 생성을 억제하는 데에 기인하는 것으로 본다.

본 연구에서도 폐조직중의 microsomal TBARS 농도를 관찰한 결과 정상군에 비해 MW군에서는 34% 현저하게 증가되었으나 catechin 공급군은 정상군 수준으로 PLA₂ 활성변화와 비슷하였다. 이러한 결과는 Kalns 등(32)의 연구결과에서처럼 마이크로웨이브에서 유도되는 산화적 스트레스의 증가로 혈액, 간, 폐 등의 주요 조직에서 병리적 손상이 일어난다는 보고와 유사하다. 또 Giulivi 등(9)의 보고에서처럼 superoxide radical(O₂⁻·), H₂O₂ 같은 free radical에 의한 산화적 스트레스의 증가로 폐조직 산화적 손상을 초래한다는 연구보고와도 일치하였다. 또한 선행연구(6)에서도 마이크로웨이브 조사 시 간조직의 SOD, GSHpx 등 항산화 효소의 활성과 유전자발현이 저하되고 TBARS 농도가 증가되었으나 catechin을 공급함으로써 이들 항산화효소계의 효소가와 유전자 발현이 증가되고 TBARS 농도가 감소된 결과와 관련이 있다고 본다.

Borowitz와 Montgomery(33)는 생체막이 free radical 생성계에 노출되었을 때 내인성 lysophospholipid의 수준이 증가된다고 보고하였다. 본 연구에서 폐조직 microsome에서 인지질분자종의 변화를 관찰한 결과 PE의 분해로 생긴 lyso PE가 정상군에 비해 MW군에서 47% 증가하였으나 MW-0.25C군 및 MW-0.5C군에서는 각각 18%, 20% 증가하였다. PC의 분해로 생성되는 lyso PC는 군 간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 이와 같이 마이크로웨이브 조사한 폐조직에서는 인지질 가수분해의 증가와 지질과산화물의 축적이 일어남이 관찰되었으나 catechin의 공급으로 세포막 인지질의 분해가 감소되었다. 이러한 결과는 당뇨 쥐 간 및 신장에서 정상군에 비해 당뇨군에서 PE hydrolysis가 증가하였다는 Kwag(13) 및 Choi 등(34)의 보고와 비슷한 경향이였다. 이러한 PE hydrolysis의 증가는 PLA₂가 PE에 특이적으로 작용한 결과로 생각되어진다.

혈소판 응집을 촉진하고 혈관수축을 촉진하는 것으로 알려진 TXA₂ 합성은 PLA₂ 활성 및 COX 등으로 이루어지는 AA cascade계의 일련의 효소반응을 통해 생성되는 강력한 혈소판 응집물질로 이의 합성조절은 세포막의 인지질로부터 arachidonic acid를 생성하는 PLA₂ 작용에 의존하고 있다. 본 연구에서 TXA₂ 생성은 정상군에 비해 MW군에서 50%의 높은 증가를 보였으나 catechin 공급군인 MW-0.25C군, MW-0.5C군은 정상군 수준이었다.

반면 prostacyclin은 혈관벽에서 생합성 되어 혈소판 응집을 억제시키고 혈관확장을 촉진시켜 혈소판 응집을 억제하여 TXA₂와 길항적인 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 PGI₂는 정상군에 비해 MW군에서는 31%의 현저한 감소를 보였으나 catechin 공급군인 MW-0.25C 및 MW-0.5C군은 정상군 수준이었다. 이러한 결과는 hypernephroma cell에서 라디오파를 조사한 후 PG receptor 및 eicosanoid generation의 감소를 나타낸 Li 등의 보고와 일치하였다(35).

따라서 혈전생성지표인 $\text{PGL}_2/\text{TXA}_2$ ratio는 MW군이 정상군에 비해 43% 유의적으로 감소되었으나 MW-0.25C군 및 MW-0.5C군은 정상군 수준으로 증가되었다. 이와 같이 녹차 catechin의 공급군은 TXA_2 합성은 감소시키고 PGL_2 합성은 증가시켜 catechin의 공급수준과 비례적으로 $\text{PGL}_2/\text{TXA}_2$ ratio를 증가시켰다. 이러한 결과는 Piana 등(36)의 사람의 혈소판에 2.45 GHz의 마이크로웨이브를 조사 시 혈소판변형 및 혈소판기능 이상을 초래한 연구결과와 일맥상통한다고 볼 수 있다.

종합해 볼 때 마이크로웨이브에 피폭된 흰쥐 폐조직에서 TBARS 농도 및 PLA_2 활성이 현저히 증가되었다. 또한 마이크로웨이브 조사로 인한 TXA_2 합성의 증가와 PGL_2 합성의 감소로 혈전생성지표로 인식하는 $\text{PGL}_2/\text{TXA}_2$ ratio의 불균형이 초래되었다. 그러나 항산화 기능이 탁월한 catechin을 다량 공급함으로써 TBARS 농도의 저하로 PLA_2 활성이 억제되고 $\text{PGL}_2/\text{TXA}_2$ ratio가 현저하게 개선되었다. 이상의 결과를 통하여 녹차 catechin은 마이크로웨이브가 조사된 흰쥐 폐조직에서의 항혈전 작용이 우수함을 확인할 수 있다.

요 약

본 연구에서는 흰쥐에 마이크로웨이브를 조사한 후 폐조직을 대상으로 폐조직 기능장애를 일으키는데 주된 역할을 하는 혈전생성능을 arachidonic acid(AA) cascade계를 통해 관찰하여 마이크로웨이브에 의한 폐혈관 기능장애와 그에 대한 녹차 catechin의 항혈전 효과를 규명하고자 하였다. 실험군은 마이크로웨이브를 조사하지 않은 정상군과 마이크로웨이브를 조사한 군으로 나누고 마이크로웨이브 조사 군은 다시 식이 중 catechin 공급수준에 따라 catechin을 넣지 않은 군(MW group), catechin을 0.25% 급여한 군(MW-0.25C group), catechin을 0.5% 급여한 군(MW-0.5C group)으로 나누었다. 식이와 음료는 자유 섭식시키면서 2주간 사육한 후 2.45 GHz 대역의 주파수를 15분간 1회 조사하였으며 마이크로웨이브 조사 후 6일째 동물을 희생시켜 본 실험에 사용하였다. 실험군의 실험동물 수는 각각 10마리로 실험하였다. PLA_2 활성은 마이크로웨이브 조사로 30% 증가하였으며 MW-0.25C군은 15% 증가하였으나 MW-0.5C군은 정상군 수준이었다. 인지질분해효소의 변화를 관찰한 결과 lyso PE가 MW군에서 47% 증가되었으나 MW-0.25C군 및 MW-0.5C군에서는 각각 18%, 20% 증가되었다. TXA_2 생성은 MW군에서 50%의 현저한 증가를 보였으나 catechin 공급군인 MW-0.25C군 및 MW-0.5C군은 정상군 수준이었다. PGL_2 생성은 MW군에서 31%의 유의적인 감소를 보였으나 catechin 공급군인 MW-0.25C군 및 MW-0.5C군은 정상군 수준이었다. 따라서 혈전생성지표인 $\text{PGL}_2/\text{TXA}_2$ ratio는 정상군에 비해 MW군에서 43% 유의적으로 감소되었으나 MW-0.25C군 및 MW-0.5C군은 정상군 수준이었다. 지질과산화

물의 함량은 MW군에서 34% 유의적으로 증가하였으며 catechin 공급군은 정상군 수준이었다. 결론적으로 마이크로웨이브에 피폭된 흰쥐 폐조직에서는 AA cascade계의 율속 효소인 PLA_2 활성의 증가와 혈전생성지표로 인식하는 $\text{PGL}_2/\text{TXA}_2$ ratio의 불균형이 초래되었으나 catechin은 TBARS 농도를 낮추면서 PLA_2 활성을 저해시키고 AA cascade계를 개선시킴으로써 항혈전 작용을 나타내었다.

감사의 글

본 논문은 한국연구재단지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Jing J, Yuhua Z, Xiao-qian Y, Rongping J, Dong-mei G, Xi C. 2012. The influence of microwave radiation from cellular phone on fetal rat brain. *Electromagn Biol Med* 31: 57-66.
2. Dasdag S, Akdag MZ, Ulukaya E, Uzunlar AK, Ocak AR. 2009. Effects of mobile phone exposure on apoptotic glial cells and status of oxidative stress in rat brain. *Electromagn Biol Med* 28: 342-354.
3. Esmekaya MA, Ozer C, Seyhan N. 2011. 900 MHz pulse-modulated radiofrequency radiation induces oxidative stress on heart, lung, testis and liver tissue. *Gen Physiol Biophys* 30: 84-89.
4. Garaj-Vrhovac V, Gajski G, Trosić I, Pavčić I. 2009. Evaluation of basal DNA damage and oxidative stress in Wistar rat leukocytes after exposure to microwave radiation. *Toxicology* 259: 107-112.
5. Dermers PA, Thomas DB, Rogenblatt KA. 1991. Occupational exposure to electromagnetic fields and breast cancer in men. *Am J Epidemiol* 134: 340-349.
6. Kim MJ, Choi JH, Kim SY, Kim JH, Lee JH, Rhee SJ. 2002. Effects of green tea catechin on enzyme activities and gene expression of antioxidative system in rat liver exposed to microwave. *Nutrition Research* 22: 733-744.
7. Kim MJ, Lee JH, Rhee SJ. 2001. Effects of catechin on mixed function oxidase system and oxidative damage in rat liver exposed to microwave. *Korean J Nutr* 34: 299-305.
8. Harman D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radical chemistry. *J Gerontol* 11: 298-300.
9. Giulivi C, Lavango CC, Lucasoli F, Bermudez MJ, Boveris A. 1995. Lung damage in paraquat poisoning and hyperbaric oxygen exposure: superoxide-mediated inhibition of phospholipase a_2 . *Free Radical Biol Med* 18: 203-213.
10. Taleb A, Witztum JL, Tsimikas S. 2011. Oxidized phospholipid on apo B-100-containing lipoproteins: a biomarker predicting cardiovascular disease and cardiovascular events. *Biomark Med* 5: 673-694.
11. Yalcin M, Aydin C. 2011. The role of the central arachidonic acid-thromboxane A_2 cascade in cardiovascular regulation during hemorrhagic shock in rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 85: 61-66.
12. Burden A, Mas E, Henry P, Durand T, Galano JM, Roberts LT, Mori TA, Croft KA. 2011. The effects of oxidation products of arachidonic acid and n3 fatty acids on vascular and platelet function. *Free Radic Res* 45: 469-476.
13. Kwag OG, Kim SO, Choi JH, Rhee IK, Choi MS, Rhee SJ.

2001. Vitamin E improves microsomal phospholipase A₂ activity and the arachidonic acid cascade in kidney of diabetic rats. *J Nutr* 131: 1297-1301.
14. Kim KR, Kim MJ, Rhee SJ. 2001. Effects of vitamin E on arachidonic acid cascade in platelets and aorta of acute cadmium-poisoned rats. *Nutr Res* 21: 657-665.
15. Muramatsu K, Fukuyo M, Hara Y. 1986. Effect of green tea catechins on plasma cholesterol-fed rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 32: 613-622.
16. Suzuki KT, Yaguchi K, Ohnuki R, Kishikawa M, Yamada YK. 1983. Extend of cadmium accumulation and its effect on essential metal in liver, kidney and body fluid. *J Toxicol Environ Health* 11: 713-726.
17. Sakanaka S, Kim M, Taniguchi M, Yamamoto T. 1989. Antibacterial substances in Japanese green tea extract against *Streptococcus mutans*, a cariogenic bacterium. *Agric Biol Chem* 53: 2307-2311.
18. Cheng SJ. 1986. The preliminary study of inhibitory effects of green tea antioxidant on mutation. *Acta of Experimental Biology* 9: 328-334.
19. Hayashi E, Hayashi M, Yamazoe H. 1990. Pharmacological action of tea extract on central nervous system in mice. *Oyo Yakuri* 40: 351-356.
20. Kada T, Kanaeko K, Matzuzaki S, Matsuzaki T, Hara Y. 1985. Detection and chemical identification of natural bio-antimutagens. *Mutat Res* 150: 127-132.
21. Fugita Y, Yamane T, Tanaka M, Kuwata K, Okuzumi J, Takehashi T, Fujiki H, Okuda T. 1989. Inhibitory effect of (-)-epigallocatechin gallate on carcinogenesis with N-ethyl-N'-nitro N-nitrosoguanidine in mouse duodenum. *Jap J Cancer Res* 80: 503-505.
22. Matsuzaki T, Hata Y. 1987. Antioxidative activity of tea leaf catechins. *Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan* 59: 129-134.
23. Yoon YH, Rhee SJ. 1994. Effect of Korea green tea, oolong tea and black tea beverage on the antioxidative detoxification in rat poisoned with cadmium. *Korean J Nutr* 27: 1007-1017.
24. Yang JA, Choi JH, Rhee SJ. 1999. Effects of green tea catechin on phospholipase A₂ activity and antithrombus in streptozotocin diabetic rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 45: 337-346.
25. Katzuko N, Midori Y, Chikusa T, Mitsuo N. 1991. Platelet aggregation inhibitory activity of tea extracts. *Nippon Shohuhin Kogyo Gakkishi* 38: 189-195.
26. Rhee SJ, Kim MJ, Kwag OG. 2002. Effects of green tea catechin on prostaglandin synthesis of renal glomerular and renal dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Asia Pacific J Clin Nutr* 11: 232-236.
27. Dole VP, Meinertz HJ. 1960. Micro determination of long-chain fatty acid in plasma and tissue. *Biol Chem* 235: 2592-2599.
28. Marinetti GV. 1962. Chromatographic separation, identification and analysis. *J Lipid Res* 3: 1-11.
29. Omura T, Sato R. 1964. The carbon mono oxide binding pigments of liver microsome II. solubilization, purification and properties. *J Biol Chem* 239: 2379-2385.
30. Lowry OH, Rosenbrouth NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
31. Gresham A, Masferrer J, Chen X, Lealkhour S, Pentland AP. 1996. Increased synthesis of high molecular-weight cPLA₂ mediates early UV-induced PGE₂ in human skin. *Am J Physiol* 270: 1037-1050.
32. Kalns J, Ryan KL, Mason PA, Bruno JG, Gooden R, Kiel JL. 2000. Oxidative stress precedes circulatory failure induced by 35-GHz microwave heating. *Shock* 13: 52-59.
33. Borowitz SM, Montgomery C. 1989. The role of phospholipase A₂ in microsomal lipid peroxidation induced with t-butyl hydroperoxide. *Biochem Biophys Res Commun* 158: 1021-1028.
34. Choi JH, Cha BK, Rhee SJ. 1998. Effects of green tea catechin on hepatic microsomal phospholipase A₂ activities and changes of hepatic phospholipid species in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nutr Sci Vitaminology* 44: 673-683.
35. Li SR, Virgolini I, Wandl E, Yang Q, Sinzinger H. 1992. Effects of irradiation on prostaglandin system of human hypernephroma cell. *Agents Action Suppl* 37: 53-57.
36. Piana ML, Hellums JD, William WL Jr. 1981. Effects of microwave irradiation on humane blood platelets. *IEEE Trans Biomed Eng* 28: 661-664.

(2012년 2월 23일 접수; 2012년 6월 19일 채택)