약학회지 제41권 제5호 666~671(1997)
Yakhak Hoeji Vol. 41, No. 5

혈관평활근 수축에 대한 타이로신 인산화 억제제의 효과

정진영 · 윤여표* · 안희열#
충북대학교 의과대학, *충북대학교 약학대학
(Received August 26, 1997)

Effects of Tyrosine Phosphorylation Inhibitors on Vascular Smooth Muscle Contraction

Jin Young Jung, Yeo-Pyo Yun* and Hee Yul Ahn#
*College of Medicine, *College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea*

Abstract—We studied effects of genistein and tyrphostin, inhibitors of tyrosine kinase, on contractions induced by high K^+ and norepinephrine in rat aorta. Genistein (10^{-6}~10^{-4} M) and tyrphostin (10^{-5}~10^{-4} M) inhibited high K^+ and norepinephrine-induced sustained contractions, respectively in a concentration-dependent manner. High K^+ and norepinephrine caused an increase in $^{45}Ca^{2+}$ uptake while 10^{-4} M genistein and tyrphostin inhibited the K^+ and norepinephrine-increased $^{45}Ca^{2+}$ uptake, respectively. These results show that inhibitor of tyrosine kinase blocks the voltage-and receptor-operated Ca^{2+} channels in rat aorta, respectively.

Keywords ☐ Tyrosine phosphorylation. Genistein. Tyrphostin. Ca^{2+} channel.

분자량 20,000 달톤(dalton)의 마이오신경쇄(myosin light chain)의 19번 세린(serine) 잔기의 인산화는 평활근 수축의 가장 필수적인 생화학적 현상으로 알려져 있다.[1] 최근 타이로신 인산화효소(tyrosine kinase)에 의한 타이로신 잔기의 인산화가 평활근 수축에 관여할 것이라는 보고가 있었다.[2] 타이로신 잔기의 인산화가 평활근 수축에 관여할 것으로 추론할 수 있는 근거로는 첫째로 예비발암유전자(proto-oncogene)인 $pp60^{c\text{-}src}$에 의하여 조절되는 타이로신 인산화효소가 심장근 또는 골격근보다 평활근에 더 많이 분포하는 것이며[3], 둘째로 화학구조가 서로 다른 타이로신 인산화효소 억제제인 genistein과 tyrphostin이 각종 생리자극에 의한 혈관 및 장관 평활근의 수축을 억제하는 것이다.[4,5] 셋째로는 타이로신 인산화효소 수용체 작동물질인 혈소판유래성장인자(platelet-derived growth factor) 및 표피세포성장인자(epidermal growth factor)가 혈관평활근의 수축을 야기하는 것이다.[6,7,8,9] 넷째로는 타이로신 탈인산화효소(tyrosine phosphatase)의 억제제인 vanadate가 장관평활근의 수축을 야기하는 것이다.[10]

그러나, 타이로신 잔기의 인산화가 평활근의 수축에 아무런 역할을 하지 못한다는 반대의 보고도 있다. 첫째로 tyrphostin이 자발적 고혈압흰쥐 대동맥의 칼륨(KCl) 수축과 phenylephrine 수축을 억제하지 못하며[11], 둘째로 기니아픽 및 흰쥐의 대동맥 노르에피네프린 수축을 genistein과 tyrphostin이 억제하지 못하는 것이다.[12] 따라서 평활근의 수축에서 타이로신 잔기의 인산화의 역할에 대한 논의는 현재까지도 분분한 실정이다.

한편, 타이로신 인산화효소 억제제의 작용기전에 대해서도 여러 보고가 있는데, 타이로신 인산화효소 억제제는 돼지의 경동맥에서 Ca^{2+}의 이동을 억제한다고 보고되었고[13], 기니아픽 회장에서는 타이로신 인산화

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 0431-61-2850 (팩스) 0431-272-1603

효소 억제제가 Ca^{2+}의 감수성을 변화시킨다고 보고되었다.[14]

본 연구에서는 혈관평활근수축에서의 단백질 타이로신잔기 인산화의 역할을 검토하기 위하여 타이로신 인산화효소 억제제를, 흰쥐의 대동맥을 재료로하여 고농도의 칼륨 및 노르에피네프린 수축에 적용하여 이완작용 및 그 기전을 조사하였다.

실험방법

표본의 제작 및 실험방법 - 흰쥐(Sprague-Dawley, 숫컷, 9 주령, 250~350 g)는 100% 이산화탄소를 흡입시켜 치사시킨 후 흉대동맥을 조심스럽게 분리하였다. 곧이어 지방조직을 박리하고 내피세포를 면봉으로 세번 상하로 문지른 후 신속히 혈관절편을 나선형으로 자르고 10 m*l*의 생리식염액(physiological salt solution, PSS)이 들어있는 챔버(organ chamber) 안으로 이동시킨 후 고정하였다. 이때 생리식염액은 37°C로 온도를 유지하였고 95%, O_2/5%, CO_2로 가스를 공급하여 pH를 7.4로 일정하게 유지하였다. 혈관평활근 장력은 isometric 으로 Gould(미국)의 polygraph를 이용하여 측정하였다. 정지장력은 1 그램(g)을 주었고 혈관조직은 실험을 시작하기 전에 1시간동안 적응시간을 주었다. 이때 타이로신 인산화효소 억제제인 tyrphostin과 genistein의 수축에 미치는 작용을 검토하기 위하여 고농도의 칼륨 및 1 μM 노르에피네프린 수축 시작 30분 전에 각각 전처치하였다. $^{45}Ca^{2+}$ 유입은 2시간 동안 혈관조직을 생리식염액에서 적응시킨 후 $^{45}Ca^{2+}$ 을 2 μCi/m*l*의 농도로 5분간 고농도의 칼륨 또는 1 μM 노르에피네프린으로 자극하였다. 이때 타이로신 인산화효소 억제제인 tyrphostin과 genistein의 $^{45}Ca^{2+}$ 유입에 미치는 작용을 검토하기 위하여 고농도의 칼륨 또는 1 μM 노르에피네프린으로 자극 30분전에 전처치하였다. 조직내의 Ca^{2+} 정량은 우선 조직표면에 결합된 Ca^{2+}을 제거하기 위하여 세정용액으로 30분간 0°C에서 세정하였다. 세정한 후 혈관조직을 20 mM EGTA 용액으로 하룻밤 침적시켜 조직내의 $^{45}Ca^{2+}$을 용출하였다. 곧이어 칵테일(scintillation cocktail)을 5 m*l* 주입하여 액체방사능측정기(liquid scintillation counter, Beckman, USA)로 측정하였다.

시약 - 실험에 사용한 시약인 genistein, tyrphostin, norepinephrine는 Sigma Chemical회사(St. Louis, USA)의 제품을 사용하였고, 생리식염액(physiological salt solution, PSS)의 조성(mM) 은 NaCl 136.9, KCl 5.4, glucose 5.5, $NaHCO_3$ 23.8, $CaCl_2$ 1.5, $MgCl_2$ 1.0 and EDTA 0.01 이었다. 등장성 고농도의 칼륨용액은(high K^+-PSS)은 NaCl의 농도를 60 mM 줄이고 KCl의 농도를 60 mM 증가시켰다. 한편, $^{45}Ca^{2+}$ 세정용액의 조성(mM) 은 $LaCl_3$ 73.8, glucose 5.5, TRIS 24 이었고, 1 N 말레익산(maleic acid)으로 pH를 6.8~6.9로 조정하였다. $^{45}Ca^{2+}$은 New England Nuclear(Wilmington, USA) 회사의 제품을 사용하였고 형광칵테일은 Beckman회사(Fullerton, USA)의 제품을 사용하였다.

통계분석 - Tyrphostin과 genistein의 이완작용은 약물을 투여하기 30분 전의 고농도의 칼륨수축 및 1 μM의 노르에피네프린의 수축을 각각 100%로써 설정하여 대조수축에 대한 백분율로써 나타내었다. Tyrphostin과 genistein의 $^{45}Ca^{2+}$ 유입에 대한 작용은 고농도의 칼륨수축 및 1 μM의 노르에피네프린의 5분간의 $^{45}Ca^{2+}$ 유입량을 30분간 약물 전처치시의 고농도의 칼륨수축과 1 μM의 노르에피네프린의 5분간의 $^{45}Ca^{2+}$ 유입량으로 각각 비교하였다. 실험결과의 통계처리는 Student's *t* test에 의하여 분석하였으며, P값이 0.05 이하일 때 유의성이 있다고 판정하였다.

실험결과

Genistein과 Tyrphostin의 혈관이완작용

고농도의 칼륨(65.4 mM KCl)은 지속적인 수축을 유발하였고, 투여 30분 후에 최대에 도달하여 계속 유지되었다. 최대 수축의 크기는 0.74±0.05 g(n=4) 이었다. 1 μM 노르에피네프린(norepinephrine)도 지속적인 수축을 유발하였고, 투여 30분 후에 최대에 도달하여 계속 유지되었다. 최대 수축의 크기는 0.72±0.05 g(n=4) 이었다. Genistein을 10^{-6} M부터 10^{-4} M 까지 30 분간 전처치 하였을 때 고농도의 칼륨(65.4 mM KCl) 수축과 1 μM 노르에피네프린에 의한 수축은 각각 억제되었다(Fig. 1). 이때 genistein의 고농도의 칼륨수축에 대한 50% 억제농도(IC_{50})는 2.29×10^{-5} M(n=4) 이었고, 노르에피네프린 수축에 대한 IC_{50}는 2.19×10^{-5} M(n=4) 이었다. 한편, tyrphostin을 10^{-5} M부터 10^{-4} M 까지 30 분간 전처치 하였을 때 고농도의 칼륨(65.4 mM KCl) 수축과 1μM

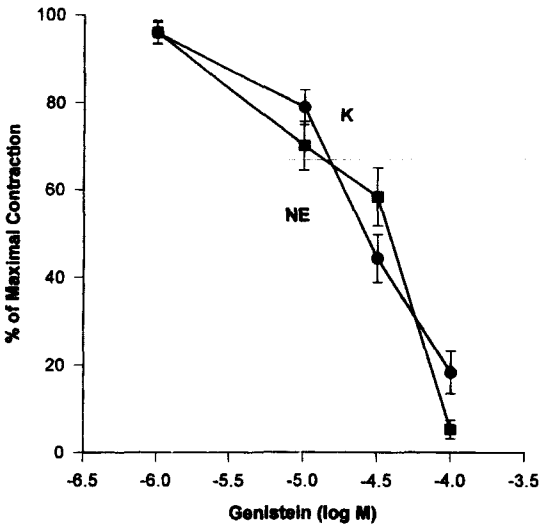

Fig. 1 — The inhibitory effects of genistein on contractile responses to high K^+ (● : 65.4 mM KCl) and 10^{-6} M norepinephrine (NE, ■) in rat aorta. Genistein (10^{-6} M-10^{-4} M) was added to the bath 30 min before the addition of high K^+ and 10^{-6} M NE. The maximal contractions induced by these in the absence of genistein treatment were taken as 100%. Data were expressed as the means±SEM of four experiments.

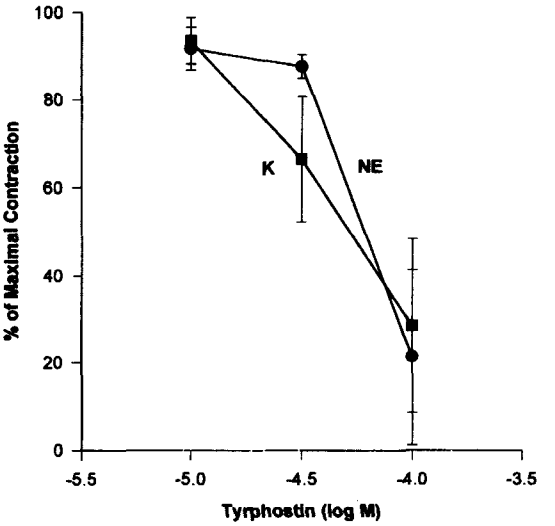

Fig. 2 — The inhibitory effects of tyrphostin on contractile responses to high K^+ (● : 65.4 mM KCl) and 10^{-6} M norepinephrine (NE, ■) in rat aorta. Tyrphostin (10^{-5} M-10^{-4} M) was added to the bath 30 min before the addition of high K^+ and 10^{-6} M NE. The maximal contractions induced by these in the absence of tyrphostin treatment were taken as 100%. Data were expressed as the means±SEM of four experiments.

노르에피네프린에 의한 수축은 각각 억제되었다(Fig. 2). 이때 tyrphostin의 고농도의 칼륨수축에 대한 50% IC_{50}는 5.13×10^{-5} M(n=4) 이었고, 노르에피네프린 수축에 대한 50% 억제농도 IC_{50}는 7.94×10^{-5} M(n=4) 이었다.

Genistein과 Tyrphostin의 $^{45}Ca^{2+}$ 유입억제작용

고농도의 칼륨(65.4 mM KCl)은 $^{45}Ca^{2+}$ 유입을 정지상태인 66.3±1.6 nmol/g aorta/5 min(n=6)에서 108.1±6.5 nmol/g aorta/5 min으로 유의하게(P〈0.01, n=6) 증가시켰다. 10^{-4} M genistein 30분 전처치에 의하여 고농도 칼륨에 의하여 증가된 $^{45}Ca^{2+}$ 유입은 50.2±13.9 nmol/g aorta/5 min으로 유의하게 감소되었다(P〈0.01, n=4). 1 μM 노르에피네프린에 의하여 $^{45}Ca^{2+}$ 유입은 정지상태인 71.9±5.2 nmol/g aorta/5 min(n=5)에서 138.6±19.5 nmol/g aorta/5 min 으로 유의하게 증가되었다(P〈0.05, n=6). 10^{-4}

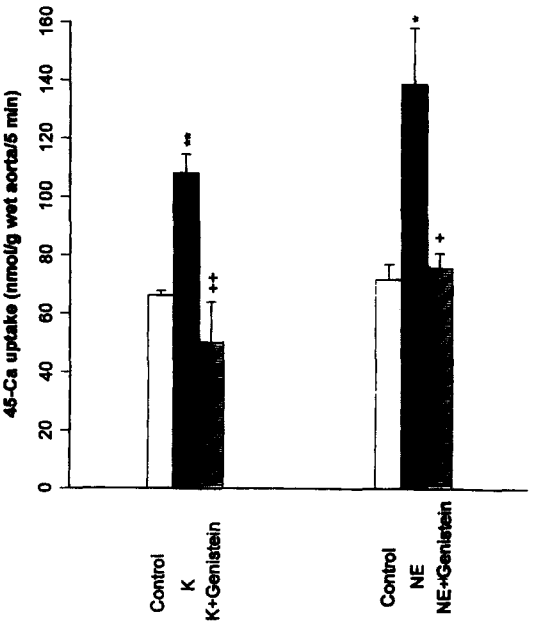

Fig. 3 — The effects of genistein on high K^+ (65.4 mM KCl) and 10^{-6} M norepinephrine (NE)-induced $^{45}Ca^{2+}$ uptake in rat aorta. Before 5 min treatment with high K^+ and 10^{-6} M NE, the aorta was pretreated with 10^{-4} M genistein for 30 min. Values are expressed as means±SEM. (n=4). Statistical difference from control values is noted as **P〈0.01, *P〈0.05, respectively, and from high K^+ and 10^{-6} M NE-treated values, as ++P〈0.01, +P〈0.05, respectively.

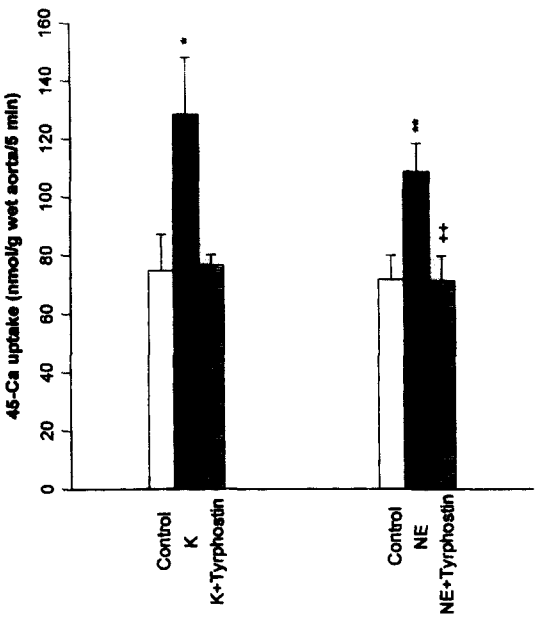

Fig. 4 — The effects of tyrphostin on high K^+ (65.4 mM KCl) and 10^{-6} M norepinephrine (NE)-induced $^{45}Ca^{2+}$ uptake in rat aorta. Before 5 min treatment with high K^+ and 10^{-6} M NE, the aorta was pretreated with 10^{-4} M tyrphostin for 30 min. Values are expressed as means±SEM. (n=4). Statistical difference from control values is noted as $^{**}P<0.01$, $^{*}P<0.05$, respectively, and from 10^{-6} M NE-treated values, as $^{++}P<0.01$.

M genistein 30분 전처치로 1 μM 노르에피네프린에 의하여 증가된 $^{45}Ca^{2+}$ 유입은 75.8±5.1 nmol/g aorta/5 min으로 유의하게 감소되었다($P<0.05$, n=4) (Fig. 3). 한편, 고농도의 칼륨에 의하여 $^{45}Ca^{2+}$ 유입은 정지상태인 74.8±12.3 nmol/g aorta/5 min(n=6)에서 128.3±19.7 nmol/g aorta/5 min으로 유의하게 ($P<0.05$, n=6) 증가하였다. 10^{-4} M tyrphostin 30분 전처치로 고농도의 칼륨에 의하여 증가된 $^{45}Ca^{2+}$ 유입은 76.5±3.6 nmol/g aorta/5 min(n=4)으로 감소하였으나 유의한 차이는 없었다. 1 μM 노르에피네프린에 의하여 $^{45}Ca^{2+}$ 유입은 정지상태인 71.7±8.2 nmol/g aorta/5 min(n=6)에서 108.6±9.7 nmol/g aorta/5 min($P<0.05$, n=6) 으로 유의하게 증가되었고, 10^{-4} M tyrphostin 30분 전처치로 1 μM 노르에피네프린에 의하여 의하여 증가된 $^{45}Ca^{2+}$ 유입은 71.2±8.6 nmol/g aorta/5 min($P<0.05$, n=4)으로 유의하게 감소하였다(Fig. 4).

고 찰

본 실험에서 타이로신 인산화효소 억제제인 genistein과 tyrphostin은 흰쥐 대동맥의 고농도의 칼륨 및 노르에피네프린에 의한 수축을 농도의존적으로 억제하였다. 이때 고농도의 칼륨 및 노르에피네프린에 의한 수축에 대하여 genistein의 억제작용이 tyrphostin의 억제작용보다 더 강력하였다. Genistein은 고농도의 칼륨 및 노르에피네프린에 의한 수축에 대하여 유사한 억제작용을 보였으나, tyrphostin은 노르에피네프린에 의한 수축보다 고농도의 칼륨에 의한 수축에 더 억제작용을 보였다. Genistein은 상경적인 ATP의 억제제로 알려져 있고, tyrphostin은 가성기질(pseudosubstrate)의 억제제로 알려져 있다. 따라서 작용기전에 의한 차이가 genistein과 tyrphostin의 고농도의 칼륨 및 노르에피네프린에 의한 수축에 대한 억제정도의 차이를 나타낼 지 도 모른다.

타이로신 인산화효소억제제는 수용체 작동약물에 의한 수축은 억제하였으나[5], 흰쥐대동맥에서 tyrphostin은 고농도의 칼륨에 의한 수축은 억제하지 못하였다.[9,15] 그러나, 개의 장간막동맥에서 genistein은 고농도의 칼륨에 의한 수축을 억제하였다.[16] 흰쥐 대동맥에서 genistein과 tyrphostin은 고농도의 칼륨에 의한 수축과 페닐에프린(phenylephrine)에 의한 수축을 억제하였다.[17] 이와는 반대로 흰쥐 대동맥에서 genistein과 tyrphostin은 노르에피네프린에 의한 수축을 억제하지 못하였다.[12] 이와같이 고농도의 칼륨 및 수용체 작동약물에 의한 수축에 대한 타이로신 인산화효소 억제제의 억제작용은 일관된 결과가 도출되어 있지 못한 실정이다. 그 이유로는 각 실험실에서 사용한 실험재료 및 사용농도의 차이가 원인이 아닌가 생각한다. 본 실험에서는 타이로신 인산화효소의 농도를 10^{-6} M부터 최대 10^{-4} M 까지 사용하였다. 일반적으로 고농도의 약물을 사용하면 비특이적인 작용을 나타낼 수 있기 때문에 실험결과의 분석에 주의를 기울여야 하지만, genistein의 경우 3×10^{-4} M 까지 타이로신 인산화효소이외의 효소에는 아무런 영향이 없다는 보고가 되어있다.[18] 따라서 흰쥐 대동맥에서 고농도의 칼륨 및 노르에피네프린에 의한 수축에는 적어도 타이로신 인산화효소의 활성이 매개되어 있다고 생각된다. 즉, 어떤 미확인 단백질의 타이로신잔기의 인산화가 고농도의 칼륨 및 노르에피네프린에 의한 수축에 중요하리라는 가능성을 말 해 주고 있다.

한편, 타이로신 인산화효소 억제제의 작용기전을 알아보기 위하여 $^{45}Ca^{2+}$ 유입에 대한 영향을 검토하였고, 그 결과 Fig. 3, 4에서 보는 바와 같이 genistein과 tyrphostin은 고농도의 칼륨 및 노르에피네프린에 의한 $^{45}Ca^{2+}$ 유입을 각각 억제하였다. 혈관평활근세포에서는 전위의존성 Ca^{2+} 이온통로는 물론 수용체 작동성 Ca^{2+} 이온통로도 존재한다.[19,20,21] 혈관평활근세포에서 genistein과 tyrphostin은 전위의존성 Ca^{2+} 이온통로를 억제한다고 보고되었고[22,23], 수용체 작동약물에 의하여 혈관평활근 세포내에 Ca^{2+}이 증가하고 이 Ca^{2+}의 증가와 단백질 타이로신 잔기의 인산화가 관련이 있다는 보고도 되어있다.[24] 따라서 본 실험결과와 위의 보고된 결과를 종합하여 볼 때 혈관평활근세포에서 전위의존성 Ca^{2+} 이온통로와 수용체 작동성 Ca^{2+} 이온통로의 활성에는 어떤 미확인 단백질의 타이로신 잔기의 인산화가 중요한 것으로 추측된다. 이 인산화가 타이로신인산화효소 억제제인 genistein과 tyrphostin에 의하여 억제되면 Ca^{2+} 이온통로가 차단되어 결과적으로 수축이 억제되는 것으로 판단된다. 실제로 세포배양한 흰쥐 대동맥 평활근세포의 막분획에서 단백질의 타이로신 잔기의 활성이 측정되었다.[25] 그러나 정확히 막분획의 어떤 단백질의 타이로신 잔기의 활성이 Ca^{2+} 이온통로의 활성과 상관이 있는 지는 앞으로 규명되야 할 중요한 연구과제라 생각된다.

결 론

혈관평활근 수축에 대한 타이로신 인산화의 역할을 알아보기 위하여 타이로신 인산화효소 억제제인 genistein과 tyrphostin의 고농도의 칼륨 및 노르에피네프린 수축에 대한 영향과 그 작용기전을 흰쥐대동맥평활근에서 검토하였다.

1. 타이로신 인산화효소 억제제인 genistein은 고농도의 칼륨 및 노르에피네프린에 의한 수축을 각각 농도의존적으로 억제하였다.

2. 타이로신 인산화효소 억제제인 tyrphostin은 고농도의 칼륨 및 노르에피네프린에 의한 수축을 각각 농도의존적으로 억제하였다.

3. 고농도의 칼륨(65.4 mM KCl)은 $^{45}Ca^{2+}$ 유입을 유의하게 증가시켰다. 10^{-4} M genistein 및 tyrphostin 30분 전처치에 의하여 고농도 칼륨에 의하여 증가된 $^{45}Ca^{2+}$ 유입은 각각 유의하게 감소되었다. 1 μM 노르에피네프린에의하여 $^{45}Ca^{2+}$ 유입은 유의하게 증가되었다. 10^{-4} M genistein 및 tyrphostin 30분 전처치로 1 μM 노르에피네프린에의하여 증가된 $^{45}Ca^{2+}$ 유입은 각각 유의하게 감소되었다.

이상의 결과로써 타이로신인산화효소 억제제인 genistein과 tyrphostin은 고농도의 칼륨 수축 및 노르에피네프린 수축을 억제하며 그 억제작용기전은 고농도의 칼륨 및 노르에피네프린에 의하여 열리는 Ca^{2+} 이온통로를 억제하는 것으로 평가된다. 따라서 흰쥐 대동맥평활근세포에서 전위의존성 및 수용체작동성 Ca^{2+} 이온통로의 활성에 미확인 단백질의 타이로신 잔기의 인산화가 중요할 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 논문은 1995년 교육부 기초의학 연구비(안희열, No 209)에 의하여 완성되었기에 감사를 드립니다.

문 헌

1) Somlyo, A. P. and Somlyo, A. V. : Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* **372**(17), 231 (1994).

2) Di Salvo, J., Steusloff, A., Semenchuk, L. A., Satoh, S., Kolquist, K. and Pfizer, G. : Tyrosine kinase inhibitors suppress agonist-induced contraction in smooth muscle. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **190**(3), 968 (1993).

3) Di Salvo, J., Gifford, D. and Kokkinakis, A. : $pp60^{c\text{-}src}$ kinase activity in coronary extracts is stimulated by ATP. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **153**, 338 (1988).

4) Yang, S. G., Saifeddine, M. and Hollenberg, M. D. : Tyrosine kinase inhibitors and the contractile action of epidermal growth factor, urogastrone and other agonists in gastric smooth muscle. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **70**, 85 (1992).

5) Di Salvo, J., Pfizer, G. and Semenchuk, L. A. : Protein tyrosine phosphorylation, cellular Ca^{2+}, and Ca^{2+} sensitivity for contraction of smooth muscle. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **72**(11), 1434 (1994).

6) Berk, B. C., Brock, T. A., Webb, R. C., Taubman, M. B., Atkinson, W. J., Gimbrone, M. A.

Jr. and Aleander, R. W. : Epidermal growth factor, a vascular smooth muscle mitogen, induces rat aortic contraction. *J. Clin. Invest.* **75**(3), 1083-1086 (1985).

7) Morgan, K. G., DeFeo, T. T., Wenc, K. and Weinstein, R. : Alterations of excitation-contraction coupling by platelet-derived growth factor in enzymatically isolated and cultured vascular smooth muscle. *Eup. J. Pharmacol.* **405**(1), 77 (1985).

8) Gan, B, S. and Hollenberg, M. D. : Distinct coronary artery receptor systems for epidermal growth factor-urogastrone. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **252**(3), 1277 (1990).

9) Laniyonu, A. A., Saifeddine, M., Yang, S. G. and Hollenberg, M. D. : Tyrosine kinase inhibitors and the contractile action of G-protein-linked vascular agonists. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **72**, 1075 (1994b).

10) Di Salvo, J., Semenchuk, L. A. and Lauer, J. : Vanadate-induced contraction of smooth muscle and enhanced protein phosphorylation. *Arch. Biochem. Biophys.* **304**, 386 (1993b).

11) Sauro, M. D. and Thomas, B. : Typhostin attenuates platelet-derived growth factor-induced contraction in aortic smooth muscle through inhibition of protein tyrosine kinase(s). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **267**(3), 1119 (1993).

12) Saifeddine, M., Laniyonu, A., Yang, S. G. and Hollenberg, M. D. : Tyrosine kinase inhibitors and the contractile action of angiotensin-II in vascular tissue. *Pharmacol. Commun.* **1**, 117 (1992).

13) Gould, E. M., Rembold, C. M. and Murphy, R. A. : Genistein, a tyrosine kinase inhibitor, reduces Ca^{2+} mobilization in swine carotid media. *Am. J. Physiol.* **268**, C1425 (1995).

14) Steusloff, A., Paul, E., Semenchuk, L. A., Di Salvo, J. and Pfizer, G. : Modulation of Ca^{2+} sensitivity in smooth muscle by genistein and protein phosphorylation. *Archiv. Biochem. Biophys.* **320**(2), 236 (1995).

15) Abebe, W. and Agrawal, D. K. : Role of tyrosine kinases in norepinephrine-induced contraction of vascular smooth muscle. *J. Cardiovas. Pharmacol.* **26**, 153 (1995).

16) Low, A. M. : Role of tyrosine kinase on Ca^{2+} entry and refilling of agonist-sensitive Ca^{2+} stores in vascular smooth muscles. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **74**, 298 (1996).

17) Filipeanu, C. M., Brailoiu, E., Huhurez, G., Slatineanu, S. and Baltatu, O. : Multiple effects of tyrosine kinase inhibitors on vascular smooth muscle contraction. *Eur. J. Phamacol.* **28**(1), 29 (1995).

18) Akiyama, T., Ishida, J., Nakgawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M. and Fukami, Y. : Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J. Biol. Chem.* **262**, 5592 (1987).

19) Flaim, S. F. and Craven, R. A. : Diltiazem and verapamil inhibit norepinephrine-stimulate ^{45}Ca uptake in rabbit arota. *Pharmacology* **22**(5), 286 (1981).

20) Karaki, H., Nakagawa, H. and Urakawa, N. : Age-related changes in sensitivity to verapamil and sodium nitroprusside of vascular smooth muscle of rabbit aorta. *Br. J. Pharmacol.* **85**(1), 223 (1985).

21) Malta, E., Schini, V. and Miller, R. C. : Effect of endothelium on basal and alpha-adrenoceptor stimulated calcium fluxes in rat aorta. *Naunyn-Schmied Arch. Pharmacol.* **334**, 63 (1986).

22) Wijetunge, S., Aalkjaer, C., Schachter, M. and Hughes, A. D. : Tyrosine kinase inhibitors block calcium channel currents in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **189**(3), 1620 (1992).

23) Laniyonu, A. A., Saifeddine, M., Ahmad, S. and Hollenberg, M. D. : Regulation of vascular and gastric smooth muscle contractility by pervanadate. *Br. J. Pharmacol.* **113**, 403 (1994a).

24) Semenchuk, L. A. and Di Salvo, J. : Receptor-activated increases in intracellular calcium and protein tyrosine phosphorylation in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* **370**(1-2), 127 (1995).

25) Srivastava, A. K. : Protein tyrosine kinase activity in cultured vascular smooth muscle cells (VSMC) rom rat aorta. *Int. J. Biochem.* **26**(4), 547 (1994).