

에스트로겐에 의한 암쥐의 심장조직의 COX-2, Mapkinases 및 관련된 Apoptotic Markers의 발현의 변화에 관한 연구*

신 장 인 · 박 옥 진[§]

한남대학교 식품영양학과

Changes in the Expression Pattern of Cyclooxygenase-2, Mapkinases and Related Apoptotic Markers by Different Levels of Estrogen Supplementation in Mature or Ovariectomized Female Rat Heart*

Shin, Jang-In · Park, Ock Jin[§]

Department of Food and Nutrition, Hannam University, Daejeon 306-791, Korea

ABSTRACT

The effects of different concentrations of estrogen supplementation to mature female rats or estrogen supplementation to ovariectomized rats on cyclooxygenase-2 (COX-2) expression, PGE₂ production and mapkinases expression were investigated in experimentally induced atherogenic rats with feeding a high fat · high cholesterol diet. In the first experiment using 48-week old mature rats, the supplementation of three different levels of estrogen was compared to the basal diet. The high concentration of estrogen supplementation induced the marked up-regulation of COX-2 protein and the increase in plasma PGE₂ production and this seems to be followed by the up-regulation of p38 among mapkinases. The regulation of bax showed in a reverse trend of COX-2 in heart tissues of mature female rats. In the second experimental system, female Sprague-Dawley rats were bilaterally ovariectomized; sham-operated animals were used as controls. Three weeks later, the animals were supplied with basal diet to sham-operated control group and ovariectomized control group, and estrogen supplemented diet to ovariectomized group for an eight-week experimental period. In a group supplemented with a medium dose of estrogen, COX-2 expression was up-regulated. This up-regulation was accompanied by the elevated expression of pERK1/2. Bax was increased in estrogen-fed animals indicating bax might be involved in estrogen feeding state in ovariectomized rats. Further investigations on the relationship between COX-2 and biological activities such as vasodilation by estrogen are required in *in vivo* system of female rats at the various physiological states. (*Korean J Nutrition* 38(1): 30~39, 2005)

KEY WORDS : estrogen supplementation, ovariectomized rats, cyclooxygenase-2 expression, PGE₂ concentration.

서 론

관상심혈관질환 (Coronary Heart Disease: CHD)의 발병률은 성별에 따른 차이를 나타내는데, 폐경기 이전의 여성은 같은 연령의 남성이나 폐경기 이후의 여성보다 심혈관 질환 발생 위험이 낮으나, 폐경기 이후에는 관상심혈관의 위험도가 증가하는 것으로 알려져 있다.^{1,2)} 또한 폐경기

전 여성은 CHD에 대한 고위험군 집단일지라고 CHD 발생률이 적으며, 심혈관 질환에 따른 합병증의 발생이 비슷한 연령대의 남성보다 매우 낮은 것으로 알려져 있다.³⁻⁵⁾ 이러한 CHD 보호작용은 폐경기 전 여성의 내인성 sex steroids인 estrogen에 의한 lipoprotein의 변화, 혈관이완 prostacyclin 합성의 증가, 혈관내피세포 및 평활근 세포 증식 저해 효과 등으로 설명하고 있다.^{6,7)} 이런 효과는 CHD의 발생률이 폐경 후 여성보다 폐경기 전 여성에서 낮게 나타난다는 것을 보여준 Framingham Study에 의해 뒷받침 될 수가 있다.⁸⁾ 또한 최근에 대두되고 있는 이론에 의하면 estrogen의 주요작용은 cyclooxygenase-2 (COX-2)를 활성화시켜 prostaglandin의 생성을 촉진하고 이로 인하여 oxidative stress의 감소 및 platelet 활성억제를

접수일 : 2004년 12월 3일

채택일 : 2004년 12월 27일

*The present research was supported by a University fund of Hannam University in 2003 and by Korea Research Foundation Grant (KRF-2003-002-C00289).

[§]To whom correspondence should be addressed.

일으켜 동맥경화 보호효과를 나타낼 수 있다고 하였다.⁹⁾

Cyclooxygenases는 세포에서 constitutive isoform인 COX-1과 inducible isoform인 COX-2 두가지 형태로 존재하는데 COX-1은 위, 대장, 신장 (신혈류량 조절), 혈소판 (혈소판 활성화제인 thromboxane A₂ 생성작용)을 포함하는 대부분의 조직에서 발현되며, 정상적인 생리과정을 유지하기 위한 세포보호 작용을 한다.¹⁰⁾ 이에 반하여 COX-2는 섬유아세포와 대식세포를 포함한 여러 세포에서 cytokines, 성장인자, 암유전자, 종양촉진인자에 의해 발현이 촉진되며, 염증이 일어난 곳에 prostaglandins (PGs)를 과량 생성하며, 혈관완제와 혈소판 응집 저해제인 PGI₂를 생성하며 정상적인 혈관에서 내피 세포들은 COX-2 활성이 활발하며 그 기저에 존재하는 근육세포들은 소량의 prostanoids를 생성한다.¹¹⁻¹⁷⁾ 이러한 조건하에서는 COX-2에 의하여 COX-2 대사 산물들이 조절되며 내피세포가 손상을 받으면 COX의 활성이 감소하여 PGI₂의 생성이 감소하고 혈관이 수축작용, 혈전형성 및 동맥경화의 과정에 노출되게 된다.¹⁸⁾ 따라서 여러 연구에서 COX-2는 endothelium-dependent 및 independent 기전에 의하여 혈관의 수축을 조절하는 것으로 보고되어지고 있다.^{19,20)} 반면 동맥경화증에서는 심근경색증이나 허혈성 심장질환의 원인이 되는 증상으로 염증반응의 특이적인 현상을 나타낸다. COX-2는 이러한 염증반응의 대표적인 효소로 염증이 나타나는 부위에 즉시 COX-2가 유도된다.²¹⁾ 사람의 동맥경화 부위의 내피세포나 근육세포와 대식세포에 COX-2 발현이 증가하는 것을 관찰하였고²²⁾ COX-2 저해제는 동맥경화를 지연시킨다는 결과도 보고되고 있다.²³⁾

에스트로겐의 효과는 역학조사에 의해서도 상반된 결과를 관찰할 수 있다. 즉 폐경기 이후의 여성에게서 호르몬 대체요법은 40~50%의 심장 위험요인을 감소시킬 수 있다는 관측적인 조사²⁴⁾나 13개의 조건화된 일차적, 이차적인 호르몬 대체요법 조사에서 더 악화된 경우는 1개의 연구이고 나머지는 증상이 호전되는 결과를 보여주었다.²⁵⁾ 그러나 일차적인 예방역학연구인 Women's Health Initiative (WHI) 연구^{26,27)}에서 16,608명의 여성이 호르몬 대체요법이나 placebo를 투여 받았는데 5.2년간 수행한 결과 전체적인 이익을 주는 면보다 해를 주는 결과가 더 많이 나와 이 연구를 중단하게 되었으며 호르몬 대체요법을 투여 받은 군에서 심장병 발병율과 유방암의 증가가 현저히 높은 것으로 나타나 호르몬 대체요법이 심장병을 예방하는 효과를 나타내지 않는 것으로 결론을 내렸으며 호르몬 대체요법은 폐경기이후 10~15년이 지난 경우 득이 되지 않고 해를 끼치는 것으로 해석하였다.²⁸⁾ 이와 같이 es-

trogen의 투여는 다양한 결과를 나타내고 있고 estrogen 자체가 실험조건에 따라 anti-inflammatory agent로 작용하기도 하고 pro-inflammatory agent로도 기능을 수행할 수 있다고 알려져 있다.²⁹⁾

Apoptosis 즉 programmed cell death는 동맥경화의 병리생리적인 과정에서의 주요부분을 차지하고 있다.^{30,31)} Apoptosis는 동맥경화 진행과정에서 활발하게 일어날 경우 동맥경화 플라그형성을 저해한다는 보고도 있고³²⁾ 동맥경화에 의한 심장마비의 경우 apoptosis는 해로운 영향을 미친다는 결과도 있다.^{30,31)}

본 연구는 동맥경화증, 염증반응에서의 estrogen의 작용을 밝혀내기 위한 기초 자료를 제공하기 위하여 성숙한 쥐에서 estrogen을 세 가지 농도로 투여하고 난소 절제를 통하여 폐경이 유도된 쥐에서 estrogen을 투여하여 심장 조직에서의 inflammatory marker인 COX-2의 발현, mapkinases의 발현과 혈청 prostaglandin의 농도의 변화 및 동맥경화와 연관성을 가지는 apoptotic 인자들인 bax와 bcl-2의 변화를 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 사육조건

Experiment A에서는 Sprague-Dawley 중 48주령의 암컷 쥐 (대한 바이오링크)를 사용하였는데 일반적으로 48주령의 중년기 암쥐는 estrogen농도가 월등히 낮아진 것으로 보고되고 있다.³³⁾ 실험쥐는 실험시작 전 고품사료 (제일사료)로 3일간 적응시킨 후 난과법으로 각 군당 7마리씩 4군으로 나누어 4주간 사육하였다. 사육 조건은 온도 22±2℃, 습도 55±5℃, 명암주시 12시간으로 유지하였다. Experiment B에서는 8주령의 Sprague-Dawley 암컷 쥐를 구입하여 일주일간 제일사료를 섭취시킨 후 난소 절제수술이나 sham-operation을 시행하여 난소절제 효과가 나타나기 위하여 3주간 사육한 후 각각 사료를 8주간 섭취시켰다. 다른 조건은 Experiment A와 동일하다.

2. 실험 식이의 조성

식은 고지방 (120 g lard/kg diet) · 고콜레스테롤 (1 g/kg diet) 식이를 기초 식이로 하였다. Experiment A는 대조군에 고지방 · 고콜레스테롤 식이를 투여하고 실험 군에는 기초식이에 estrogen은 저, 중, 고 수준의 세 가지로 조정하였는데 각각 300 µg, 600 µg과 1,200 µg의 17β-estradiol (Sigma Co, Mo, USA)이 포함되도록 식이를 구성하였다 (Table 1). 식이 kg당 300 µg은 저 수준으로

Table 1. The groups of experimental rats and the composition of the experimental diet. The basal diet was high fat (120 g lard/kg diet) and high cholesterol 1 g/kg diet¹⁾

Groups	Diet
1. Control	basal diet
2. Low estrogen supplemented	basal diet + 17 β -estradiol (300 μ g/kg)
3. Medium estrogen supplemented	basal diet + 17 β -estradiol (600 μ g/kg)
4. High estrogen supplemented	basal diet + 17 β -estradiol (1,200 μ g/kg)

1) High-fat and high-cholesterol diet contains Corn starch 438 g; sucrose 100 g; soybean oil 41 g; lard 120 g; cholesterol 1 g; casein, 200 g; L-cysteine, 3.0 g; α -cellulose, 50 g; choline bitartrate, 2.5 g; tert-butylhydroquinone, 0.014 g; AIN 93G salt mix²⁾, 35.0 g; AIN 93G vitamin mix³⁾ 10.0 g/kg.

2) AIN 93G salt mix (g/kg): calcium carbonate, 357.0; potassium phosphate monobasic, 196.0; potassium citrate, 70.78; sodium chloride, 74.0; potassium sulfate, 46.6; magnesium oxide, 24.4; ferric citrate, 6.08; zinc carbonate, 1.65; manganous carbonate, 0.63; cupric carbonate, 0.3; potassium iodate, 0.01; sodium selenate, 0.01025; ammonium paramolybdate, 0.00795; chromium potassium sulfate, 0.275; sodium meta-silicate, 1.45; powdered sucrose, 221.2268

3) AIN 93G vitamin mix (g/kg): nicotinic acid, 3.0; calcium pantothenate, 1.6; pyridoxine hydrochloride, 0.7; thiamin hydrochloride, 0.6; riboflavin, 0.6; D-biotin, 0.02; folic acid, 0.2; vitamin B₁₂, 0.025; α -tocopherol acetate, 15.0; retinyl acetate, 0.8; vitamin D₃, 0.25; vitamin K, 0.075; powdered sucrose, 974.655

Table 2. The groups of experimental rats and the composition of the experimental diet. The basal diet was high fat (120 g lard/kg diet) and high cholesterol 1 g/kg diet¹⁾

Groups	Diet
1. Control (sham-operated)	basal diet
2. Control (ovariectomized)	basal diet
3. Ovariectomized estrogen supplemented	basal diet + 17 β -estradiol (600 μ g/kg)

1) High-fat and high-cholesterol diet contains Corn starch 438 g; sucrose 100 g; soybean oil 41 g; lard 120 g; cholesterol 1 g; casein, 200 g; L-cysteine, 3.0 g; α -cellulose, 50 g; choline bitartrate, 2.5 g; tert-butylhydroquinone, 0.014 g; AIN 93G salt mix²⁾, 35.0 g; AIN 93G vitamin mix³⁾ 10.0 g/kg.

2) AIN 93G salt mix (g/kg): calcium carbonate, 357.0; potassium phosphate monobasic, 196.0; potassium citrate, 70.78; sodium chloride, 74.0; potassium sulfate, 46.6; magnesium oxide, 24.4; ferric citrate, 6.08; zinc carbonate, 1.65; manganous carbonate, 0.63; cupric carbonate, 0.3; potassium iodate, 0.01; sodium selenate, 0.01025; ammonium paramolybdate, 0.00795; chromium potassium sulfate, 0.275; sodium meta-silicate, 1.45; powdered sucrose, 221.2268

3) AIN 93G vitamin mix (g/kg): nicotinic acid, 3.0; calcium pantothenate, 1.6; pyridoxine hydrochloride, 0.7; thiamin hydrochloride, 0.6; riboflavin, 0.6; D-biotin, 0.02; folic acid, 0.2; vitamin B₁₂, 0.025; α -tocopherol acetate, 15.0; retinyl acetate, 0.8; vitamin D₃, 0.25; vitamin K, 0.075; powdered sucrose, 974.655

간주되며 이에 2배와 4배를 첨가한 것을 중, 고 농도로 조정하였다. Experiment B에서는 sham-operated 대조군과 난소절제 대조군에는 기초식을 estrogen군은 600 μ g의 17 β -estradiol이 함유되도록 하였다 (Table 2). 식이에 사용되는 corn starch (우리승진식품), sucrose (삼양사), casein (New Zealand Dairy Board, Wellington, New Zealand), soybean oil (동방유량), powdered sugar (신광식품산업사)를 사용하였고 cholesterol, cellulose, choline bitartrate, tert-butylhydroquinone, vitamin B₁₂, α -tocopherol acetate, retinol palmitate, vitamin D₃, vitamin K₁은 Sigma 제품을 사용하였으며, 이외의 시약은 국산 및 일본의 Junsei사의 시약을 사용하였다.

3. 혈액과 장기 채취 및 생화학 분석

실험 종료 전 12시간을 절식시킨 후, ethyl ether로 마취한 후 개복하였다. 주사기로 심장혈을 채취하여 3시간동안 실온에 방치한 후 2,700 \times g, 10분간 원심분리하여 혈장을 얻어 냉동보관 (-80 $^{\circ}$ C)하였다. 심장은 혈액을 채취한 후 분리하여 생리식염수 (0.9% NaCl)로 세척하여 여

지로 수분을 제거한 다음 무게를 측정하고 일부를 액체질소에 급속 동결시켜 -80 $^{\circ}$ C 냉동고에 보관하였다.

액체 질소를 이용하여 급속 냉동시킨 조직에 균질완충액 (PRO-PREPTM protein extraction solution, Intron Biotechnology, 17081)을 10~20 mg/600 μ l 비율로 넣어 균질화시켰다. 균질화한 후 실온에서 30분 방치한 후 원심분리를 이용하여 원심 분리 한 후 상층액을 얻은 후 Western blot 분석을 실시하였다. Western blot 분석을 위한 단백질 농도 측정은 Bradford's method를 이용하였고, ELISA (SpectraMAX 340pc, Molecular Devices)를 이용하여 562 nm에서 흡광도를 측정 단백질 농도를 환산하였다.

Western blot 분석법을 이용하여 COX-2, mapkinases, bcl-2, bax 단백질의 발현량을 측정하였다. 동일한 단백질 양의 대조군과 실험군시료에 5 \times sample buffer를 첨가하여 99 $^{\circ}$ C, 5분간 가열함 다음 12% SDS-PAGE gel에서 전기영동 (200 v, 2 hr)하였다. 전기영동 후 gel의 단백질을 membrane (HybondTM-ECLTM Nitrocellulose mem-

brane, RPN303D, Amersham, Mass, USA)에 electrotransfer (in electrotransfer buffer, 300A, 2 hr)하여 단백질을 이동시키고 blocking buffer (5% fat-free dry milk-PBST buffer containing 0.1% tween-20)로 두시간 동안 blocking 하였다. Primary antibody (Rabbit anti β -actin antibody, 1 : 2000, Goat anti COX-2 antibody, 1 : 1000, Mouse anti pERK, pJNK, pp38 antibody antibody 1 : 1000, Rabbit anti bcl-2 and bax, 1 : 1000 dilution, Santa Cruz Biotech, USA)는 상온에서 두시간 동안 반응시켰고, PBST로 15분간 4회 세척하였다. Secondary antibody (Goat anti rabbit IG JRP conjugate, 1 : 1000, Rabbit anti Goat IG HRP conjugate, 1 : 5000, Rabbit anti mouse IG HRP conjugate, 1 : 2500 dilution, Santa Cruz Biotech, USA)를 상온에서 한 시간 동안 반응시키고 다시 15분간 4회 세척하였다. ECL (enhanced chemiluminescence) detection reagent A (substrate): B (enhancer) = 1 : 1로 혼합한 용액에 1분간 반응시켰다. 암실에서 membrane에 film (Scientific Imaging Film, Kodak, USA)을 얹고 1분 방치후 Developer (Vivd, USA), H₂O, Fixer (Vivd, USA)순으로 film을 담근 후 건조시켜 단백질의 발현량을 측정하였다. Western blot 분석법에 나타난 band들은 densitometer를 이용하여 표시하였다.

혈장의 PGE₂농도는 효소면역법kit (Amersham Pharmacia Biotech, UK)를 사용하여 측정하였다.

4. 자료처리 및 분석

PGE₂ 실험결과는 SPSS를 이용하여 통계처리를 하였다. 각 군의 유의차 검정은 One-way ANOVA분석을 한 후 Duncan 방법으로 사후 검정을 하였으며 p < 0.05수준에서 통계적 유의성을 평가하였다.

결 과

1. Experiment A

48주령의 성숙한 쥐에서 저, 중, 고 농도의 estrogen을 투여하여 심장조직의 COX-2의 발현을 살펴보면 저 농도의 estrogen 투여시 COX-2 발현이 대조군에 비하여 약간 감소를 보여주었고 중간 농도 및 고 농도의 estrogen 투여시 대조군에 비하여 COX-2 발현이 증가하는 경향을 보여 이 연령에서는 고농도 (1200 μ g/kg)의 estrogen 투여에 의하여 COX-2 단백질 양이 증가함을 관찰할 수 있다 (Fig. 1). 이러한 COX-2발현과 mapkinases의 발현과의 연관성에 대하여 살펴본 결과 pERK1/2는 COX-2

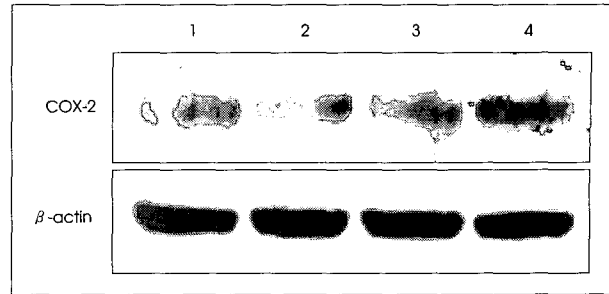


Fig. 1. Expression of COX-2 after three different levels of estrogen treatments in mature female rats. Rats were treated with basal diet, low estrogen (300 μ g/kg), medium estrogen (600 μ g/kg) and high estrogen (1200 μ g) for four weeks. Heart tissues were collected and lysates were prepared, subjected to electrophoresis on 7% SDS-PAGE, Western-blotted, and visualized with ECL detection kit described in Materials and Methods. Lane 1. Control, lane 2. low estrogen treated, lane 3. medium estrogen treated and lane 4. high estrogen treated respectively as described in Materials and Methods.

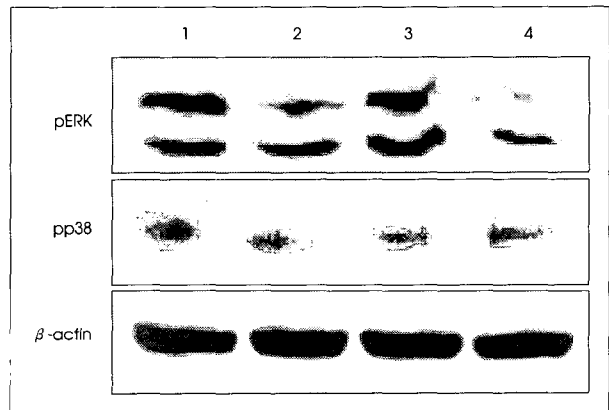


Fig. 2. Expression of pERK (top) and pp38 (bottom) after three different levels of estrogen treatments in mature female rats. Rats were treated with basal diet, low estrogen (300 μ g/kg), medium estrogen (600 μ g/kg) and high estrogen (1200 μ g) for four weeks. Heart tissues were collected and lysates were prepared, subjected to electrophoresis on 7% SDS-PAGE, Western-blotted, and visualized with ECL detection kit described in Materials and Methods. Lane 1. Control, lane 2. low estrogen treated, lane 3. medium estrogen treated and lane 4. high estrogen treated respectively as described in Materials and Methods.

와 관련이 없는 것으로 나타났고 phospho-p38의 경우 약간의 연관성이 보이는 것으로 나타났다 (Fig. 2). COX-2의 산물중의 하나인 혈장 PGE₂의 농도를 측정하여본 결과 높은 농도의 estrogen 투여군이 높은 농도를 나타내었고 나머지 군들은 차이를 보이지 않았다 (Fig. 3). Estrogen에 의한 혈장 PGE₂의 농도는 estrogen 높은 농도군에서 가장 높게 나타나 높은 농도에서는 COX-2 발현과 유사한 경향을 보이었고 저 농도와 중간 농도에서 PGE₂ 농도가 낮으나 estrogen 농도에 따른 경향은 보이지 않아 COX-2 발현과 다른 점을 보였다. 심장마비에 관여하는 apoptosis과정³⁰⁾에서 역할을 수행하는 bcl-2와 bax의 발

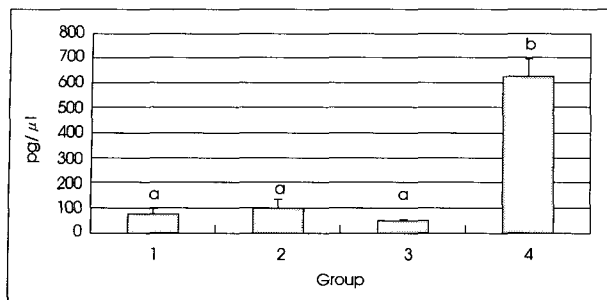


Fig. 3. The concentrations of plasma PGE₂ after three different levels of estrogen treatments in mature female rats. Rats were treated with basal diet, low estrogen (300 μg/kg), medium estrogen (600 μg/kg) and high estrogen (1200 μg) for four weeks. PGE₂ was determined with an enzyme-immunoassay kit (Amersham Pharmacia Biotech, UK). Lane 1. Control, lane 2. low estrogen treated, lane 3. medium estrogen treated and lane 4. high estrogen treated respectively as described in Materials and Methods. Lane 4 was significantly different from 1,2,3 at *p* < 0.05 by ANOVA test.

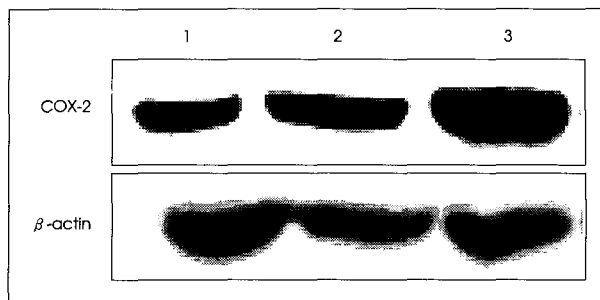


Fig. 5. Expression of COX-2 after estrogen treatments in ovariectomized female rats. Rats were treated with basal diet (sham-operated), basal diet (ovariectomized) and estrogen (600 μg/kg) for six weeks. Heart tissues were collected and lysates were prepared, subjected to electrophoresis on 7% SDS-PAGE, Western-blotted, and visualized with ECL detection kit described in Materials and Methods. Lane 1. Control (sham-operated), lane 2. Control (ovariectomized), lane 3. Estrogen (600 μg/kg; ovariectomized) treated respectively as described in Materials and Methods.

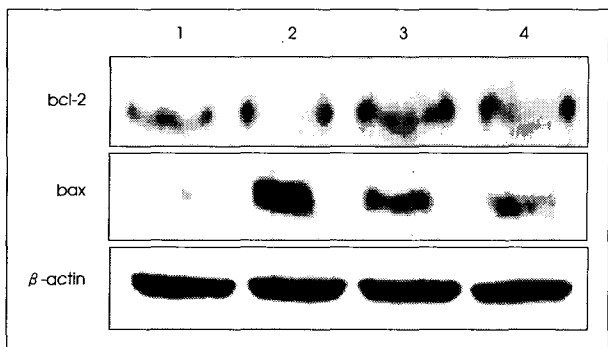


Fig. 4. Expression of bcl-2 (top) and bax (bottom) after three different levels of estrogen treatments in mature female rats. Rats were treated with basal diet, low estrogen (300 μg/kg), medium estrogen (600 μg/kg) and high estrogen (1200 μg) for four weeks. Heart tissues were collected and lysates were prepared, subjected to electrophoresis on 7% SDS-PAGE, Western-blotted, and visualized with ECL detection kit described in Materials and Methods. Lane 1. Control, lane 2. low estrogen treated, lane 3. medium estrogen treated and lane 4. high estrogen treated respectively as described in Materials and Methods.

현이 COX-2의 발현과 어떠한 관련을 가지는지 밝혀내기 위하여 bcl-2와 bax의 발현을 관찰한 결과 심장에서 bcl-2와 bax의 발현은 estrogen 농도에 따라 차이를 보여주었는데 bcl-2는 estrogen의 중간 농도로 투여한 경우 가장 높았고 bax는 estrogen 투여에 의하여 증가하는데 저 농도에서 가장 높고, 다음 중간 농도, 높은 농도에서 낮게 나타났다 (Fig. 4).

2. Experiment B

성숙한 쥐에서의 estrogen투여와 난소절제된 쥐에서의 estrogen 투여가 COX-2의 변화에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 Experiment B에서는 난소절제술을 시행하여 estrogen을 투여하였다. 난소절제된 쥐에서의 estrogen

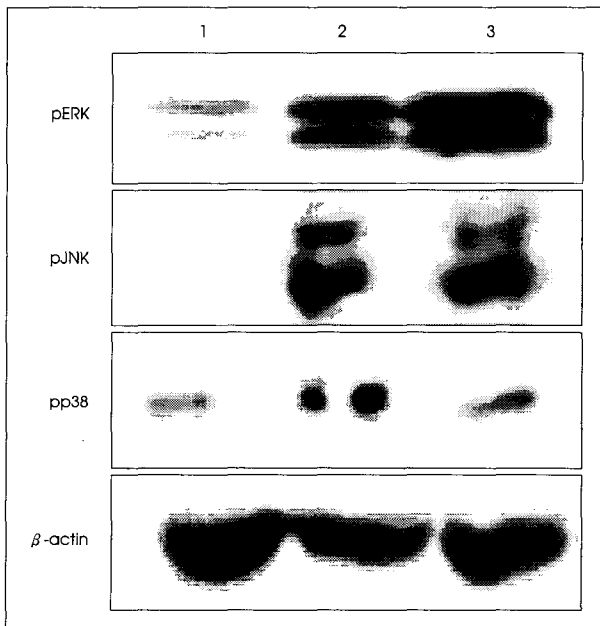


Fig. 6. Expression of pERK (top), pJNK (middle) and pp38 (bottom) after estrogen treatments in ovariectomized female rats. Rats were treated with basal diet (sham-operated), basal diet (ovariectomized) and estrogen (600 μg/kg) for six weeks. Heart tissues were collected and lysates were prepared, subjected to electrophoresis on 7% SDS-PAGE, Western-blotted, and visualized with ECL detection kit described in Materials and Methods. Lane 1. Control (sham-operated), lane 2. Control (ovariectomized), lane 3. Estrogen (600 μg/kg; ovariectomized) treated respectively as described in Materials and Methods.

투여는 COX-2의 발현을 증가시켰고 난소절제된 대조군과 sham-operated 대조군간에 차이를 보이지 않아 endogenous estrogen보다는 외부에서 첨가하는 estrogen에 더 민감한 반응을 보이는 것을 알 수 있었다 (Fig. 5). 이러한 COX-2의 증가는 pERK의 증가와 관련을 가지는 것으로 보이며 pJNK나 pp38과는 연관성을 보이지 않았다

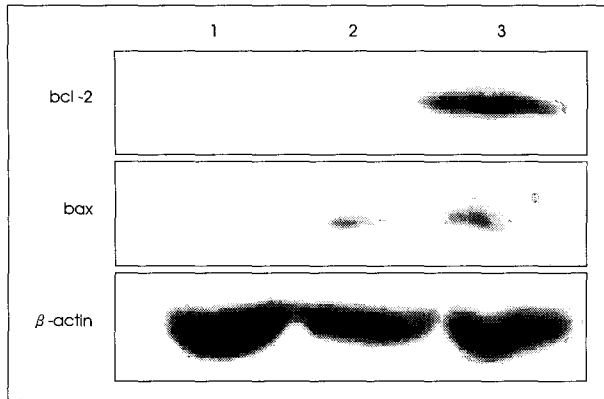


Fig. 7. Expression of bcl-2 (top) and bax (bottom) after estrogen treatments in ovariectomized female rats. Rats were treated with basal diet (sham-operated), basal diet (ovariectomized) and estrogen (600 μ g/kg) for six weeks. Heart tissues were collected and lysates were prepared, subjected to electrophoresis on 7% SDS-PAGE, Western-blotted, and visualized with ECL detection kit described in Materials and Methods. Lane 1. Control (sham-operated), lane 2. Control (ovariectomized), lane 3. Estrogen (600 μ g/kg; ovariectomized) treated respectively as described in Materials and Methods.

(Fig. 6). 난소절제 쥐에서의 estrogen투여에 의하여 bcl-2와 bax가 증가하는 것으로 나타났다 (Fig. 7).

고 찰

본 연구는 성숙한 쥐에서의 세가지 수준의 estrogen을 투여하였을 때와 난소절제쥐에 estrogen을 투여하였을 때의 심장 (성숙한 쥐의)에서의 COX-2 발현의 변화를 관찰하였다. 성숙한 쥐에서의 COX-2의 발현은 estrogen을 저 농도로 투여할 경우 감소하다가 그 이상의 농도에서는 오히려 증가하는 것을 보여주었으며 PGE₂의 경우는 고 농도에서 가장 높고 estrogen농도가 낮은 경우 PGE₂ 농도가 감소하여 대조군과 비슷한 경향을 보여주었다. 난소절제된 쥐에서의 estrogen 투여는 COX-2의 증가를 보였으며 이는 최근 이론에서 주장하고 있는 COX-2의 증가 및 PGE₂의 증가는 COX-2 derived prostanoid에 의한 동맥경화 완화효과가 가능하다는 것을 시사해준다고 볼 수 있다. 본 연구에서는 estrogen 투여시 폐경 전 시기나 폐경 직후 시기에 estrogen 투여에 의하여 심장의 COX-2 증가를 가져다주고 PGE₂ 농도도 상승시킴으로 동맥경화 완화효과를 두 경우 다 나타낼 수 있다고 추론할 수 있고 충분한 효력을 발생하기 위하여서는 estrogen이 저 농도만으로는 부족한 것으로 보여진다. 그러나 sham-operated대조군이나 난소절제에 의하여 endogenous estrogen의 농도의 차이가 나타남에도 불구하고 COX-2 발현은 차이를 보이지 않았고 이는 외부에서 첨가하는 경우가 endogenous es-

trogen의 경우가 다른 것을 나타내주며 COX-2가 외부에서 첨가하는 estrogen에 민감한 이유는 불명확하다. 생체에는 estrogen은 혈관내피세포, 평활근세포 및 vascular stromal 세포나 leukocyte 여러 종류의 생리적 역할을 조절하는 물질로 알려져 있다.³⁴⁾ 따라서 estrogen은 동맥경화증과 같은 염증반응의 주요 조절물질로 작용할 가능성이 높다고 볼 수 있다.³⁵⁾ Estrogen은 단기간, 대상자수가 적은 연구에서는 항염증작용을 하는 것으로 보고되고 있으나³⁶⁾ WHI 연구에서처럼 폐경기가 훨씬 지난 경우 estrogen이 proinflammatory agent로 작용하는 것으로 나타났다.²⁷⁾ 이러한 estrogen의 상반된 결과는 estrogen에 의한 염증 반응 조절작용이 폐경 후 시간이 경과함에 따라 변화되며 이는 estrogen receptor의 감소와 연관성을 가지리라는 이론도 대두되고 있다.³⁷⁾ 높은 농도의 estrogen 투여시 PGE₂의 증가함을 보여준 결과는 estrogen 존재하에서 COX-2의 조절작용에 의하여 prostaglandin의 합성이 증가하며 이들 중 일부, 특히 prostacyclin I₂는 암컷 쥐에서의 oxidant stress와 platelet activation을 억제하여 동맥경화진행을 억제한다는 관찰과 연관성이 있는 것으로 보인다.⁹⁾ 그러나 반면 동맥경화증 동물모델에서는 동맥경화부위에 COX-2 발현이 증가되어 있으며 thromboxane 등의 prostaglandin합성을 촉진하여 세포 adhesion과 증식을 촉진시켜 동맥경화가 악화된다는 실험결과도 보고되고 있다.^{22,23)}

여성에게서의 가입기동안은 고혈압, 동맥경화, 심장마비의 발생빈도나 심장마비이후의 심장세포의 회복 등에서 폐경기 여성이나 남성과의 차이³⁸⁾를 보여주는데 이는 estrogen이 genomic 또는 non-genomic 또는 genomic경로를 통하여 효과를 나타내는 것³⁹⁾으로 보이는데 이들 두 경로의 경우 모두 세포막에 존재하는 estrogen receptor alpha⁴⁰⁾ 및 beta⁴¹⁾에 의하여 세포가 자극을 받게 되는데 이들 receptor는 내피세포나 평활근세포 등의 혈관조직에 모두 다 존재한다.^{42,43)} ER α 가 estrogen의 혈관보호작용에 관여하는 것으로 보이는데 ER α 가 결핍된 남자환자에게서 혈관작용이나 동맥경화증의 조기징후를 보여주는 것과 ER α 가 완전히 결핍된 쥐에서의 estrogen의 작용불응 등의 현상⁴⁴⁻⁴⁷⁾에서 ER α 의 중요성을 발견할 수 있다. ER β 의 경우도 약간의 불응작용을 나타내나 ER α 만큼 결정적인 작용을 수행하는 것으로는 보이지 않았다.⁴⁷⁾ Estrogen은 receptor의 자극에 의하여 steroid response elements가 생성되며 이는 target genes의 promoter 부위를 자극하는 것으로 보인다.⁴⁸⁾ Estrogen의 non-genomic regulation은 ER α 의 자극에 의한 PI3kinase의 활성화에 따른 eNOS 등의 효소의 활성화과정⁴⁹⁾이 주목을 받고 있

다.⁴⁹⁾ Estrogen이 ER α 를 자극하여 COX-2의 생성을 촉진시켜 PGI₂ 생성이 증가되어 혈관이완 등의 estrogen의 항 동맥경화 효과가 발생한다는 실험적 증거⁵⁰⁾로 비추어 보면 COX-2 생성 촉진은 ER α 자극과 관련이 많은 것을 알 수 있다. 본 연구에서 나타난 COX-2 발현의 증가와 ER α receptor 자극과의 연관성 여부에 대하여서는 앞으로 연구가 수행되어야 밝혀낼 수 있다고 사료된다.

COX-2의 발현은 많은 종류의 mapkinases와 transcription factors에 의하여 조절되는데⁵⁰⁾ 세포의 자극을 세포내부로 전달하는 신호전달경로인 mapkinases cascades를 통해 세포내의 반응이 유도된다.⁵¹⁻⁵⁴⁾ 많은 종류의 세포에서 mapkinases의 superfamilies인 ERK (p44/42 extracellular signal-regulated kinase), JNK (c-Jun N-terminal kinase) 및 p38 등 존재한다.⁵¹⁻⁵⁵⁾ 성숙한 쥐의 심장에서 estrogen 투여시 나타나는 COX-2 발현증가는 mapkinases중 p38과 연관이 있는 것으로 나타났고 난소 절제된 쥐에 estrogen을 투여한 경우의 COX-2 발현증가는 ERK와 연관성을 나타내었다. 심장에서의 COX-2 발현은 p38 mapkinase에 의하여 유도되며 이는 MAP kinase kinase 6에 의하여 유도된다는 실험적 증거는 Rubin group의 transgenic mice를 사용한 *in vivo* 실험과 cultured myocyte를 이용한 *in vitro* 연구에서 밝혀졌다.⁵⁶⁾ 그러나 조직종류나 조건을 달리할 때에 COX-2는 p38, pERK, pJNK와도 연관성을 가지는 것으로 나타났다.⁵⁷⁻⁵⁹⁾

Apoptosis 즉 programmed cell death는 동맥경화의 병리생리적인 과정에서의 주요부분을 차지하고 있다.^{30,31)} 심장세포의 apoptosis과정에서 중요한 역할을 하는 단백질은 bcl-2이며 심장세포가 산소부족에 의하여 사멸하게 되면 bcl-2의 양이 급격히 줄어들어 세포를 유지할 능력이 부족하여지는 것으로 보고되고 있다.⁶⁰⁾ 본 연구에서 estrogen이 성숙한 쥐 (중간 수준 농도에서)에게서나 난소절제된 쥐에서 둘 다 bcl-2를 증가시킴을 보여주었다. 다른 estrogen 농도에서는 이러한 경향을 보이지 않았고 bax의 조절은 저 농도의 estrogen 투여에 의하여 증가되었다. Bax의 발현의 경우 성숙한 쥐에서 estrogen 투여하지 않은 대조군보다 저 농도에서 급격히 상승하고 고 농도에서는 다시 감소하는 포물선의 양상을 보이는데 이는 외부에서 가하는 estrogen에 의하여 apoptosis가 유도된다는 발표⁶¹⁾에 비추어 볼 때에 apoptosis에 예민한 것으로 보이나 저 농도의 estrogen에 더 민감한 이유는 불분명하다. COX-2의 증가는 bcl-2나 bax 발현과 연관성을 가진다는 연구⁶²⁾와 비교하여 보면 본 연구에서의 estrogen에 의한 COX-2의 증가는 성숙한 쥐에서는 bax의 경우 COX-2

와 연관성을 보여주며 난소절제된 쥐에서는 bcl-2 증가와 관련성을 가지는 것으로 나타났다.

본연구에서는 estrogen 투여시 폐경전 시기나 폐경직 후 시기에 estrogen 투여에 의하여 심장의 COX-2증가를 가져다주거나 PGE₂ 농도도 상승시킴으로 동맥경화완화효과를 두 경우 다 나타낼 수 있다고 추론할 수 있으나 WHI 연구²⁷⁾에서의 estrogen 보충은 일부 암 발생을 촉진할 수 있다는 위험성을 제시하고 있고 또한 estrogen에 의한 COX-2가 심장이외의 다른 기관에서도 발현증가효과를 가져다 줄 수 있다면 COX-2와의 일부 암과의 밀접한 관계^{63,64)}를 고려하여 볼 때에 estrogen 보충은 바람직하지 않다고 할 수 있으나 estrogen이 COX-2에 민감한 기관인 유방, 대장, 전립선 등에서도 COX-2의 발현을 증가하는가에 대한 검토가 필요하리라 사료된다.

요약 및 결론

관상심혈관질환의 발병률은 폐경 전에는 성별에 따라 차이를 보이고 있고 폐경이후 급격히 증가하는 양상을 보여 준다. Estrogen은 실험동물모델에서 동맥경화를 억제할 수 있고 고지혈증을 가진 여성에게서 혈관기능을 향상시키는 역할을 하는 것으로 나타났으나 최근 WHI연구²⁷⁾에서의 estrogen 보충은 심혈관질환을 악화시킬 수 있다는 역학 조사결과에 의하면 estrogen 보충의 효과에 대한 의문이 대두되게 된다. 본 연구에서는 estrogen의 역할을 밝혀내기 위하여 성숙한 암쥐에 세 가지 수준의 estrogen을 투여하고 난소절제된 쥐에 estrogen을 투여하여 심혈관에서 중요한 cyclooxygenase-2의 변화를 비교하고자 하였다. 고지방·고콜레스테롤식을 투여한 48주령의 암쥐에 세 가지 수준 (300, 600, 1200 μ g/kg 식이)의 estrogen을 투여하여 심장조직에서의 COX-2, mapkinases, PGE₂ 및 bcl-2, bax의 변화를 관찰하였다. 높은 수준의 estrogen은 심장조직의 COX-2 발현을 증가시켰으며 이는 mapkinases중 p38과 연관성이 가지는 것으로 나타났으며 COX-2 발현의 증가는 혈장에서의 PGE₂ 농도의 증가를 수반하였다. Apoptosis에 관련된 인자인 bcl-2와 bax의 발현도 측정하여본 결과 bcl-2는 중간정도에서 성숙한 쥐나 난소절제된 쥐에서 증가를 가져왔고 bax가 estrogen에 의하여 저 농도에서는 발현의 증가를 가져왔고 estrogen 농도가 증가함에 따라 COX-2와 달리 감소하는 경향을 보였다.

폐경을 유도한 후 estrogen을 투여하여 어떠한 현상을 보이는가 알아 보기위하여 sham-operated 한 대조군과 난소절제된 대조군 이외에 난소절제된 군에게 중간 농도의

estrogen을 투여하여 COX-2 발현을 살펴보았다. 난소절제된 쥐에 estrogen을 투여하였을 때 심장에서 sham-operated 및 난소절제된 대조군에 비하여 COX-2 발현의 현저한 증가를 가져왔다. COX-2의 발현의 증가는 ERK1/2와 관련이 있는 것으로 나타났으며 bcl-2와 bax 두개의 apoptotic marker의 발현의 증 bax가 estrogen 투여가 상관관계를 가지는 것으로 나타났다. 본 연구에서는 estrogen 투여시 폐경전 시기나 폐경직 후 시기에 estrogen 투여에 의하여 심장의 COX-2증가를 가져다주거나 PGE₂ 농도도 상승시킴으로 동맥경화완화효과를 두 경우 다 나타낼 수 있다고 추론할 수 있고 충분한 효력을 발생하기 위하여서는 estrogen을 600 µg/kg정도 수준으로 공급하여야 한다고 할 수 있다.

Literature cited

- 1) Barrett-Connor E, Bush TL. Estrogen and the coronary heart disease in women. *J Am Med Assoc* 265: 1861-1867, 1991
- 2) Knopp RH, Zhu X, Bonet B. Effects of estrogens in lipoprotein metabolism and cardiovascular disease in women. *Atherosclerosis* 110: S83-S91, 1994
- 3) Stampfer MJ, Colditz GA. Estrogen replacement therapy and coronary heart disease: a quantitative assessment of the epidemiologic evidence. *Prev Med* 20: 47-63, 1991
- 4) Mikkola TS, Clarkson TB. Estrogen replacement therapy, atherosclerosis and vascular function. *Cardiovasc Res* 53: 605-619, 2002
- 5) Knopp RH, Zuh X, Bonet B. Effects of estrogens in lipoprotein metabolism and cardiovascular disease in women. *Atherosclerosis* 110: S83-S91, 1994
- 6) Koh KK. Vascular effects of estrogen and vitamin E therapies in postmenopausal women. *Circulation* 100: 717-722, 1999
- 7) Squadrito F, Altavilla D, Squadrito G, Saitta A, Cucinotta D, Minutoli L, Deodato B, Ferlito M, Campo GM, Bova A, Caputi AP. Genistein supplementation and estrogen replacement therapy improve endothelial dysfunction induced by ovariectomy in rats. *Cadiovas Res* 45: 454-462, 2000
- 8) Kannel WB, Hjortland MC, McNamara PM, Gordon T. Menopause and risk of cardiovascular disease: the Framingham study. *Ann Intern Med* 85: 447-452, 1976
- 9) Egan KM, Lawson JA, Fries S, Koller B, Rader DJ, Smyth EM, Fitzgerald GA. COX-2 derived prostacyclin confers atheroprotection on female mice. *Science* 306: 1954-1957, 2004
- 10) Hla T, Neilson K. Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Pro Natl Acad Sci USA* 89: 7384-7388, 1992
- 11) Caughey GE, Cleland LG, Penglis PS, Gamble JR, Janes MJ. Roles of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in prostanoid production by human endothelial cells: selective up-regulation of prostacyclin synthesis by COX-2. *J Immunol* 167: 28231-28238, 2001
- 12) Ghanam K, Lavagna C, Burgaud J-L, Javellaud J, Ea-Kim L, Oudart N. Involvement of cyclooxygenase 2 in the protective effect of 17 β-estradiol in hypercholesterolemic rabbit aorta. *Biochem Biophys Resear Comm* 275: 696-703, 2000
- 13) Hyslop S, De Nucci G. Prostaglandin biosynthesis in the microcirculation: regulation by endothelial and non-endothelial factors. *Leukotrienes Essent Fatty Acids* 49: 723-760, 1993
- 14) Ge T, Hughes H, Junquero DC, Wu KK, Vanhoutte PM, Boulanger CM. Endothelium-dependent contractions are associated with both augmented expression of prostaglandin H synthase-1 and hypersensitivity to prostaglandin H₂ in the SHR aorta. *Cir Res* 76: 1003-1010, 1995
- 15) Dyer SM, Taylor DA, Bexis S, Hime NJ, Frewin DB, Head RJ. Identification of a non-endothelial cell thromboxane-like constrictor response and its interaction with the renin-angiotensin system in the aorta of spontaneously hypertensive rats. *J Vasc Res* 31: 5-60, 1994
- 16) Wong E, Huang J, Tagari P, Riendeau D. Effects of COX-2 inhibitors on aortic prostacyclin production in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 157: 393-402, 2001
- 17) Smith WL. Prostaglandin synthesis and its compartmentation in vascular muscle and endothelial cells. *Ann Rev Physiol* 48: 251-262, 1986
- 18) Bishop-Bailey D, Pepper JR, Larkin SW, Mitchell JA. Differential induction of cyclooxygenase-2 in human arterial and venous smooth muscle. Role of endogenous prostanoids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18: 1655-1661, 1998
- 19) Asano H, Shimizu K, Muramatsu M, Iwama Y, Toki Y, Miyazaki Y, Okumura K, Hashimoto H, Ito T. Prostaglandin H₂ as an endothelium-derived contracting factor modulates endothelin-1-induced contraction. *J Hyperten* 12: 383-390, 1994
- 20) Dyer SM, Taylor DA, Bexis S, Hime NJ, Frewin DB, Head RJ. Identification of a non-endothelial cell thromboxane-like constrictor response and its interaction with the renin-angiotensin system in the aorta of spontaneously hypertensive rats. *J Vasc Res* 31: 5-60, 1994
- 21) Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Eng J Med* 340: 115-126, 1999
- 22) Schonbeck U, Sukhova GK, Graber P. Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. *Am J Physiol* 155: 1281-1291, 1999
- 23) Burleigh ME, Babev VR, Oates JA, Harris RC, Gautam S, Riendeau D, Marnett LJ, Morrow JD, Fazio S, Linton MF. Cyclooxygenase-2 promotes early atherosclerotic lesion formation in LDL receptor-deficient mice. *Circulation* 105: 1816-1823, 2002
- 24) Grodstein F. Postmenopausal estrogen and progestin use and the risk of cardiovascular disease. *N Engl J Med* 335: 453-461, 1996
- 25) Hodis HN, et al. Estrogen in the prevention of atherosclerosis. A randomized, double-blind placebo-controlled trial. *Arch Intern Med* 135: 939-953, 2001
- 26) Grodstein F, et al. Understanding the divergent data on postmenopausal hormone therapy. *N Engl J Med* 348: 645-650, 2003
- 27) Hully S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B, Vittinghoff. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention on coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study

- (HERS) research Group. *J Am Med Assoc* 280: 605-613, 1998
- 28) Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCorix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *J Am Med Assoc* 288: 321-333, 2002
 - 29) Cid MC, et al. Estradiol enhances leukocyte binding to tumor necrosis factor (TNF)-stimulated endothelial cells via an increase in TNF-induced adhesion molecules E-selectin, intercellular adhesion molecule type 1, and vascular cell adhesion molecule type 1. *J Clin Invest* 93: 17-25, 1994
 - 30) Rossig L, Kimmeler S, Zeiher AM. Apoptosis in the vascular wall and atherosclerosis. *Basic Res Cardiol* 96: 11-22, 2001
 - 31) Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 407: 233-241, 2000
 - 32) Liu J, Thewke DP, Su YR, Linton MF, Fazio S, Sinensky MS. Reduced macrophage apoptosis is associated with accelerated atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-null mice. *Arter Thromb Vasc Biol* Oct 21, 2004
 - 33) Jesmin S, Sakuma I, Hattori Y, Kitabatake A. *In vivo* estrogen manipulations on coronary capillary network and angiogenic molecule expression in middle-aged female rats. *Arter Thromb Vasc Biol* 22: 1591-1597, 2002
 - 34) Watanabe T, Miyahara Y, Masahiro A, Nakaoka T, Yamashita N, Iijima K, Kim H, Kozaki K and Ouch Y. Inhibitory effect of low-dose estrogen neointimal formation after balloon injury of rat carotid artery. *Eur J Pharmacol* 502: 265-270, 2004
 - 35) Nilsson S. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev* 81: 1535-1565, 2001
 - 36) Stork S, Schouw YT, Grobbee DE, Bots ML. Estrogen, inflammation and cardiovascular risk in women: a critical appraisal. *Trends Endocrinol Metabolism* 15: 66-72, 2004
 - 37) Karas RH, Clarkson TB. Considerations in interpreting the cardiovascular effects of hormone replacement therapy observed in the WHI: timing is everything. *Menopausal Med* 10: 8-11, 2003
 - 38) Huang A, Kaley G. Gender-specific regulation of cardiovascular function: estrogen as key player. *Microcirculation* 11: 9-38, 2004
 - 39) Simoncini T, Mannella P, Fornari L, Caruso A, Varone G, Genazzani AR. Genomic and non-genomic effects of estrogens on endothelial cells. *Steroids* 69: 537-542, 2004
 - 40) Green S, Walter P, Kumar V, Krust, Bormert JM, Argos P. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 320: 134-139, 1986
 - 41) Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 392: 49-53, 1996
 - 42) Venkov CD, Rankin AB, Vaughan DE. Identification of authentic estrogen receptor in cultured endothelial cells. A potential mechanism for steroid hormone regulation of endothelial function. *Circulation* 94: 727-733, 1994
 - 43) Karas RH, Patterson BL, Mendelsohn ME. Human vascular smooth muscle cells contain functional estrogen receptor. *Circulation* 89: 1943-195, 1994
 - 44) Sudhir K, Chou TM, Messina LM, Hutchison SJ, Korach KS, Chatterjee K. Endothelial dysfunction in a man with disruptive mutation in oestrogen-receptor gene. *Lancet* 349: 146-1147, 1997
 - 45) Sudhir K, Chou TM, Chatterjee K, Smith EP, Williams TC, Kane JP. Premature coronary artery disease associated with a disruptive mutation in the estrogen receptor gene in a man. *Circulation* 96: 3773-3777, 1997
 - 46) Pare G, Krust A, Karas RH, Dupont S, Aronovitz M, Chambon P. Estrogen receptor-alpha mediates the protective effects of estrogen against vascular injury. *Circ Res* 90: 1087-1092, 2002
 - 47) Zhu Y, Bian Z, Lu P, Karas RH, Bao L, Cox D. Abnormal vascular function and hypertension in mice deficient in estrogen receptor beta. *Science* 295: 505-508, 2002
 - 48) Truss M, Beato M. Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endocr Rev* 14: 459-479, 1993
 - 49) Simoncini T, Fornari L, Mannella P, Varone G, Caruso A, Liao JK, Genazzani AR. Novel non-transcriptional mechanisms for estrogen receptor signaling in the cardiovascular system. Interaction of estrogen receptor α with phosphatidylinositol 3-OH kinase. *Steroids* 67: 935-939, 2002
 - 50) Xie W, Herschman HR. Transcriptional regulation of prostaglandin synthase 2 gene expression by platelet-derived growth factor and serum. *J Biol Chem* 271: 31742-31748, 1996
 - 51) Guan Z, Buckman SY, Miller BW, Springer LD, Morrison AR. Interleukin-1 beta-induced cyclooxygenase-2 expression requires activation of both c-Jun NH₂-terminal kinase and p38 MARK signal pathways in rat renal mesangial cells. *J Biol Chem* 273: 28670-28676, 1998
 - 52) Whitmarsh AJ, Sharrocks AD, Davis RJ. Integration of MAP kinase signal transduction pathways at the serum response element. *Science* 269: 403-407, 1995
 - 53) Cobb MH, Goldsmith EJ. How MAP kinases are regulated. *J Biol Chem* 270: 14843-14846, 1995
 - 54) Xie W, Herschman HR. Transcriptional regulation of prostaglandin synthase 2 gene expression by platelet-derived growth factor and serum. *J Biol Chem* 271: 31742-31748, 1996
 - 55) Guan Z, Buchman SY, Miller BW, Springer LD, Morrison AR. Interleukin-1 beta-induced cyclooxygenase-2 expression requires activation of both c-Jun NH₂-terminal kinase and p38 MARK signal pathways in rat renal mesangial cells. *J Biol Chem* 273: 28670-28676, 1998
 - 56) Degousee N, Martindale J, Stefanski E, Cieslak M, Lindsay TF, Fish JE, Marsden PA, Threarauf DJ, Glembotski CC, Rubin BB. MAP kinase kinase 6-p38 MAP kinase signaling cascade regulates cyclooxygenase-2 expression in cardiac myocytes *in vitro* and *in vivo*. *Circ Res* 92: 757-764, 2003
 - 57) Adderley SR, Fitzgerald DJ. Oxidative damage of cardiomyocytes is limited by extracellular regulated kinases 1/2-mediated induction of cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 274: 5038-5046, 1999
 - 58) Sirois J, Levy LO, Simmons DL, Richards JS. Characterization and hormonal regulation of the promoter of the rat prostaglandin endoperoxide synthase 2 gene in granulosa cells: identification of functional and protein-binding regions. *J Biol Chem* 268: 12199-12206, 2000
 - 59) Wadleigh DJ, Reddy ST, Kopp E, Ghosh S, Herschman HR. Transcriptional activation of the cyclooxygenase-2 gene in endotoxin-treated RAW 264.7 macrophages. *J Biol Chem* 275: 6259-6266, 2000

- 60) Mayorga M, Bahi N, Ballester M, Comella JX, Sanchis D. Bcl-2 is a key factor for cardiac fibroblast resistance to programmed cell death. *J Biol Chem* 279: 34882-34889, 2004
- 61) Mori-Abe A, Tsutsumi S, Takahashi K, Toya M, Yoshida M, Du B, Kawagoe J, Nakahara K, Takahashi T, Ohmichi M, Kurachi H. Estrogen and raloxifene induce apoptosis by activating p38 mitogen-activated protein kinase cascade in synthetic vascular smooth muscle cells. *J Endocrinol* 178: 417-426, 2003
- 62) Badawi AF, Liu Y, Eldeen MB, Morrow W, Razak ZR, Maradeo M, Badr MZ. Age-associated changes in the expression pattern of cyclooxygenase-2 and related apoptotic markers in the cancer susceptible region of rat prostate. *Carcinogenesis* 25: 1681-1688, 2004
- 63) Prescott SM, Fitzpatrick FA. Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1470: M69-M78, 2000
- 64) Zha S, Yegnasubramanian V, Nelson WG, Isaacs WB, De Marzo AM. Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective. *Cancer Letters* 215: 1-20, 2004