

녹차 Catechin의 마이크로웨이브 조사 흰쥐 심장 조직의 Phospholipase A₂ 활성과 Arachidonic Acid Cascade계 개선 효과

김 미 지†

대구보건대학교 호텔외식조리학부

Effects of Green Tea Catechin on Microsomal Phospholipase A₂ Activity and Arachidonic Acid Cascade in Rat's Heart When Exposed to Microwave

Mi-Ji Kim†

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

Abstract

The purpose of the present study is to investigate the effects of green tea catechin on microsomal phospholipase A₂(PLA₂) activity and the arachidonic acid (AA) cascade in hearts of microwave exposed rats. Sprague-Dawley male rats weighing 100±10 g were randomly assigned to one normal group and three microwave exposed groups. The microwave exposed groups were subdivided into three groups: catechin free diet (MW) group, 0.25% catechin (MW-0.25C group and 0.5% catechin (MW-0.5C) group according to the levels of dietary catechin supplementation. Rats were sacrificed 6th day after microwave irradiations (2.45 GHz, 15 min). The heart microsome PLA₂ activity in the MW group was 130% greater than that of normal groups, whereas there was no significant difference between normal group and MW-0.25C, MW-0.5C group. The percentage phosphatidyl ethanolamine (PE) hydrolyzed in the heart microsome in the MW was increased 54% by microwave irradiation, whereas there was no significant difference between normal group and MW-0.5C group. The percentage phosphatidyl choline (PC) hydrolyzed in the heart microsome in the MW group was increased by 104% and by microwave irradiation, whereas there was no significant difference between normal group and MW-0.5C group. The formation of thromboxane A₂(TXA₂) in the heart microsome was 70% greater in the MW group than in the normal group. However, the MW-0.25C and MW-0.5C group maintained the normal level. The formation of prostacyclin (PGI₂) in the heart microsome was 21% lower in the MW group than in the normal group, while that of MW-0.25C and MW-0.5C group were maintained in the normal group. The heart microsomal thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) concentrations, as an index of lipid peroxide, were 71% greater in the MW group, as compared with normal group. However, the MW-0.25C and MW-0.5C group were 4.6% and 9.2% lower, respectively, than that of MW group. In conclusion, heart function appeared to be improved by green tea catechin supplementation due to its antithrombus action, which in return controls the AA cascade system.

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

서 론

최근 미국, 일본 등 선진국에서는 전자파 장애 증후군에 관심이 고조됨에 따라 전자파 유해설이 많은 논쟁을 일으키고 있다. 전자파는 일상생활에서 생체에 많은 영향을 미치는 것으로 알려져 있는데, 장시간 전자파에 노출되는 사람은 고혈압, 두통, 기억감퇴, 뇌손상 등의 증상을 보일 가능성이 높으며, 백혈병, 유방암과 같은 각종 질병에 걸릴 확률이 높다는 통계가 보고되고 있다(Dasdag *et al* 2009). 특히 마이크로파와 같은 고주파의 경우에는 상당한 양의 에너지를 함유하

여 노출될 경우, 체온을 상승시켜 열 스트레스에 의한 생리적 효과를 일으키게 된다.

지금까지의 연구 보고(Jing *et al* 2012, Esmekaya *et al* 2011, Dasdag *et al* 2009, Garaj *et al* 2009)나 선행 연구(Kim MJ 2012, Km *et al* 2002, Kim *et al* 2001)를 종합해 볼 때, 이러한 전자파로 인한 유해 증상은 활성 산소종의 발생과 항산화 방어계 간의 불균형으로 초래되는 산화적 스트레스로 인한 독성작용에 기인할 가능성이 높다.

활성 산소종은 정상적인 생체대사 반응과정에도 생성되지만, UV, X-ray, 중금속 등과 같은 외부의 화학적 물리적 스트레스에 의해 그 생성이 증가되어 조직의 노화를 가속화시키고, 질병 발생을 촉진시키는 것으로 알려져 있다(Partil *et al* 2013). 특히 암이나 동맥경화증과 같은 성인병은 초기 단계

† Corresponding author : Mi-Ji Kim, Tel : +82-53-320-4506, Fax : +82-53-320-1490, E-mail : mjkim@dhc.ac.kr

에서 *supeoxide radical*과 같은 *free radical*에 의한 조직의 손상으로부터 시작되어 점차적으로 여러 생리적 기능이 저하됨으로써 발병되는 것으로 보고되고 있다(Cacanyiova *et al* 2013).

심장 조직은 전자파에 노출 시 고혈압을 비롯한 임상적 유해 증상의 발생 빈도가 높고, 각종 기능 장애가 일어나는 주요 기관이다. Jauchen & Frei(1997)는 흰쥐를 350 MHz의 마이크로웨이브에 노출시킨 후, 여러 가지 생리적 parameter에 미치는 영향을 관찰한 결과, 말초부위와 직장온도의 상승을 관찰하였고, 호흡율의 변화 및 심박 수, 동맥혈압 증가를 관찰하였다(Jauchen & Frei 1997). 또한 Ryan KL(1997)은 흰쥐에 35 GHz의 마이크로웨이브를 조사한 후 심박 수의 증가를 관찰하였으며, Kalns *et al*(2000)은 35 GHz 마이크로웨이브 노출 시 순환기계 기능장애의 원인을 산화적 스트레스의 증가로 보고하고 있다.

한편, arachidonic acid(AA)는 정상세포에서는 대부분이 세포막 구성 인지질인 phosphatidylcholine 및 phosphatidylethanolamine의 sn-2 위치에 결합되어 존재하는데, 세포가 외부의 자극을 받아 활성화되면 phospholipase A₂(PLA₂)에 의해 유리된다. 이 단계가 eicosanoid 생합성의 속도 조절 단계이다. AA를 기질로 하여 cyclooxygenase(COX)가 생성시킨 eicosanoid들은 낮은 농도에서 혈소판 응집, 혈압의 조절, 천식 등에 관여한다. 혈소판으로부터 생성되는 thromboxane A₂(TXA₂)와 혈관 내피로부터 생성되는 prostacyclin(PGI₂)는 각각 혈소판 응집을 촉진 또는 억제하여 서로 길항적인 작용을 가지며, 정상상태에서는 PGI₂/TXA₂ 비율이 일정하게 유지되어 항상성을 유지하게 된다. 그러나 질병상태가 되면 PGI₂/TXA₂ 비율의 불균형을 초래하여 혈전 생성을 촉진하며, 혈액 순환 장애를 나타내게 된다. 이러한 불균형 현상은 AA cascade 전 단계의 key enzyme인 PLA₂ 활성이 free radical의 농도나 지질 과산화물 함량에 의해 활성화되며, 특히 PGI₂ 합성효소인 prostacyclin synthetase가 TXA₂ 합성효소인 thromboxane synthetase보다 훨씬 낮은 지질 과산화물의 농도에서 그 활성이 저해받기 때문에 나타나게 된다. (Kwag *et al* 2001, Kim *et al* 2001). 그러므로 혈전 생성을 막기 위해서는 AA cascade 계의 속도조절효소인 PLA₂ 활성을 조절하고, 그 생성물인 PGI₂/TXA₂ 비율 개선이 필요하며, 이를 위해서는 free radical의 축적을 감소시키고 과산화지질량을 감소시키는 것이 최우선이라고 할 수 있다.

한편, 녹차 중에 존재하는 폴리페놀성 화합물인 catechin은 혈중 콜레스테롤 저하작용(Muramazu *et al* 1986), 중금속류 제거작용(Suzuki *et al* 1983), 충치 억제작용(Otake *et al* 1991), 항암작용(Cheng SJ 1986), 중추신경 활성화(Hyashi *et al* 1990), 항돌연변이(Kada *et al* 1985) 및 항알레르기 작용 등(Fugita

et al 1989)의 여러 가지 약리작용이 보고되고 있고, 특히 항산화 작용 및 항혈소판 응집능의 기능이 뛰어난이 보고되고 있다(Matuzaki & Hata 1985, Yoon & Rhee 1994, Yang *et al* 1999). 실제로 카드뮴 중독쥐나 당뇨쥐의 혈소판 및 심장조직에서의 항혈전 작용이 vitamin E보다 우수함이 규명된 바 있다(Katzuko *et al* 1991).

따라서 본 연구에서는 흰쥐에 마이크로웨이브를 조사한 후, 임상적 유해 증상의 발병빈도가 높고, 혈액순환의 가장 핵심적이고 주된 기관인 심장 조직을 대상으로 심장기능 장애를 일으키는데 주된 역할을 하는 심장 조직의 혈전 생성능을 AA cascade계를 통해 관찰하여 마이크로웨이브에 의한 심장기능 장애와 이에 대한 녹차 catechin의 개선 효과를 규명하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 식이

실험군은 마이크로웨이브를 조사하지 않은 정상군과 마이크로웨이브를 조사한 군으로 나누고 마이크로웨이브 조사군은 다시 식이 중 catechin 공급수준에 따라 catechin을 넣지 않은 마이크로웨이브군(MW group), catechin을 2.5 g/kg diet 급여한 군(MW-0.25C group), catechin을 5 g/kg diet를 급여한 군(MW-0.5C group)으로 나누었다. 식이와 음료는 자유 섭취시키면서 2주간 사육한 후 2.45 GHz대역의 주파수를 15 분간 1회 조사하였으며, 마이크로웨이브 조사 후 6일째 동물을 희생시켜 본 실험에 사용하였다. 실험군의 실험동물 수는 각각 10마리로 실험하였다. 식이용 catechin은 Matsuzaki & Hata(1985)의 방법으로 crude catechin 분말을 조제하여 사용하였으며, 순도는 87.5%였다(Matuzaki & Hata 1985). 이것을 100%로 환산하면 catechin 종류별 함량은 Epigallo catechin gallate (EGCG) 51.86%, Epicatechin gallate(ECG) 12.48%,

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-0.25C : Microwave irradiation, 0.25% catechin supplementation.

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

Epigallocatechin (EGC) 27.65%, Epicatechin(EC) 8% 순이었으며, 이것을 0.25%(MW-0.25C group), 0.5%(MW-0.5C group) 씩 첨가하였다.

2. 실험동물의 마이크로웨이브 조사장치 및 방법

실험장비로는 고주파 발생장치로 2.45 GHz로 발진 주파수를 가진 가정용 전자레인지에 개조하여 출력환 및 노출시간을 임의로 설정할 수 있도록 원격조정을 가능하게 제작하였으며, 마이크로웨이브 발생장치의 출력측정은 미국 Hewlett packard 사(PaloAlto, USA)의 EMC analyzer를 이용하여 측정하였다. 방사능의 출력의 측정은 최대 노출시간 15분 이상이 되도록 수차례 거리를 조절하여 출력발생장치의 35 cm 거리를 노출점으로 잡고, 이 점에서의 출력을 측정한 결과, 40 mW/cm²(17 dBuV/m)였다.

3. 시료 채취 및 효소원의 조제

실험이 종료된 동물은 가벼운 에테르 마취 하에서 혈액을 채취한 후 심장을 절제하고 0.9% NaCl로 세척한 후 액체 질소로 급속 냉동시킨 후 -80℃에 냉동 보관하였다가 실험에 사용하였다. 심장의 microsome 분획은 전보와 같은 방법을 행하였다(Kim *et al* 2001).

4. 심장 조직 Microsome 에서의 Phospholipase A₂의 활성 측정

기질로는 1-pal-2-[1-¹⁴C] linoleoyl PE를 사용하였고, 유리되어진 linoleic acid를 측정하는 Dole & Meinertz(1960) 방법을 사용하였다. 효소로는 분리해 놓은 microsome을 1 mg protein/mL로 희석한 것 20 μL를 사용하며, 0.05 M Tris-HCl (pH 7.0) 20 μL, 40 μL, 40 mM CaCl₂ 10 μL, 기질은 1-pal-2-[1-¹⁴C] linoleic PE (1,000 cpm/nmol) 20 nmol, 증류수 30 μL를 넣은 후 37℃에서 20분간 incubation시켰다. 여기에 Dole 시약(N-H₂SO₂ 1 mL + isopropanol 39 mL + N-heptane 4 mL) 560 μL와 증류수 110 μL를 넣고 1분간 교반한 후 3,000 rpm에서 원심분리하여 얻어진 상층액 150 μL를 heptane 0.8 mL에 넣는다. 1분간 교반한 후, 3분간 원심분리하여 얻어진 상층액 0.8 mL를 toluene계 cocktail solution 0.5 mL에 넣은 후 liquid scintillation counter에서 유리되어진 linoleic acid를 측정하였다.

5. 심장 Microsome에서의 인지질 분자종 측정

1) 인지질 추출법

심장 microsome을 5 mg protein/mL 로 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 원심분리하였다. 이때 하층액을 취하고 상층액에 chloroform 2.4 mL를 넣어 교반하여 얻은 하층액을 합하여 유기용매를 N₂ gas로 날린 후 lipid film을 형성하였다.

2) 인의 정량법

Marinetti GV(1962)방법으로 lipid film에 200 μL chloroform을 넣은 후 20 μL를 취한 것을 시료로 하고, 3 mM KH₂PO₄를 standard로 하며 분해 용액(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 환원액(1-amino-2-naphtol-4-sulfonic acid 1 g을 유발에서 혼화시킨 후, 15% 황산나트륨 100 mL와 섞은 후) 0.1mL를 넣어 95℃에서 10분간 가열시켰다. 다시 실온에서 식힌 후, 750 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) 인지질 분자종의 분리

인지질 분자종의 분리는 2차원의 TLC plate로 분리하며, 1차 전개용매로는 chloroform : methanol : acetic acid = 65 : 25 : 10을 사용하였다. TLC plate는 MERCK사의 5721번(20 cm×20 cm, silicagel 60, without fluorescent indicator)을 사용하였고, I₂로 발색시킨 후 다시 ninhydrin으로 발색하였다. TLC plate상에 나타나나 인지질 분자종은 각각 긁어내어 전술한 방법으로 인정량 하였다. 인지질 분자종 중 phosphatidylcholine(PC), lysophosphatidyl-choline(LysoPC), phosphatidylethanolamine(PE), lysophosphatidylethanolamine(Lyso PE)의 인정량 값을 이용하여 PC와 PE의 가수분해율을 구하였다.

$$PC \text{ 가수분해율}(\%) = [\text{lyso PC}/\text{lyso PC}+\text{PC}] \times 100$$

$$PE \text{ 가수분해율}(\%) = [\text{lyso PE}/\text{lyso PE}+\text{PE}] \times 100$$

6. 심장 조직 Microsome에서의 Prostacyclin (PGI₂) 생성 측정

PGI₂는 반감기가 매우 짧으므로 생리적으로 안정된 대사물질인 6-keto prostaglandin F_{1α}를 측정하여 PGI₂ 생성량을 대신하였다. Amersham Bioscience(Piscataway, Newjersey, USA)에서 구입한 6-keto prostaglandin F_{1α} RIA kit(RPA515)를 사용하여 전보에서와 같은 방법으로 실시하였다(Kim *et al* 2012). 즉, 미리 조제해 놓은 반응 상등액은 phosphate buffered saline gel로 희석하여 이 희석액 100 μL에 [¹²⁵I]-PGI₂에 100 μL와 antiserum 100 μL를 가하여 잘 혼합하고, 4℃ cold chamber 내에 16시간 방치하여 반응액 중의 PGI₂와 [¹²⁵I]-

PGI₂가 antiserum과 결합하도록 하였다. 냉욕 상에 반응액을 방치하면서 여기에 잘 흔들여 균질화시킨 Amerlex-M second antibody 용액 500 μL를 가해 잘 섞은 후, 냉욕상에서 10분간 방치함으로써 유리상태의 trace를 첨가한 ¹²⁵I-PGI₂와 시료 중의 PGI₂가 antibody와 경쟁적으로 결합하게 하였다. 그 다음 4°C에서 10분간 1,500×g로 원심분리한 후, 상층액을 버리고 pellet 층에 결합된 상태로 [¹²⁵I]-PGI₂를 gamma counter로 측정하였다. 시료 중의 PGI₂의 농도는 표준곡선으로부터 얻었다.

7. 심장 조직 Microsome 에서의 Thromboxane A₂ (TXA₂)생성 측정

심장 조직 microsome의 TXA₂ 생성량은 Amersham Bioscience(Piscataway, USA)에서 구입한 TXB₂용 RIA kit(RPA-516)를 사용하였다. 미리 조제해 놓은 반응 상등액은 phosphate buffered saline gel로 희석하여 이 희석액 100 μL에 [¹²⁵I]-TXA₂에 100 μL와 antiserum 100 μL를 가하여 잘 혼합하고, 4°C cold chamber 내에 16시간 방치하여 반응액 중의 TXA₂와 [¹²⁵I]-TXA₂가 antiserum과 결합하도록 하였다. 냉욕 상에 반응액을 방치하면서 여기에 잘 흔들여 균질화시킨 Amerlex-M second antibody 용액 500 μL를 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 원심분리한 후, 상층액을 버리고 pellet 층에 결합된 상태로 [¹²⁵I]-TXA₂

를 gamma counter로 측정하였다. 시료 중의 TXA₂의 농도는 표준곡선으로부터 얻었다

8. 과산화 지질 정량

과산화 지질의 정량은 thiobarbituric acid(TBA)와 반응하는 물질을 측정하는 Satoh 법을 이용하였다(Omura & Sato 1964).

9. 단백질 정량

심장 조직 microsome의 단백질 정량은 bovine serum albumin을 표준용액으로 하여 Lowry 방법에 의해 측정하였다(Lowry *et al* 1951).

10. 통계처리

모든 실험 결과에 대한 통계처리는 각 실험군 별로 평균 차이가 있는가를 검증하기 위하여 분산 분석(ANOVA 검증)을 실시하였으며, 분산 분석의 결과 유의성이 발견된 경우 Tukey's-HSD test(honestly significantly difference test)에 의해 처리되었다.

결 과

1. 체중 증가량, 식이섭취량 및 식이효율

체중 증가량과 식이섭취량 및 식이효율을 관찰한 결과는 Table 2와 같다. 체중 증가량과 식이섭취 및 식이효율은 마

Table 2. Effect of green tea catechin on body weight gain, food intake and food efficiency ratio (FER) in rats exposed to microwave

Groups	Body weight gains	Food intake	FER
	g/day	g/day	
During 2 weeks before microwave irradiation			
Normal	6.71±0.63 ^{NS}	21.03±1.44 ^{NS}	0.30±0.04 ^{NS}
MW	5.18±0.58	21.46±0.73	0.24±0.04
MW-0.25C	5.05±0.77	21.81±0.41	0.22±0.03
MW-0.5C	6.95±0.25	23.33±1.03	0.30±0.04
During 16 days after microwave irradiation			
Normal	6.50±0.37 ^a	19.42±0.44 ^a	0.35±0.03 ^a
MW	4.08±0.70 ^b	17.01±0.53 ^b	0.25±0.02 ^b
MW-0.25C	5.60±0.48 ^b	18.75±1.30 ^b	0.28±0.01 ^b
MW-0.5C	5.03±0.75 ^b	18.66±1.43 ^b	0.27±0.02 ^b

All values are mean±S.E. (n=10). Values with different superscript letters are significantly different at $p<0.05$ by Tukey's test.

^{NS} Not significant.

이크로웨이브 조사 후, 정상군에 비해 MW군에서 감소되었으나, catechin 공급으로 인한 차이는 없었다.

2. 심장 조직 중의 Phospholipase A₂ (PLA₂) 활성

A.A cascade 계의 속도조절단계효소로 알려진 PLA₂의 활성을 심장 조직 microsome에서 관찰한 결과는 Fig. 1과 같다. PLA₂ 활성은 정상군에 비해 MW군에서 133%로 가장 많이 증가되었고, catechin 공급군인 MW-0.25C군과 MW-0.5C군은 MW군에 비해 감소함으로써 정상군 수준을 유지하였다. 이와 같이 심장 조직에서 PLA₂ 활성은 마이크로웨이브 조사로 그 활성이 증가되었으나, catechin 공급으로 저하됨에 따라 catechin 공급수준에 비례하여 PLA₂ 활성은 현저하게 저해됨을 알 수 있었다.

3. 심장 조직 인지질분자종의 변화

심장 조직 microsome 분획에서 각 인지질 분자종의 변화를 관찰한 결과는 Table 3과 같다. PC hydrolysis는 정상군에 비해 MW군에서 104% 증가되었다. 반면, MW-0.25C군은 MW군에 비해 28% 감소되었으며, MW-0.5C군에서는 정상군 수준이었다. PE hydrolysis는 정상군에 비해 MW군에서 54% 증가되었으나, MW-0.25C군에서는 MW군에 비해 17% 감소하였으며, MW-0.5C군에서는 정상군 수준이었다.

4. 심장 조직 Microsome의 Thromboxane A₂(TXA₂), Prostacyclin(PGI₂) 생성

혈소판의 응집과 혈관 수축을 촉진하는 TXA₂ 생성은 정상군에 비해 MW군에서 70%의 현저한 증가를 보였으나, catechin 공급군인 MW-0.25C군, MW-0.5C군은 MW군에 비해 현저히 감소하여 정상군 수준이었다(Fig. 2(A)). 이와 같이

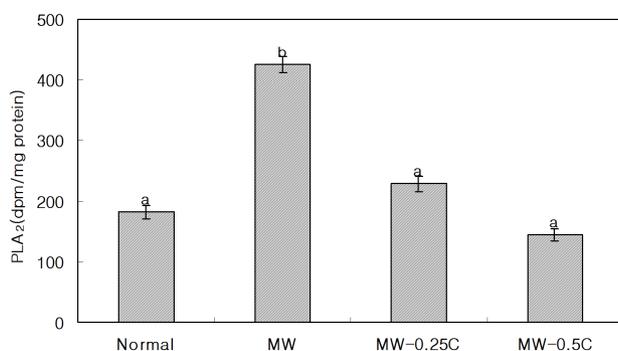


Fig. 1. Effects of green tea catechin on PLA₂ activities in rat heart of exposed to microwave.

All values are mean±S.E. (n=10).

Values within a column with different superscript letters are significantly different each group at $p<0.05$ by Tukey's test.

Table 3. Effects of green tea catechin on changes in microsomal phosphatidylcholine and phosphatidyl ethanolamine hydrolysis in rat lung of exposed to microwave

Group	PC hydrolysis (%)	PE hydrolysis (%)
Normal	8.89±0.61 ^a	10.80±1.37 ^a
MW	18.21±3.13 ^b	16.67±2.48 ^b
MW-0.25C	13.10±1.31 ^{bc}	13.89±2.29 ^{ab}
MW-0.5C	11.58±1.85 ^{ac}	11.48±3.12 ^a

All values are mean±S.E. (n=10).

Values within a same column with different superscript letters are significantly different each group at $p<0.05$ by Tukey's test.

혈소판 응집과 혈관 수축 지표인 TXA₂ 농도는 catechin 공급시 그 생성량이 현저하게 감소되었다. TXA₂와는 길항적인 작용을 하며, 혈관 이완 및 항혈소판 응집 작용물질인 PGI₂는 정상군에 비해 MW군에서는 21%의 유의적인 감소를 보였으나, catechin 공급군인 MW-0.25C 및 MW-0.5C군은 MW군에 비해 증가하여 정상군 수준을 유지하였다(Fig. 2(B)). 따라서 혈전 생성지표인 PGI₂/TXA₂ ratio는 MW군은 정상군에 비해 51% 유의적으로 감소되었으나, MW-0.25C 및 MW-0.5C군은 정상군 수준으로 증가되었다(Fig. 2(C)). 이와 같이 녹차 catechin은 TXA₂ 합성은 감소시키고, PGI₂ 합성은 증가시켜 catechin의 공급수준과 비례적으로 PGI₂/TXA₂ ratio를 증가시켰다.

5. 심장조직 중의 과산화지질 함량

조직의 산화적 손상의 지표로 삼고 있는 지질 과산화물의 함량을 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. 정상군에 비해 MW군에서는 71% 유의적으로 증가되었다. Catechin 공급군인 MW-0.25C군과 MW-0.5C군은 MW군에 비해 각각 4.6%, 9.2%씩 감소하였다.

고 찰

본 연구는 마이크로웨이브를 조사한 흰쥐의 심장기능 장애와 혈전 생성능에 미치는 catechin의 영향을 규명하기 위하여 AA cascade계를 중심으로 연구하였다. AA cascade 대사반응은 속도 조절 단계 효소인 PLA₂가 활성화되어 세포막 인지질 이중막으로부터 AA가 유리됨으로써 개시되는데, 이 반응은 생체의 내인적 병리상태나 화학적 물리적 스트레스와 같은 외인적 요인에 의해 과잉 생성된 free radical이나 축적된 지질 과산화물의 작용에 의해 가속화 된다. 세포가 어떤 자극을 받을 때 인지질 분해효소인 phospholipase가 활성

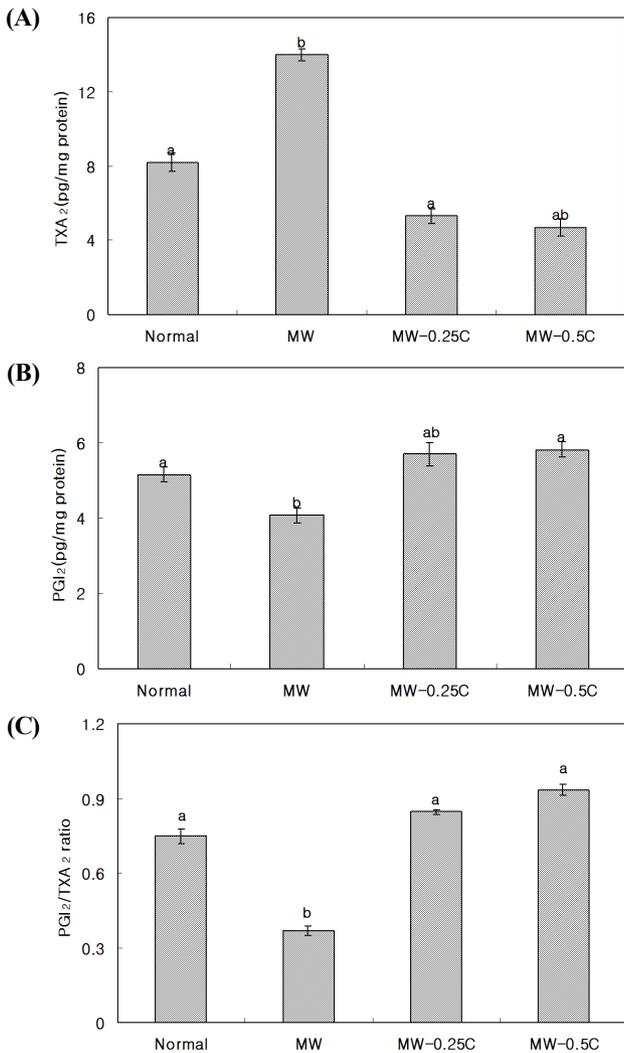


Fig. 2. Effects of green tea catechin on TXA₂(A), PGI₂(B) and PGI₂/TXA₂ ratio(C) in rat heart microsomes of exposed to microwave.

All values are mean±S.E. (n=10).

Values within a column with different superscript letters are significantly different each group at *p*<0.05 by Tukey's test.

화되어 arachidonic acid가 유리되는 데, 그 중 이 반응에 관여하는 주된 효소는 PLA₂와 PLC지만, 인지질에 직접적으로 관여하여 AA를 유리시키는 효소는 PLA₂로 알려져 있다. 특히 PLA₂는 인지질 2번 위치의 fatty acid ester 결합을 가수분해하여 유리지방산과 lysophospholipid를 생성하는데, 이 위치는 대개 고도의 불포화 지방산만이 에스테르 결합을 하고 있으므로 자유 라디칼의 공격을 받을 경우 쉽게 과산화물이 생성되며, 다양한 산화적 스트레스에 의해 활성화된다. 또한 분해된 산물 중 산화된 유리 지방산은 염증부위에서 혈관 투과성의 증가, 혈관 확장 작용 등을 나타내며, lysophospholipid는 용혈작용 및 혈소판 응집작용 등의 생리활성을 나타

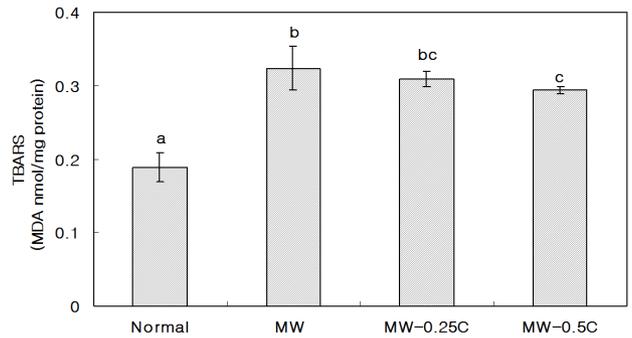


Fig. 3. Effects of green tea catechin on TBARS concentrations in rat heart of exposed to microwave.

All values are mean±S.E. (n=10).

Values within a column with different superscript letters are significantly different each group at *p*<0.05 by Tukey's test.

낸다.

본 연구에서 PLA₂의 활성을 심장 조직에서 관찰한 결과, PLA₂ 활성은 정상군에 비해 MW군에서 133%의 현저한 증가가 되었으나, MW-0.25C군과 catechin 0.5% 공급군인 MW-0.5C군은 정상군 수준이었다. 이는 마이크로웨이브 조사에 의한 지질 과산화의 증가로 인해 PLA₂가 자극을 받아 증가 되었음을 의미하며, 강력한 항산화제인 catechin 공급으로 완화됨을 보였다. 이러한 결과는 식이중 vitamin E나 selenium이 결핍될 경우, 간 및 폐조직의 PLA₂ 활성이 항진된다는 보고와 일맥상통한다(Kuo *et al* 1995). 또한 당뇨쥐에서 증가된 혈소판 PLA₂ 활성이 catechin 급여로 그 활성이 억제되었다는 Yang *et al*(1999)과 Kwag *et al*(2001)의 vitamin E의 다량 급여로 지질 과산화물이 저하되면서 PLA₂ 활성이 감소되었다는 보고와 일치한다. 특히 마이크로웨이브 조사된 흰쥐 폐조직의 PLA₂ 활성을 관찰한 결과, 이와 유사한 결과를 나타내었다(Kim MJ 2012). 이러한 결과들은 catechin이나 vitamin E의 항산화 기능에 의한 지질 과산화물의 생성을 억제하는 데에 기인하는 것으로 본다.

또한 Stephen 등은 생체막이 free radical 생성계에 노출되었을 때, 내인성 lysophospholipid의 수준이 증가된다고 보고하였다(Stephen *et al* 1989). 본 연구에서 심장 조직 microsome에서 인지질 분자종의 변화를 관찰한 결과, PE의 분해로 생긴 lyso PE가 정상군에 비해 MW군에서 54% 증가하였으나, MW-0.25C군에서는 MW군에 비해 17% 감소하였으며, MW-0.5C군은 정상군 수준을 유지하였다. PC의 분해로 생성되는 lyso PC는 정상군에 비해 MW군에서 104% 증가하였으나, MW군에 비해 MW-0.25C군에서는 28% 감소하였으며, MW-0.5C군에서는 정상군 수준이었다. 이와 같이 마이크로웨이브를 조사한 심장 조직에서는 인지질 가수분해의 증가

와 지질 과산화물의 축적이 일어남이 관찰되었으나, catechin의 공급으로 세포막 인지질의 분해가 감소되었다. 이러한 결과는 당뇨쥐 간 및 신장에서 정상군에 비해 당뇨군에서 PE hydrolysis가 증가하였다는 Kwag *et al*(2001) 및 Choi *et al*(1998)의 보고와 유사한 결과를 나타내었다.

TXA₂는 혈소판 응집을 촉진하고 혈관을 수축시키는 물질로서, PLA₂, COX 등으로 이루어지는 AA cascade 계의 일련의 효소반응을 통해 생성된다. 특히 강력한 혈소판 응집 물질로 이의 합성조절은 세포막의 인지질로부터 AA를 생성하는 PLA₂ 활성에 의존하고 있다. 본 연구에서 TXA₂ 생성은 정상군에 비해 MW군에서 70%의 높은 증가를 보였으나 catechin 공급군인 MW-0.25C군, MW-0.5C군은 정상군 수준이었다.

Prostacyclin은 혈관벽에서 합성되는 물질로서, 혈관 확장을 촉진시키고 혈소판 응집을 억제하여 TXA₂와 길항적인 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 PGI₂는 정상군에 비해 MW군에서는 21%의 현저한 감소를 보였으나, catechin 비공급군인 MW-0.25C 및 MW-0.5C군은 정상군 수준이었다. 이러한 결과는 hypernephroma cell에서 라디오파를 조사한 후 PG receptor 및 eicosanoid generation이 감소됨을 보고한 Li *et al*(1992)의 보고와 일치하였다. 또한 Piana *et al*(1981)의 사람의 혈소판에 2.45 GHz의 마이크로웨이브 조사 시 혈소판 변형 및 혈소판 기능 이상을 초래한 연구 결과와 일맥상통한다고 볼 수 있다.

따라서 혈전 생성지표인 PGI₂/TXA₂ ratio는 MW군은 정상군에 비해 51% 유의적으로 감소되었으나, MW-0.25C 및 MW-0.5C군은 정상군 수준으로 증가되었다. 이와 같이 녹차 catechin의 공급군은 TXA₂ 합성은 감소시키고 PGI₂ 합성은 증가시켜 catechin의 공급수준과 비례적으로 PGI₂/TXA₂ ratio를 증가시켰다. 이러한 결과는 당뇨쥐 혈소판에서의 catechin의 작용기전이나 당뇨쥐 신장조직에서의 vitamin E의 작용기전과 거의 비슷한 양상이었다.(Yang *et al* 1999 and Kwag *et al* 2001).

심장 조직 중의 microsomal TBARS 농도를 관찰한 결과, 정상군에 비해 MW군에서는 71% 현저하게 증가되었으며, catechin 공급군인 MW-0.25C군 및 MW-0.5C군에서는 MW군에 비해 각각 4.6%, 9.2% 감소하였다. 이러한 결과는 마이크로웨이브에서 유도되는 산화적 스트레스의 증가로 혈액, 간, 폐, 심장 등의 주요 조직에서 병리학적 손상이 일어난다는 Kalns *et al*(2000)의 연구와 비슷한 경향을 나타내었다.

종합해 볼 때, 마이크로웨이브에 피폭된 흰쥐 심장 조직에서 마이크로웨이브조사로 PLA₂ 활성과 TXA₂ 합성이 증가되고, PGI₂ 합성이 감소됨으로써 혈전생성 지표로 인식하는 PGI₂/TXA₂ ratio의 불균형이 초래되었다. 그러나 항산화 기

능이 탁월한 catechin의 공급은 TBARS 농도의 저하를 유도하여 PLA₂ 활성을 현저하게 억제시키고, 이로 인해 PGI₂/TXA₂ ratio가 개선됨으로써 강한 항혈전 작용을 나타내었다.

요약 및 결론

본 연구에서는 흰쥐에 전자파를 조사한 후 심장 조직을 대상으로 심장 조직 기능장애를 일으키는데 주된 역할을 하는 혈전 생성능을 AA cascade계를 통해 관찰하여 마이크로웨이브에 의한 심혈관 기능장애와 그에 대한 녹차 catechin의 항혈전 효과를 규명하고자 하였다. 실험군은 마이크로웨이브를 조사하지 않은 정상군과 마이크로웨이브를 조사한 군으로 나누고, 마이크로웨이브 조사군은 다시 식이 중 catechin 공급수준에 따라 catechin을 넣지 않은 마이크로웨이브군(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 섭취시키면서 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. PLA₂ 활성은 마이크로웨이브 조사로 133% 증가하였으며, MW-0.25C군 및 MW-0.5C군은 정상군 수준이었다. 인지질 분자종의 PE의 분해로 생긴 lyso PE가 정상군에 비해 MW군에서 54% 증가하였으나, MW-0.25C군에서는 MW군에 비해 17% 감소하였으며, MW-0.5C군에서는 정상군 수준이었다. PC의 분해로 생성되는 lyso PC는 정상군에 비해 MW군에서 104% 증가하였으나 MW-0.25C군에서는 MW군에 비해 28% 감소하였으며, MW-0.5C군에서는 정상군 수준이었다. TXA₂ 생성은 MW군에서 70%의 현저한 증가를 보였으나, catechin 공급군인 MW-0.25C군 및 MW-0.5C 군은 정상군 수준이었다. PGI₂생성은 MW군에서 21%의 유의적인 감소를 보였으나, catechin 공급군인 MW-0.25C군 및 MW-0.5C군은 정상군 수준이었다. 따라서 혈전 생성지표인 PGI₂/TXA₂ ratio는 정상군에 비해 MW군에서 51% 유의적으로 감소되었으나, MW-0.25C 및 MW-0.5C군은 정상군 수준이었다. 지질 과산화물의 함량은 정상군에 비해 MW군에서 71% 유의적으로 증가하였으며, catechin 공급군인 MW-0.25C군과 MW-0.5C군은 MW군에 비해 각각 4.6%, 9.2% 감소하였다.

결론적으로 마이크로웨이브에 피폭된 흰쥐 심장 조직에서 AA cascade 계의 속도조절단계효소인 PLA₂ 활성의 증가와 혈전생성 지표로 인식하는 PGI₂/TXA₂ ratio의 불균형이 초래되었으나, catechin은 TBARS 농도를 낮추면서 PLA₂ 활성을 저해시키고 AA cascade 계를 개선시킴으로써 항혈전 작용을 나타내었다.

감사의 글

본 논문은 한국연구재단지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

문헌

- Cacanyiova S, Dovinova I, Kristek F (2013) The role of oxidative stress in acetylcholine induced relaxation of endothelium-denuded arteries. *J Physiol Pharmacol* 64: 241-247.
- Cheng SJ (1986) The preliminary study of inhibitory effects of green tea antioxidant on mutation. *Acta of Experimental Biology* 9: 328-334.
- 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.
- 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.
- Dole VP, Meinertz HJ(1960) Micro determination of long-chain fatty acid in plasma and tissue. *Biol Chem* 235: 2592-2599.
- Esmekaya MA, Ozer C, Seyhan N (2011) 900 MHz pulse-modulated radio frequency radiation induces oxidative stress on heart, lung, testis and liver tissue. *Gen Physiol Biophys* 30: 84-89.
- 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 : 503-510.
- Garaj-vrhovac V, Gajski G, Trosicl, Pavicicl (2009) Evaluation of basal DNA damage and oxidative stress in wistar rat leukocytes after exposure to microwave radiation. *Toxicology* 259: 107-112.
- Hayashi E, Hayashi M, Yamazoe, H (1990) Pharmacological action of tea extract on central nervous system in mice. *Oyo Yakuri* 40: 351-356.
- Jauchen JR, Frei MR (1997) Body heating induced by sub-resonant (350 MHz) microwave irradiation: cardiovascular and respiratory responses in anesthetized rats. *Bioelectromagnetics* 18: 335-338.
- 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.
- Kada T, Kanaeko K, Matzuzaki S, Matsuzaki, T, Hara Y (1985) Detection and chemical identification of natural bio-antimutagens. *Mutation Research* 150 : 127-131.
- 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.
- Katzuko N, Midori Y, Chikusa T, Mitsuo N (1991) Platelet aggregation in inhibitory activity of tea extracts. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkishi* 38: 189-195.
- Kim KR, Kim MJ, Rhee SJ (2001) Effects of vitamin E on arachidonic acid cascade in platelets and aorta of acute cadmium-poisoned rats. *Nutrition Research* 21: 657-665.
- Kim MJ (2012) Effects of green tea catechin on microsomal phospholipase A₂ activity and arachidonic acid cascade in rat lung exposed to microwave. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 936-942.
- Kim Mj, Choi JH, Kim SY, Kim JH, Lee JH, Rhee SJ (2001) 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.
- Kuo CF, Cheng S, Burgess JR (1995) Deficiency of vitamin E and selenium enhances calcium-independent phospholipase A₂ activity in rat lung and liver. *J Nutrition* 125: 1419-1429.
- 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 Nutrition*. 131: 1297-1301.
- Lee YH, Rhee SJ (2001) Effects of green tea on mixed function oxidase system and xanthine oxidase activities in rat liver exposed to microwaves. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 168-173.
- 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.
- Lowry OH, Rosenbrouth NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
- Marinetti GV (1962) Chromatographic separation, identifica-

- tion and analysis. *J Lipid Res* 3: 1-11.
- Matzuzaki T, Hata Y (1985) Antioxidative activity of tea leaf catechins. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 59: 129-134.
- Muramatsu K, Fukuyo M, Hara Y (1986) Effect of green tea catechins on plasma cholesterol-fed rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 32: 613-622.
- 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.
- Otake S, Makimura M, Kuroki T, Nishimura Y, Hirasawa M (1991) Anticaries effects of polyphenolic compounds from Japanese green tea. *Caries Res* 25 :438-443.
- Patil SL, Mallaiiah SH, Patil RK (2013) Antioxidative and radioprotective potential of rutin and quercetin in Swiss albino mice exposed to gamma radiation. *J Med Phys* 38: 87-92.
- Piana ML, Hellums JD, William WL Jr (1981) Effects of microwave irradiation on humane blood platelets. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 28: 661-664.
- Ryan KL (1997) Age dose not affect thermal and cardiorespiratory responses to microwave heating in calorie restricted rats. *Shock* 8: 55-60.
- Stehen M, Borowitz, Catherine Montgomery (1989) The role of phospholipase A₂ in microsomal lipid peroxidation induced with t-butyl hydroperoxide. *Biochem Biophys* 158: 1021-1028.
- 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.
- 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.
- Yoon YH, Rhee SJ (1994) Effect of Korea green tea, oolong tea and black tea beverage on the antioxidative detoxification mechanism in cadmium. *Korean J Nutr* 27: 1007-1017.

접 수: 2013년 1월 11일
최종수정: 2013년 6월 29일
채 택: 2013년 6월 30일