

Isoflavonoids에 의한 혈관이완효과에 있어 Rho-kinase의 역할

제 현 동#

대구가톨릭대학교 약학대학 약물학 교실
(Received August 18, 2006; Revised August 23, 2006)

Vasorelaxing Effect of Isoflavonoids *Via* Rho-kinase Inhibition in Agonist-Induced Vasoconstriction

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 of Rho-kinase inhibition on the plant-derived estrogen-like compounds-induced arterial relaxation. Agonist- or depolarization-induced vascular smooth muscle contractions involve the activation of Rho-kinase pathway. However, there are no reports addressing the question whether this pathway is involved in genistein- or daidzein-induced vascular relaxation in rat aortae precontracted with phenylephrine or thromboxane A₂ mimetic U-46619. We hypothesized that Rho-kinase inhibition plays a role in vascular relaxation evoked by genistein or daidzein in rat aortae. Endothelium-intact and denuded arterial rings from male Sprague-Dawley rats were used and isometric contractions were recorded using a computerized data acquisition system. Genistein concentration-dependently inhibited phenylephrine or thromboxane A₂-induced contraction regardless of endothelial function. Surprisingly, in the agonists-induced contraction, similar results were also observed in aortae treated with daidzein, the inactive congener for protein tyrosine kinase inhibition, suggesting that Rho-kinase might act upstream of tyrosine kinases in phenylephrine-induced contraction. In conclusion, in the agonists-precontracted rat aortae, genistein and daidzein showed similar relaxant response regardless of tyrosine kinase inhibition or endothelial function.

Keywords □ daidzein, genistein, vasoconstriction, phenylephrine, thromboxane A₂ mimetic, tyrosine kinase, Rho kinase

식물에 분포하는 phytoestrogen은 estrogen과 유사한 생리활성을 나타내고 있으며 대체적으로 isoflavonoid, flavonoid, stilbene 및 lignan계열에 속하는 화합물들로 알려지고 있다. 역학적 및 실험적 연구결과를 종합할 때 이런 phytoestrogen들은 폐경기증후군, estrogen관련 질병, 골다공증, 전립선 및 유방암 등에 관련이 깊고 이들 질병을 예방하고 발생을 억제하는 것으로 알려져 estrogen 대체요법을 위한 제품들과 마찬가지로 많은 제품들이 시판되고 있는 실정이다. 그 중 genistein, daidzein, biochanin A, formononetin, coumestans 등은 isoflavonoids에 속하며 grapes, grape juices, wine, peanuts 등에 stilbene의 일종인 resveratrol이 존재한다. Genistein은 17 β -estradiol과 구조

적으로 유사한 phytoestrogen이며 여성호르몬보다 느리게 세포질이나 핵의 estrogen 수용체와 결합한다.^{1,2)} Genistein이 estrogen 수용체와 결합하면 estrogen이 일으키는 많은 생물학적 반응을 초래한다.^{3,4)} 그 밖에도 혈청 고밀도 지단백 콜레스테롤 농도변화없이 혈청 전체 콜레스테롤, 저밀도 지단백 콜레스테롤과 트리글리세라이드 감소가 관찰되었다.⁵⁻⁷⁾ 그런데 genistein (5,7,4-trihydroxyisoflavone) 등의 estrogen성 화합물에 의해 나타나는 혈관효과에 대해서는 알려진 바가 거의 없다. Genistein은 효과적인 비선택성 tyrosine kinase 억제제이며⁸⁾ 따라서 tyrosine kinase매개 혈관평활근 수축을 억제할 수 있다.^{9,10)}

효능약이나 증가된 혈관내압에 대한 혈관평활근 수축은 칼슘과 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 평

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 053-850-3615 (팩스) 153-850-3602
(E-mail) hyundong@cu.ac.kr

활근 수축의 개시가 마이오신의 20 kDa 경사슬 인산화의 칼슘의 존적 증가에 의해 전적으로 조절된다고 생각되었지만¹¹⁾ 다른 경로들도 세포내 칼슘이온의 증가와 상관없이 마이오신의 20 kDa 경사슬 인산화를 조절하여 평활근 수축성을 조절한다고 생각된다.¹²⁻¹⁴⁾ 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.¹⁵⁾ 따라서 마이오신 경사슬 인산화수준과 수축정도를 조절하는 추가조절기전이 제안되었다. Rho GEFs(guanine nucleotide-exchange factors), Rho A, Rho-kinase 등에 의한 마이오신 탈인산화효소의 억제자가 칼슘이온 감각에서 주요한 경로라는 것이 뒤이은 연구들에서 밝혀졌다.¹⁶⁻¹⁹⁾

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 A₂ 수용체에 thromboxane A₂가 결합되면 G_{q/11}을 통해 phospholipase C β 가 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. 다시 말해 thromboxane A₂는 L-type 칼슘통로를 통해 칼슘이온 유입을 유도하고 RhoA/Rho-kinase 활성화를 통해 칼슘이온 감각을 일으킨다.²⁰⁾ 이번 실험에서 세포내 신호전달에 대한 thromboxane A₂의 다양한 효과 때문에 isoflavones에 의한 평활근 이완에 관련된 신호전달경로를 조사하기 위한 유용한 도구로 thromboxane A₂를 사용하였다. Thromboxane A₂에 의한 수축에 RhoA/Rho-kinase 경로 활성화가 포함된다.²⁰⁾ 그러나 genistein이나 daidzein 등의 isoflavones에 의한 혈관 평활근 이완에서 이러한 경로가 억제되는지에 대한 문헌상 보고는 없었다. 따라서 이번 실험의 목적은 tyrosine kinase 억제제를 사용하여 isoflavones에 의한 대동맥 혈관 이완에서 칼슘이온 탈감각에 대한 RhoA/Rho-kinase 활성 억제제의 역할을 설명하는 것이다.

재료 및 방법

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), phenylephrine hydrochloride(Sigma), acetylcholine(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

연구는 US National Institute of Health(NIH, 1996)에 의해 출판된 실험동물의 care와 use에 대한 guide에 따라서 수행되었다. 무게 250~350 g의 성숙한 웅성 Sprague-Dawley쥐가 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 담겼다. 대동맥내 혈액과 각종 결체조직은 제거되었다. 대동맥은 4 mm 길이의 고리로 잘려졌다.

기계적 활성 측정

동맥의 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.

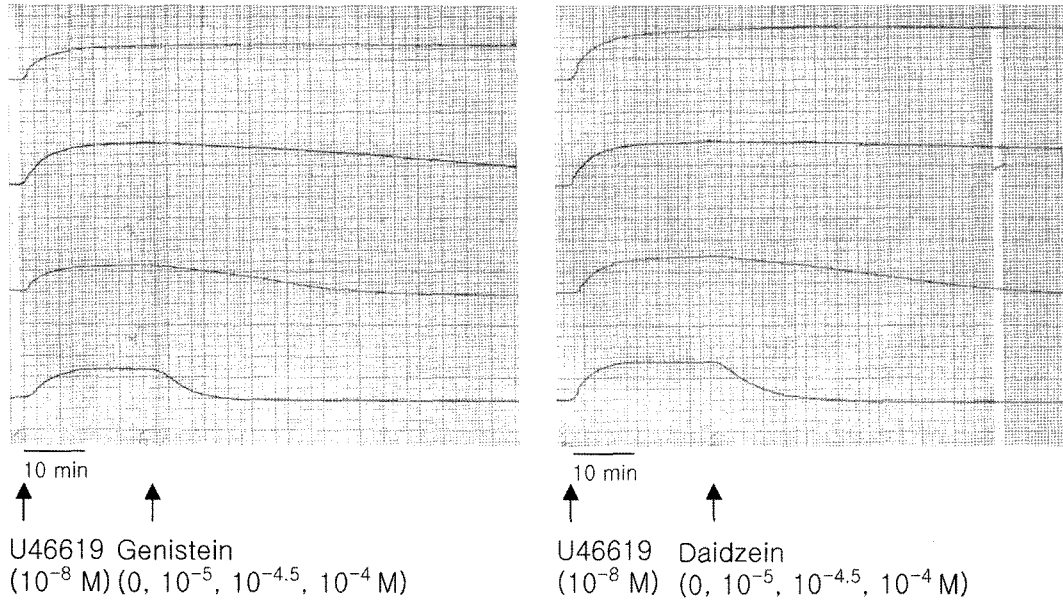


Fig. 1 - A representative tracing of vasorelaxation induced by genistein or daidzein in rat aortic rings with endothelium denuded precontracted with 0.01 μM U46619. Time bars express the timing of responses.

실험 결과

내피가 제거된 쥐 대동맥에서 thromboxane A₂에 의한 수축에 대한 genistein의 직접이완효과

분리된 쥐 대동맥의 휴지기 장력은 공기를 통한 Krebs 용액 관류 60분 후 안정 상태에 도달한다. 휴지기 장력은 2.0 g으로 조절한다. 내피가 제거된 쥐 대동맥에서 저농도(10⁻⁸ M)의 thromboxane A₂에 의한 수축에 대한 genistein의 효과를 조사하였다. 급속 붓을 쥐 대동맥 고리 안에 넣고 4~6회 돌려 내피를 제거하였다. 50 mM KCl에 의한 수축에 대한 1 μM acetylcholine의 이완이 20% 이하일 경우 내피가 제거되었다고 판단하였다. 내피가 제거된 쥐 대동맥에서 저농도(10⁻⁸ M)의 thromboxane A₂에 의한 수축에 대해 genistein은 10⁻⁵ M 이상의 농도에서 유의성 있는 이완효과를 보였다(Fig. 1, Fig. 2). 따라서 genistein에 의한 이완기전은 내피 비의존성이며 endothelial nitric oxide synthase, cyclooxygenase product prostacyclin, endothelium-derived hyperpolarising factor 등이 관여하지 않는다고 생각된다.

내피가 제거되지 않은 쥐 대동맥에서 thromboxane A₂에 의한 수축에 대한 genistein의 직접이완효과

내피가 제거되지 않은 쥐 대동맥에서 저농도(10⁻⁸ M)의 thromboxane A₂에 의한 수축에 대해 genistein은 10⁻⁵ M 이상의 농도에서 유의성 있는 이완효과를 보였다(Fig. 3). 또한 내피가 제거된 쥐 대동맥과 비교시 유사한 이완효과를 보였다.

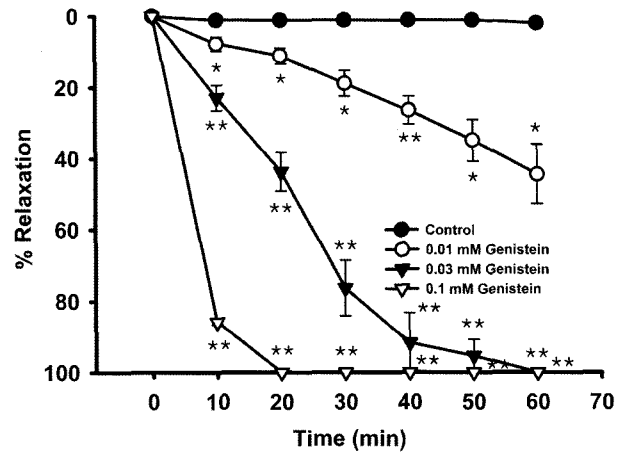


Fig. 2 - Relative relaxing effect of genistein on 0.01 μM U46619-induced vascular contraction in the absence of endothelium. Data are expressed as means of 3~5 experiments with vertical bars showing SEM. *P<0.05, **P<0.01, presence versus absence of genistein.

내피가 제거된 쥐 대동맥에서 thromboxane A₂에 의한 수축에 대한 daidzein의 직접이완효과

내피가 제거된 쥐 대동맥에서 저농도(10⁻⁸ M)의 thromboxane A₂에 의한 수축에 대해 tyrosine kinase 억제에 대한 비활성 유사체인 daidzein은 10^{-4.5} M 이상의 농도에서 유의성 있는 이완효과를 보였고 전체적으로 tyrosine kinase 억제체인 genistein과 유사한 효과를 보였다(Fig. 1, Fig. 4). 따라서 daidzein에 의한 이완기전은 내피 비의존성이며 endothelial nitric oxide synthase, cyclooxygenase product prostacyclin, endothelium-

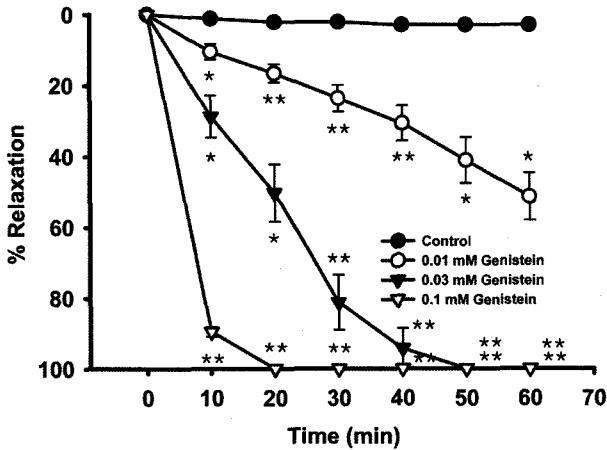


Fig. 3 - Relative relaxing effect of genistein on 0.01 μ M U46619-induced vascular contraction in the presence of endothelium. Data are expressed as means of 3~5 experiments with vertical bars showing SEM. * P <0.05, ** P <0.01, presence versus absence of genistein.

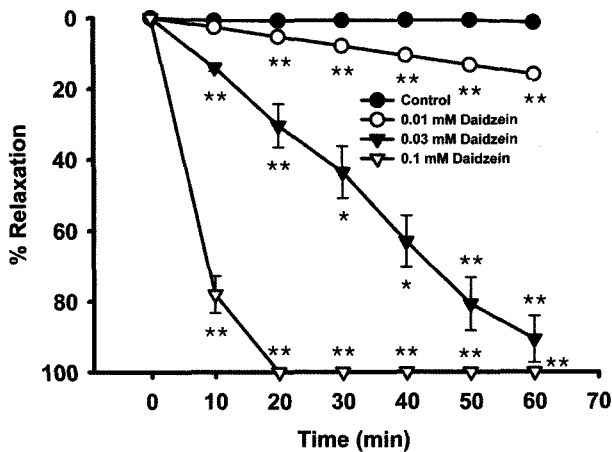


Fig. 4 - Relative relaxing effect of daidzein on 0.01 μ M U46619-induced vascular contraction in the absence of endothelium. Data are expressed as means of 3~5 experiments with vertical bars showing SEM. * P <0.05, ** P <0.01, presence versus absence of daidzein.

derived hyperpolarising factor 등이 관여하지 않는다고 생각된다. 또한 tyrosine kinase 억제에 대한 비활성 유사체인 daidzein이 tyrosine kinase inhibitor인 genistein과 유사한 이완효과를 보였기에 적어도 저농도(10^{-8} M)의 thromboxane A_2 에 의한 혈관 평활근 수축에서 Rho-kinase가 tyrosine kinases의 상위에서 작용하여 tyrosine kinases를 활성화한다고 추측된다. 반면에 고농도(10^{-7} ~ 10^{-6} M)의 thromboxane A_2 에 의한 강력한 수축에 대해 daidzein은 genistein에 비해 현저히 약한 이완효과를 보였다 (data not shown). 이런 강력한 수축의 경우 L-type 칼슘이온통로를 통한 칼슘이온 유입이 증진되며 이 경우 genistein에 이러한 L-type 칼슘이온통로를 통한 칼슘이온 유입을 억제하는 추가

적인 효과가 있고^{21,22)} daidzein에는 없는 것으로 추정된다.

내피가 제거되지 않은 쥐 대동맥에서 thromboxane A_2 에 의한 수축에 대한 daidzein의 직접이완효과

내피가 제거되지 않은 쥐 대동맥에서 저농도(10^{-8} M)의 thromboxane A_2 에 의한 수축에 대해 tyrosine kinase억제에 대한 비활성 유사체인 daidzein은 $10^{-4.5}$ M 이상의 농도에서 유의성 있는 이완효과를 보였고 전체적으로 tyrosine kinase 억제제인 genistein과 유사한 효과를 보였다(Fig. 5). 또한 내피가 제거된 쥐 대동맥에서의 결과와 비교시 유사한 이완효과를 보였다.

내피가 제거된 쥐 대동맥에서 phenylephrine에 의한 수축에 대한 전처치된 genistein의 억제효과

Phenylephrine도 RhoA/Rho-kinase를 활성화시켜 혈관 평활근을 수축시킨다고 알려져 있다. 내피가 제거된 쥐 대동맥에서 전처치된 genistein은 10^{-4} M의 농도에서 phenylephrine(10^{-6} M)에 의한 수축에 대해 유의성 있는 억제효과를 보였다(Fig. 7).

내피가 제거된 쥐 대동맥에서 phenylephrine에 의한 수축에 대해 전처치된 daidzein의 억제효과

내피가 제거된 쥐 대동맥에서 전처치된 tyrosine kinase 억제에 대한 비활성 유사체인 daidzein은 $10^{-4.5}$ M 이상의 농도에서 phenylephrine(10^{-6} M)에 의한 수축에 대해 유의성 있는 억제효과를 보였고 전체적으로 tyrosine kinase 억제제인 genistein보다 우수한 수축억제 효과를 보였다(Fig. 6, Fig. 8). Tyrosine kinase 억제에 대한 비활성 유사체인 daidzein이 tyrosine kinase inhibitor인 genistein를 능가하는 혈관 수축 억제효과를 보였기

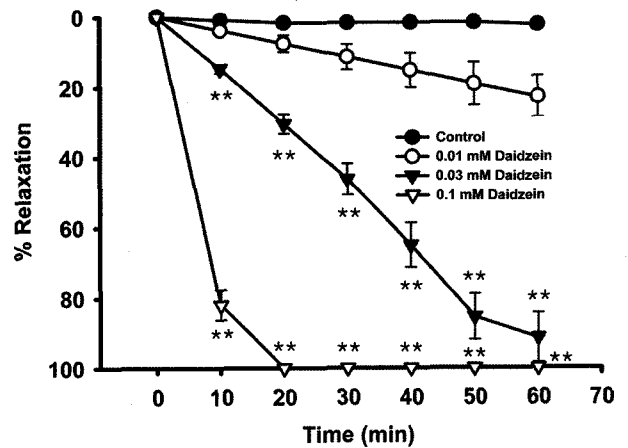


Fig. 5 - Relative relaxing effect of daidzein on 0.01 μ M U46619-induced vascular contraction in the presence of endothelium. Data are expressed as means of 3~5 experiments with vertical bars showing SEM. ** P <0.01, presence versus absence of daidzein.

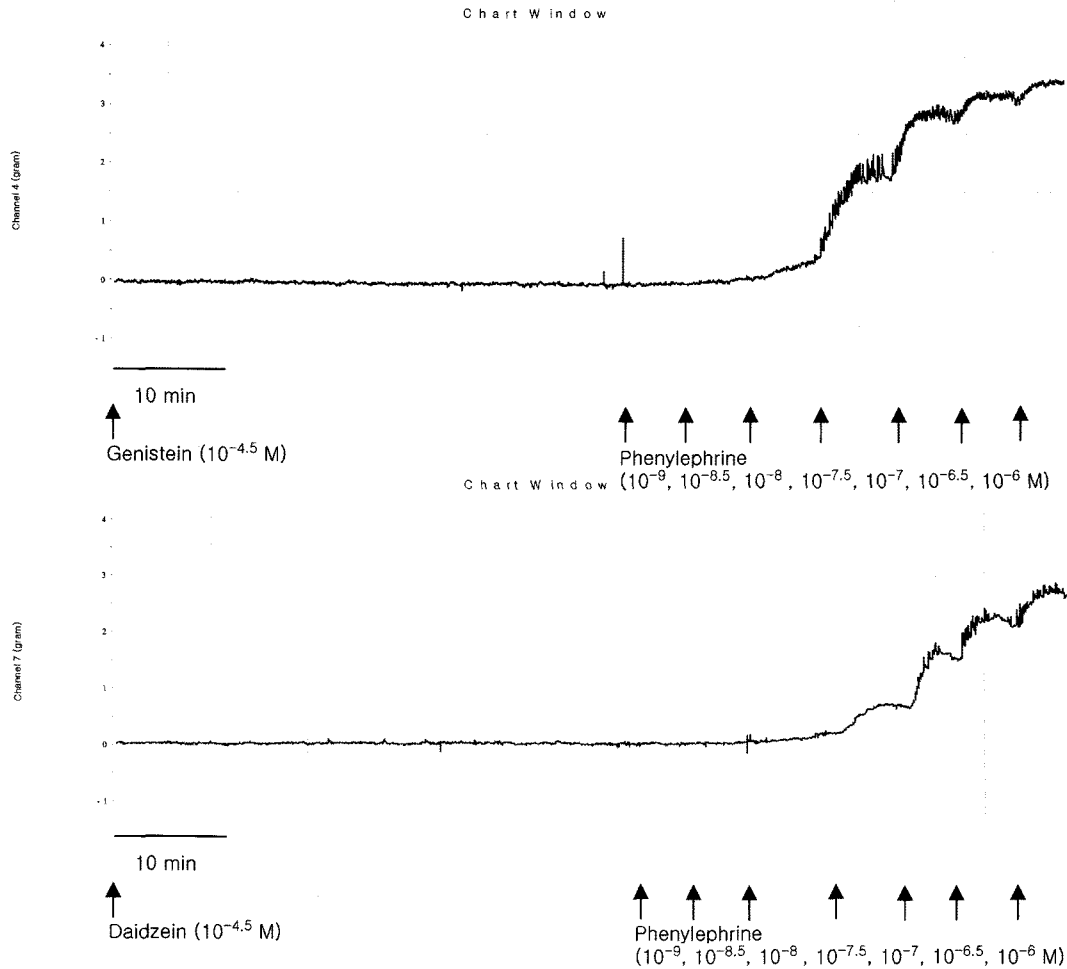


Fig. 6 – A representative tracing of the inhibition of phenylephrine-induced vasoconstriction by pretreated $10^{-4.5}$ M genistein or $10^{-4.5}$ M daidzein in rat aortic rings with endothelium denuded. Time bars express the timing of responses.

에 적어도 phenylephrine에 의한 혈관 평활근 수축에서 Rho-kinase가 tyrosine kinases의 상위에서 작용하여 tyrosine kinases를 활성화한다고 추측된다.

고찰

식물에 분포하는 phytoestrogen은 estrogen과 유사한 생리활성을 나타내고 있으며 대체적으로 isoflavonoid, flavonoid, stilbene 및 lignan 계열에 속하는 화합물들로 알려지고 있다. Isoflavonoid에 속하는 genistein은 17 β -estradiol과 구조적으로 유사한 phytoestrogen이며 여성호르몬보다 느리게 세포질이나 핵의 estrogen 수용체와 결합하며 tyrosine kinase 억제에 대한 비활성 유사체인 daidzein도 isoflavonoid 계열의 phytoestrogen이다. 효능약 자극에 의한 마이오신 경사슬 인산화나 수축력의 정도는 대개 세포내 칼슘이온 농도상 증가에 의한 것보다 더 높고, 이 현상은 소위 칼슘이온 감각이라고 설명된다.¹⁵⁾ 따라서 마이오신 경사슬 인산화수준과 수축정도를 조절하는 추가조절기전

이 제안되었다. Rho GEFs(guanine nucleotide-exchange factors), Rho A, Rho-kinase 등에 의한 마이오신 탈인산화효소의 억제가 칼슘이온 감각에서 주요한 경로라는 것이 뒤이은 연구들에서 밝혀졌다. Thromboxane A₂는 L-type 칼슘통로를 통해 칼슘이온 유입을 유도하고 RhoA/Rho-kinase 활성화를 통해 칼슘이온 감각을 일으킨다고 알려져 있다.

내피가 제거된 쥐 대동맥에서 저농도(10^{-8} M)의 thromboxane A₂에 의한 수축에 대해 genistein는 10^{-5} M 이상의 농도에서 유의성 있는 이완효과를 보였다(Fig. 1, Fig. 2). 따라서 genistein에 의한 이완기전은 내피 비의존성이며 endothelial nitric oxide synthase, cyclooxygenase product prostacyclin, endothelium-derived hyperpolarising factor 등이 관여하지 않는다고 생각된다. 또한 tyrosine kinase 억제에 대한 비활성 유사체인 daidzein이 tyrosine kinase 억제제인 genistein과 유사한 이완효과를 보였기에 적어도 저농도(10^{-8} M)의 thromboxane A₂에 의한 혈관 평활근 수축에서 Rho-kinase가 tyrosine kinases의 상위에서 작용하여 tyrosine kinases를 활성화한다고 추측된다. 반면에 고농

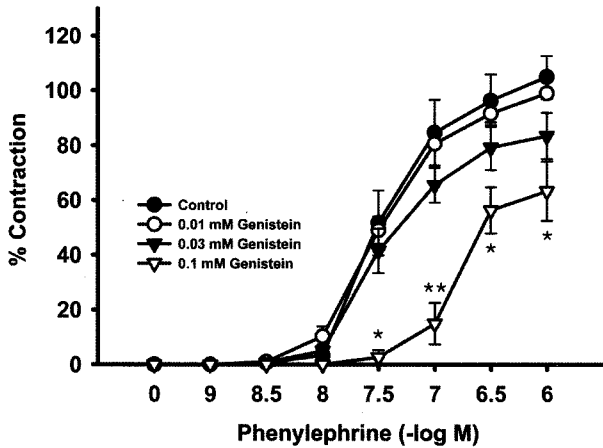


Fig. 7 - Effect of pretreated genistein on phenylephrine-induced contraction. Phenylephrine was added cumulatively to elicit tension in the presence or absence of genistein for 30 min in the aortic rings with endothelium denuded. Developed tension is expressed as a percentage of the maximum contraction 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 genistein.

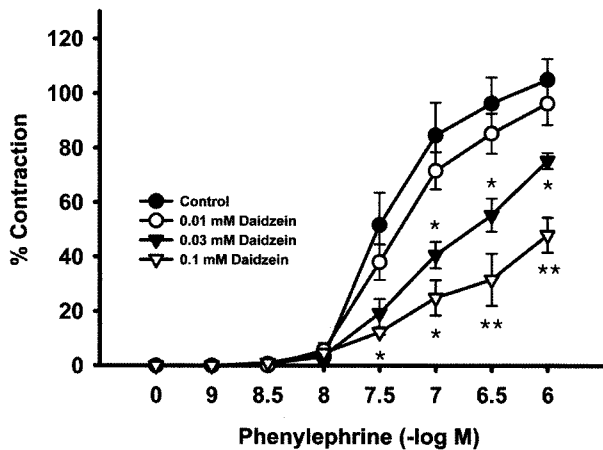


Fig. 8 - Effect of pretreated daidzein on phenylephrine-induced contraction. Phenylephrine was added cumulatively to elicit tension in the presence or absence of daidzein for 30 min in the aortic rings with endothelium denuded. Developed tension is expressed as a percentage of the maximum contraction 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 daidzein.

도($10^{-7} \sim 10^{-6}$ M)의 thromboxane A_2 에 의한 강력한 수축에 대해 daidzein은 genistein에 비해 현저히 약한 이완효과를 보였다 (data not shown). Genistein 등의 tyrosine kinase 억제제가 L-type 칼슘이온통로를 통한 칼슘이온 유입을 억제한다는 것은 이미 여러 문헌에서 보고되었고 따라서 고농도 thromboxane A_2 에 의한 수축에 대해 genistein과 daidzein이 차이를 보이는 것에 tyrosine

kinase 억제에 대한 활성이 관여될 수 있고 이는 간접적으로 daidzein에는 L-type 칼슘이온통로를 통한 칼슘이온 유입을 억제하는 추가적인 효과가 없다는 것을 의미한다.

Phenylephrine도 RhoA/Rho-kinase를 활성화시켜 혈관 평활근을 수축시킨다고 알려져 있다. 내피가 제거된 쥐 대동맥에서 전처치된 tyrosine kinase 억제에 대한 비활성 유사체인 daidzein은 $10^{-4.5}$ M 이상의 농도에서 phenylephrine(10^{-6} M)에 의한 수축에 대해 유의성 있는 억제효과를 보였고 전체적으로 tyrosine kinase 억제제인 genistein보다 우수한 수축억제 효과를 보였다 (Fig. 6, Fig. 8). Tyrosine kinase 억제에 대한 비활성 유사체인 daidzein이 tyrosine kinase inhibitor인 genistein를 능가하는 혈관 수축 억제효과를 보였기에 적어도 phenylephrine에 의한 혈관 평활근 수축에서 Rho-kinase가 tyrosine kinases의 상위에서 작용하여 tyrosine kinases를 활성화한다고 추측된다.

본 실험에서는 폐경기증후군, estrogen 관련 질병, 골다공증, 전립선 및 유방암 등에 대해 예방과 치료를 목적으로 사용되기 시작하는 genistein과 daidzein 등의 isoflavonoids의 혈관 이완 기전에 대해 조사하여 심혈관계 질환 치료제로서의 주의 및 새로운 가능성을 보고자 하였다.

결 론

본 연구에서는 내피를 제거하지 않은 흰쥐 동맥혈관과 내피를 제거한 흰쥐 동맥혈관에서 저농도(10^{-8} M)와 고농도($10^{-7} \sim 10^{-6}$ M)의 thromboxane A_2 의 수축기전이 각각 다르며 RhoA/Rho-kinase 활성화를 통해 칼슘이온 감작을 일으킨다고 알려져 있는 저농도(10^{-8} M)의 thromboxane A_2 에 의한 수축에 대해 genistein과 daidzein이 유사한 농도 의존적 이완효과가 있음을 관찰하였다. 또한 RhoA/Rho-kinase를 활성화시켜 혈관 평활근을 수축시킨다고 알려져 있는 phenylephrine에 의한 수축에 대해서도 전처치된 genistein과 daidzein이 유사한 농도 의존적 수축 억제효과가 있었다. 따라서 적어도 저농도(10^{-8} M)의 thromboxane A_2 또는 phenylephrine에 의한 혈관 평활근 수축에서의 isoflavonoids의 이완반응은 내피 비존재성이고 tyrosine kinase 억제활성과도 상관없으며 오히려 Rho-kinase가 tyrosine kinases의 상위에서 작용하여 tyrosine kinases를 활성화할 가능성이 있다. 향후 genistein 또는 daidzein 등의 isoflavonoids의 RhoA/Rho-kinase 활성 억제효과 또는 myosin phosphatase 활성증대 효과를 생화학적 방법으로 연구하고자 한다.

문 헌

1) Hsieh, C. Y., Santell, R. C., Haslam, S. Z. and Helferich, W. G. : Estrogenic effects of genistein on the growth of estrogen

- receptor-positive human breast cancer (MCF-7) cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res.* **58**, 3833 (1998).
- 2) Martin, P. M., Horwitz, K. B., Ryan, D. S. and McGuire, W. L. : Phytoestrogen interaction with estrogen receptors in human breast cancer cells. *Endocrinology* **103**, 1860 (1978).
 - 3) Kuiper, G. G., Lemmen, J. G., Carlsson, B., Corton, J. C., Safe, S. H., Van der Saag, P. T., Van der Burg, B. and Gustafsson, J. A. : Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* **139**, 4252 (1998).
 - 4) Williams, J. K. and Clarkson, T. B. : Dietary soy isoflavones inhibit *in vivo* constrictor responses of coronary arteries to collagen-induced platelet activation. *Coron. Artery Dis.* **9**, 759 (1998).
 - 5) Anderson, J. W., Johnstone, B. W. and Cook-Newell, M. E. : Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *N. Engl. J. Med.* **333**, 276 (1995).
 - 6) Hodgson, J. M., Croft, K. D., Puddey, L. B., Mori, T. A. and Beilin, L. J. : Soybean isoflavonoids and their metabolic products inhibit *in vitro* lipoprotein oxidation in serum. *J. Nutr. Biochem.* **7**, 664 (1996).
 - 7) Mitchell, J. H. and Collins, A. R. : Effects of a soymilk supplement on plasma cholesterol levels and oxidative DNA damage in men-a pilot study. *Eur. J. Nutr.* **38**, 143 (1999).
 - 8) Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, 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).
 - 9) Hollenberg, M. D. : Tyrosine kinase pathways and the regulation of smooth muscle contractility. *Trends Pharmacol. Sci.* **15**, 108 (1994).
 - 10) Liu, C. Y. and Sturek, M. : Attenuation of endothelin-1-induced calcium response by tyrosine kinase inhibitors in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* **270**, C1825 (1996).
 - 11) Somlyo, A. P. and Somlyo, A. V. : Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* **372**, 231 (1994).
 - 12) Somlyo, A. P. and Somlyo, A. V. : From pharmacomechanical coupling to G-proteins and myosin phosphatase. *Acta. Physiol. Scand.* **164**, 437 (1998).
 - 13) 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**, 990-994 (1997).
 - 14) Sakurada, S., Takuwa, N., Sugimoto, N., Wang, Y., Seto, M., Sasaki, Y. and Takuwa, Y. : Ca^{2+} -dependent activation of Rho and Rho-kinase in membrane depolarization-induced and receptor stimulation-induced vascular smooth muscle contraction. *Circ. Res.* **93**, 548 (2003).
 - 15) Somlyo, A. P. and Somlyo, A. V. : Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* **372**, 231 (1994).
 - 16) 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).
 - 17) 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).
 - 18) 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).
 - 19) 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).
 - 20) Wilson, D. P., Susnjar, M., Kiss, E., Sutherland, C. and Walsh, M. P. : Thromboxane A_2 -induced contraction of rat caudal arterial smooth muscle involves activation of Ca^{2+} entry and Ca^{2+} sensitization: Rho-associated kinase-mediated phosphorylation of MYPT1 at Thr-855, but not Thr-697. *Biochem. J.* **389**, 763 (2005).
 - 21) Davis, M. J., Wu, X., Nurkiewicz, T. R., Kawasaki, J., Gui, P., Hill, M. A. and Wilson, E. : Regulation of ion channels by protein tyrosine phosphorylation. *Am. J. Physiol.* **281**, H1835 (2001).
 - 22) 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).