

브로콜리 유래 Sulforaphane의 혈관 수축성 조절 효과

제 현 동[#]

대구가톨릭대학교 약학대학 약물학교실

(Received May 16, 2014; Revised August 17, 2014; Accepted August 22, 2014)

The Inhibitory Effect of Broccoli in Cruciferous Vegetables Derived-Sulforaphane on Vascular Tension

Hyun Dong Je[#]

Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Catholic University of Daegu 712-702, Korea

Abstract — The present study was undertaken to investigate the influence of sulforaphane on vascular smooth muscle contractility and to determine the mechanism involved. We hypothesized that sulforaphane, the primary ingredient of broccoli of cruciferous vegetables, plays a role in vascular relaxation through inhibition of Rho-kinase in rat aortae. Intact of denuded arterial rings from male Sprague-Dawley rats were used and isometric tensions were recorded using a computerized data acquisition system. Interestingly, sulforaphane significantly inhibited fluoride, phorbol ester or thromboxane A₂ mimetic-induced contraction in denuded muscles suggesting that additional pathways different from endothelial nitric oxide synthesis such as inhibition of Rho-kinase or MEK might be involved in the vasorelaxation. Furthermore, sulforaphane inhibited thromboxane A₂-induced increases in pERK1/2 levels suggesting the mechanism including inhibition of thromboxane A₂-induced increases in ERK1/2 phosphorylation. This study provides evidence that sulforaphane induces vascular relaxation through inhibition of Rho-kinase or MEK in rat aortae.

Keywords □ endothelium, fluoride, MEK, phorbol ester, Rho-kinase, sulforaphane, vasoconstriction

평균수명 증가와 더불어 뇌혈관 질환과 심장질환 등 만성질환도 증가하고 있으며 이들 질환의 위험인자인 고혈압은 그 자체로는 증상이 없으나 합병증인 관상동맥질환, 뇌혈관질환, 심부전, 신부전, 말초혈관질환 및 기타 심혈관계 질환의 주요 위험인자로 생각되고 있다. 따라서 평소 적절한 혈압 관리가 중요하며 이러한 혈압에 영향을 주는 요인으로 연령, 비만, 식습관, 신체 활동, 흡연, 음주, 스트레스, 가족력 등이 있다고 생각된다.¹⁾ 게다가 노화와 고혈압, 죽상경화증, 당뇨병 등 대사성 질병에서 내피의 손상 및 기능장애가 관찰되므로 이 경우에 혈압조절 기능이 더 악화된다.^{2,3)} 고혈압에 대해 일반적으로 베타 차단제, 칼슘 통로 차단제, 안지오텐신 수용체 차단제 또는 이뇨제가 사용되고 있으나 현재까지도 더 나은 물질을 찾으려고 노력하고 있으며 이러한 노력은 고혈압 발병과 관련된 기전을 이해하는데 도움이 된다.

Sulforaphane [1-isothiocyanate-(4R)-(methylsulfinyl)butane]은 브로콜리, 케일 및 양배추 등 배추속의 십자화과 채소에서 발견되는 전구체에서 합성된 식이성 isothiocyanate이다(Fig. 1). 항암 특성에 대해 연구가 널리 진행되었고⁴⁾ 장관 허혈/재관류 손상,⁵⁾ 허혈성 심장 손상,⁶⁾ 허혈성 뇌 손상,⁷⁾ 유기인 중독,⁸⁾ 및 외상성 뇌 손상⁹⁾ 등 산화적 손상과 관련된 급성 조직 손상 모형에서 항산화 효과가 보고되었다. 이들 연구에서 sulforaphane 처치는 NADPH quinone oxidoreductase, glutathione-S-transferase 및 heme oxygenase-1을 포함하는 nuclear factor E2 관련 인자 2 (Nrf2) 의존성 경로의 몇몇 항산화 효소의 유도를 초래하였다.^{10,11)}

효능약이나 증가된 혈관내압에 대한 혈관평활근 수축은 칼슘과 칼모듈린에 의한 미오신의 조절성 경시슬의 인산화를 포함하는 평활근의 생화학적 경로에 의존하며 이들의 존재는 분리된 혈

[#]Corresponding Author

Hyun Dong Je

Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Catholic University of Daegu, Gyeongbuk, 712-702, Korea

Tel.: +82-53-850-3615 Fax.: +82-53-850-3602

E-mail: hyundong@cu.ac.kr

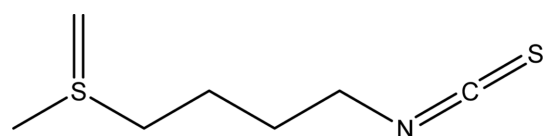


Fig. 1 – Chemical structure of sulforaphane.

관 평활근에서 세포내 칼슘에 대한 형광 측정과 전기영동적 평가로 직접적으로 확인되었다. 혈관 평활근 수축의 개시가 미오신의 20 kDa 경사슬 인산화의 칼슘의존적 증가에 의해 조절된다고 생각되었지만¹²⁾ 다른 경로들도 세포내 칼슘이온의 증가와 상관없이 미오신의 20 kDa 경사슬 인산화를 조절하여 평활근 수축성을 조절한다고 생각된다.¹³⁻¹⁵⁾ 미오신 경사슬 인산화가 약틴과 미오신의 상호작용과 평활근 수축을 촉진하지만 미오신 경사슬 인산화나 수축의 정도는 세포내 칼슘이온농도와 언제나 일치하지는 않다. 효능약 자극에 의한 미오신 경사슬 인산화나 수축력의 정도는 대개 세포내 칼슘이온 농도상 증가에 의한 것보다 더 높아서 소위 칼슘이온 감각이라고 설명된다.¹²⁾ 따라서 미오신 경사슬 인산화수준과 수축정도를 조절하는 추가조절기전이 제안되었다. 즉 guanine nucleotide- exchange factors (Rho GEFs), Rho A, Rho-kinase 등에 의한 미오신 탈인산화효소의 억제¹⁶⁻¹⁹⁾ 또는 mitogen activated protein kinase kinase/Extracellular signal regulated kinase (MEK/ERK) 등이 관여되는 가는 미세섬유성(약틴 섬유성) 조절 등이 칼슘이온 감각에서 주요한 경로라는 것이 뒤이은 연구들에서 밝혀졌다.²⁰⁾

따라서 본 연구의 목적은 sulforaphane을 사용하여 sulforaphane에 의한 내피비의존성 대동맥 혈관 수축 조절 관찰과 이에 대한 내피에 의한 산화 질소 생성외에 칼슘이온 탈감작에 대한 MEK/ERK 또는 RhoA/Rho-kinase 활성화 억제의 역할을 설명하는 것이다. 수축제에 의한 혈관 수축에 가는 미세섬유성(약틴 섬유성) 조절과 굵은 미세섬유성(미오신 섬유성) 조절이 포함되는데 수축제 fluoride와 thromboxane A₂에 의한 수축에 RhoA/Rho-kinase 경로 활성화가 포함되며^{21,22)} 이와 대조적으로 phorbol ester와 thromboxane A₂에서 주로 가는 미세섬유성 조절을 통해 작용하는 것으로 보고되었는데^{20,23)} 이러한 수축제에 의한 혈관 수축에서 sulforaphane에 의한 이완에 이런 경로가 관여되었다는 보고는 없었다. 따라서 우리는 sulforaphane이 내피가 제거된 혈관 이완에 어떤 역할을 수행할 것으로 가설을 세웠고 혈관내피도 혈관 수축성 조절에 관여하므로 혈관내피가 제거된 혈관이 사용되었고 수축에 대한 기계적 신호는 전기적 신호로 바뀌어 컴퓨터에 기록되었다.

노인이나 고혈압이나 당뇨병 등 성인병을 지닌 환자에서 내피가 손상되어 내피의 기능이 억제되는데^{2,3)} 만일 sulforaphane이 내피에만 작용한다면 sulforaphane은 노인이나 성인병 환자에서 효과가 없을 것이다. 그런데 내피가 제거된 혈관에서 sulforaphane이 효과가 있다면 내피를 통한 산화질소 생성외에 sulforaphane이 혈관평활근에 직접 작용하여 노인이나 성인병 환자에서 효과가 있을 것이다. 따라서 sulforaphane 섭취가 혈압 조절에 중요한 역할을 수행하며 기존의 혈압조절제와의 병용투여시 다양한 상호작용이 나타날 수 있을 것이다. 여러 성인병에서 손상되기 쉬운 혈관 내피의 중요성을 인식하고 sulforaphane의 내피 비의

존성 혈관 긴장도 조절 효과를 조사하였다.

실험방법

재료, 시약 및 기기

다음과 같은 약품이 사용되었다. Potassium chloride (Sigma, St. Louis, MO, USA), sodium bicarbonate (Sigma), sulforaphane (Sigma), pentobarbital sodium (Dongwon, Korea), sodium fluoride (Sigma), phorbol 12,13-dibutyrate (PDBu) (Sigma), acetylcholine (Sigma), D-(+)-glucose (Sigma), SD (Sprague-Dawley) 쥐 (Hyochang Science, Korea). 그 외 다른 시약은 특급 또는 일급으로 사용하였다. 약품은 3차 증류수에 용해되어 필요에 따라 Krebs 용액이나 생리식염수에 첨가되었다.

실험과정

본 실험은 대구가톨릭대학교의 동물실험에 대한 윤리규정 (CUD-2014-005)과 US National Institute of Health (NIH, 1996)에 의해 출판된 실험동물의 care와 use에 대한 guide에 따라서 수행되었다. 무게 200~300 g의 성숙한 웅성 Sprague-Dawley 쥐가 실험에 사용되었다. 실험동물은 분리된 상자에 개별적으로 수용되었고 1주일 이상 사료와 물이 충분히 공급되었고 점진적인 적응기를 거쳐 실험에 사용되었다. 실험 당일 pentobarbital sodium (50 mg/kg)을 복강으로 투여하여 마취시키고 고정시켰다.

대동맥 적출

흉부 절개로 흉곽이 열렸고 수술도구로 심장과 주변 부위를 노출시켰다. 심장과 폐는 분리되지 않았고 대동맥 적출을 위한 충분한 공간을 확보하기 위해 좌측으로 밀어서 생리식염수로 적셔진 천으로 덮었다. 대동맥은 간 근처에서 심장부근까지 적출되었고 즉시 차가운 Krebs 용액에 담귀졌다. 대동맥내 혈액과 각종 결체조직은 제거되었다. 대동맥은 4 mm 길이의 고리로 잘려졌고 대동맥 고리의 안쪽으로 cell scraper가 놓여져 부드럽게 3~5회 긁혀서 내피가 물리적으로 제거되었다.

기계적 활성 측정

동맥의 고리 조각은 2개의 금속 갈고리로 수조내 현수되었다. 아래쪽 갈고리는 수조바닥에 고정되었고 위쪽 갈고리는 등장력 변환기에 연결되었다. 등장력 변환기의 신호는 physiograph에 표시되었다. 수조의 부피는 10 ml이고 수조내 용액은 37°C에서 95% O₂와 5% CO₂로 포화되었다. Krebs 용액의 조성은 다음과 같다. NaCl, 118.4; KCl, 4.7; CaCl₂, 2.5; MgCl₂, 1.18; NaHCO₃, 25; KH₂PO₄, 1.2; glucose, 11.7. 용액의 최종 pH는 7.4~7.5로 유지되었다. 1시간의 평형기간동안 휴지기 장력은 2.0 g

으로 조절되었다. 평형기간 후 대동맥 고리는 1 μ M phenylephrine 으로 자극되었고 근육이 충분히 수축하고 1 μ M acetylcholine에 의해 20% 이하로 이완될 경우 내피가 제거된 것으로 판단하고 실험이 시작되었다. 6 mM NaF, 0.1 μ M U46619 또는 1 μ M PDBu에 의한 혈관 수축이 평형에 도달 한 후 일부의 혈관에 sulforaphane(10, 30, 100 μ M)을 투여하여 일어나는 혈관이완의 정도는 6 mM NaF, 0.1 μ M U46619 또는 1 μ M PDBu에 의한 혈관 수축을 기준(100%)으로 하여 표시하였다.

전기 영동

60분 동안 안정화된 후에 6 mM NaF, 0.1 μ M U-46619 또는 1 μ M PDBu를 투여하여 점차 수축되다가 대략 20분 후에 혈관 수축이 평형에 도달 한 후 sulforaphane을 투여하여 60분 동안 충분히 이완된 대동맥 조직을 미리 냉동된 dithiothreitol, trichloroacetic acid, acetone으로 얼리고(-80°C) 1시간 후 dithiothreitol, acetone으로 세척하고 20 mM MOPS, 4% SDS, 10% glycerol, 10 mM DTT, 20 mM β -glycerophosphate, 5.5 μ M leupeptin, 5.5 μ M pepstatin, 20 kIU aprotinin, 2 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF, 100 μ M ZnCl₂, 20 μ M 4-(2-aminoethyl) benzenesulphonyl fluoride (AEBSF) 및 5 mM EGTA를 함유한 homogenizing buffer를 가해 균질화시킨다. 이를 원심분리하고 상층액을 얻은 다음 단백질 정량을 (BioRad) 실시한다. 동량의 gel loading buffer와 혼합한 후 4분간 끓인 각각의 sample을 SDS-polyacrylamide mini-gel에서 전기 영동시킨다. 전개된 gel 을 PVDF membrane에 transfer시키고 각각의 1차 항체와 실온

에서 2시간 동안 반응시킨다. Washing buffer로 3회 세척하고 horseradish-peroxidase가 결합된 2차 항체와 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. Washing buffer로 3회 세척 후 ECL detection reagent를 가하여 1분간 반응시켜 molecular imager에 감광시켜 밴드를 확인한다. 1차 항체로 ERK 또는 phosphoERK at Thr202/Tyr204에 대한 항체가 MEK 활성 정도를 확인하기 위해 사용되었다(Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) 또는 Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA)).

통계 분석

모든 실험결과들은 평균±표준오차로 나타내었고 통계 처리는 two-way ANOVA followed by Boneferroni post-test (Fig. 2~4) 또는 Student's t-test를 실시하여 p<0.05를 기준으로 유의성 여부를 판정하였다.

실험결과

내피가 제거된 쥐 혈관에서 fluoride에 의한 수축에 대한 sulforaphane의 효과

분리된 쥐 대동맥의 휴지기 장력은 60분 후 안정 상태에 도달 하였고 휴지기 장력은 2.0 g으로 조절하였다. 물리적으로 내피가 제거된 쥐 대동맥에서 fluoride (6 mM)에 의한 수축에 대해 sulforaphane은 유의성 있는 억제 효과가 있었다(Fig. 2). 따라서 sulforaphane은 내피 의존성 산화질소 생성외에 Rho-kinase 활성 억제 효과가 있는 것으로 생각된다.

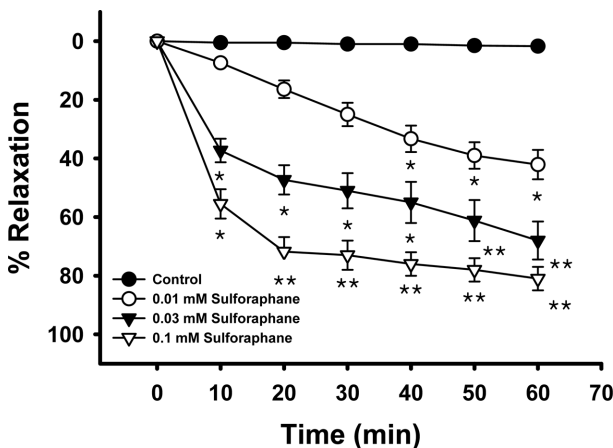


Fig. 2 – The effect of sulforaphane on 6 mM fluoride-induced vascular contraction in denuded muscles. After 6 mM NaF-induced contraction had reached plateau, various concentrations (10, 30, 100 μ M) of sulforaphane were added into organ bath. Developed tension is expressed as a percentage of the maximum contraction to 6 mM fluoride. Data are expressed as means of 3-5 experiments with vertical bars showing SEM. *P<0.05, **P<0.01, presence versus control.

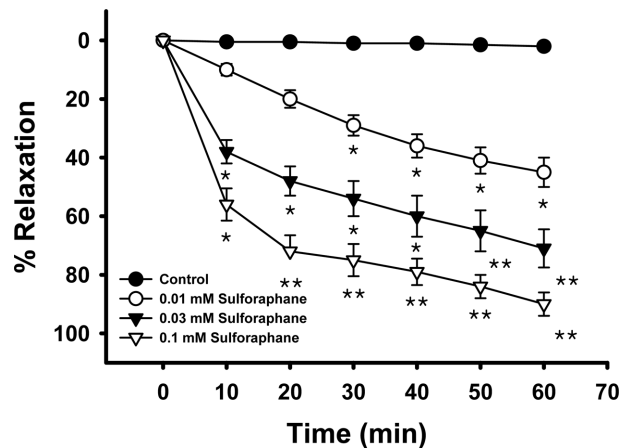


Fig. 3 – The effect of sulforaphane on 6 mM fluoride-induced vascular contraction in intact muscles. After 6 mM NaF-induced contraction had reached plateau, various concentrations (10, 30, 100 μ M) of sulforaphane were added into organ bath. Developed tension is expressed as a percentage of the maximum contraction to 6 mM fluoride. Data are expressed as means of 3-5 experiments with vertical bars showing SEM. *P<0.05, **P<0.01, presence versus control.

내피가 제거되지 않은 쥐 혈관에서 fluoride에 의한 수축에 대한 sulforaphane의 효과

내피가 제거되지 않은 쥐 대동맥에서 fluoride (6 mM)에 의한 수축에 대해 sulforaphane은 10^{-5} M 이상의 농도에서 유의성 있는 이완효과를 보였다(Fig. 3). 또한 내피가 제거된 쥐 대동맥과 비교시 다소 증가된 이완효과를 보였다.

내피가 제거된 쥐 대동맥에서 thromboxane A₂에 의한 수축에 대한 sulforaphane의 효과

Thromboxane A₂는 주로 RhoA/Rho-kinase를 활성화시키고 일부 MEK/ERK가 관여되는 미세섬유성(악틴 섬유성) 조절을 활성화시켜 혈관 평활근을 수축시킨다고 알려져 있다. 내피가 제거된 쥐 대동맥에서 thromboxane A₂에 의한 수축에 대해 sulforaphane은 10^{-5} M 이상의 농도에서 유의성 있는 이완효과를 보였다(Fig. 4).

내피가 제거된 쥐 혈관에서 phorbol ester에 의한 수축에 대한 전처치된 sulforaphane의 억제효과

Phorbol ester (PDBu)의 경우 주로 MEK/ERK가 관여되는 미세섬유성(악틴 섬유성) 조절을 활성화시켜 혈관 평활근을 수축시킨다고 알려져 있다. 물리적으로 내피가 제거된 쥐 대동맥에서 전처치된 sulforaphane은 $10^{-4.5}$ M의 농도에서 phorbol

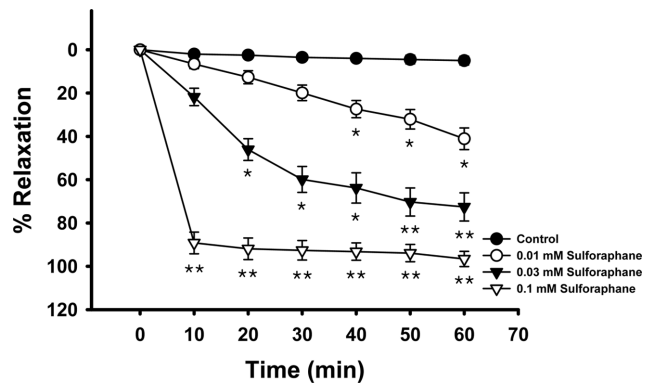


Fig. 4 – The effect of sulforaphane on 0.1 μ M U-46619-induced vascular contraction in denuded muscles. After 0.1 μ M U-46619-induced contraction had reached plateau, various concentrations (10, 30, 100 μ M) of sulforaphane were added into organ bath. Developed tension is expressed as a percentage of the maximum contraction to 0.1 μ M U-46619. Data are expressed as means of 3-5 experiments with vertical bars showing SEM. * P <0.05, ** P <0.01, presence versus control.

12,13-dibutyrate (PDBu) (10^{-6} M)에 의한 수축에 대해 유의성 있는 억제 효과를 보였다(Fig. 5). 따라서 sulforaphane에 MEK/ERK 등이 관여하는 미세섬유성 조절 기능이 있는 것으로 생각된다.

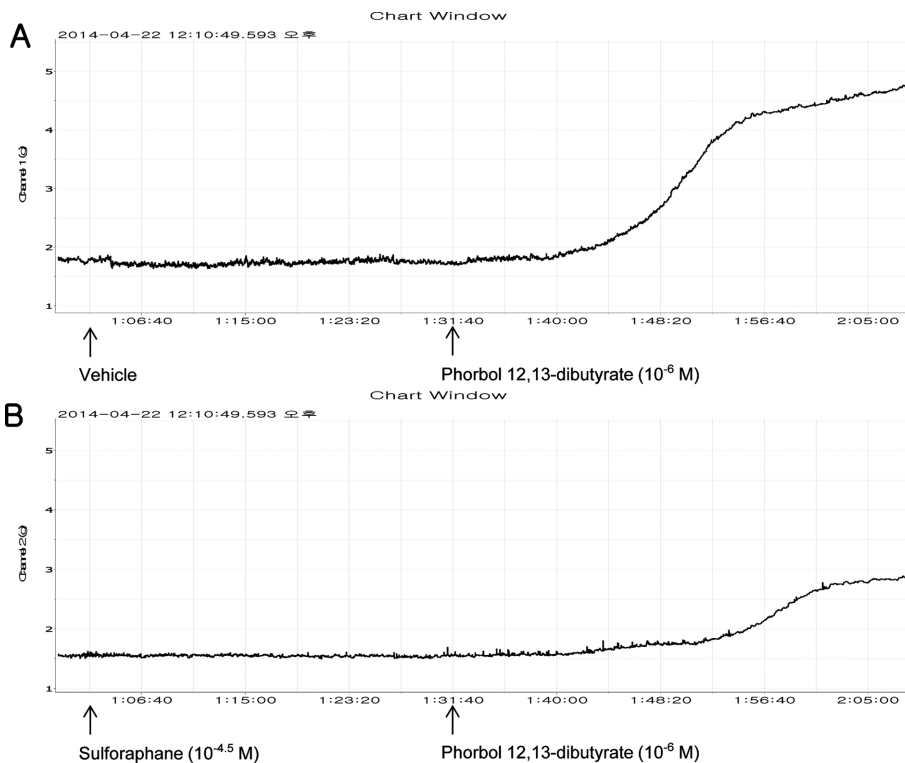


Fig. 5 – A representative tracing of the inhibition of 1 μ M phorbol 12,13-dibutyrate-induced vasoconstriction by pretreated $10^{-4.5}$ M sulforaphane in rat aortic rings with endothelium denuded.

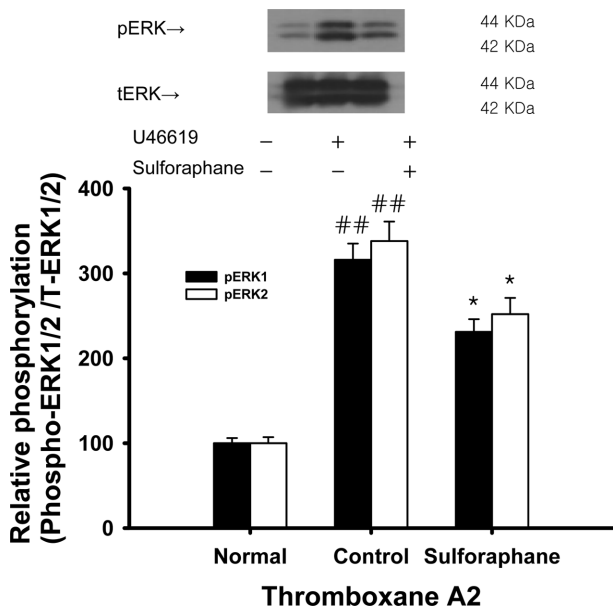


Fig. 6 – Effect of sulforaphane (0.1 mM) on U-46619-induced increases in phospho-ERK1/2 levels. Phospho-ERK1/2 protein levels were decreased in quick frozen sulforaphane-treated rat aortas in the absence of endothelium compared to vehicle-treated rat aortas precontracted with U-46619. The upper panel shows a typical blot and the lower panel shows average densitometry results for relative levels of phospho-ERK1/2. Data are expressed as the means of 3-5 experiments with vertical lines representing SEMs. ##*P*<0.01 versus normal. **P*<0.05 versus U-46619 alone.

Thromboxane A₂에 의한 ERK1/2 인산화에 대한 억제 효과

내피를 제거한 쥐 대동맥에서의 thromboxane A₂에 의한 ERK1/2의 상대적인 인산화 정도는 control에 비해 sulforaphane 처리 군에서는 인산화가 유의성 있게 억제되었다(Fig. 6). ERK1/2는 Ca²⁺ 비의존적인 수축기전 중의 actin 미세섬유 조절 경로에서 MEK의 기질로 작용한다. MEK에 의해 MAPK 중 하나인 ERK1/2가 인산화되어 caldesmon을 인산화시켜 악틴-미오신 상호작용을 증가시켜 혈관 수축이 증대된다. MAPK 경로의 partial activator인 thromboxane A₂에 의해 수축이 유도된 normal, control, sulforaphane 처리 군에 대해 western blot을 통한 t-ERK1/2, p-ERK1/2의 농도를 확인하였는데 sulforaphane 처리 군에서 ERK1/2의 인산화가 유의성 있게 억제되었다. 따라서 sulforaphane은 MEK 활성화와 ERK1/2의 인산화를 억제하여 작용하는 것으로 생각된다.

고 찰

Sulforaphane은 일상에서 흔히 접하는 브로콜리, 케일 및 양배추 등 배추속의 십자화과 채소에서 발견되는 전구체에서 합성된 식이성 isothiocyanate로서 항암 특성에 대해 연구가 널리 진행

되었고 산화적 손상과 관련된 급성 조직 손상 모형에서 항산화 효과가 보고되었으며^{10,11)} 현재까지 심각한 부작용은 보고되지 않았으나 60°C 이상에서 불안정하며 반감기가 짧고 생체이용률이 낮은 것으로 보고되었다.²⁴⁾ 따라서 이번 실험에서 내피를 제거한 혈관을 이용하여 유효 성분인 sulforaphane의 추가 기전을 조사하게 되었다. 한편 혈관 수축 기전에 효능약 자극에 의한 미오신 경사슬 인산화나 수축력의 정도는 대개 세포내 칼슘이온 농도상 증가에 의한 것보다 더 높으며 이 현상은 소위 칼슘이온 감각이라고 설명된다.¹²⁾ 따라서 미오신 경사슬 인산화수준과 수축 정도를 조절하는 추가조절기전이 제안되었다. 즉 protein kinase C (PKC), MEK에 의한 가는 미세섬유성 조절이나 Rho GEFs, Rho A, Rho-kinase 등에 의한 미오신 탈인산화효소의 역할이 칼슘이온 감각에서 주요한 경로라는 것이 뒤이은 연구들에서 밝혀졌다. 예를 들어 phorbol ester는 MEK, ERK에 의한 가는 미세섬유성 조절을 통해서, fluoride, thromboxane A₂, phenylephrine 등은 RhoA/Rho-kinase 활성화를 통해 칼슘이온 감각을 일으킨다고 알려져 있다.

그 중 fluoride와 thromboxane A₂는 RhoA/Rho-kinase를 활성화시켜 혈관 평활근을 수축시킨다고 알려져 있는데 내피가 유지되거나 내피가 제거된 쥐 대동맥에서 sulforaphane은 fluoride 또는 thromboxane A₂에 의한 수축에 대해 억제효과를 보였다(Fig. 2, Fig. 3, Fig. 4). 따라서 적어도 fluoride와 thromboxane A₂에 의한 혈관 평활근 수축에서 sulforaphane은 RhoA/Rho-kinase를 불활성화시켜서 작용하는 것으로 생각되었다. 한편 phorbol ester와 thromboxane A₂는 MEK, ERK 등을 활성화시켜 혈관 평활근을 수축시킨다고 알려져 있는데 내피가 제거된 쥐 대동맥에서 sulforaphane은 phorbol ester 또는 thromboxane A₂에 의한 수축에 대해 억제효과를 보였고(Fig. 5) 이는 전기영동에서 확인되었다(Fig. 6). 따라서 적어도 phorbol ester 또는 thromboxane A₂에 의한 혈관 평활근 수축에서 sulforaphane은 MEK, ERK 등을 불활성화시키는 것으로 생각되었다.

결 론

본 실험에서는 심혈관계 질환, 뇌졸중 등에 대해 예방과 치료를 목적으로 사용될 수 있는 sulforaphane에서의 혈관 이완 기전에 대해 조사하여 천연물 유래 sulforaphane의 투여에서의 주의 및 새로운 가능성을 확인하고자 하였다. Sulforaphane은 내피에 대한 작용외에 추가적인 기전으로 평활근 자체의 악틴-미오신 상호작용을 억제하여 작용하는 것으로 생각되며 구체적으로 Rho-kinase 또는 MEK 불활성화에 관여하는 것으로 생각된다. 향후에 aequorin이나 fura-2 등의 광단백질로 sulforaphane의 Ca²⁺ 유입에 대한 효과를 관찰하고 confocal microscope 등으로 효소 단백질의 membrane translocation을 관찰하여 sulforaphane의

RhoA/Rho-kinase 활성 억제효과, MEK, ERK 의존성 가는 미세섬유성 조절 경로 등을 보다 직접적인 방법으로 확인하고자 한다.

References

- 1) Lydakis, C., Lip, G. Y. H., Beevers, M. and Beevers, D. G. : Diet, lifestyle and blood pressure. *Coronary Health Care* **1**, 130 (1997).
- 2) Marn, C., Yubero-Serrano, E. M., Lopez-Miranda, J. and Prez-Jimnez, F. : Endothelial aging associated with oxidative stress can be modulated by a healthy mediterranean diet. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 8869 (2013).
- 3) Favero, G., Paganelli, C., Buffoli, B., Rodella, L. F. and Rezzani, R. : Endothelium and its alterations in cardiovascular diseases: life style intervention. *Biomed. Res. Int.* in press (2014).
- 4) Zhang, Y., Talalay, P., Cho, C. G. and Posner, G. H. : A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 2399 (1992).
- 5) Zhao, H. D., Zhang, F., Shen, G., Li, Y. B., Li, Y. H., Jing, H. R., Ma, L. F., Yao, J. H. and Tian, X. F. : Sulforaphane protects liver injury induced by intestinal ischemia reperfusion through Nrf2-ARE pathway. *World J. Gastroenterol.* **16**, 3002 (2010).
- 6) Piao, C. S., Gao, S., Lee, G. H., Kim, D. S., Park, B. H., Chae, S. W., Chae, H. J. and Kim, S. H. : Sulforaphane protects ischemic injury of hearts through antioxidant pathway and mitochondrial K (ATP) channels. *Pharmacol. Res.* **61**, 342 (2010).
- 7) Zhao, J., Kobori, N., Aronowski, J. and Dash, P. K. : Sulforaphane reduces infarct volume following focal cerebral ischemia in rodents. *Neurosci. Lett.* **393**, 108 (2006).
- 8) Alp, H., Aytakin, I., Hatipoglu, N. K., Alp, A. and Ogun, M. : Effects of sulforaphane and curcumin on oxidative stress created by acute malathion toxicity in rats. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **16**, 144 (2012).
- 9) Hong, Y., Yan, W., Chen, S., Sun, C. R. and Zhang, J. M. : The role of Nrf2 signaling in the regulation of antioxidants and detoxifying enzymes after traumatic brain injury in rats and mice. *Acta pharmacologica Sinica* **31**, 1421 (2010).
- 10) Innamorato, N. G., Rojo, A. I., Garcia-Yague, A. J., Yamamoto, M., de Ceballos, M. L. and Cuadrado, A. : The transcription factor Nrf2 is a therapeutic target against brain inflammation. *J. Immunol.* **181**, 680 (2008).
- 11) Vomhof-Dekrey, E. E. and Picklo, M. J., Sr. : The Nrf2-antioxidant response element pathway: a target for regulating energy metabolism. *J. Nutr. Biochem.* **23**, 1201 (2012).
- 12) Somlyo, A. P. and Somlyo, A. V. : Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* **372**, 231 (1994).
- 13) Somlyo, A. P. and Somlyo, A. V. : From pharmacomechanical coupling to G-proteins and myosin phosphatase. *Acta. Physiol. Scand.* **164**, 437 (1998).
- 14) Uehata, M., Ishizaki, T., Satoh, H., Ono, T., Kawahara, T., Morishita, T., Tamakawa, H., Yamagami, K., Inui, J., Maekawa, M. and Narumiya, S. : Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* **389**, 990 (1997).
- 15) Sakurada, S., Takuwa, N., Sugimoto, N., Wang, Y., Seto, M., Sasaki, Y. and Takuwa, Y. : Ca²⁺-dependent activation of Rho and Rho-kinase in membrane depolarization-induced and receptor stimulation-induced vascular smooth muscle contraction. *Circ. Res.* **93**, 548 (2003).
- 16) Kitazawa, T., Masuo, M. and Somlyo, A. P. : Protein-mediated inhibition of myosin light-chain phosphatase in vascular smooth muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 9307 (1991).
- 17) Gohla, A., Schultz, G. and Offermanns, S. : Roles for G(12)/G(13) in agonist-induced vascular smooth muscle cell contraction. *Circ. Res.* **87**, 221 (2000).
- 18) Leung, T., Manser, E., Tan, L. and Lim, L. : A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. *J. Biol. Chem.* **270**, 29051 (1995).
- 19) Matsui, T., Amano, M., Yamamoto, T., Chihara, K., Nakafuku, M., Ito, M., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A. and Kaibuchi, K. : Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *EMBO. J.* **15**, 2208 (1996).
- 20) Wier, W. G. and Morgan, K. G. : Alpha1-adrenergic signaling mechanisms in contraction of resistance arteries. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **150**, 91 (2003).
- 21) Jeon, S. B., Jin, F., Kim, J. I., Kim, S. H., Suk, K., Chae, S. C., Jun, J. E., Park, W. H. and Kim, I. K. : A role for Rho kinase in vascular contraction evoked by sodium fluoride. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **343**, 27 (2006).
- 22) Wilson, D. P., Susnjar, M., Kiss, E., Sutherland, C. and Walsh, M. P. : Thromboxane A₂-induced contraction of rat caudal arterial smooth muscle involves activation of Ca²⁺ entry and Ca²⁺ sensitization: Rho-associated kinase-mediated phosphorylation of MYPT1 at Thr-855, but not Thr-697. *Biochem. J.* **389**, 763 (2005).
- 23) Bhattacharya, B. and Roberts, R. E. : Enhancement of alpha2-adrenoceptor-mediated vasoconstriction by the thromboxane-mimetic U46619 in the porcine isolated ear artery: role of the ERK-MAP kinase signal transduction cascade. *Br. J. Pharmacol.* **139**, 156 (2003).
- 24) Eylen, D. V., Oey, I., Hendrickx, M. and Loey, A. V. : Kinetics of the stability of broccoli (*Brassica oleracea cv. italica*) myrosinase and isothiocyanates in broccoli juice during pressure/temperature treatments. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 2163 (2007).