

Quercetin에 의한 혈관이완효과에 대한 알코올의 추가적인 역할

진영배 · 제현동[#]

대구가톨릭대학교 약학대학 약물학 교실

(Received July 23, 2010; Revised September 29, 2010; Accepted September 29, 2010)

The Synergistic Effect of Additional Ethanol Exposure on Quercetin-induced Vasorelaxation in a Vasoconstrictor-dependent Manner

Youngbae Jin and Hyun Dong Je[#]

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

Abstract — The aim of present study was to investigate the possible influence and related mechanism of additional alcohol on the flavonoid- induced arterial relaxation. Agonist-induced vascular smooth muscle contractions involve the activation of thick or thin filament pathway. However, there are no reports addressing the question whether this pathway is involved in quercetin-induced relaxation cotreated with alcohol in rat aortae contracted with phorbol ester, fluoride or thromboxane A₂ mimetic U-46619. We hypothesized that cotreated alcohol plays a role in vascular relaxation evoked by quercetin in rat aortae. Endothelium-denuded arterial rings from male Sprague-Dawley rats were used and isometric contractions were recorded using a computerized data acquisition system. Quercetin inhibited phorbol ester, fluoride or thromboxane A₂-induced contraction regardless of endothelial function. However, alcohol didn't decrease any agonist-induced contraction. Interestingly, only in thromboxane A₂-induced contraction, synergistic results were observed in aortae denuded and cotreated with quercetin and alcohol suggesting that additional pathways different from antioxidation or endothelial nitric oxide synthesis might be involved in the vasorelaxation. In conclusion, in the agonists-contracted rat aortae, quercetin and alcohol together showed synergistic response regardless of endothelial function in an agonist-dependent manner.

Keywords □ alcohol, fluoride, phorbol ester, quercetin, Rho-kinase, thromboxane A₂ mimetic, vasoconstriction

고혈압에 영향을 주는 요인으로 나이, 경제적 수준, 비만, 식습관, 신체 활동, 흡연, 음주, 스트레스, 가족력 등이 있다고 생각된다.¹⁾ 특히 음주의 경우 적정량의 알코올을 섭취하면 심혈관 질환의 위험을 감소시키는 것으로 보고되고 있고^{2,3)} 과량 또는 만성 섭취의 경우 그 위험성이 증가되는 것으로 생각된다.⁴⁾ 그런데 이것은 주로 내피세포에 의한 산화 질소 유리와 관련이 있는 것으로 보고되었는데 저용량의 알코올은 내피세포에 의한 산화 질소 유리를 증가시켰고 고용량 알코올이나 만성 섭취는 내피 기능을 손상시켜 산화 질소의 유용성을 감소시켜⁵⁾ 작용하는 것으로 생각된다.

폴리페놀화합물인 플라보노이드는 식물의 뿌리, 줄기, 열매 등에 함유되어 있으며, 플라보노이드의 항암, 항염증, 항바이러스,

항알러지 등의 생리활성이 보고되었다.⁶⁾ 역학적 및 실험적 연구 결과를 종합할 때 이런 플라보노이드들은 심혈관계 질환, 뇌졸중 등에 관련이 깊고 이들 질병을 예방하고 발생을 억제하는 것으로 알려져 많은 제품들이 시판되고 있는 실정이다. 그 중 quercetin은 양파, 사과, 딸기, 포도주, 기타 식물속에 널리 존재하는 플라보노이드로서 건강상 유용성과 생리활성 때문에 많은 관심이 집중되고 있다(Fig. 1).⁷⁾ 관련 연구 결과 quercetin은 내피 기능을 활성화시키거나 항산화 효과로 혈관 이완을 초래하는 것으로 알려져 있다. 또한 알코올은 매우 오래된 식품이지만 항정신성 약품이면서 독성 물질이다. 즉 알코올 과량 섭취 또는 만성 중독의 경우 고혈압, 동맥경화 등 심혈관계 질환을 초래하는 것으로 알려져 있다. 그런데 저농도 알코올의 혈관 이완 효과의 경우 내피에 의한 산화 질소 생성⁵⁾이외에 알려진 바가 없고 quercetin과 ethanol의 상호작용에 의해 나타나는 혈관효과에 대해서도 알려진 바가 거의 없다.

효능약이나 증가된 혈관내압에 대한 혈관평활근 수축은 갈습

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 053-850-3615 (팩스) 053-850-3602
(E-mail) hyundong@cu.ac.kr

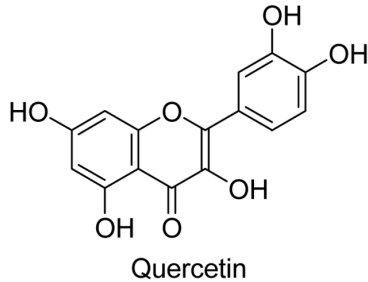


Fig. 1 – Chemical structure of quercetin.

과 칼모듈린에 의한 마이오신의 조절성 경사슬의 인산화를 포함하는 고전적인 평활근의 생화학적 경로에 주로 의존한다. 이들 경로의 존재는 분리된 혈관 평활근에서 세포내 칼슘에 대한 형광 측정과 전기영동적 평가로 직접적으로 확인되었다. 혈관 평활근 수축의 개시가 마이오신의 20 kDa 경사슬 인산화의 칼슘의 존적 증가에 의해 전적으로 조절된다고 생각되었지만⁸⁾ 다른 경로들도 세포내 칼슘이온의 증가와 상관없이 마이오신의 20 kDa 경사슬 인산화를 조절하여 평활근 수축성을 조절한다고 생각된다.⁹⁻¹¹⁾ 마이오신 경사슬 인산화는 악틴과 마이오신의 상호작용과 평활근 수축을 촉진한다. 그런데 마이오신 경사슬 인산화나 수축의 정도는 세포내 칼슘이온농도와 언제나 평행하지는 않다. 효능약 자극에 의한 마이오신 경사슬 인산화나 수축력의 정도는 대개 세포내 칼슘이온 농도상 증가에 의한 것보다 더 높고, 이 현상은 소위 칼슘이온 감각이라고 설명된다.¹²⁾ 따라서 마이오신 경사슬 인산화수준과 수축정도를 조절하는 추가조절기전이 제안되었다. 즉 Rho GEFs(guanine nucleotide- exchange factors), Rho A, Rho-kinase 등에 의한 마이오신 탈인산화효소의 억제가 칼슘이온 감각에서 주요한 경로라는 것이 뒤이은 연구들에서 밝혀졌다.¹³⁻¹⁶⁾

Thromboxane A₂는 thromboxane A₂ synthase에 의한 prostaglandin H₂ 이성질체화를 통해 주로 혈소판에서 생성되는 arachidonic acid의 불안정한 대사산물이다. Thromboxane A₂는 평활근 수축과 증식, 혈소판 모양 변화와 응집 등을 유도한다. 그것의 작용은 G단백결합 수용체인 thromboxane A₂ 수용체를 통해 매개되며 thromboxane A₂수용체에 thromboxane A₂가 결합되면 G_{q/11}을 통해 phospholipase Cβ가 활성화되어 세포질내 유리 칼슘이온 농도가 증가되고 칼슘이온 감각이 일어난다. 그런데 thromboxane A₂ 자체가 불안정하기에 안정한 thromboxane A₂ 유사체인 U-46619가 흔히 사용된다. 다양한 평활근에서 thromboxane A₂ 유사체인 U-46619는 수축을 유도하고 이것은 세포내 칼슘이온 동원과 칼슘이온 감수성 증진에 기인된다. 이번 실험에서 세포내 신호전달에 대한 thromboxane A₂의 다양한 효과 때문에 flavonoids에 의한 평활근 이완에 관련된 신호전달 경로를 조사하기 위한 유용한 도구로 thromboxane A₂를 사용하

였다. Thromboxane A₂에 의한 수축에 RhoA/Rho-kinase 경로 활성화가 포함된다.¹⁷⁾ 또한 유사한 기전으로 fluoride도 있으며 이와 대조적으로 주로 thin filament 조절을 통해 작용하는 phorbol ester도 사용되었다. 그러나 quercetin 단독 또는 quercetin과 ethanol 병용에 의한 혈관 평활근 이완에서 이러한 경로가 억제되는지에 대한 문헌상 보고는 없었다. 따라서 이번 실험의 목적은 플라보노이드 quercetin 단독 또는 저농도 알코올을 함께 사용하여 flavonoids 또는 알코올에 의한 대동맥 혈관 조절 관찰과 이에 대한 항산화 또는 내피에 의한 산화 질소 생성 외에 칼슘이온 탈감작에 대한 MEK 또는 RhoA/Rho-kinase 활성 억제의 역할을 설명하는 것이다.

실험방법

재료, 시약 및 기기

다음과 같은 약품이 사용되었다. Potassium chloride(Sigma, St. Louis, MO, USA), U-46619(Sigma), sodium bicarbonate(Sigma), pentobarbital sodium(Dongwon, Korea), sodium fluoride(Sigma), phorbol 12,13-dibutyrate(Sigma), acetylcholine(Sigma), quercetin(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 US National Institute of Health(NIH, 1996)에 의해 출판된 실험동물의 care와 use에 대한 guide에 따라서 수행되었다. 무게 250~350 g의 성숙한 웅성 Sprague-Dawley 쥐가 실험에 사용되었다. 실험동물은 분리된 상자에 개별적으로 수용되었고 1주일 이상 사료와 물이 충분히 공급되었다. 실험 당일 pentobarbital sodium(50 mg/kg)을 복강으로 투여하여 마취시키고 고정시켰다.

대동맥 적출

중부 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 담겨졌다. 대동맥내 혈액과 각종 결체조직은 제거되었다. 대동맥은 4 mm 길이의 고리로 잘려졌다.

기계적 활성 측정

대동맥의 고리 조각은 2개의 금속 갈고리로 수조내 현수되었다.

아래쪽 갈고리는 수조바닥에 고정되었고 위쪽 갈고리는 등장력 변환기에 연결되었다. 등장력 변환기의 신호는 physiograph에 표시되었다. 수조의 부피는 20 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 g으로 조절되었다. 평형기간 후 대동맥 고리는 50 mM KCl로 자극되었고 근육이 충분히 수축할 경우 실험이 시작되었다. 용량-반응 곡선을 얻기 위해 혈관수축제들이 수조내로 투여되었다. 결과는 50 mM KCl에 의한 대조수축의 %로 표시되었다.

통계 분석

모든 실험결과들은 평균±표준오차로 나타내었고 통계 처리는 Student's t-test를 실시하여 p<0.05를 기준으로 유의성 여부를 판정하였다.

실험결과

내피가 제거된 쥐 대동맥에서 thromboxane A₂에 의한 수축에 대한 quercetin 단독 또는 quercetin과 ethanol 병용의 이완효과

분리된 쥐 대동맥의 휴지기 장력은 공기를 통한 Krebs 용액 관류 60분 후 안정 상태에 도달하였고 휴지기 장력은 2.0 g으로 조절하였다. 물리적으로 내피가 제거된 쥐 대동맥에서 thromboxane A₂에 의한 수축에 대한 quercetin의 효과를 조사하였다. 금속 봉을 쥐 대동맥 고리 안에 넣고 3~5회 돌려 내피를 제거하였다. 50 mM KCl에 의한 수축에 대한 1 μM acetylcholine의 이완이 20% 이하일 경우 내피가 제거되었다고 판단하였다. 내피가 제거된 쥐 대동맥에서 플라보노이드 단독 또는 알코올 병용 투여의 기저 수축에 대한 효과는 없었고(data not shown) thromboxane A₂(10⁻⁷ M)에 의한 수축에 대해 quercetin(0.1 mM) 단독은 유의성 있는 이완 효과가 있었지만 알코올 단독(3% ethanol)은 유의성 있는 이완효과가 없었다(Fig. 2, Fig. 3). 그런데 quercetin과

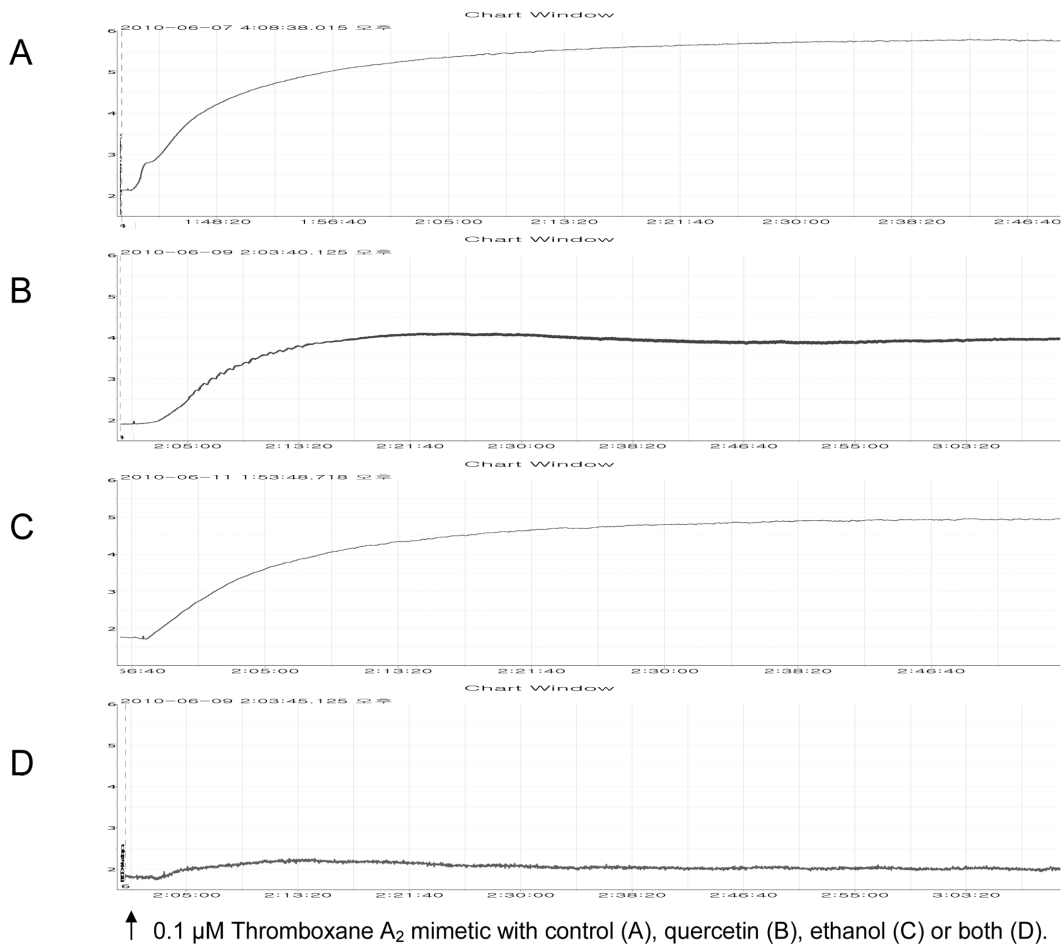


Fig. 2 – A representative tracing of vasorelaxation induced by pretreated quercetin or alcohol in rat aortic rings with endothelium denuded contracted with 0.1 μM U46619. Each muscle was pretreated with control (A), quercetin (B), ethanol (C) or both quercetin and ethanol (D).

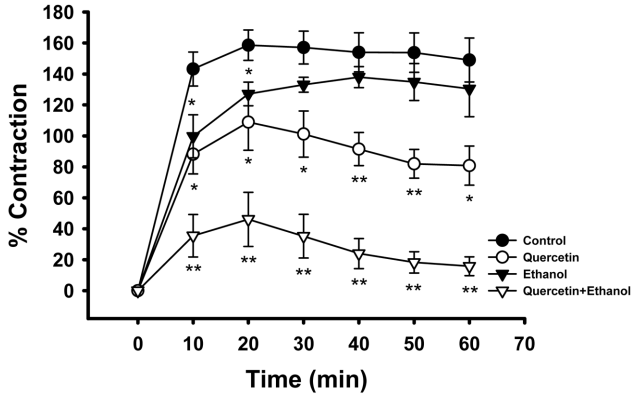


Fig. 3 – The effect of pretreated quercetin or ethanol on 0.1 μM U46619- induced vascular contraction in the absence of endothelium. Developed tension is expressed as a percentage of the maximum contraction to 50 mM KCl. Data are expressed as means of 3-5 experiments with vertical bars showing SEM. **P*<0.05, ***P*<0.01, presence versus absence of quercetin or alcohol.

알코올 병용은 완전한 이완효과를 보였다. 따라서 quercetin과 알코올의 이완기전은 다르며 quercetin 단독 또는 알코올 병용 투여에 의한 이완기전은 비항산화성 및 내피 비의존성이며 endothelial nitric oxide synthase, cyclooxygenase product prostacyclin, endothelium-derived hyperpolarising factor 등이 관여하지 않는다고 생각된다.

내피가 제거된 쥐 대동맥에서 fluoride에 의한 수축에 대한 quercetin 단독 또는 quercetin과 ethanol 병용의 이완효과

물리적으로 내피가 제거된 쥐 대동맥에서 플라보노이드 단독

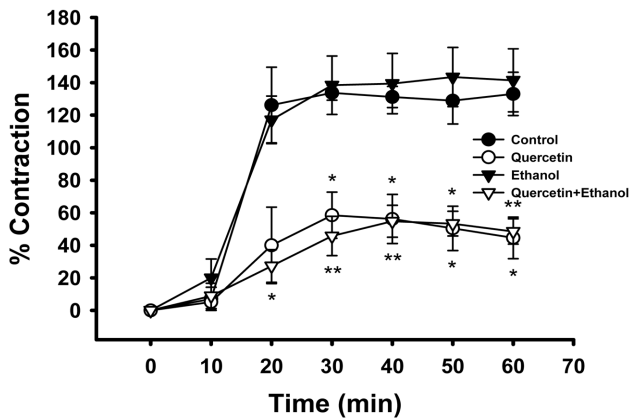


Fig. 4 – The effect of pretreated quercetin or ethanol on 8 mM fluoride- induced vascular contraction in the absence of endothelium. Developed tension is expressed as a percentage of the maximum contraction to 50 mM KCl. Data are expressed as means of 3-5 experiments with vertical bars showing SEM. **P*<0.05, ***P*<0.01, presence versus absence of quercetin or alcohol.

또는 알코올 병용 투여의 기저 수축에 대한 효과는 없었고(data not shown) fluoride(8 mM)에 의한 수축에 대해 quercetin 단독은 유의성 있는 이완효과를 보였고 알코올 단독은 효과가 없었다(Fig. 4). 그런데 quercetin과 알코올 병용은 quercetin 단독과 유사한 효과를 보였다(Fig. 4). 따라서 알코올은 Rho-kinase 활성화에 대한 억제 효과가 전혀 없는 것으로 생각된다. 또한 quercetin 단독 또는 알코올 병용 투여에 의한 이완기전은 비항산화 및 내피 비의존성이며 endothelial nitric oxide synthase, cyclooxygenase product prostacyclin, endothelium-derived hyperpolarising factor 등이 관여하지 않는다고 생각된다.

내피가 제거된 쥐 대동맥에서 phorbol ester에 의한 수축에 대한 quercetin 단독 또는 quercetin과 ethanol 병용의 이완효과

Phorbol ester의 경우 주로 thin filament regulation를 활성화시켜 혈관 평활근을 수축시킨다고 알려져 있다. 물리적으로 내피가 제거된 쥐 대동맥에서 플라보노이드 단독 또는 알코올 병용 투여의 기저 수축에 대한 효과는 없었고(data not shown) 전처치된 quercetin 단독은 phorbol 12,13-dibutyrate(10⁻⁶ M)에 의한 수축에 대해 거의 완전한 억제효과를 보였지만 알코올 단독은 전혀 효과가 없었다(Fig. 5). 그런데 quercetin과 알코올 병용은 quercetin 단독보다 약한 이완효과를 보였다(Fig. 5). 따라서 quercetin에 thin filament 조절에 대한 억제 기능이 있으며 알코올에 thin filament 조절 억제 기능이 없을 뿐 아니라 병용된 quercetin의 작용을 감소시킨다고 생각된다. 또한 quercetin 단독 또는 알코올 병용 투여에 의한 이완기전은 비항산화성 및 내피

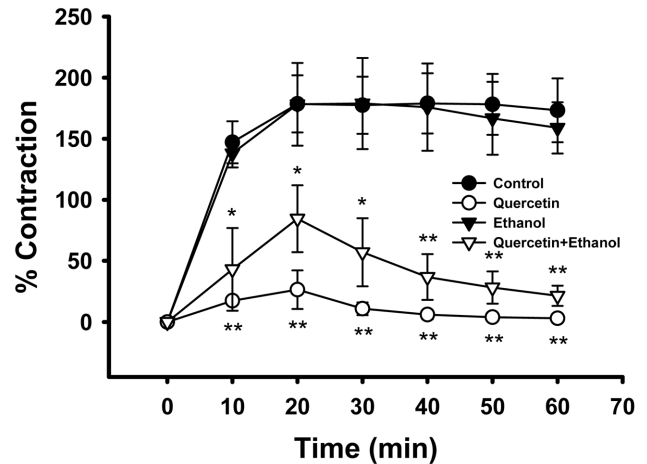


Fig. 5 – The effect of pretreated quercetin or ethanol on 1 μM phorbol 12,13-dibutyrate-induced vascular contraction in the absence of endothelium. Developed tension is expressed as a percentage of the maximum contraction to 50 mM KCl. Data are expressed as means of 3-5 experiments with vertical bars showing SEM. **P*<0.05, ***P*<0.01, presence versus absence of quercetin or alcohol.

비의존성이며 endothelial nitric oxide synthase, cyclooxygenase product prostacyclin, endothelium-derived hyperpolarising factor 등이 관여하지 않는다고 생각된다.

고 찰

식물에 분포하는 플라보노이드에 다양한 생리활성이 있으며 그 중 quercetin은 심혈관계 조절 활성이 있는 것으로 보고되고 있는데 주로 항산화 또는 내피 산화질소 생성을 통해 작용하는 것으로 알려져 있다. 또한 함께 사용된 알코올의 경우 심혈관계 질환을 악화시키는 것으로 알려져 있으나 최근 연구 결과에 따르면 저농도에서 내피의 산화질소 생성으로 오히려 혈압을 저하시키는 것으로 밝혀졌다. 따라서 이번 실험에서 내피를 제거한 혈관을 이용하여 quercetin 또는 알코올의 추가 기전을 조사하게 되었다. 한편 혈관 수축 기전에 효능약 자극에 의한 마이오신 경사슬 인산화나 수축력의 정도는 대개 세포내 칼슘이온 농도상 증가에 의한 것보다 더 높으며 이 현상은 소위 칼슘이온 감각이라고 설명된다.¹²⁾ 따라서 마이오신 경사슬 인산화수준과 수축정도를 조절하는 추가조절기전이 제안되었다. 즉 PKC, MEK에 의한 thin filament 조절이나 Rho GEFs(guanine nucleotide-exchange factors), Rho A, Rho-kinase 등에 의한 마이오신 탈인산화효소의 억제가 칼슘이온 감각에서 주요한 경로라는 것이 뒤이은 연구들에서 밝혀졌다. 예를 들어 phorbol ester는 MEK, ERK에 의한 thin filament 조절을 통해서, thromboxane A₂는 L-type 칼슘통로를 통해 칼슘이온 유입을 유도하고 RhoA/Rho-kinase 활성화를 통해 칼슘이온 감각을 일으킨다고 알려져 있다.

이전까지는 quercetin이나 알코올이 항산화작용이나 내피의존적으로 혈관을 이완시킨다고 보고되었다. 그런데 내피가 제거된 쥐 대동맥에서 Rho-kinase 활성화와 L-type 칼슘 통로를 통한 칼슘 유입으로 작용한다는 thromboxane A₂에 의한 수축¹⁷⁾에 대해 quercetin은 유의성 있는 이완효과를 보였다(Fig. 2, Fig. 3). 따라서 quercetin에 의한 이완기전은 비항산화성 및 내피 비의존성이며 endothelial nitric oxide synthase, cyclooxygenase product prostacyclin, endothelium-derived hyperpolarising factor 등이 관여하지 않는다고 생각된다. 또한 알코올 단독은 전혀 효과가 없었는데 이전에 보고된 이완 효과는 내피를 통한 기전으로 생각된다. 또한 알코올과의 병용 투여가 quercetin 단독보다 강력한 이완효과를 보였기에 thromboxane A₂에 의한 혈관 평활근 수축에서 quercetin 또는 알코올이 L-type 칼슘 통로를 통한 칼슘 유입 또는 Rho-kinase를 억제하여 혈관을 이완시킨다고 추측된다. Quercetin과 알코올이 항산화 또는 내피를 통해 작용한다는 것은 이미 여러 문헌에서 보고되었고 따라서 내피가 제거된 혈관에 대해 이완을 보이는 것에 혈관 평활근 자체에 대한 활성이 관여될 수 있고 이는 간접적으로 quercetin 또는 알코올

에 악틴-마이오신 상호작용을 억제하는 추가적인 효과가 있다는 것을 의미한다.

Fluoride도 RhoA/Rho-kinase를 활성화시켜 혈관 평활근을 수축시킨다고 알려져 있다.¹⁸⁾ 내피가 제거된 쥐 대동맥에서 전처치된 quercetin은 fluoride에 의한 수축에 대해 유의성 있는 억제효과를 보였고 알코올과 병용 투여시 quercetin 단독과 유사한 수축억제 효과를 보였다(Fig. 4). 알코올과의 병용이 quercetin 단독과 유사한 혈관 수축 억제효과를 보였기에 적어도 fluoride에 의한 혈관 평활근 수축에서 quercetin이 Rho-kinase를 억제하여 혈관을 이완시킨다고 추측되며 알코올은 그런 기능이 없는 것으로 생각된다.

Phorbol ester는 MEK, ERK 등을 활성화시켜 혈관 평활근을 수축시킨다고 알려져 있다.¹⁸⁾ 내피가 제거된 쥐 대동맥에서 전처치된 quercetin은 phorbol ester에 의한 수축에 대해 완전한 억제효과를 보였고 알코올과 병용 투여시 quercetin 단독보다 약한 수축억제 효과를 보였다(Fig. 5). 알코올과의 병용이 quercetin 단독보다 약한 혈관 수축 억제효과를 보였기에 적어도 phorbol ester에 의한 혈관 평활근 수축에서 quercetin은 MEK, ERK 등을 억제하여 혈관을 이완시킨다고 추측되며 알코올은 오히려 MEK, ERK 등을 활성화시키는 것으로 생각된다.

본 실험에서는 심혈관계 질환, 뇌졸중 등에 대해 예방과 치료를 목적으로 사용될 수 있는 quercetin 단독 또는 알코올과의 상호작용에서의 혈관 이완 기전에 대해 조사하여 저농도 알코올의 혈관 이완 기전, 알코올 중독에서의 주의 및 새로운 가능성을 보고자 하였다. Quercetin은 항산화나 내피에 대한 작용외에 thin filament 또는 thick filament 조절을 통해 평활근에 직접 작용하여 악틴-마이오신 상호작용을 억제하여 작용하였고 추가적인 알코올 노출 또는 섭취는 일부 항고혈압치료제의 작용을 증강시켜 저혈압이나 쇼크를 악화시킬 수 있으며 그 기전은 내피와 상관없이 L-type 칼슘 통로를 통한 칼슘 유입 억제 등을 통해 평활근 자체의 악틴-마이오신 상호작용을 억제하여 작용하는 것으로 생각된다.

결 론

본 연구에서는 고혈압, 당뇨병 등 성인병에서 내피가 손상되기 쉬우므로 내피가 제거된 흰쥐 동맥혈관에 기전이 서로 다른 phorbol ester, fluoride, thromboxane A₂ 등의 수축제가 투여되었고 L-type 칼슘 통로를 통한 칼슘 유입 또는 RhoA/Rho-kinase 활성화를 통해 칼슘이온 감각을 일으킨다고 알려져 있는 thromboxane A₂에 의한 수축에 대해 quercetin 또는 quercetin과 ethanol이 현저한 이완효과가 있음을 관찰하였다. 그런데 동일하게 RhoA/Rho-kinase를 활성화시켜 혈관 평활근을 수축시킨다고 알려져 있는 fluoride에 의한 수축에 대해서는 전처치된

quercetin 단독만 수축 억제효과가 있었고 알코올 단독은 효과가 없었다. 그런데 이전까지는 quercetin이나 알코올이 항산화작용이나 내피의존적으로 혈관을 이완시킨다고 보고되었다. 따라서 thromboxane A₂, fluoride 또는 phorbol ester에 의한 혈관 평활근 수축에서의 flavonoids 또는 알코올 노출의 이완반응은 내피비의존성이고 항산화 활성과도 상관없으며 오히려 L-type 칼슘 통로를 통한 칼슘 유입 또는 Rho-kinase 활성화에 작용하여 약틴-미오신 상호작용을 불활성화할 가능성이 있다. 향후 알코올 또는 quercetin 등의 flavonoids의 RhoA/Rho-kinase 활성화 억제효과, myosin phosphatase 활성화증대 효과, MEK, ERK 의존성 thin filament 조절 경로 등을 생화학적 방법으로 연구하고자 한다.

참고문헌

- Henriksson, K. M., Lindblad, U., Gullberg, B., Agren, B., Nilsson-Ehle, P. and Rastam, L. : Body composition, ethnicity and alcohol consumption as determinants for the development of blood pressure in a birth cohort of young middle-aged men. *Eur. J. Epidemiol.* **18**(10), 955 (2003).
- Agarwal, D. P. and Srivastaba, L. M. : Does moderate alcohol intake protect against coronary heart disease? *Indian Heart J.* **53**, 224 (2001).
- Agarwal, D. P. : Cardioprotective effects of light-moderate consumption of alcohol. a review of putative mechanism. *Alcohol Alcohol.* **37**, 409 (2002).
- Corrao, G., Rubbiati, L., Bagnardi, V., Zamboni, A. and Poikolainen, K. : Alcohol and coronary heart disease. a meta analysis. *Addiction* **95**, 1505 (2000).
- Toda, N. and Ayajiki, K. : Vascular actions of nitric oxide as affected by exposure to alcohol. *Alcohol Alcohol.* **45**(4), 347 (2010).
- Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Marin, F. R., Ortuno, A. and Del-Rio, J. A. : *J. Agri. Food Chem.* **45**, 4505 (1997).
- Moreira, A. J., Fraga, C., Alonso, M., Collado, P. S., Zettler, C., Marroni, C., Marroni, N. and Gonzalez-Gallego, J. : Quercetin prevents oxidative stress and NF- κ B activation in gastric mucosa of portal hypertensive rats. *Biochem. Pharmacol.* **68**, 1939 (2004).
- Somlyo, A. P. and Somlyo, A. V. : Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* **372**, 231 (1994).
- Somlyo, A. P. and Somlyo, A. V. : From pharmacomechanical coupling to G-proteins and myosin phosphatase. *Acta. Physiol. Scand.* **164**, 437 (1998).
- 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).
- 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).
- Somlyo, A. P. and Somlyo, A. V. : Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* **372**, 231 (1994).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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).
- Wilson, D. P., Susnjak, 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).
- Je, H. D., Lee, M. H., Jeong, J. H., Park, S. Y. and Sohn, U. D. : Protective effect of resveratrol on agonist-dependent regulation of vascular contractility via inhibition of rho-kinase activity. *Pharmacology* **86**(1), 37 (2010).