creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

약학석사학위논문

Curcuminoid 계열 물질의 혈관 수축 억제 기전에 대한 연구

Effects of Curcuminoid-related chemical on Vascular Smooth Muscle Contraction in rat aortic rings

2014년 2월

서울대학교 대학원
약학과 예방약학 전공
김 정 준

초 록

고혈압은 심혈관 질환, 뇌졸중, 신장질환 등의 가장 큰 risk factor로 알려져 있어 이를 예방하고 치료하기 위해 현재 수많은 합성 의약품을 이용하고 있다. 하지만 장기 치료를 기본으로 하는 고혈압 치료의 특성상 수많은 부작용이 보고되고 있어, 좀 더 효과 적이고 부작용이 적은 고혈압 치료제의 개발을 위해 천연 성분을 이용하여 새로운 고혈압 치료를 개발하려는 연구가 진행 중에 있다. 천연물 울금의 주요 활성성분으로 알려진 Curcuminoid는 CC1, CC2, CC3, CC4가 있으며, 실험 결과 CC4의 혈관 수축 억제 효과가 가장 큰 것으로 밝혀졌다. 다른 Curcuminoid에 비해 CC4는 그 효과가 잘 알려지지 않았으므로 본 연구에서는 CC4의 혈관 수축 억제에 관한 효과를 규명 하고자 한다. 분리한 흰 쥐의 흉부 대동맥에 CC4를 전 처리 하였을 때, Serotonin 및 Phenylephirne (PE)에 의한 혈관 수축을 농도 의존적으로 억제시켰다. 이런 효과가 비 선택적인 혈관 평활근 손상 때문에 일어나는 것인지 확인하기 위해 LDH assay 및 CC4에 의한 효과의 가역성을 확인 하였고 그 결과 CC4의 혈관 수축억제는 혈관 평활근의 손상에 의한 비가역적 효과 및 비 특이적인 세포 독성 작용이 아니라는 사실을 확인 할 수 있었다. 혈관 수축의 정도는 내피 및 평활근에 의해서 조절되므로 CC4의 작용점을 확인하기 위해 내피를 제거한 혈관에서 실험 해 본 결과 CC4는 평활근에 작용하여 혈관 수축을 억제하는 것으로 밝혀졌다. 혈관 평활근 세포에서 칼슘은 CaM과 함께 MLC을 인산화 시켜 혈관 수축을 유발하는 중요한 요소이다. 따라서 CC4가 Serotonin에 의한 평활근 세포내의 칼슘 level에 어떠한 영향을 주는지 확인 하였다. 실험 결과

CC4는 Serotonin에 의한 평활근 세포내의 칼슘 level 증가를 억제함을 확인 할 수 있었다. 이때 평활근 세포내의 칼슘 증가는 Voltage-Operated Calcium Channel (VOCC), Store-Operated Calcium Channel (SOCC) 에 의한 외부 칼슘의 유입 그리고 Sarcoplasmic Reticulum (SR) 내에서의 칼슘 유리에 의한 내부 칼슘의 유리에 의해 증가하므로 CC4가 어느 경로를 통해서 칼슘 level을 감소시키는지 알아보았다. 그 결과 CC4가 모든 경로를 통한 칼슘 level 증가에 따른 혈관 수축을 억제 하였다. 따라서 CC4는 비 특이적으로 모든 평활근 세포내의 칼슘 level 증가 경로를 억제함으로서 혈관 수축억제를 일으키는 것으로 사료된다.

주요어 : Curcuminoid, 혈관 수축억제 효과, 칼슘, SOCC, VOCC,
SR Ca^{2+} release

목 차

초 록 i

목 차 iii

List of Figures iv

List of Abbreviations v

서 론 1

실험방법 4

- 시약 4
- 실험동물 4
- 혈관 조직 분리 4
- 혈관의 수축력 측정 5
- 혈관 수축의 washout 효과 측정 6
- 혈관으로부터의 LDH 유출 실험 6
- 평활근 세포내 칼슘 level 측정 7
- 외부 및 내부 칼슘 의존성 측정 8
- 통계처리 9

실험결과 10

고 찰 20

참고문헌 25

Abstract 31

List of Figures

Fig 1. Effect of contraction inhibition by Curcuminoids in rat aortic rings

Fig 2. Effect of CC4 on Phenylehrine (PE) & Serotonin induced contraction in rat aortic rings

Fig 3. Wash out effect of CC4 on Serotonin induced contraction in rat aortic rings

Fig 4. Nonspecific cytotoxicity of CC4

Fig 5. Effect of CC4 on Serotonin induced contraciton in aortic rings without endothelium

Fig 6. Effect of CC4 on Serotonin induced intracellular Calcium increase in primary rat smooth muscle cell

Fig 7. Effect of CC4 on extra/intracellular Calcium induced contraction in denuded aortic rings

List of Abbreviations

Ach	:	Acetylcholine
ACEI	:	Angiotensin converting enzyem inhibitor
ARB	:	Angiotensin receptor blocker
CaM	:	Calmodulin
CCB	:	Calcium channel blocker
DAG	:	Diacyl glycerol
EDTA	:	Ethylenediaminetetraacetic acid
IP_3	:	Inositol triphosphate
KR	:	Krebs-Ringer
LDH	:	Lactate dehydrogenase
MLC	:	Myosin light chain
MLCP	:	Myosin light chain phosphatase
PE	:	Phenylephrine
SOCC	:	Store operated calcium channel
SR	:	Sarcoplasmic reticulum
TRPC	:	Transient receptor potential cation channels
TRPV	:	Transient receptor potential vanilloid type
VOCC	:	Voltage operated calcium channel

서 론

고혈압은 심장 및 혈관 기능 손상에 의해 혈압이 정상 범위보다 높은 만성질환을 말하는 것으로 혈압이 140/60mmHg 이상일 때 고혈압이라고 한다. 고혈압은 미국 성인 3명중 한명꼴로 가지고 있을 정도로 빈도 높은 질환이며, heart disease, stroke, end-stage renal failure, peripheral vascular disease 등의 주요한 risk factor 로서 한해 대략 710만 명의 환자들이 고혈압과 관련되어 사망한다고 알려져있다(Aram V et al, 2003, Qiuping Gu et al, 2012). 고혈압의 치료는 diuretics, ACEI, ARB, BB, CCB 등의 약물이 주로 쓰이며 환자의 혈압이나 합병증 등을 고려하여 약을 결정 한다. 하지만 고혈압치료를 받는 환자 중 34%가 고혈압 치료제에 의한 부작용을 호소하고 있고 의사들은 환자의 치료와 부작용 사이에서 많은 고민을 하고 있는 실정이다 (Js Cohen, 2001). 따라서 최근 30년간 천연물을 이용하여 좀 더 안전하고 접근성이 높은 새로운 고혈압 치료제를 찾기 위한 노력이 계속 되고 있다 (Tabassum N, 2011).

Curcuminoid는 울금의 주성분으로서 CC1, CC2, CC3, CC4가 있다 (Kiuchi F et al, 1993, Rahman I et al, 2006). Curcuminoid는 항염증, 항산화, 항 HIV, 항암 작용 등 여러 생리 활성을 가지는 물질이며 (Hideji Itokawa, 2008), 특히 CC1은 혈관 평활근 세포의 migration및 proliferation에 관여하는 PDGF의 receptor binding을 억제하고 MMPs 를 억제하여 TNF-α에 의한 혈관 평활근 세포의

migration을 억제하는 작용이 있으며, CC2는 FAK/PI3K/AKT, PGK1/ERK1/2 신호전달과정을 억제하여 neointima formation을 억제하고, CC3 역시 PDGF에 의한 혈관 평활근 세포의 proliferaion을 억제하는 작용이 있어 동맥경화나 혈관 협착증 등 심혈질환 치료제로써 가능성을 제시 하고 있다 (Ming-Jyh Sheu et al, 2013, Xiaoping Yang et al, 2006, Yinan-Hua, 2013, Yu YM, 2010). Curcuminoid 중 가장 연구가 많이 되어있는 CC1의 경우는 pocine coronary artery에서 NO, cGMP, adrenergic β-receptor에 작용하여 혈관 이완 효과가 있다고 알려져 있다 (Pei-Han Xu, 2007). 또한 Ca^{2+} release activated Ca^{2+} channel 및 inositol triphosphate (IP_3)에 의한 Ca^{2+} 유리를 억제하여 세포내 Ca^{2+}을 억제 한다는 보고가 있는데 (Dong Hoon Shin et al, 2011, J. L. Dyer et al, 2002), Ca^{2+}은 혈관 평활근 수축에 중요한 물질이며 혈관 평활근 세포 내에서도 위와 비슷한 기전으로 Ca^{2+} 증가가 일어나므로 CC1 이 혈관 평활근 세포 내에 Ca^{2+}을 억제 할 수있는 가능성을 제시 해 볼 수 있다. 위와 같은 보고들은 CC1의 고혈압 치료제로서의 가능성을 제시 하고 있으며, 더 나아가 CC1과 유사한 다른 Curcuminoid 역시 고혈압치료제로서의 가능성이 있다는 사실을 제시한다.

Ca^{2+}은 혈관 수축에 있어 매우 중요한 물질로 평활근 세포내에서 calmodulin (CaM)과 복합체를 형성한 후 myosin light chain kinase (MLCK)를 활성화 시킨다. 활성화된 MLCK는 myosin light chain (MLC)를 phosphorylation 시켜 수축을 유발하게 된다 (Horowitz et al, 1996). Agonist에 의해 혈관 수축 시 평활근 세포내에서의 Ca^{2+}의 변화는, 우선 Sarcoplasmic Reticulum (SR)내에서의 Ca^{2+} 유리에

의한 일시적인 증가 후 membrande의 depolarization에 의해 활성화 되는 Voltage-Operated Calcium channel (VOCC)과 SR내의 Ca^{2+} 고갈에 의해 활성화 되는 Sotre-Operated Calicum Channel (SOCC)에 의한 칼슘 유입에 의해 칼슘 level이 유지가 되는 양상을 보인다 (Alan Gibson et al, 1998, Kevin S et al, 2005).

따라서 본 연구는 Curcuminoid 계열 물질의 혈관 수축억제력을 확인 하고 이 중 가장 큰 효과를 보이는 CC4가 혈관 평활근 수축에 미치는 영향을 관찰함과 동시에 그 기전을 명확히 알아보고, 고혈압 치료제로서의 가능성이 있는지 살펴보고자 한다.

실 험 방 법

시약

CC4는 Chromadex에서 CC1, CC2, CC3은 Cayman chemical company에서 Acetylcholine, dimethylsulfoxide (DMSO), Serotonin, phenylephrine (PE) 등의 시약은 모두 Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA)로부터 구입하였다. 세포 실험에 필요한 모든 시약은 Gibco Co (Calsbad, CA, USA)로부터 구입하였다. 그 밖의 시약은 모두 특급시약을 사용하였다.

실험동물

Sprague-Dawley 수컷 흰쥐를 샘타코 (Korea)로부터 공급 받아, 서울대학교 동물실험 연구동에서 일주일가량 적응 시킨 뒤 실험에 이용하였다. 사육실은 온도 22 ± 2 ℃, 습도 55 ± 5 % 의 온도 환경을 유지하였으며, 오전 7 시와 오후 5 시를 기준으로 하여 밤낮을 조절하였다. 사료 (애그니브랜드, 퓨리나코리아) 와 물은 제한 없이 공급하였다. 모든 실험에서 수컷 흰쥐 250-300g을 사용하였다.

혈관 조직 분리

혈관의 반응은 organ bath system을 이용하여 측정하였다. 흰쥐를 실혈 치사시킨 후 개흉하여 신속하게 흉부 대동맥 (thoracic aorta)을 적출하고, 즉시 95% O_2/5% CO_2의 혼합가스로 포화된

ice-cold Krebs-Ringer 완충액 (NaCl 115.5 mM, KCl 4.6 mM, KH_2PO_4 1.2 mM, $MgSO_4$ 1.2 mM, $CaCl_2$ 2.5 mM, $NaHCO_3$ 25.0 mM, disodium. Ca^{2+}-EDTA 0.026 mM, glucose 11.1 mM, pH 7.4)으로 옮겼다. 혈관내의 혈액과 주변의 결합조직 및 지방 등을 제거하고 길이 3-4 mm의 혈관 ring을 만들었다. 내피세포가 없는 혈관은 안과용 핀셋 끝을 혈관 내에 넣고 KR 완충액으로 적신 거름종이 위에서 3초씩 10회 정도 회전시켜 내피를 제거하였다. 매 3초마다 KR 완충액에 다시 담그고 혈관이 건조해지지 않도록 하였다.

혈관의 수축력 측정

만들어진 혈관 ring을 혈관에 자극이 가해지지 않도록 주의하면서 KR 완충액 10 mL이 채워진 organ bath에 현수하였다. Organ bath내의 KR 완충액은 circulator bath (PolyScience, USA)를 이용하여 37℃를 유지하고, 95% O_2/5% CO_2 의 혼합가스를 지속적으로 공급하여 pH 7.4를 유지시켰다. 혈관 ring은 두 개의 텅스텐 사를 이용하여 고정하였는데 하부의 텅스텐 사는 organ bath내의 holder에 부착되어 있고, 하부의 철사와 평행되게 장치한 상부의 텅스텐 사는 Grass FT03 force transducer (Grass Instrument Co., Quincy, USA)에 연결되어 혈관의 장력을 감지하도록 하였다. 감지된 장력의 변화는 BIOPAC's MP100 data acquisition system (BIOPAC Systems Inc., Goleta, USA)에 의해 computer로 전달되고, Acknowledge III computer program으로 결과를 기록, 분석하였다. 혈관 ring은 초기 30분간 점증적으로 장력을 주어 2g로 평형 상태에 도달하도록 하였다. 혈관을 phenylephrine (PE) 10^{-6} M으로 수축시

킨 후, acetylcholine (Ach) 10^{-6} M 을 가하여 이완시켰을 때 내피세포가 있는 혈관의 경우에는 이완율이 80% 이상인 것을, 내피세포가 없는 혈관은 10% 이하인 것을 표본으로 사용하였다. 그 후 30분간 혈관 장력을 2g의 평형 상태로 유지시킨 다음, NaCl과의 이온평형을 고려하여 제조한 90 mM KCl을 함유한 KR 완충액 (37℃)으로 organ bath내의 완충액을 교환하여 혈관의 수축을 유도하였다. 이것을 최대 수축으로 삼아 혈관 수축률을 구하였다. 그 후 3번 wash 한 후 혈관 장력이 2g의 평형상태로 유지되도록 30분간 KR 완충액상에 두었다. CC4의 용량 의존성 효과를 관찰할 때에는 2g의 평형 상태에서, 혈관에 용매(DMSO) 혹은 CC4를 30min 전 처리 한 다음, Organ bath 상에서 수축 유발 agonist인 PE 및 Serotonin을 점증적으로 가하여 혈관 장력의 변화를 관찰하였다.

혈관 수축의 washout 효과 측정

혈관 수축에 미치는 물질의 효과에 대한 비가역성 여부를 검토하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다. 먼저 혈관에 CC4를 25 μM을 30분 처리 한 다음, Organ bath 상에서 Serotonin으로 유도된 혈관 수축을 측정한 후, 5회 KR 완충액으로 wash 하고 완충액 상에서 4시간 동안 혈관 장력이 2g 로 유지 되도록 방치한 후 다시 Serotonin으로 혈관 수축을 유발 하였다.

혈관으로부터의 lactatedehydrogenase(LDH) 유출 실험

혈관으로부터의 lactatedehydrogenase(LDH) 유출은 spectro-photometry 방법을 이용하였다. 내피를 제거한 혈관에 CC4 또는 용

매인 DMSO를 37℃에서 30분 동안 처리하여 Tris-EDTA buffer (56 mM Tris, 5.6 mM EDTA, pH 7.4)에 녹인 0.17 mM NADH 1.0 ml에 25 μl의 상등액을 가한 후 37℃에서 10분 동안 배양했다. 여기에 37℃에서 미리 가온하여 놓은 100 μl의 14 mM pyruvate를 가하고 UV spectrophotometry (Shimadzu, Japan)를 사용하여 339 nm의 파장에서 흡광도 감소를 측정하였다. 흡광도 감소 속도는 NADH의 산화 속도를 의미하며 이는 혈관으로부터 유리된 LDH의 활성도를 나타낸다. 혈관에 lysophosphatidylcholine (LPC) 10^{-4} M을 가하고 37℃에서 48시간동안 배양한 후 LDH를 측정하고 이를 positive control로 사용하였다.

평활근 세포내 칼슘 level 측정

세포 내 칼슘 level을 측정하기 위해 fura-2 와 digital imaging 방법을 도입하였다. 혈관 내피와 외피를 제거하고 잘게 자른 뒤 elastase 와 collagenase를 이용하여 평활근 세포를 혈관과 분리시켰다. 그 후 평활근 세포에 CC4를 30 min 처리하고 fura-2 를 로딩하기 위하여 평활근 세포를 1 μM fura/2AM과 1% bovaine serum albumin이 포함된 Physiological Salt Solution (PSS; 140mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM $NaHCO_3$, 1.8 mM $CaCl_2$, 1.4 mM $MgCl_2$, 1.2 mM NaH_2PO_4, 11.5 mM glucose and 10 mM HEPES, pH 7.4)에 1 hr 동안 배양 하였다. 그리고 실험 도중 PSS를 2 ml/min로 계속해서 perfusion을 해 주었다. 모든 실험은 37℃에서 수행 하였고, Cell image는 S Fluor 40X (N.A. 1.30, oil) object lens (Nickon, Melville, NY)와 evolve EMCCD camera (Photometrics, Tucson,

AZ)가 장착 된 Nickon Eclipse Ti-U inverted microcope를 이용하여 찍었으며, 광원은 Sutter DG-4 filter changer (Sutter Instruments, Novato, CA)을 이용하였고, fura-2의 excitation 그리고 emission 파장은 각각 340/380 그리고 535 nm 로 하였다. Image는 Meta Imaging System (Molecular Devices, West Chester, PA)를 이용하여 분석 하였다.

외부 및 내부칼슘 의존성 측정

외부 칼슘 유입에 의한 혈관 수축을 보기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다. 혈관에 용매 혹은 CC4를 30분 전 처리 한 다음 organ bath 상에서 60mM KCL용액 (NaCl 105 mM, KCl 60 mM, KH_2PO_4 1.2 mM, $MgSO_4$ 1.2 mM, $CaCl_2$ 2.5 mM, $NaHCO_3$ 25.0 mM, disodium.Ca^{2+}-EDTA 0.026 mM, glucose 11.1 mM, pH 7.4)을 이용하여 Voltage-Operated Calcium Channel (VOCC)를 활성화 시켜 수축을 유도 하였다. 또한, Store-Operated Calcium Channel (SOCC)를 통한 외부 칼슘 유입에 의한 혈관 수축 반응 효과를 알아보기 위해, Ca^{2+}-free KR 완충액 조건에서 혈관에 1 μM thapsigargin (sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase 저해제)을 1 hr 전 처리하여 SR 내부 칼슘을 고갈시켰다. 그 후 혈관에 용매나 CC4를 30분 처리 후, 용매 혹은 CC4, 2.5 mM Ca^{2+}이 포함된 KR 완충액으로 교체하여 SOCC에 의한 혈관 수축을 유도하였다.

내부 칼슘 동원에 의한 혈관 수축 반응에서의 효과를 검토하기 위해, 혈관의 수축력 측정과 동일한 방법으로 진행하였다. 혈관에 용매 혹은 CC4를 30분 전 처리하고 마찬가지로 용매 혹은 CC4가

포함된 Ca^{2+}-free KR 완충액 (NaCl 120 mM, KCl 5.9 mM, NaH_2PO_4 1.2 mM, $MgCl_2$ 1.2 mM, $NaHCO_3$ 25.0 mM, EGTA 2 mM, glucose 11.5 mM, pH 7.4)으로 교환하여 5분 동안 안정화 시킨 뒤 Serotonin 10^{-4} M으로 유발된 수축을 관찰하였다.

통계처리

실험결과는 3회 이상 실험한 후, 값을 mean ± SEM으로 표시하였다. 두 군 사이의 차이는 t-test로서 검증하였으며, 세 군 이상의 비교에서는 one-way ANOVA test를 수행한 후 Duncan's multiple range test를 실시하여 유의성을 검증하였다. 모든 경우에서 p value가 0.05 이하인 경우에서 유의적인 차이가 있다고 판정하였다.

실 험 결 과

우선 각각의 Curcuminoid가 혈관 수축에 미치는 영향을 organ bath system에서 관찰 하였다. 대조군에는 용매인 DMSO를, 투여군에는 각각의 Curcuminoid를 25 μM씩 30 분간 혈관에 전 처리 한 후 혈관 수축 물질인 Phenylephrine (PE) 및 Serotonin을 점증적으로 가하여 혈관 수축의 변화를 관찰하였다 (Fig. 1). 그 결과 CC4가 가장 큰 혈관 수축 억제 효과가 있음을 확인하였다.

다음으로 CC4의 효과의 농도 의존성을 확인하기 위해 5, 10, 25 μM씩 30 분간 혈관에 전 처리 한 후 혈관 수축 물질인 PE 및 Serotonin을 점증적으로 가하여 혈관 수축의 변화를 관찰하였다 (Fig. 2A, 2B). 그 결과 CC4가 농도 의존적으로 agonist에 의한 혈관 수축을 억제하는 것을 확인 할 수 있었다.

이런 CC4의 효과가 혈관 기능 이상에 의한 비가역적인 손상 및 비 특이적 세포 독성인지 아니면 약리학 적으로 적용 가능한 작용인지 확인하기 위해 CC4의 효과의 가역성 (Fig. 3)과 lactatedehydrogenase (LDH) leakage (Fig. 4)를 확인 하였다. 우선 CC4의 효과의 가역성을 확인하기 위해 일단 CC4 25 μM을 전 처리 한 혈관에서 Serotonin에 의한 수축이 억제 되는 효과를 확인 한 후, KR buffer로 wash out 후 4시간 뒤에 다시 Serotonin을 가하여 수축력의 가역성을 확인 한 결과 CC4를 처리 했던 혈관의 수축력이 대조군 수준으로 회복 되는 것을 확인 할 수 있었다 (Fig .3). 그 다음 CC4의 비 특이적 세포 독성을 확인하기 위해 LDH assay를 수행 한 결과 농도별로 CC4를 처리한 혈관에서 LDH의 유리를 확인 할 수 없었다 (Fig .4). 따라서 CC4의 혈관 수축 억제 효과는 비가역적 손상 및

비 특이적 세포 독성이 아님을 확인 할 수 있었다.

CC4의 혈관 수축 억제 효과가 내피세포에 작용하는 효과인지 평활근 세포에 작용하는 효과인지 확인하기 위해 혈관 내피세포를 제거하고 CC4를 30 min간 혈관에 전 처리 한 후 Serotonin을 점증적으로 가하여 혈관 수축의 변화를 관찰하였다 (Fig. 5). 그 결과 내피가 제거된 혈관에서도 CC4의 혈관 수축 억제를 확인 할 수 있었다. 따라서 CC4의 혈관 수축 억제 효과는 평활근에 직접 작용하여 일어나는 효과임을 알 수 있었다. 따라서 이후의 실험은 모두 내피를 제거한 혈관에서 진행 하였다.

Serotonin과 같은 agonist는 혈관 평활근 세포의 receptor에 binding 하게 되면 평활근 세포내의 칼슘 농도를 증가 시키고 이 칼슘은 Calmodulin과 결합하여 MLCK라는 효소를 활성화 시키게 된다. 활성화된 MLCK는 MLC을 phosphorylation 시키고 phosphorylation 된 MLC는 actin과 binding 하여 혈관 수축을 일으키게 된다. 따라서 칼슘은 평활근 수축에 있어 매우 중요한 요소이다. 따라서 CC4가 평활근 세포내의 칼슘 level에 미치는 영향을 관찰하기 위해 Primary cultured rat aortic smooth muscle cell에서 Fura-2am을 이용하여 CC4가 Serotonin에 의한 칼슘증가에 미치는 영향을 관찰 하였다 (Fig. 6A, 6B). 실험 결과 CC4가 농도 의존적으로 Serotonin에 의한 혈관 평활근 세포내의 칼슘증가를 억제하는 것으로 밝혀졌다.

평활근 세포 내의 칼슘 증가는 주로 외부 칼슘 유입과 내부 칼슘 유리에 의해 일어난다. 평활근 세포 외부에서 유입되는 칼슘은 Voltage-operated Calcium Channel (VOCC) 중에 하나인 L-type calcium channel 및 Sarcoplasmic Reticulum (SR)의 칼슘 고갈에 의해 열리는 Store-operated Calcium Channel (SOCC)을 통해 유입되고 내부 칼슘 유리는 Serotonin receptor의 활성화에 따른 일련의 신호 과정에 의해 생기는 SR의 calcium channel이 열리면서 유리가 된다. 먼저 외부로부터 유입되는 칼슘에 의한 수축에 CC4가 미치는 영향을 관찰하기 위해 CC4를 전 처리

한 후 60mM KCL을 이용하여 평활근 세포를 depolarization 시켜서 VOCC를 열어 혈관 수축을 유발 한 후 그 변화를 확인하였고 (Fig. 7A), 이와 함께 thapsigargin으로 SR 내의 칼슘을 강제로 고갈시킨 후 외부에서 칼슘을 공급하여 SOCC를 열어 혈관 수축을 유발 한 후 그 변화를 확인 하였다 (Fig. 7B). 마지막으로 외부의 칼슘을 배제한 Ca^{2+} free KR buffer를 도입하여 SR에서의 칼슘 유리에 의한 혈관 수축에 CC4가 미치는 영향을 확인 하였다 (Fig. 7C). 그 결과 CC4는 비 특이적으로 모든 평활근 세포 내 칼슘 증가 경로에 의한 수축을 억제하는 것으로 밝혀졌다.

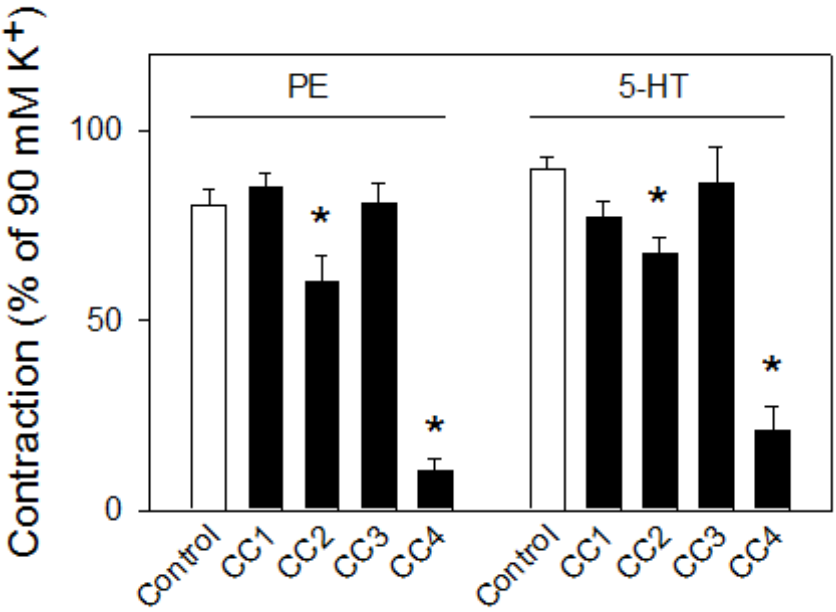

Fig 1. Effect of contraction inhibition by Curcuminoids in rat aortic rings

After pre-treatment each Curcuminoids 25 μM was treated to aortic rings with endothelium for 30 min and investigated Phenylephrine (PE) and Serotonin-induced contraction. Values are mean ± SEM of three to four independent experiments. * represent significant differences

from control ($p < 0.05$).

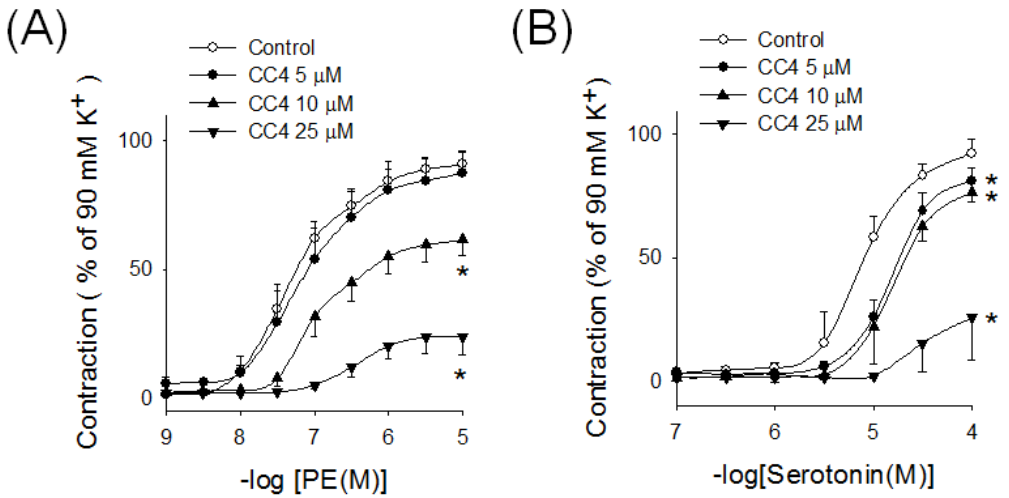

Fig 2. Effect of CC4 on Phenylephrine (PE) & Serotonin induced contraction in rat aortic rings

After CC4 was treated to aortic rings with endothelium for 30min, dose-dependent curve of (A) Phenylephrine and (B) Serotonin were obtained. Values are mean ± SEM of three to four independent experiments. * represent significant differences from control ($p < 0.05$).

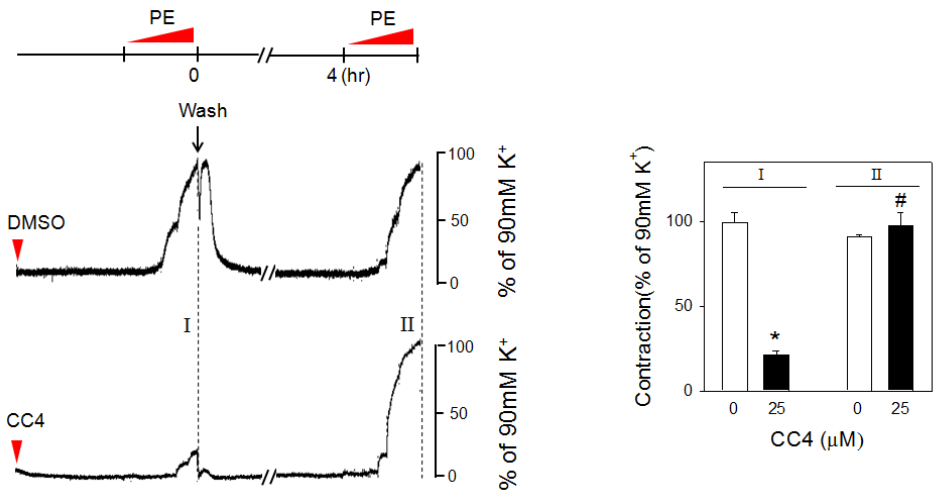

Fig 3. Washout effect of CC4 on Serotonin-induced contraction in rat aortic rings

After treatment of CC4 (25 μM, 30min), Reversible effect of CC4 on Serotonin-induced contraction was measured 4hr after rinsing out CC4-containing KR buffer in organ bath. Values are mean ± SEM of three independent experiments * represen significant different from control and # represent significant difference from CC4-treated group before washout ($p < 0.05$).

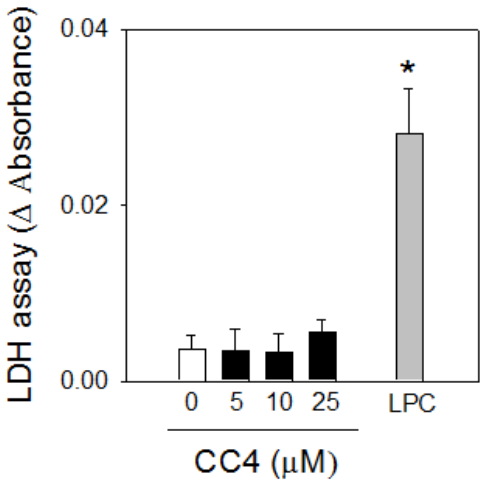

Fig 4. Nonspecific cytotoxicity of CC4

Nonspecific cyototoxicity of CC4 was investigated in aortic rings using Lactate dehydrogenase (LDH) assay. Lysophosphatidiylcholine (LPC 10^{-4}M) was treated as a positive control. Values are means ± SEM of three independent experiments. * represent significant difference from control group

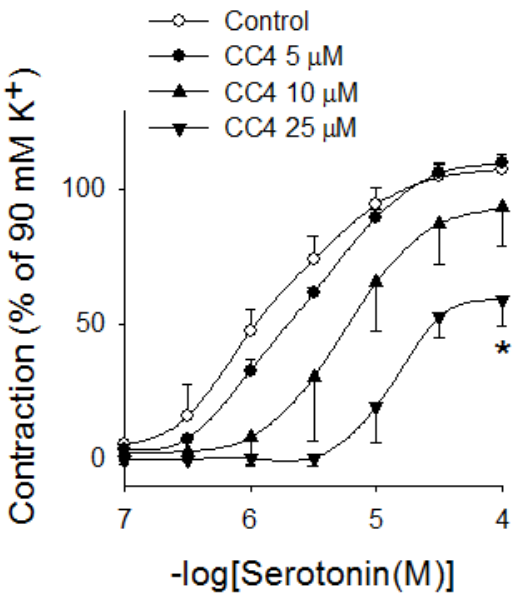

Fig 5. Effect of CC4 on Serotonin-induced contraction in aortic ring wihtout endothelium

After CC4 was treated to aortic rings without endothelium (denuded) for 30 min, dose-contraction curves of Serotonin were obtained. Values are means ± SEM of four indipendent experiments. * represent significant difference from control group

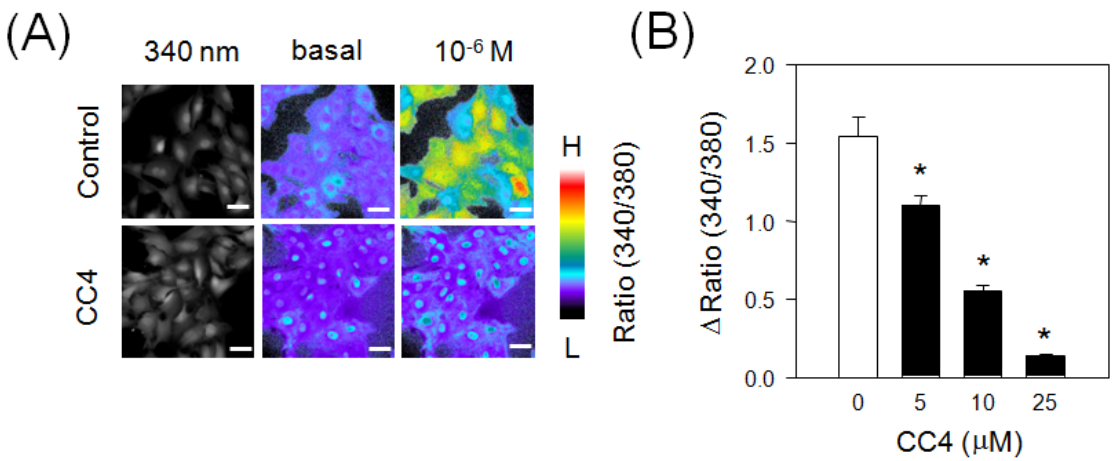

Fig 6. Effect of CC4 on Serotonin-induced intracellular calcium increase in primary rat smooth muscle cell

Dose dependent effect of CC4 on Serotonin-induced calcium increase was observed in primary rat smooth mucle cells, using fura-2 in fluorescence microscopy. (A) Representative images. (B) Calcium level is demonstrated by difference of fura-2 ratio (340/380). Values are mean ± SEM of thirty to thirty seven independent experiments. * represent significant differences from control ($p < 0.05$).

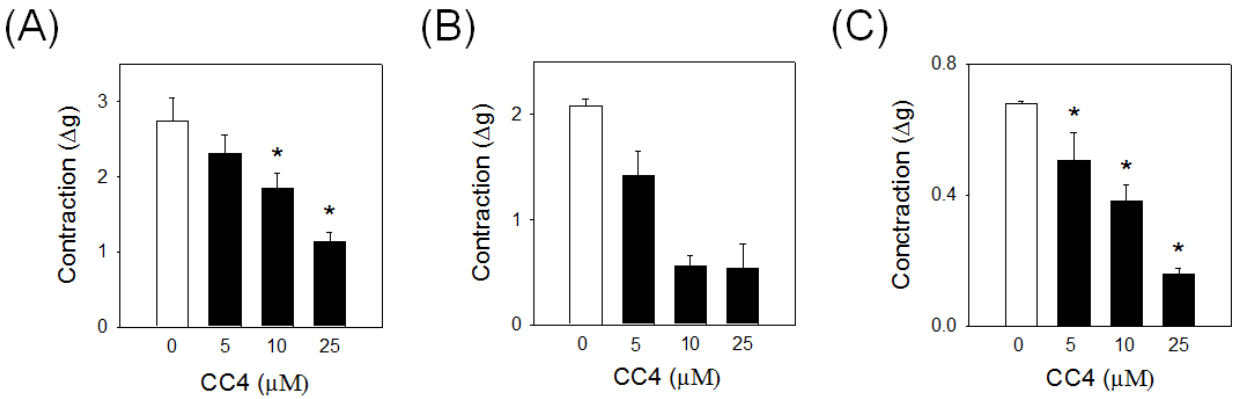

Fig 7. Effect of CC4 on extra/intracellular Calcium induced contraction in denuded aortic rings

After CC4 was treated to aortic rings without endothelium for 30 min, extracellular calcium influx, (A) voltage-operated calcium channel (VOCC) and (B) Store-operated calcium channel (SOCC)-mediated contraction were investigated. (C) Effect of CC4 on intracelluar calcium release induced contraction was invesitgated in Ca^{2+}-free buffer condition. Values are means ± SEM of two to three independent experiments. * represent significant difference from control group.

고 찰

본 연구에서는 (1) 각각의 Curcuminoid들이 혈관 수축에 미치는 영향을 비교 (2) CC4의 혈관 수축 억제 효과가 혈관 평활근을 통한 작용이라는 것 (3) 혈관 평활근 세포내의 칼슘증가를 억제함 (4) CC4의 세포 내 칼슘 증가 억제 효과는 Sarcoplasmic Reticulum (SR) calcium release, Voltage-Operated Calcium Channel (VOCC), Store-Operated Calcium Channel (SOCC) 모두를 억제하는 효과임을 밝혔다.

Ca^{2+}은 Calmodulin과 결합하여 MLCK라는 효소를 활성화 시키게 된다. 활성화된 MLCK는 MLC을 phosphorylation 시키고 phosphorylation 된 MLC는 actin과 binding 하여 혈관 수축을 일으키게 된다. 따라서 Ca^{2+}을 억제하는 것은 고혈압 치료에 있어 중요한 기전 중 하나로 여겨지고 있으며, 현재까지도 calcium channel blocker인 nifedipine, amlodipine 등은 고혈압치료제로 사용되고 있다 (Qiuping Gu et al, 2012). 본 연구에서 이용한 CC4 역시 혈관 평활근 내의 Ca^{2+} 증가를 억제하는 것으로 밝혀져 새로운 고혈압 치료제로서의 개발 가능성을 제시 하였다 (Fig. 6). 혈관 수축 시 Ca^{2+}은 biphasic하게 증가되는 것을 볼 수 있다. 우선 SR내에서의 Ca^{2+} 유리에 의해 일시적으로 Ca^{2+} 증가가 크게 보이고, 다음에 외부로 부터의 Ca^{2+} 유입에 의하여 앞선 농도보다는 낮게 유지가 된다. 이때 외부에서의 칼슘 유입은 주로 depolarization에 의해 활성화 되는 VOCC 그리고 SR 내의 Ca^{2+} 고갈에 의해 활성화 되는 SOCC 에 의해 일어난다고 알려져 있다 (Alan Gibson et al, 1998,

Kevin S et al, 2005). 따라서 본 연구는 이 세 가지 경로 중 어느 경로를 차단하여 CC4가 혈관 평활근 내의 Ca^{2+} 증가를 억제하는 지 알아보았고 그 결과 CC4가 모든 경로를 통한 Ca^{2+} 증가에 따른 혈관 수축을 억제하는 것으로 밝혀졌다 (Fig. 7). CC4와 같이 모든 Ca^{2+} 증가 경로를 억제하는 물질은 아직 밝혀지지 않았고, SR Ca^{2+} release, VOCC, SOCC를 공통적으로 활성화 시키는 기전 또한 밝혀진 바 가 없다. 하지만 CC4의 구조 및 다른 Curcuminoid의 효과를 바탕으로 복합적으로 생각해 보면 이런 비 특이적인 억제는 보일 수 있는 몇몇의 기전을 생각 해 볼 수 있다.

첫 번째로 CC4의 높은 지질 친화성이다. 같은 Curcuminoid 계열인 Curcumin 역시 Ca^{2+} release activated Ca^{2+} channel을 억제하는 동시에 inositol triphosphate (IP_3)에 의한 Ca^{2+} 유리를 억제하여 세포내 Ca^{2+}을 억제 한다는 보고가 있고 (Dong Hoon Shin et al, 2011, J. L. Dyer et al, 2002), 이로써 Curcumin 역시 CC4와 마찬가지로 혈관 평활근 세포내의 칼슘증가 경로를 비 특이적으로 억제한다고 볼 수 있다. 따라서 Curcumin의 선행 연구 보고에서 이 점을 언급하면서 지질 친화성이 높은 Curcumin이 plasma membrane에 녹아들어 이온 채널에 영향을 주든지, 혹은 이온채널의 화학적인 변화를 야기 한다고 추측하고 있다 (Dong Hoon Shin et al, 2011). CC4역시 지질 친화성이 높기 때문에 이런 작용으로 인한 비 선택인 칼슘 채널 억제를 야기 하는 것이 아닌가 생각이 된다. 두 번째는 phospholipase 억제 효과를 볼 수 있다. phospholipase는 평활근 수축에 있어서 매우 중요한 역할을 한다. 혈관 수축을 일으키는 PE, Serotonin, Endothelin 등 과 같은 agonist들의 receptor는 대부분

G-protein coupled receptor인 경우가 많은데 receptor에 agonist가 붙으면 phospholipase C가 활성화 되게 된다. 활성화 된 phospholipase C는 membrane lipid 중 하나인 phosphatidyl-inositol 4,5-bisphosphate를 분해하게 되고 분해 산물로 IP_3, Diacyl glycerol (DAG)를 만들어 내고 이 분해 산물들은 일련의 신호 과정을 거쳐 혈관 수축을 유발하게 된다 (R. Clinton Webb, 2003). 칼슘 채널 활성 면에서는 IP_3 는 SR의 IP_3 receptor에 붙어 SR Ca^{2+} release를 유발하여 SR 내의 Ca^{2+}을 고갈 시켜 SOCC의 활성을 유발 한다. (Tarik Smani et al, 2008). 그리고 DAG는 혈관에 존재하는 nonselective cation channel을 활성화 시킨다는 연구결과가 있으며, transient receptor potential cation channels (TRPC) 3, 6 ,7은 가장 잘 알려진 subtype이다. 이런 nonselective cation channel의 활성은 주로 Na^{+}의 유입을 일으켜 평활근 세포를 depolarization 시켜 VOCC를 활성화 시킨다 (Alexander Dietrich et al, 2006, Helliwell RM et al, 1997, Kevin S et al, 2005). 또한 Ca^{2+} independent Phopospholipase $A_2\beta$ ($iPLA_2\beta$) 는 intracellular Ca^{2+} store depletion 에 의해 활성화 되어 lysophospholipid를 생성 시켜 SOCC 활성화 및 plasma membrane의 Ca^{2+} influx를 매개 한다 (Tarik Smani et al, 2008). 즉 phophalipase는 SR Ca^{2+} release, VOCC, SOCC를 모두 활성화 시킬 수 있는 효소라고 할 수 있다. 그런제 CC4와 같은 Curcumionoid 계열인 Curcumin이 phopohlipase를 억제 한다는 보고가 있고 (Hisanori Yamamoto et al, 1997) 이를 근거로 CC4 역시 이런 작용을 가지고 있다고 생각 해 볼 수 있으며 이런 기전으로 모든 Ca^{2+} 증가 경로를 억제한다고 가정 할 수 있다. 하지만 Ca^{2+} independent

phospholipase A_2 inhibitor인 BEL이나 phospholipase C inhibitor인 NCDC에 의해 high potassium에 의한 depolarization이 일으키는 수축이 억제 되지 않는 다는 점은 이 가설로 CC4의 기전을 완벽히 설명 할 수는 없음을 제시 하고 있다 (Fig. 7, Toshio Nakaki, 1985, Zhenheng Guo, 2003). 세번째는 혈관 평활근 세포의 hyperpolarization 이다. CC4의 구조를 보면 양 끝쪽에 vanillyl group이 있다. 혈관 평활근 세포엔 이런 vanillyl group이 결합하는 vanilloid recepetor인 transient receptor potential vanilloid type 1-4 (TRPV1-4)가 존재한다고 알려져 있다 (Xiao-Ru Yang et al, 2006). 이들 중 TRPV 4는 혈관 평활근 세포의 hyperpolarization과 관계가 있다. 활성화 된 TRPV 4 에 의하여 유입된 Ca^{2+}은 SR에 있는 Ryanodine receptor를 활성화 시키고, 활성화 된 Ryanodine receptor에 의해 SR내의 Ca^{2+}이 release가 되어 그 주위의 Ca^{2+} 농도가 일시적으로 늘어나는 Ca^{2+} spark 현상이 일어나게 된다. Ca^{2+} spark는 Ca^{2+} activated K^+ channel (BK_{Ca} channel)을 활성화 시켜 평활근 세포을 hyperpolarization 시킨다 (Scott Earley et al, 2005). Hyperpolarization은 rabbit mesenteric artery에서 noradrenalin (NA)에 의한 IP_3 생성을 억제 하여 SR내에서의 Ca^{2+} release를 억제 한다 (Takeo Itoh et al, 1992). 또한 Hyperpolarization은 membrane potential에 영향을 받는 VOCC도 억제한다. 그러나 SOCC와 membrane potential과의 관계는 명확하지 않다. SOCC가 membrane potential에 영향을 받지 않는다는 연구도 있으며 (Markus Hoth et al, 1992), membrane potential이 SOCC에 의한 Ca^{2+} 유입의 driving force와 연관되어있다는 연구도 있어 membrane potential과 SOCC에 의한 Ca^{2+} 유입의 관계는 명확하지 않으나 hyperpolarization이 SOCC에 의한 Ca^{2+}

유입에 결정적 영향을 미치지는 않는 것 같다 (Rong Ma et al, 2000). 따라서 CC4가 TRPV 4를 통하여 hyperpolarization을 일으켜 SR calcium release, VOCC, SOCC 모두 억제한다는 가설 역시 CC4의 기전을 설명 하기에는 완벽하지 않다.

CC4가 어떤 기전으로 인하여 비 특이적인 억제를 보이는 지에 대사해서는 확실히 알 수가 없다. 하지만 본 연구에서는 CC4가 VOCC, SOCC, SR Ca^{2+} release에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 각각의 경로를 활성화 시킨 뒤 혈관 평활근 세포내의 Ca^{2+} level을 본 것이 아니라 혈관 평활근의 수축을 본 것이므로 엄밀히 말하자면 CC4가 각각의 경로를 통한 Ca^{2+} level 증가를 억제한다고 말할 수는 없다. 혈관 평활근의 수축은 Ca^{2+} 의존적인 경로와 Ca^{2+} 비의존적인 경로로 나뉘고 CC4가 Ca^{2+} 비의존적인 경로를 함께 억제 한다고 한다면 VOCC, SOCC, SR Ca^{2+} release에 의한 Ca^{2+} level 증가 중 일부만 억제한다고 해도 본 실험의 결과처럼 나올 수 있기 때문이다 (Fig. 7). 따라서 CC4의 기전을 명확히 확인하기 위해서는 이들 각각의 경로를 활성화 시킨 뒤 Ca^{2+} level을 확인 하는 후속 연구가 필요할 것이다.

참 고 문 헌

Alan Gibson, Ian McFadzean, Pat Wallace and Christopher P. Wayman. 1998. Capacitative Ca2+ entry and the regulation of smooth muscle tone. *Trends Pharmacol Sci*. 19(7):266-269

Alexander Dietrich, Vladimir Chubanov, Hermann Kalwa, Benjamin R. Rost, Thomas Gudermann. 2006. Cation channels of the transient receptor potential superfamily: Their role in physiological an pathophysiological processes of smooth muscle cells. *Pharmacology & Therapeutics*. 112:744-760

Aram V. Chobanian, George L. Bakris, Henry R. Black, William C. Cushman Lee A. Green, Joseph L. Izzo, Jr, Daniel W. Jones, Barry J. Materson, Suzanne Oparil, Jackson T. Wright, Edward J. Roccella and the National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. 2003. Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension*. 42:1206-1252

Dong Hoon Shin, Eun Yeong Seo, Bo Pang, Joo Hyun Nam, Hyang Sun Kim, Woo Kyung Kim, Sung Joon Kim. 2011. Inhibition of Ca^{2+}-Release-Activated Ca^{2+} Channel (CRAC) and K+ Channels by Curcumin in Jurkat-T Cells. *J Pharmacol Sci* 115:144-154

Helliwell RM, Large WA. 1997. Alpha 1-adrenoceptor activation of a nonselective cation cuurent in rabbit portal vein by 1,2-diacyl-sn-glycerol. *J Physiol.* 499: 417-428

Hideji Itokawa, Qian Shi, Toshiyuki Akiyama, Susan L Morris-Natschke and Kuo-Hsiung Lee. 2008. Recent advances in the investigation of curcuminoids. *Chin Med.* 3:11

Hisanori Yamamoto, Kentaro Hanada, Kiyishi Kawasaki, Masahiro Nishijima. 1997. Inhibitory effect of curcumin on mammalian phospholipase D activity. *FEBS Letters.* 417:196-198

Horowitz A, Menice CB, Laporte R, Morgan KG. 1996 Mechanism of smooth muscle contraction. *Physiol Rev.* 76(4):967-1003

J. L. Dyer, S. Zafar Khan, J. G. Bilmen, S. R. Hawtin, M. Wheatley, M.-ul-H. Javed, F. Michelangeli. 2002. Curcumin: a new cell-permeant inhibitor of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Cell Calcium.* 31(1): 45-52

Js Cohen. 2001. Adverse Drug Effects, Compliance, and Initial Doses of Antihypertensive Drugs Recommended by the Joint National Committee vs the Physicias' Desk Reference. *Arch Intern Med.* 161:880-885

Kevin S, Thorneloe, Mark T. Nelsom. 2005. Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility. *Can J Physiol Pharmacol.* 83:215-242

Kiuchi F, Goto Y, Sugimoto N, Akao N, Kondo K, Tsuda Y. 1993. Nematocidal activity of turmeric: synergistic action of curcuminoids. *Chem Pharm Bull(Tokyo).* 41(9):1640-1643.

Markus Hoth, Reinhold Penner. 1992. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature.* 355(6358):353-356

Ming-Jyh Sheu, Hui-Yi Lin, Yi-Hsuan Yang, Chia-Ju Chou, Yi-Chung Chien, Tian-Shung Wu, Chieh-Hsi Wu. 2013. Demethoxycurcumin, a major active curcuminoid from Curcuma longa, suppresses balloon injury induced vascular smooth muscle cell migration and neointima formation: An in vitro and in vivo study. *Mol Nutr Food Res.* 57:1586-1597

Pei-Han Xu, Yuan Long, Fang Dai, Zhong-Li Liu. 2007. The relaxant effect of curcumin on porcine coronary arterial

ring segments. *Vascular Pharmacology.* 47:25-30

Qiuping Gu, Vicki L. Burt, Charles F. Dillon and Sarah Yoon. 2012. Trends in Antihypertensive Medication Use and Blood Pressure Control Among United States Adults With Hypertension: The National Health and Nutrition Examination Survey, 2001 to 2010. *Circulation.* 126:2105-2114

Rahman I, Biswas SK, Kirkham PA. 2006. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Bioche Pharmacol.* 30:72(11):1439-1452.

R. Clinton Webb. 2003. SMOOTH MUSCLE CONTRACTION AND RELAXATION. *ADV PHYSIOL EDUC.* 27:201-206

Rong Ma, Somja Smith, Angie Child, Pamela K. Carmines, Steven C. Sansom. 2000. Store-opertated Ca^{2+} channels in human glomerular mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 278(6):F954-961

Scott Earley, Thomas J. Heppner, Mark T. Nelsom and Joseph E. Brayden. 2005. TRPV4 Forms a Novel Ca2+ signaling Complex With Ryanodine Receptors and BKCa Channels. *Cir Res.* 97:1270-1279

Tabassum N, Ahmad F. 2011. Role of nature herbs in the treatment of hypertension. *Pharmacogn. Rev.* 5(9):30-40

Takeo Itoh, Narihito Seki, Satoshi Suzuki, Shinichi Ito, Junko Kajikuri and Hirosi Kuriyama. 1992. MEMBRANE HYPERPOLARIZATION INHIBITS AGONIST -INDUCED SYNTHESIS OF INOSITOL 1,4,5 -TRISPHOSPHATE IN RABBIT MESENTERIC ATRTERY. *Journal of Physiology.* 451:307-328

Tarik Smani, Tima Patel, Victoria M. Bolotina. 2008. Complex regulation of store-operated Ca2+ entry pathway by PKC-ε in vascular SMCs. *Am J Phsiol Cell Physiol. 294(6)*:C1499-1508

Toshio Nakaki, Bryan L Roth, De-Maw Chuang, Erminio Costa. 1985. Phasic and tonic components in 5-HT_2 receptor -mediated rat aorta contraction: participation of Ca^{++} channels and phospholipase C. *J Pharmacol Exp Ther.* 234(2):442-446

Xiaoping Yang, D. Paul Thomas, Xiaochun Zhang, Bruce W. Culver, Brenda M. Alexander, William J. Murdoch, Mysore N.A. Rao, David A. Tulis, Jun Ren, Nair Sreejayan. 2005. Curcumin Inhibits Platelet-Derived Growth Factor-Stimulated Vascular Smooth Muscle Cell Function and Injury-Induced Neointima Formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26:85-90

Xiao-Ru Yang, Mo-Jun Lin, Lionel S. Mclntosh, James S. K. Sham. 2006. Functional expression of transient receptor potential melastatin- and vanilloid-related channels in pulmonary aterial and aortic smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 290(6):L1267-1276

Yinan Hua, Julia Dolence, Shalini Ramanan, Jun Ren, Sreejayan Nair. 2013. Bisdemethoxycurcumin inhibits PDGF -induced vascular smooth muscle cell motility and proliferaion. *Mol Nutr Food Res.* 57:1611-1618

Yu Ym, Lin HC. 2010. Curcumin prevents human aortic smooth muscle cells migration by inhibiting of MMP-9 expression. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 20:125-132

Zhenheng Guo, Wen Su, Zhongmin Ma, George M, Smith and Ming C. Gong. 2003. Ca2+-independent phospholipase A2 is required for agonist-induced Ca2+ sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *J. Bio. Chem.* 278:1856-1863

Abstract

Background & Purpose: Hypertension is a major modifiable risk factor for heart disease, stroke, end-stage renal failure and peripheral vascular disease. A number of synthetic medicines are used to treat hypertension. But a lot of patients discontinue anti-hypertensive drugs because of side effect. In the last three decades, a lot of concerted efforts have been channeled into researching the herbal medicine with anti-hypertensive therapeutic values. Curcuminoids are colored polyphenol compounds derived from Curcuma longa Linn, also known as turmeric. There are four Curcuminoids, CC1, CC2, CC3, CC4. Based on lots of study, we conclude Curcuminoids have possibility to be new anti-hypertensive agent. In this study, we investigate the effect of each curcuminoid on agonist-induced vascular contraction and its mechanism

Result: CC4 shows more potent inhibitory effect than any other Curcuminoids. CC4 inhibits phenylephrine (PE) & Serotonin induced vascular contraction in a dose dependent manner. This effect is not caused by nonspecific toxicity or irreversible vascular damage. Also, This inhibitory effect is observed in aortic rings without endothelium, suggesting that the site of effect of CC4 is vascular smooth muscle. The calcium level in vascular smooth muscle cell is key factor in vascular smooth muscle contraction. CC4 inhibits

increasing of intracellular calcium level by Serotonin. Calcium level in vasuclar smooth muscle cell increases, owing to the relelase of calcium from sarcoplasmic reticulum (SR) and calcium entry through voltaged-operated calcium channel (VOCC) and store-operated calcium channel (SOCC). CC4 nonspecifically inhibits all contraction by activating SR calcium release, VOCC and SOCC.

Conclusion: CC4 inhibits vascular contracion by decreasing calcium level in vascular smooth muscle. This effect results from nospecifically inhibiting SR caclium release, VOCC and SOCC

Key words: Curcuminoid, Inhibiton of vascular contration, Calcium, SR-calcium release, VOCC, SOCC

Student number: 2012-21574