

혈관평활근세포에서 Phorbol 12-Myristate 13-Acetate의 전처리가 Interleukin-1 β 에 의한 Nitrite생성에 미치는 영향

윤병헌 · 김인겸 · 박태규 · 김종영*

경북대학교 의과대학 약리학교실

Inhibitory Effect of Phorbol 12-Myristate 13-Acetate on NO Production Induced by Interleukin-1 beta in Aortic Vascular Smooth Muscle Cells of Rats

Byung Hun Yunn, In Kyeom Kim, Tae Gyu Park and Choong Young Kim*

Department of Pharmacology School of Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-422, Korea

Abstract

To examine the role of protein kinase C (PKC) in regulation of interleukin-1 beta (IL-1 β)-induced iNOS expression, IL-1 β -induced nitrite production was observed in cultured vascular smooth muscle (VSM) cells pretreated with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and phorbol 12,13-butyrate (PDB) as PKC activator; 4 α -phorbol-didecanoate (PDD) as PKC non-activator. Nitrite production induced by IL-1 β was increased by the presence of increasing concentration of PMA ranging from 2 to 200 nM. However, in VSM cells pretreated with PMA and PDB, IL-1 β -induced NO₂ production was decreased in proportion to the duration of pretreatment, and most significantly decreased in pretreatment time of 24 hours. Using RT-PCR method, the expression of iNOS mRNA induced by IL-1 β was decreased in VSM cells pretreated with PMA 200 nM for 24 hours. These results suggest that decrease in IL-1 β -induced nitrite production by the pretreatment of PMA result from inhibition of iNOS expression and the inhibition related to PMA-induced PKC down-regulation.

Key words – Smooth Muscle, Phorbol 12-Myristate 13-Acetate, Nitrate, Interleukin-1 β

서 론

혈관내피세포에 혈관평활근을 이완시킬 수 있는 물질 (endothelium-dependent relaxing factor, EDRF)의 발견으로[4] acetylcholine 및 histamine에 의한 혈관이완작용[5]을 설명할 수 있게 되었을 뿐 아니라, 이 두 약물은 EDRF를 유리시키는 중요한 실험약물로 많이 이용되어 지고 있

다. EDRF는 불안정한 산화질소(nitric oxide, NO)라는 것을 알게 되었고[24], 생체 내에서 생리학적 및 병리학적으로 중요한 역할을 담당하는 오타코이드(autacoid)의 일종으로 분류되어 있다. 이 물질은 신경, 심혈관 및 면역계의 다양한 생리학적반응을 나타내는 매개인자로서의 역할을 하며, 자간전증(preeclampsia), 고혈압, 폐혈성 충격(septic shock), 동맥경화증, 혈소판 유착 과 응집억제작용 등과도 관련이 있다[19]. iNO는 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 arginine으로부터 생성되는데, 이 NOS는 칼슘이온 농도에 의존성을 가진 constitutive형(cNOS)과 lipopolysac-

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 053-420-6936, Fax : 053-426-4703
E-mail : cykim1@knu.ac.kr

charide 및 cytokine 등에 의하여 활성화되는 inducible형 (iNOS)이 있다[12]. iNOS는 인체 간세포[6], 혈관세포[9], 인체 성상신경교 세포[18], 등에는 정상적으로 존재하지 아니하나, 이들 세포가 interleukin-1 beta (IL-1 β)에 의해 활성화되면 NO가 생성되어진다고 한다. 또한 천식[11], 류마티스관절염[10], 간경화증[14] 등의 질환에 NO가 많이 생성된다는 점은 iNOS발현과 관련되고 있음을 의미한다.

Muniyappa 등[21]은 혈관 평활근세포에서 IL-1 β 투여에 의한 NO₂생성증가 및 iNOS 발현이 증가되고, 이 증가현상이 고농도의 포도당에 의해 억제되는데 이 작용이 protein kinase C (PKC)활성에 기인되는 것 같다고 하였고, Li 등은[17] lipopolysaccharide에 의한 NO의 생성에 PKC의 역할이 큰 것으로 보고하였다. 이는 PKC 활성이 iNOS 발현에 상반되는 작용을 나타낼 수 있다고 본다. 즉 IL-1 β , TNF (tumor necrosis factor) α 와 IFN (interferon) 등과 같은 cytokine에 의한 iNOS발현은 TGF (transforming growth factor) β [30], angiotensin[22], PKC[13], IL-10[2] 등에 의해 억제된다고 한다. 또한 macrophage (대식세포)나 간세포에서 PKC 활성화제인 phorbol ester가 NO생성을 촉진[28]한다고 하였으나, 사구체간질세포에서 IL-1 β 에 의하여 야기되는 NO생성은 PKC활성에 의하여 억제된다고 하였다[20]. 이는 PKC의 작용이 세포종류에 따라 iNOS발현에 촉진적, 또는 억제적으로 반응할 수 있으며, 동일 세포라 할지라도 여러 가지 PKC 이성효소가 있을 경우, 각 이성효소의 활성상태의 변화에 의하여 iNOS발현에 영향을 줄 수 있을 것이다. 특히 혈관평활근세포에는 여러 가지의 PKC 이성효소가 있어[1,29] 혈관이완작용이나 수축작용이 야기될 수 있을 것이다.

본 실험은 PKC를 활성화시키는 상태를 지속시켰을 때 야기되는 세포 내 변화가 iNOS 생성에 영향을 줄 수 있는지를 검토하기 위하여, 혈관평활근세포에 PKC활성제인 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 로 전처리하여 interleukin-1 β (IL-1 β)에 의한 NO생성 및 RT-PCR을 이용하여 iNOS발현 여부를 관찰하였다.

재료 및 방법

세포배양

체중 300 g 내외의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐의 대동

맥으로 부터 얻은 혈관평활근세포를 10% fetal bovine serum (FBS)을 첨가한 Dulbecco-Eagle 배양액을 이용하여 37°C CO₂ incubator내에서 배양하였다. 세포가 밀생 상태에 가까워지면 trypsin을 처리하여 계대배양을 시작하였는데, 5-15 계대 배양세포를 본 실험에 이용하였다. 계대 배양세포를 24-well cluster dish에 분주하여 밀생 여부를 확인한 후, PMA로 전처리하고 HBSS (Hank's balanced salt solution)로 세척한 후 IL-1 β 를 첨가하여 24시간 배양하고, 이 때 생성된 불안정한 NO대신 안정된 상태인 NO₂를 아래 방법에 의하여 측정하였다.

NO₂량 측정

혈관평활근세포의 계대배양을 위하여 분주한 세포는 약 7일 후 밀생 상태를 확인할 수 있었고, 분주한 7일 후 1% BSA가 함유된 DMEM배양액을 다시 교환하고, PDB, PDD 또는 PMA로 전처리한 후 IL-1 β 를 첨가하여 24시간 배양한 배양액을 취하였으며, 이 배양액과 Gries 용액을 4:1의 비율로 혼합하고, Fast 수정방법[3]을 이용하여 생성된 NO₂량을 측정하였는데, plate reader (Titertek Multiskan MCC 344, 독일산)를 사용하여 543 nm 에서 흡광도를 측정하여 NO₂량을 sodium nitrate 용액을 희석하여 얻은 표준곡선에서 산정하였다.

NOS유전자발현 검사

배양액 중의 혈관 평활근 세포를 RNA solTM (Biotex lab Inc, 미국)에 용해하여, 그 용해물에 E-tube에서 chloroform을 처리하고 원심분리(1200 g, 20분)하여 상층액에 isopropanol과 RNA TackTM resin을 첨가하여 생성된 침전물을, 75% 알콜로 세척하여 광전분광광도계(260-280 nm)를 이용하여 RNA순도를 확인하였다.

RT-PCR은 Stratagene RT-PCR kit를 사용하였으며 그 처리 및 역전사 방법은 김[12]의 실험방법과 동일하였다. Primer는 iNOS와 GAPDH에 대하여 흰쥐 평활근세포내의 iNOS cDNA [23]와 GAPDH cDNA (250 bp)[31] 서열에 근거하여 (주)바이오니아 (한국)에서 제작한 것을 사용하였다.

실험군: 본 실험은 편의상 다음과 같이 5군으로 나누어 성적을 정리하였다.

제 1 군은 PMA 2, 20 또는 200 nM가 존재한 세포배양액에 IL-1 β 100 U/ml를 첨가하여 24 시간 배양으로 생성

되는 NO₂량을 측정하였다.

제 2 군은 세포배양액에 PMA 200 nM를 첨가하여 2, 8, 24시간 경과 한 후 HBSS로 세척하고, 다시 세포배양액으로 교환하여 이 중 IL-1 β 100 U/ml을 첨가하여 24시간 배양으로 생성되는 NO₂량을 측정하였다.

제 3 군은 세포배양액에 PMA 2, 20 또는 200 nM를 첨가하여 24시간 경과 후 HBSS로 세척하고 세포배양액에 IL-1 β 100 U/ml 첨가하여 24시간 배양으로 생성되는 NO₂량을 측정하였다.

제 4 군은 PKC활성제인 PMA는 200 nM, PDB는 500 nM와 PKC 비활성제인 PDD는 200 nM 존재 하에서 2, 8, 24시간 경과 후 HBSS로 세척한 후 세포배양액에 IL-1 β 100 U/ml첨가하고 24시간 배양하여 생성되는 NO₂량을 측정하였다.

제 5 군은 IL-1 β 존재 하에 배양시간 경과 및 IL-1 β 농도에 따른 iNOS 발현과, PMA전처리 24시간 경과 후, IL-1 β 존재로서 야기되는 iNOS 발현을 RT-PCR method를 이용하여 측정하였다.

통계처리는 실험을 4-6회 반복하여, 평균치±표준오차로 표시하였으며, Student's t test로 P값이 0.05 이하일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

제 1 군은 PMA 2, 20 또는 200 nM이 존재하는 세포배양액에 IL-1 β 100 U/ml를 첨가하여 24 시간 배양으로 생성된 NO₂량 (μ M)을 측정한 군(Fig. 1)으로, PMA가 존재하지 않을 때는 14.45 \pm 0.82이었고, PMA 2, 20, 또는 200 nM 존재 하에서 각각 16.33 \pm 0.39, 21.84 \pm 0.92, 22.93 \pm 0.39이 생성되어 IL-1에 의한 NO₂ 생성이 PMA의 용량 따라 증가되었다.

제 2 군은 세포배양액에 PMA 200 nM를 첨가하여 2, 8 또는 24시간 경과 한 후 IL-1 β 100 U/ml에 의하여 생성되는 NO₂량을 측정한 군(Fig. 2 left)으로, 세포배양액에 PMA 첨가하여 2, 8 또는 24 시간 후 IL-1 β 에 의하여 생성되는 NO₂ (μ M)량은 각각 17.28 \pm 0.82, 10.81 \pm 0.57, 1.62 \pm 0.08로 PMA에 노출된 시간의 경과에 따라 감소율이 현저히 차이를 보였다.

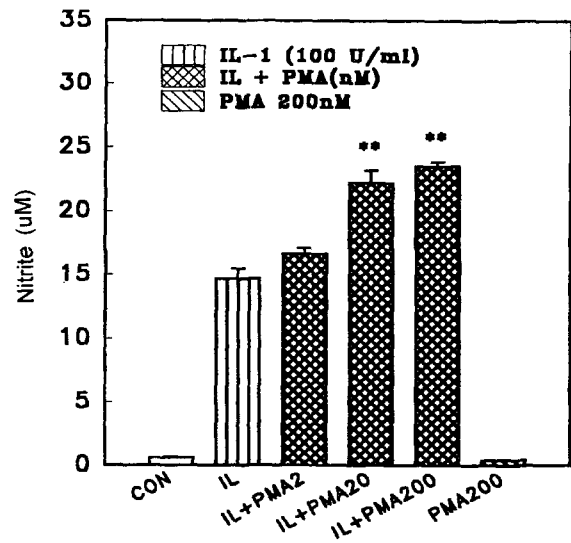


Fig. 1. Effect of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) on interleukin-1 β (IL-1 β)-induced nitrite production in rat vascular smooth muscle (VSM) cells. VSM cells were incubated in control media or media containing IL-1 β with or without PMA for 24 hrs. n=4 replicates for each bar. ** P<0.05 as compared to IL-1 β alone.

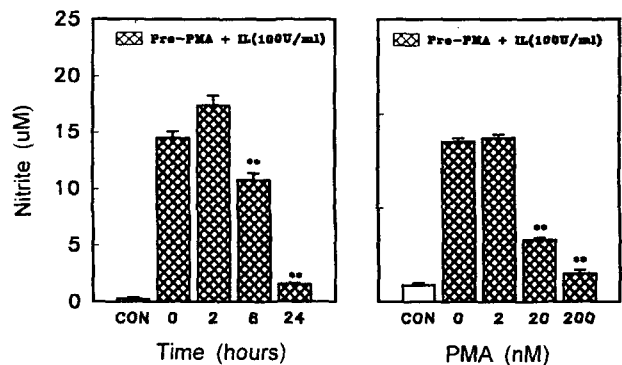


Fig. 2. Effect of PMA pretreatment on IL-1 β -induced nitrite production in rat VSM cells. Left; VSM cells were incubated in media containing PMA for time indicated and after washing HBSS for 2 times, followed by media containing IL-1 β for 24 hours. Right: VSM cells were incubated in media containing PMA at concentrations indicated and after washing Hank's balanced salt solution (HBSS) for 2 times followed by media containing IL-1 β for 24 hours. n=4 replicates for each bar. ** P<0.05 as compared to non-pretreatment 0 hour and 0 nM, respectively.

제 3 군은 세포배양액에 PMA 2, 20, 200 nM를 첨가하여 24시간 경과 후 IL-1 β 100 U/ml에 의하여 야기되는 NO₂량(μ M)을 측정된 군(Fig. 2 right)으로, PMA가 존재하지 않을 때는 14.01 ± 0.43 이었는데, PMA 2, 20 또는 200 nM를 첨가하여 24시간 경과 후 IL-1 β 에 의하여 생성되는 NO₂량은 각각 14.56 ± 0.39 , 5.41 ± 0.21 , 2.44 ± 0.32 로서 PMA의 양의 증가에 따라 NO₂생성이 현저히 감소되었다.

제 4 군은 PKC 활성제인 PMA, PDB와 PKC 비활성제인 PDD 존재하에서 일정 시간경과 후 IL-1 β 100 U/ml에 의하여 생성되는 NO₂량을 측정된 군으로(Fig. 3) 그 성적은 다음과 같다.

200 nM의 PMA를 세포배양액에 첨가하여 2, 8, 24시간 경과 후 IL-1 β 에 의하여 생성되는 NO₂량(μ M)은 각각 17.36 ± 0.87 , 10.75 ± 0.58 , 1.51 ± 0.09 이었고, 500 nM의 PDB를 세포배양액에 첨가하여 2, 8, 24시간 경과 후 IL-1 β 에 의하여 생성되는 NO₂량(μ M)은 각각 14.54 ± 0.66 , 12.42 ± 0.57 , 1.96 ± 0.06 이었다.

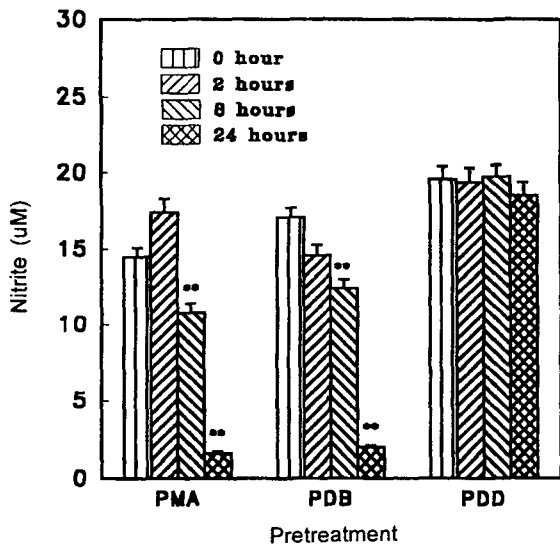


Fig. 3. Effect of phorbol ester pretreatment on IL-1 β -induced nitrite production in rat VSM cells. VSM cells were incubated in media containing PMA (200 nM), PDB (500 nM) or PDD (200 nM) for time indicated and, after washing HBSS for 2 times, followed by media containing IL-1 β for 24 hours. n=4 replicates for each bar. ** P<0.05 as compared to non-pretreatment 0 hour and 0 nM, respectively.

PMA 및 PDB로 전처리하여 24시간 경과한 경우에는 IL-1 β 에 의한 NO₂생성량이 현저히 감소하였으나, PDD를 첨가한 경우에는 아무런 변화가 나타나지 아니하였다.

제 5 군은 IL-1 β 및 PMA 처리로 야기되는 iNOS mRNA 발현을 측정된 군으로, IL-1 100 U/ml를 투여한 경우에는 배양시간의 경과에 따라 iNOS 발현이 증가되었고(Fig. 4), 24시간 전 200 nM PMA로 전처리한 경우는 IL-1 β 에 의한 iNOS발현이 현저히 억제되었고, IL-1 β 에 의한 iNOS의 발현이 cycloheximide 및 actinomycin D 존재로서도 현저히 억제되었다(Fig. 5).

고 찰

Protein kinase C (PKC)는 inositol-1,4,5 triphosphate와 같이 평활근 수축 조절에 중요한 역할을 하고 있으며, phospholipids 존재하에서 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 및 phosphatidylcholine로 부터 phospholipase C에 의하여 생성되는 diacylglycerol에 의하여 활성화되며 이 활성화 과정에 칼슘이 필요하게 된다[29].

아직까지 완전히 특성이 밝혀지지 않은 10여종의 PKC 이성효소가 있는데[1,29], Liou와 Morgan[16]은 혈관평활근세포에 존재하는 PKC가 alpha, delta, zeta 등의 이성효소가 있으며, Andera와 Walsh [1]는 평활근에 존재하는 PKC는 칼슘의존성 이성효소(alpha, beta-1, beta-2, gamma)와 비의존성 이성효소(delta, epsilon, zeta, eta)가 존재한다

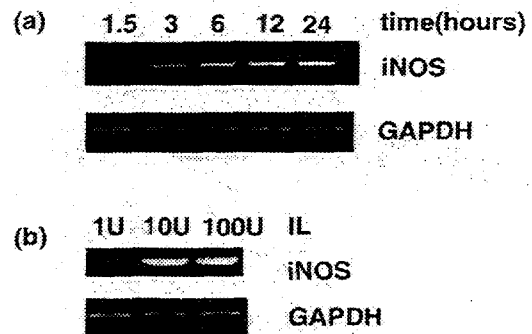


Fig. 4. Expression of iNOS mRNA stimulated by IL-1 β (100 U/ml) in VSM cells. Upper; Time course of iNOS mRNA expression. Lower; concentration-response of iNOS mRNA expression.

혈관평활근세포에서 Phorbol 12-Myristate 13-Acetate의 전처리가 Interleukin-1 β 에 의한 Nitrite생성에 미치는 영향

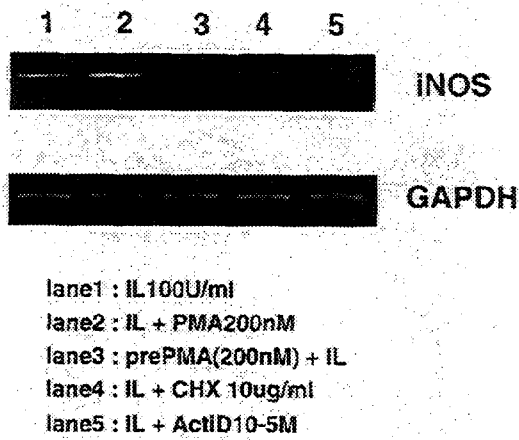


Fig. 5. Effect of PMA pretreatment on iNOS mRNA expression in rat VSM cells. VSM cells were incubated with the indicated concentrations of IL-1 β in the absence or presence of indicated drugs for 24 hours. Lane 1, IL-1 β alone; lane 2, IL-1 β + PMA 200 nM; lane 3, PMA (200 nM) for 24 hrs followed by IL-1 β ; lane 4, IL-1 β + cycloheximide (10 μ g/ml); lane 5, IL-1 β + actinomycin D.

고 한다. 그리고 PKC는 대식세포 및 간세포에서도 NO 생성유도에 관여한다고[9,28] 하며, 설치류의 대식세포에서 iNOS 발현에 PKC 의존성과정인 관련되며[26] lipopolysaccharide 및 interferon-gamma에 의하여 야기되는 iNOS유도 조절에 PKC-tyrosine kinase-polyADP-ribosylation 이 관련된다고 한다[25]. 한편 세포의 종류에 따라 PKC활성화에 의하여 NO생성이 촉진될 수도[28] 억제되어질 수도[7] 있다고 한다.

본 실험에서는 혈관 평활근 세포배양액 중 PKC 활성화제인 PMA가 존재하는 경우에는 IL-1 β 에 의한 NO₂ 생성이 증가되었는데, PMA로 전처리 하였을 경우에는 IL-1에 의한 NO₂ 생성이 감소되었다. 이는 동일 세포에서라도 실험 조건에 따라 PKC가 iNOS 및 NO생성과정에 촉진 또는 억제적으로 작용할 수 있다는 것을 의미한다. Lee[15]는 PKC 활성화제인 PDB나 PKC 불활성제인 PDD는 IL-1 β 에 의한 NO₂ 생성에 아무런 영향을 주지 아니하였고, PDB와 PMA는 유사한 PKC 활성화제임에도 불구하고, PMA에서 만 유일하게 농도의 증가에 따라 IL-1 β 에 의한 NO₂ 생성을 유일하게 증가시켰다고 했다. 그러나 본 실험에서 PMA 및

PDB로 전처리한 경우에는, IL-1 β 에 의한 NO₂ 생성을 같은 양상으로 억제하였다. 이는 혈관평활근세포에서 PMA와 PDB에 의한 PKC 활성화과정은 다르나, PKC 억제과정은 유사할 수 있다는 것을 의미하는 것으로 본다.

Lee[15]는 IL-1 β 에 의한 NO₂ 생성에 대한 PMA의 촉진작용이 비특이성 PKC억제제인 staurosporine에 의하여 감소되지 아니하고, 오히려 증가되는 현상을 나타내었고, 특이성 PKC 억제제인 bisindolylmalamide에 의해서 유의하게 억제된 것은 IL-1 β 에 의하여 야기되는 NO₂ 생성이 PMA와 같은 특정한 PKC활성제에 의하여 촉진될 수 있다고 하였다. 본 연구 결과 역시 PKC 활성화제와 PKC 활성화제의 특이성에 의하여 동일종류의 세포에서도 다양한 결과를 나타낼 수 있음을 의미한다. 이는 PKC의 여러 가지 이성체가 iNOS 발현에 양성적 또는 음성적으로 반응할 수 있음을 시사한 Paul 등[26]의 보고로 뒷받침될 수 있다고 본다. PMA 또는 PDB전처리로 특히 전처리 시간이 비교적 긴 24시간에 IL-1 β 에 의한 NO₂ 생성이 현저히 억제되었던 것은, PMA 또는 PDB 전처리에 의하여 세포내 존재하는 PKC의 활성이 억제된 것인지, PKC 활성화작용과는 무관한 PMA 또는 PDB의 다른 작용에 의한 억제작용인지는 검토되어야 할 것이다.

본 실험에 혈관평활근세포를 이용하여 PMA로 전처리 하였을 때 IL-1 β 에 의한 NO생성이 억제된다는 결과는, 혈관평활근세포에서 IFN-gamma 및 TNF에 의한 NO₂생성이 PKC 활성화제인 PMA에 의하여 감소되고[7], 사구체간질세포에서 IL-1 β 에 의한 NO₂ 생성과 iNOS mRNA 함유량이 증가되며, 이 증가는 PMA 및 PDB에 의하여 억제된다[20]고 볼 수 있다.

이상에서 IL-1 β 에 의한 NO₂ 생성이 PKC 활성화제 전처리로 억제되는 것이 어떤 경로를 통하여 야기되는 것인지는 알 수 없으나, iNOS 발현이 cycloheximide, actinomycin D의 존재와 PMA 전처리로 IL-1 β 에 의한 iNOS 발현이 억제되었다는 것은 mRNA 발현이나 translation이, PMA 전처리에 의한 PKC의 조절저하에 관련된 것으로 추정된다. 그러나 그 억제가 IL-1 β 에 의한 iNOS 발현의 어떤 과정에 관여하는지, mRNA 안정성저하에 기인된 것인지, iNOS의 소실을 촉진한 것인지는 추구되어야할 문제점으로 남아 있다.

요 약

Protein kinase C (PKC)가 interleukin-1 beta (IL-1 β)에 의하여 산화질소(NO) 생성과정에 어떤 역할을 하는지를 검토하기 위하여, 혈관평활근세포에서 PKC 활성화제인 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)로 전처리한 후 IL-1 β 에 의하여 야기되는 NO생성을 nitrite (NO₂)로 정량하고, RT-PCR method를 이용하여 iNOS 발현에 미치는 영향을 검토하여 다음과 같은 결과를 얻었다. PMA (20, 200 nM)는 IL-1 β 에 의한 NO₂ 생성을 유의하게 증가시켰다. PMA 200 nM, phorbol 12,13-dibutyrate 500 nM로 전처리하여 8, 24시간 노출된 세포에서 IL-1 β 에 의한 NO₂생성이 현저히 감소되었으나, PKC 비활성제인 4 α -phorbol-didecanoate 200 nM로 전처리한 경우는 영향을 받지 아니하였다. PMA 농도를 달리하여 24시간 전처리한 경우 IL-1 β 에 의한 NO₂생성의 감소는 PMA의 농도가 20 및 200 nM에서 현저하였다. RT-PCR method를 이용하여 iNOS 발현을 검토한 바 IL-1 β 100U/ml에 의한 iNOS발현이 PMA전처리 및 cycloheximide 또는 actinomycin D존재로서 현저히 억제되었다. 이상의 결과로 미루어 혈관평활근세포에서 PMA 전처리로 야기되는 IL-1 β 에 의한 NO 생성의 감소는, PKC 조절저하작용에 의한 iNOS 발현의 억제로 야기되는 것 같다.

참 고 문 헌

1. Andrea, J. E. and M. P. Walsch. 1992. Protein kinase C of smooth muscle. *Hypertension* **20**, 585-595.
2. Bogdan, C., Y. Vodovotz and C. Nathan. 1991. Macrophage deactivation by interleukin 10. *J. Exp. Med.* **174**, 1549-1555.
3. Fast, D. J., R. C. Lynch and R. W. Leu. 1993. Cyclosporin A inhibits nitric oxide production by L929 cells in response to tumor necrosis factor and interferon gamma. *J. Interferon Res.* **13**, 325-240.
4. Furchgott, R. F and J. V. Zawadzki. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**, 373-376.
5. Furchgott, R. F., P. D. Cherry and J. V. Zawadzki. 1984. Endothelial cells as mediator of vasodilation of arteries. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **6(Suppl.2)**, S336-343
6. Gella, D. A., M. E. De Vera, D. A. Russel, R. A. Shapiro, A. K. Nussler, R. L. Simmons and T. R. Billiar. 1995. A central role for IL-beta in the in vitro and in vivo regulation of hepatic inducible nitric oxide synthase. IL-1beta induces hepatic nitric oxide synthesis. *J. Immunol.* **155**, 4890-4898.
7. Geng, Y. J., Q. Wu and G. K. Hansson. 1994. Protein kinase C activation inhibits cytokine-induced nitric oxide synthesis in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Acta.* **1223**, 125-132.
8. Hortelano, S., A. M. Genaro and L. Bosca. 1992. Phorbol esters induce nitric oxide synthase activity in rat hepatocytes. Antagonism with the induction elicited by lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* **267**, 24937-24940.
9. Junquero, D. C., T. Scott-Burden, V. B. Schini, and P. M. Vanhaoutte. 1992. Inhibition of cytokine-induced nitric oxide production by transforming growth factor- beta1 in human smooth muscle cells. *J. Physiol (London).* **454**, 451-465.
10. Kaur, H. and B. Halliwell. 1994. Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation. Nitroglycerine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. *FEBS Lett.* **350**, 9-12.
11. Kharitonov, S. A., D. Yates, R. A. Robbins, R. Logan-Sinclair, E. A. Shinebourne, and P. J. Barnes. 1994. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet* **343**, 133-135.
12. Kim, I. K. 1996. Experimental intervention to reverse inhibition of nitric oxide production by cyclosporin A in rat aortic smooth muscle cells. *Kor. J. Pharmacol.* **32**, 211-219.
13. Kunz, D., G. Walker, W. Eberhardt, U. K. Messmer, A. Huwiler and J. Pfeilschifter. 1997. Platelet-derived growth factor and fibroblast growth factor differentially regulate interleukin-1 beta and c AMP-induced nitric oxide synthase expression in rat renal mesangial cells. *J. Clin. Invest.* **100**, 2800-2809.
14. Laffi, G., M. Foschi, E. Masini, A. Simoni, L. Mugnai, G. La Villa, G. Barletta, P. F. Mannaioni and P. Gentilini. 1995. Increased production of nitric oxide by neutrophils and monocytes from cirrhotic patients with ascites and hyperdynamic circulation. *Hepatology* **22**, 1666-1673.
15. Lee, H. Y. 1996. Role of protein kinase C in nitrite production induced by interleukin-1 beta in aorta

- vascular smooth muscle cells from rats, *The Doc. thesis in Kyungpook Univ.* pp.1-29.
16. Liou, Y. M. K. G. and Morgan KG. 1994. Redistribution of protein kinase C isoforms in association with vascular hypertrophy of rat aorta. *Am. J. Physiol.* **267**, 980-989.
 17. Li, S., F. L. Huang, Q. Feng, J. Liu, S. X. Fan and T. M. McKenna. 1998. Overexpression of protein kinase C- α enhance lipopolysaccharide-induced nitric oxide formation in vascular smooth muscle cells. *J. Cell Physiol.* **176**, 402-411.
 18. Liu, J., M. L. Zhao, C. F. Brosnan, and S. C. Lee. 1996. Expression of type II nitric oxide synthase in primary human astrocytes and microglia: Role of IL-1 β and IL-1 receptor antagonist. *J. Immunol.* **157**, 3569-3576.
 19. Moncana, S., R. M. Palmer and E. A. Higgs. 1991. Nitric oxide; physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**, 109-142.
 20. Muhl, H and J. Pfeilschifter. 1994. Possible role of protein kinase C epsilon isoenzyme in inhibition of interleukin-1 beta induction of nitric oxide synthase in rat renal mesangial cells. *Biochem. J.* **303**, 607-612.
 21. Muniyappa, R., P. R. Srinivas, Ram J. L, M. F. Walsh and J. R. Sower. 1998. Calcium and protein kinase C mediates high-glucose-induced inhibition of inducible Nitric oxide synthase in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* **31**, 289-295.
 22. Nakayama, I., Y. Kawahara, T. Tsuda, M. Okuta, and M. Yokoyama. 1994. Angiotensin II inhibits cytokin-stimulated inducible nitric oxide synthase expression in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **269**, 11628-11633.
 23. Nunokawa, Y., N. Oshida and S. Tanaka. 1993. Colony of inducible nitric oxide synthase in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophysic. Res. Commun.* **181**, 852-857.
 24. Palmer, R. M. J., A. G. Ferrige and S. Moncana. 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of the endothelium derived relaxing factor. *Nature* **327**, 524-526.
 25. Paul, A., R. H. Pendreigh and R. Plevin. 1995. Protein kinase C and tyrosine kinase pathways regulate lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase activity in RAW 264.7 murine macrophages. *Br. J. Pharmacol.* **114**, 482-488.
 26. Paul, A., K. Doherty and R. Plevin. 1997. Differential regulation by protein kinase C isoforms of nitric oxide synthase induction in RAW264.7 macrophage and rat aortic smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.* **120**, 940-946.
 27. Sands, W.A., J. S. Clark, F. Y. and Liew. 1994. The role of a phosphatidylcholine-specific phospholipase C in the production of diacylglycerol for nitric oxide synthesis in macrophages activated by IFN- γ and LPS. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199**, 461-466.
 28. Severn, A., M. J. Wakelam, F. Y. and Liew. 1992. The role of protein kinase C in the induction of nitric oxide synthesis by murine macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **188**, 997-1002.
 29. Stabel, S and P. J. Parker. 1993. Protein kinase C. *Internat. Encycloped. Pharmacol Ther.* **139**, 167-198.
 30. Vodovotz, Y., C. Bogdan, J. Paik, Q. W. Xie and C. Nathan. 1993. Mechanism of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor beta. *J. Exp. Med.* **178**, 605-613.
 31. Yoon, K. S., J. B. Jun, D. W. Kim, S.L. Chung and M.K. Kim. 1995. The effects of lipopolysaccharide on cytokine gene expression of cultured keratinocytes and peripheral mononuclear cells. *The Kyungpook Univ. Med. J.* **36**, 591-603.

(Received April 16, 2003; Accepted August 1, 2003)