

혈관평활근 수축-연관 신호전달 체계에 대한 Endothelin-1의 역할과 Endothelin-1-유도 통증-연관 유해감각

-통증전문물리치료 연구를 위한 기초물리치료학적 접근을 중심으로-

용인대학교 물리치료학과¹⁾, 용인대학교 노인재활복지학과²⁾,
포항1대학 물리치료과³⁾, 평촌성심병원 물리치료실⁴⁾, 한마음병원 통증전문물리치료실⁵⁾,
민-물리치료연구센터⁶⁾, 용인대학교 재활보건과학대학원 물리치료학과 석⁷⁾, 박사과정⁸⁾

김중환^{1#)} · 이숙희^{2+#)} · 이상빈^{3+#)} · 최유림^{4+#)} · 김보경^{5+#)} · 박주현^{6+#)} · 구자풍^{7+#)}
최완석^{3+#)} · 안호정^{4+#)} · 최정현^{4+#)} · 김무기⁵⁾ · 김순희^{1#)}

Endothelin-1 as a Regulator of Vascular Smooth Muscle Contraction-related
Signal Transduction and Endothelin-1-induced Pain-related Nociception
-The Approach of Basic Physical Therapy for the Study of Pain Specialized Physical Therapy-

Kim, Jung Hwan^{1#)}, P.T., Ph.D. · Lee, Sook Hee^{2+#)}, P.T., M.S. · Lee, Sang Bin^{3+#)}, P.T., M.S.
Choi, Yoo Rim^{4+#)}, P.T., M.S. · Kim, Bo Kyung^{5+#)}, P.T., M.S. · Park, Ju Hyun^{6+#)}, P.T.
Koo, Ja Pung^{7+#)}, P.T. · Choi, Wan Suk^{3+#)}, P.T., M.S. · An, Ho Jung^{4+#)}, P.T., M.S.
Choi, Jeong Hyun^{4+#)}, P.T., M.S. · Kim, Moo Gi⁵⁾, P.T., M.S.
Kim, Soon Hee^{1#)}, P.T., Ph.D.

*Dept. of Physical Therapy, Yongin University¹⁾, Dept. of Senior Rehabilitation Welfare, Yongin University²⁾
Dept. of Physical Therapy, Pohang 1 College³⁾, Dept of Physical Therapy, Pyoungchon Sungshim Hospital⁴⁾
Dept of Pain Specialized Physical Therapy, Hanmaun Hospital⁵⁾
Min's Research Center⁶⁾, Dept of Physical Therapy, the Graduate School of Rehabilitation and Health Science, Yongin University^{7+#)}*

ABSTRACT

Endothelin (ET) is a 21 amino acid peptide with multifunctional effects on the vasculature as well as a

variety of other cell types such as respiratory, gastrointestinal, urogenital, endocrine, central nervous systems, and others. Endothelin has emerged as a modulator by autocrine and paracrine actions for many cellular activities, including vasoconstriction, cell proliferation, hormone production, neurotransmitter and/or neuromodulator. The endothelin family consists of three closely related peptides, ET-1, ET-2, and ET-3 derived from separate genes, such as chromosome 6, 1, and 20, respectively. ET-1 is the predominant isoform produced in the cardiovascular system and about which most is known. Endothelin receptors are seven-transmembrane GTP-binding protein-coupled receptors, which are classified into endothelin-A (ETA) and endothelin-B (ETB) receptors. Interestingly, recent evidence is accumulating to suggest that ET-1 may contribute to a variety of pain states such as allodynia and hyperalgesia in animals and humans. Therefore, in this review the biological characteristics and contraction-related mechanism of endothelin-1 in mammalian cells will be summarized. Especially, we focus on multifunctional roles for ET-1 in noxious stimulation-induced pain for the study of pain specialized physical therapy.

Key words ; Endothelin, Pain, Contraction, Signal transduction, Pain specialized physical therapy

I. 서론

21개의 아미노산으로 구성된 Endothelin(ET)에 대한 연구는 1985년 Hickey 등에 의해 혈관내피세포의 배양을 통한 실험으로 유리되는 혈관수축물질의 연구로부터 시작되었다. 이러한 수축물질은 1988년 Yanagisawa 등에 의해 분리 및 동정과 함께 "endothelin"이라는 이름이 명명되면서 주목을 받게 되었다. 이 단백질은 ET-1과 -2, -3의 아형(subtype)이 존재하며, 각각 존재 및 유리되는 부위와 작용에 차이가 있음을 확인할 수 있다(Inoue 등, 1989a). 또한 이 단백질은 혈관평활근 수축을 비롯한 세포증식, 아드레날린을 포함한 신경전달물질 및 알도스테론과 같은 호르몬 분비의 자극 등으로 세포활성을 조절해 주는 인자로서의 역할을 담당하여 생리 혹은 병리적으로 그 중요성이 인정받고 있다(Boarder와 Marriott, 1989; Cozza 등, 1989; Alberts 등, 1994; Kim 등, 2004a). 더욱이 ET-1 적용으로 나타나는 신호전달계에 있어서 유사분열-활성 단백질부활효소

(mitogen-activated protein kinase, MAPK)와 단백질부활효소 C(protein kinase C, PKC)의 직접적 상관성과 심혈관질환 등을 유발시키는데 관여한다는 보고 역시 ET-1의 중요성을 인지시켜 준다(Masaki 등, 1999; Ishihata 등, 2002; Kim 등, 2004a). 한편 ET는 혈관내피세포와 혈관평활근세포를 비롯한 후근 신경절과 척수 및 말초신경 등에서 광범위하게 생성 분비되어 그 중요성이 강조되고 있다(Yanagisawa 등, 1988; Giaid 등, 1989; Kurokawa 등, 1997; Pomonis 등, 2001). 특히, ET-1-유도 통증유발과 관련된 중추신경과 말초신경에서 작용하는 상반된 효과(dual effects) 즉, 중추신경에서 ET-1은 통증억제로 작용하는 반면 말초신경계에서는 이질통(allodynia)과 통각과민(hyperalgesia)과 같은 통증유발에 직접적 작용 혹은 감수성(sensitivity)을 증가시키는 등의 내용이 보고 되어 통증물리치료영역에서 그 중요성이 대두되고 있다(Kamei 등, 1993; Nikolov 등, 1993; Davar 등, 1998; Gokin 등, 2001). 이와 함께 통증기전에 관여하는 PKC와 MAPK의 중요성은 통증물

리치료 영역에서 이미 논의한 바 있다(김중환 등, 2005a, 2005b). 그러나 Endothelin 단백질의 이해와 작용기전에 대한 실험 및 연구보고는 미비한 상태에 있다. 따라서 본 연구자들은 Endothelin 단백질의 작용기전과 endothelin-유도 PKC 및 MAPK 등의 관여 여부에 대한 관찰 및 endothelin-유도 통증유발기전에 대한 내용을 살펴봄으로써 통증전문물리치료 연구의 기초 자료로 도움이 되고자 하였다.

II. 본론 및 결론

1. Endothelin의 생합성과 소멸

21개의 아미노산 잔기로 구성되어 있는 Endothelin(ET)에는 ET-1과 -2 및 -3의 아형이 존재하며, ET-1과 비교하여 아미노산 잔기의 차이(ET-2: 6번과 7번 잔기, ET-3: 2, 4, 5, 6, 7번과 14번 잔기)가 다른 아형을 결정해 준다(Yanagisawa 등, 1988; Inoue 등, 1989a)(그림 1A). 이 단백질들은 모두 인간과 돼지로부터 얻을 수 있는 반면, ET-1은 개와 흰쥐(*rat*), 마우스 및 소(*bovine*)로부터 분리할 수 있었으며, ET-2는 마우스[4번째 *serine*(Ser) 잔기가 *asparagine*(Asn) 잔기로 치환], ET-3는 흰쥐와 토끼(*rabbit*)로부터 각각 분리 및 추출할 수 있었다(Masaki, 2004)(그림 1A). 또한 이 단백질의 원시단백질(*prepro-endothelin*)을 생합성하는 유전자는 각각 6번(*6p23-p24*) 염색체와 1번(*1p34*) 및 20번(*20q13.2-q13.3*) 염색체에 각각 존재한다(Arinami 등, 1991). 이들의 생합성은 모두 원시호르몬(*preprohormones*) 단계에서 전사-해독과정(*post-translationally*)을 거쳐 활성형의 효소로 생성되는 일련의 과정을 거침으로써 이루어지게 된다(그림 1B). Endothelin의 아형 중에서 ET-1은 혈관내피세포와 혈관평활근세포, 상피세포, 간세포, 뇌, 뉴런, 후근신경절(*dorsal root ganglion, DRG*) 및 성상교세포

(*astrocytes*) 등에 풍부히 존재하며 가장 확실한 생리적 기능을 지니고 있다(Giaid 등, 1989; Wanebo 등, 1998; Josko 등, 2000). 이에 비해 ET-2는 신장의 상피세포와 위장관 세포(*gastrointestinal stromal cells*) 등에 존재하지만 생리적 기능은 확립되어 있지 않으며, ET-3는 뇌를 비롯한 중추신경계에 풍부하게 존재하는 이유로 "*neural-endothelin*"으로 추정하고 있다(Levin, 1995; Goraka, 2002). 따라서 본 연구에서는 ET-1의 생성 및 역할을 중심으로 기술하고자 한다.

ET-1의 생성은 먼저 212개의 고분자 아미노산 펩타이드로 구성된 ET-1 즉, 원시ET-1(*preproET-1*)이 세포 내에 존재하는 단백질 분해효소인 endopeptidase(혹은 *furin-like enzyme*)에 의해 38개의 아미노산 펩타이드로 구성된 전 단계 ET-1(*proET-1* 혹은 *big ET-1*으로 명명하기도 함)으로 잘려지게 된다(Yanagisawa 등, 1988). 이렇게 잘려진 *big ET-1*은 ET-1에 비해 생물학적 활성도가 1%에 지나지 않은 비활성 상태로 존재한다. 생성된 *big ET-1*은 endothelin 전환효소(*zinc-binding metalloendoprotease endothelin converting enzyme, ECE*)의 작용에 의해 생물학적 기능을 발휘하는 21개의 아미노산으로 구성된 활성형 ET-1(일반적 기능을 나타내는 *ET-1*을 가리키는 명칭)으로 되어 그 역할을 담당하게 된다(Inoue 등, 1989b; Kimura 등, 1989)(그림 1B). 이러한 ET-1의 생성은 ECE가 *big ET*의 Trp²¹와 Val²²/Ile²²부분을 절단함으로써 이루어지게 된다(Xu 등, 1994). ECE에는 두 개의 동위효소 즉 ECE-1과 ECE-2가 존재하며, 이 효소 중에서 ECE-1이 생리적 활성형에 해당된다. 이 효소는 동일한 유전자로부터 발현되는 4개의 다른 동위효소(*ECE-1a, -1b, -1c, -1d*)의 형태로 존재한다(Xu 등, 1994; Emoto와 Yanagisawa, 1995; Valdenaire 등, 1995). 이러한 동위효소에서 ECE-2는 ECE-1과 유사한 성질을 지니고 있으나 ECE-1과는 달리 pH5.5의 산성인 조건에서만 활성화되는 특징을 가지고 있다(Emoto와 Yanagisawa, 1995). 이러한 과정

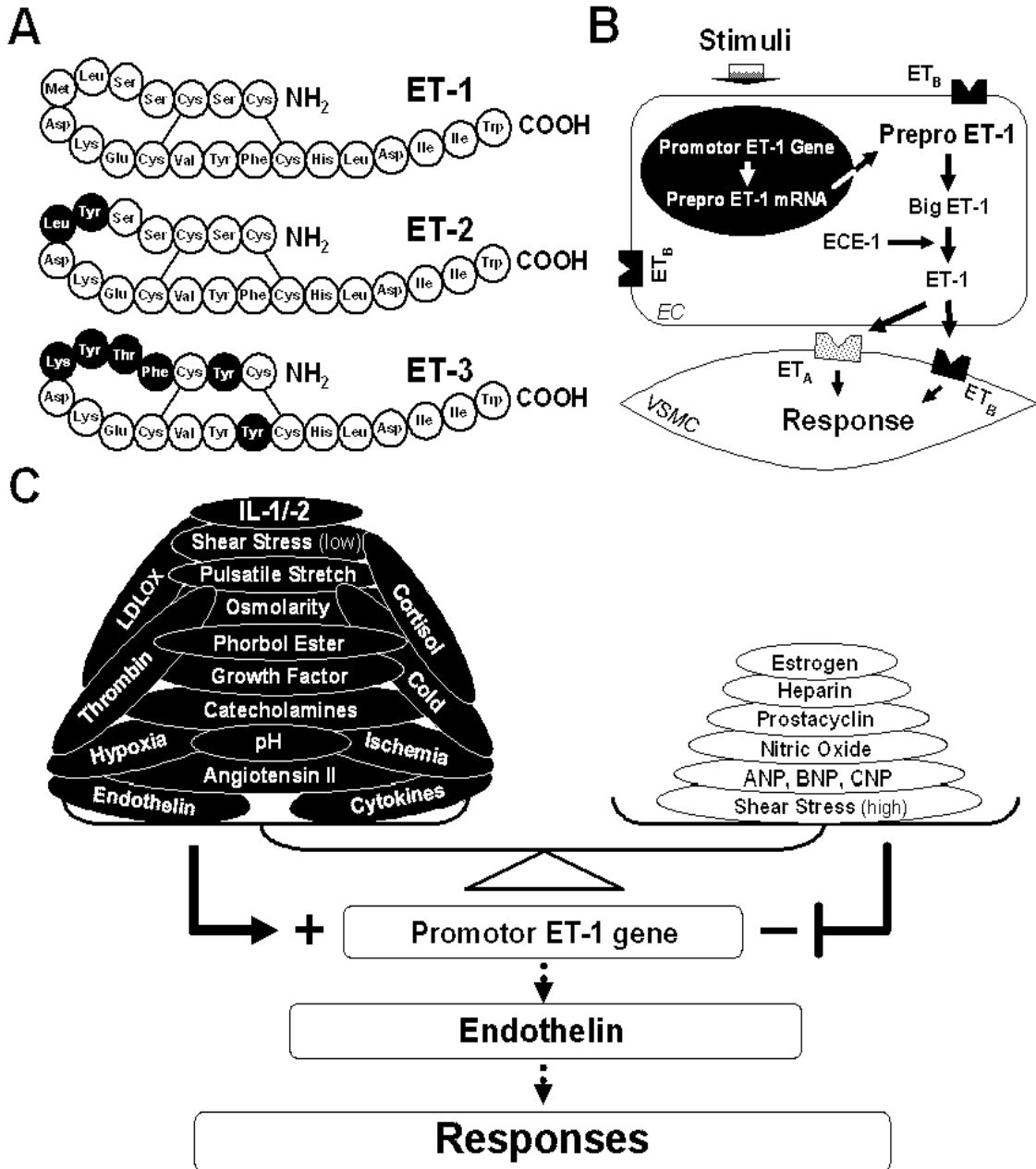


그림 1. Schematic representation of the structures and mechanisms of endothelin-1 in mammalian cell. ET-1, -2, -3; endothelin-1, -2, -3, ET_A and B; subtype A and B of endothelin receptor, ECE; endothelin-converting enzyme, ECE-1 and -2; subtype 1 and 2 of endothelin-converting enzyme, IL-1/-2; interleukin-1 and -2, ANP; atrial natriuretic peptide, BNP; brain natriuretic peptide, CNP; C-type natriuretic peptide, VSMC; vascular smooth muscle cell, EC; endothelial cell, LDLox; oxidized low density lipoprotein, mRNA; messenger ribonucleic acid, NH₂; amino group, COOH; carboxyl group, Asp; aspartic acid (D), Cys; cysteine (C), Glu; glutamic acid (E), His; histidine (H), Ile; isoleucine (I), Leu; leucine (L), Lys; lysine (K), Met; methionine (M), Phe; phenylalanine (F), Ser; serine (S), Thr; threonine (T), Trp; tryptophan (W), Tyr; tyrosine (Y), Val; valine (V).

으로 생성된 ET-1의 구조와 기능은 뱀독(*snake venom*)과 sarafotoxin S6b의 그것과 유사한 특징을 갖고 있다(Dashwood와 Tsui, 2002).

한편, Endothelin은 세포 내에서 저장형으로 존재하지 않으므로, 단백질의 생성 및 분비는 유전자 수준에서 조절되는 특징을 나타낸다(Nakamura 등, 1990; Ortega Mateo와 de Artiñano, 1997)(그림 1B, 1C). 또한 Endothelin은 여러 자극 즉, 저산소(*hypoxia*) 및 허혈(*ischemia*) 상태와 추위, 안지오텐신 II, 염증-유도 사이토카인(*tumor necrosis factor- α* , *interleukin-1/-2* 등), cortisol, thrombin, 맥동성 혈관 벽의 신장(*pulsatile stretch*), epinephrine, 산화형 저밀도 지질단백(*oxidized low density lipoprotein*), 성장인자 등에 의해서 생성 및 유리되는 것으로 보고 되어있다(Ortega Mateo와 de Artiñano, 1997; Haynes와 Webb, 1998; Mayes, 2003)(그림 1C). 반면 여성호르몬이나 *Prostacyclin*, 내인성 일산화질소(*endogenous nitric oxide*), 헤파린 및 심방 나트륨이뇨 펩타이드(*atrial natriuretic peptide, ANP*) 등은 endothelin의 생성 및 분비를 억제하는 것으로 보고하고 있다(Haynes와 Webb, 1998; Mayes, 2003)(그림 1C).

Endothelin은 일반적으로 혈장 내 존재하는 농도가 0.5~10 pmol/l 정도로 낮은 농도분포를 보이며, 나타나는 반응시간(30~60분)에 비해 혈장 내 반감기는 1~7분 정도로 짧은 것으로 보고 되어있다(Miyauchi 등, 1991; Morise 등, 1995; Ortega Mateo와 de Artiñano, 1997; Attinà 등, 2005). 그러나 고혈압이나 심근경색, 선천성심부전(*congestive heart failure, CHF*), 만성신부전(*chronic renal failure, CRF*) 및 당뇨(*non-insulin-dependent diabetes mellitus, NIDDM*와 제1형 당뇨)에 이환된 환자 등의 경우, 혈장 ET-1 수준이 정상인에 비해 증가되어 있는 내용으로 미루어 병리적 지표로 중요한 부분을 차지하는 것으로 확인할 수 있었다(Saito 등, 1991; Cody 등, 1992; Haak 등, 1992; Omland 등, 1994; Morise 등, 1995).

2. Endothelin 수용체와 그 특성

인간을 포함한 포유동물에 존재하는 endothelin의 수용체에는 endothelin 수용체 A형(ET_A) 과 B형(ET_B)의 상이한 형태로 나타나며, 이 수용체의 유전자는 4번과 13번 염색체에 각각 위치한다(Sakurai

표 1. Classification of endothelin receptors

Receptor	ETA	ETB
Agonist Potency	ET-1 ≥ ET-2 >> ET-3	ET-1 = ET-2 = ET-3
Affinity	ET ¹ ~ 10 ⁹ mol/l ET ³ ~ 10 ⁶ mol/l	ET ¹ ~ 10 ⁹ mol/l ET ³ ~ 10 ⁹ mol/l
Tissue	VSM	Endothelium, VSM
Selective Agonist	None	ET-3, BQ-3020, Sarafotoxin S6c, IRL-1620
Antagonist	BQ-123	BQ-788
Main Functions	Vasoconstriction Cell Proliferation Angiogenesis Mitogenesis Matrix Formation	Vasoconstriction/Vasodilatation ET Clearance Natriuresis Release of NO & Prostacyclin Inhibition of ECE-1 Expression

등, 1990; Cyr 등, 1991; Arai 등, 1993). 이들 수용체는 세포막을 7번 관통하는 전형적인 로돕신-유사 GTP-결합 단백질(*rhodopsin-like guanosine monophosphate-binding protein*)의 특성을 지니고 있다(Inoue 등, 1989; Sakurai 등, 1990). 각각의 동위효소에 대한 수용체의 친화도는 ET_A 의 경우 특히 $ET-1$ 에 선택적으로 작용하는 반면 ET_B 는 3개의 동위효소에 대해 친화도가 동일한 것으로 보고하고 있다(Sakurai 등, 1990; Hosoda 등, 1991)(표 1). 실제 ET_A 의 친화도는 $ET-3$ 에 비해 $ET-1$ 과의 친화도가 1,000배 정도 강한 차이를 나타내는 것으로 보고하고 있다(Hosoda 등, 1991). 한편 통증 및 고혈압 원인 물질 등으로 유도되는 혈관수축의 경우, 평활근세포에 존재하는 ET_A 와 ET_B 수용체가 관여하며, 이와 상반되는 이완작용은 혈관내피세포에 존재하는 ET_B 수용체를 통한 내인성 일산화질소의 생성으로 유도됨이 보고 되어있다(Yanagisawa 등, 1988; Rubanyi와 Polokoff, 1994; Haynes와 Webb, 1998)(표 1). 또한 정확한 작용기전은 밝혀지지 않았으나 ET_B 수용체가 평활근세포에 존재하여 혈관수축에 관여함이 보고 되어있다(Haynes 등, 1995). 그러나 ET_B 수용체를 특정적으로 자극하는 효현제(agonist)로부터 유도되는 혈관의 수축반응은 동물의 종(species)이나 혈관의 크기 및 종류에 따라 다양하게 나타나는 것으로 보고 되었다.

Endothelin 수용체의 수는 여러 인자들에 의해 조절되는 특징을 나타내는데, 허혈/재관류(ischemia/reperfusion)나 cyclosporin A는 수용체의 수를 증가시키는 반면 안지오텐신 II나 발암물질인 phorbol ester는 수용체의 수를 감소시키는 것으로 보고 되어있다(Roubert 등, 1989; Liu 등, 1990; Nambi 등, 1990).

3. Endothelin-1-유도 혈관평활근 수축에 관여하는 Ca^{2+} 이온통로와 그 작용기전

농도 의존적 Endothelin-1 적용으로 유발되는 혈관

평활근의 수축이나 세포증식에 필수요건으로 세포 외 Ca^{2+} 의 세포 내 유입(고농도, 10^{-8} M; 저농도, 10^{-10} M)과 세포 내 저장고로부터 유리(고농도, 10^{-8} M)되는 Ca^{2+} 이 관여한다(Enoki 등, 1995; Minowa 등, 1997; Inui 등, 1999). 일반적으로 이러한 Ca^{2+} 유입의 통로에는 세 가지 부류의 통로가 존재하며 다음과 같다. 첫 번째는 세포막 전압의 변동으로 열리고 닫히는 통로인 전압-의존성 Ca^{2+} 통로(voltage-dependent or operated Ca^{2+} channel, VDCC or VOCC)가 그것이며, 세포막 바깥에 존재하는 리간드와 수용체/이온채널과 결합하는 과정에서 생성되는 신호전달로 활성화되는 Ca^{2+} 통로 즉, 수용체-조절 Ca^{2+} 통로(receptor-operated Ca^{2+} channel)가 또한 그것이다. 마지막으로 Ca^{2+} 통로의 활성화유무가 막전압의 변동과 리간드의 결합에 비-의존적 경향을 나타냄과 동시에 세포 내에서 일어나는 신호전달계의 활성화와 직접적 연관성이 있는 Ca^{2+} 통로 즉, 저장-조절 Ca^{2+} 통로(store-operated Ca^{2+} channel, SOCC)와 비 선택적 양이온 통로(nonspecific cation channel, NSCC) 등이 그것이다(Huang 등, 1990; Miwa 등, 1999; Munaron 등, 2004; Kawanabe와 Nauli, 2005)(그림 2A). 여기서 SOCC는 세포 내 Ca^{2+} 저장고가 고갈될 경우 활성화되는 칼슘통로인 반면, NSCC는 세포 내 Ca^{2+} 저장고의 고갈 유무에 관계없이 즉 독립적으로 작용하는 특징을 지니고 있다. 또한 $ET-1$ 의 농도에 따라 통과유무의 이온(Mn^{2+}) 변동과 통로억제제(SK&F 96365, LOE 980)에 특이성을 나타내는 NSCC-1과 NSCC-2로 각각 분류하고 있다(Kawanabe 등, 2002a; Miwa 등, 1999; 2005)(그림 2A).

혈관평활근 세포에는 특히 A형 ET 수용체의 발현이 우세하며, $ET-1$ -유도 NSCC와 SOCC활성에 있어서 GTP-결합 단백질이 연결되어 작용을 나타낸다(Okamoto 등, 1997; Kawanabe 등, 2002b). 여기서 ET_A 수용체는 G_q 와 G_s , G_{12} 및 G_{13} 과 결합하여 작용을 나타내는 것으로 보고 되어 있다(Takagi 등, 1995; Gohla 등, 2000; Kawanabe 등, 2002b). 또

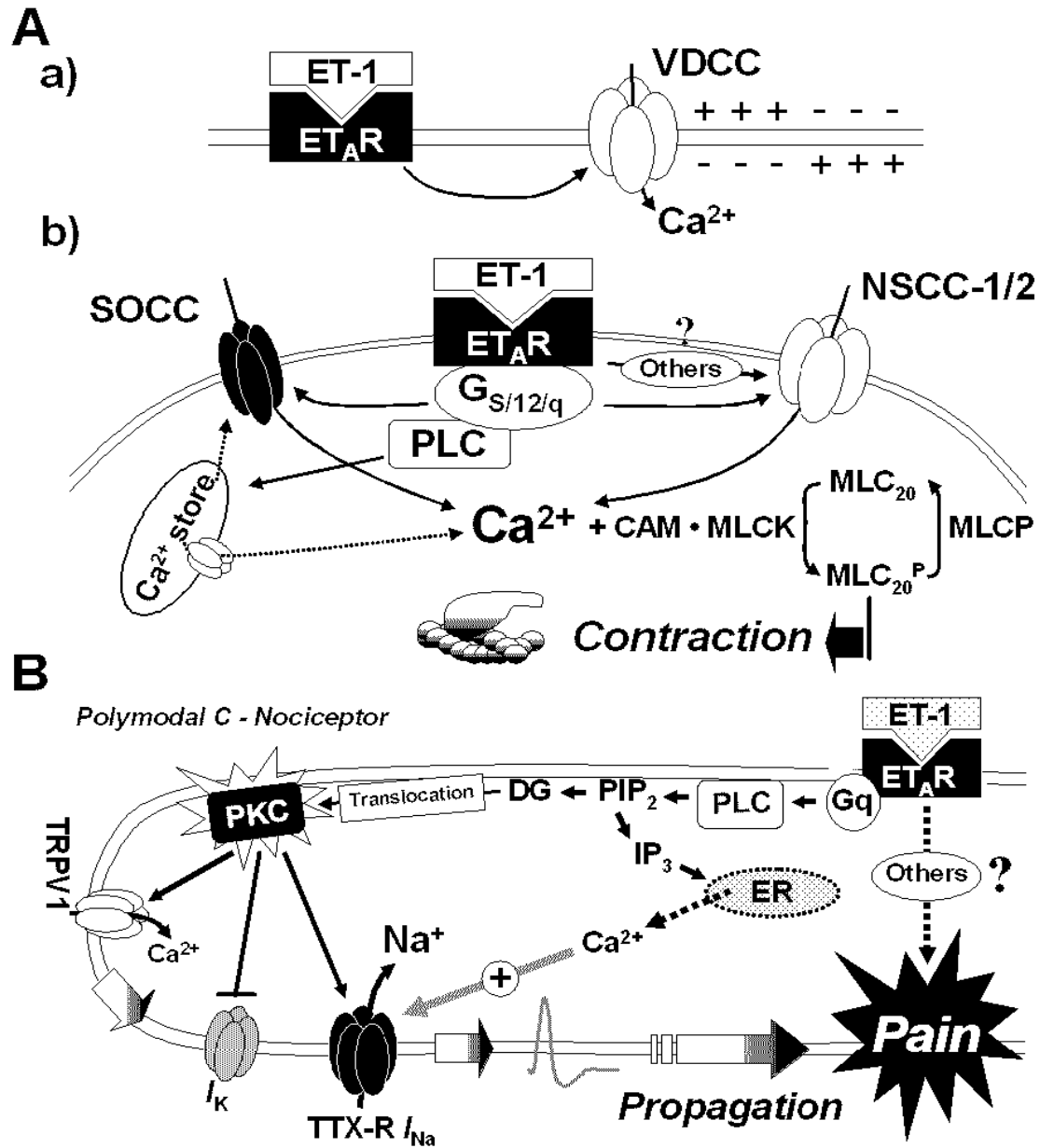


그림 2. Schematic representation of the activation mechanisms of voltage-dependent/-independent Ca²⁺ channel (A) and the model for the mechanisms of pain signaling (B) by endothelin-1/endothelinA receptor.

ET-1; endothelin-1, ETAR; endothelinA receptor, VDCC; voltage-dependent Ca²⁺ channel, SOCC; store-operated Ca²⁺ channel, NSCC1/2; nonselective cation channel 1 and 2, PLC; phospholipase C, CAM; calmodulin, MLCK; myosin light chain kinase, MLCP; myosin light chain phosphatase, MLC₂₀; 20-kD myosin light chain, MLC₂₀^P; phosphorylated 20-kD myosin light chain, G_{S/12/q}; the families of trimeric GTP-binding protein, DG; Diacylglycerol, PKC; protein kinase C, PIP₂; phosphatidyl inositol-bisphosphate, IP₃; inositol triphosphate, ER; endoplasmic reticulum, I_K; delayed rectifier K⁺ currents, TRPV1; transient receptor potential V1 also known as vanilloid receptor 1, TTX-R I_{Na}; tetrodotoxin-resistant Na⁺ currents.

한 GTP-결합 단백질 활성화의 효과기로서 PLC(phospholipase C)의 활성이 관여한다(Kelso 등, 2000; Shin 등, 2002). 이렇게 활성화된 ET-1-유도 PLC의 활성증가는 세포막지질 중에서 이노시톨-함유 지질인 PIP₂(phosphoinositol 4, 5-biphosphate)를 가수분해하여 IP₃(inositol 1, 4, 5-triphosphate)와 디아실글리세롤(diacylglycerol, DAG 혹은 DG)의 2차 전령계를 생산하게 된다(Berridge, 1989; Shin 등, 2002). 따라서 위의 과정으로 생성된 IP₃는 SR로부터 Ca²⁺ 유리를 촉진시키게 된다(Saida와 van Breemen, 1987; Wu 등, 2006). 한편, ET-1 자극에 대한 반응으로 증가된 세포 내 Ca²⁺은 Ca²⁺ 결합단백질인 칼모둘린(calmodulin, CAM)과 결합하게 되며, 활성이 증가된 CAM은 마이오신경쇄(myosin light chain, MLC)를 인산화시키는 효소인 마이오신경쇄 부활효소(myosin light chain kinase, MLCK)를 활성화시킨다(Hartshorne과 Siemankowski, 1981; Ansari 등, 2004; Woodsome 등, 2006). 이러한 ET-1-유도 MLCK의 활성 증가는 분자량 20-kD의 MLC(MLC₂₀)를 인산화 시킴으로써 마이오신 단백질의 구조적 변화를 가져오며 액틴 단백질과의 결합을 일으키게 된다(Murphy, 1989; Gohla 등, 2000; Ansari 등, 2004; Woodsome 등, 2006). 그러나 이와 반대로 세포 내 Ca²⁺이 감소할 경우, MLCK의 활성이 감소함과 동시에 마이오신경쇄 인산분해효소(myosin light chain phosphatase, MLCP)의 활성이 증가하여 MLC₂₀의 탈인산화를 유발시키게 된다(Somlyo와 Himpens, 1989; Katoch 등, 1997). 이러한 MLC₂₀의 탈인산화는 액틴 단백질과 마이오신 단백질의 해리(dissociation)을 촉진시켜 결국 근이완 반응이 일어나게 된다(Taylor와 Stull, 1988; Katoch 등, 1997; Miwa 등, 2005)(그림 2A). 또한 ET-1-유도 평활근의 수축기전에는 위에서 설명한 MLCK를 활성화시키는 경로와 함께 또 다른 신호전달경로가 존재하며 다음과 같다. 즉 단백질 부활효소 C의 활성화가 관여하는 PKC-경로와 유사분열-활성

단백질부활효소가 관여하는 MAPK-경로, 저분자량 단량체 GTP 결합 단백질 (small molecular monomeric GTP binding protein)이 관여하는 Rho-Associated Protein Kinase (ROCK)-경로 및 이노시톨 인산화 부활효소의 활성 유무가 관여하는 PI3K-경로 등이 ET-1-유도 평활근 수축기전에 관여한다고 보고 되었다(Karaki 등, 1997; Ansari 등, 2004; Kim 등, 2004a; Zubkov 등, 2004).

4. Endothelin-1-유도 유해감각 수용체에서 유발되는 통증기전

Endothelin-1(ET-1)은 사람을 포함한 포유동물의 뇌와 척수, 교감신경절 및 후근신경절 등에 그 발현이 존재함과 동시에 통증신호전달체계에서 중요한 역할을 하는 내용이 보고 되어 있다(Giaid 등, 1989, 1991; Kar 등, 1991; Kurokawa 등, 1997; Damon, 1998; Davar 등, 1998; Jarvis 등, 2000; Davar, 2001; Gokin 등, 2001). 이러한 ET-1 연관성 통증발현에는 중추와 말초신경에서 나타나는 반응이 서로 상이하며 다음과 같다. 먼저 중추신경계의 PAG(dorsolateral periaqueductal gray) 영역과 척수에 주입한 ET-1의 경우, 항유해효과(antinociceptive effect)를 나타낸 결과로 미루어 ET-1은 중추신경계에서 통증전도를 억제하는 조절자로서의 역할을 보고하고 있다(Kamei 등, 1993; Yamamoto 등, 1994; D'Amico 등, 1996;). 반면 말초신경계에 적용한 ET-1은 통각과민(hyperalgesia)과 유해 및 통증반응 등이 나타남을 보고하고 있다(Davar 등, 1998; De-Melo 등, 1998; Gokin 등, 2001). 실제 염증성 세포와 암세포 배양을 비롯한 다수의 세포에서 ET-1이 생성되며, 피부손상 후 ET-1의 과도한 유리가 보고 되어 있다(Gandhi 등, 1994; Ahn 등, 1998; Zhou 등, 2002). 이러한 ET-1을 족척부위(plantar hindpaw)에 피하주입함으로써 통증-유사 행위(pain-like behavior)가 나타나는 것 역시 이러한 내용을 뒷받침해 준다(Ferreira 등,

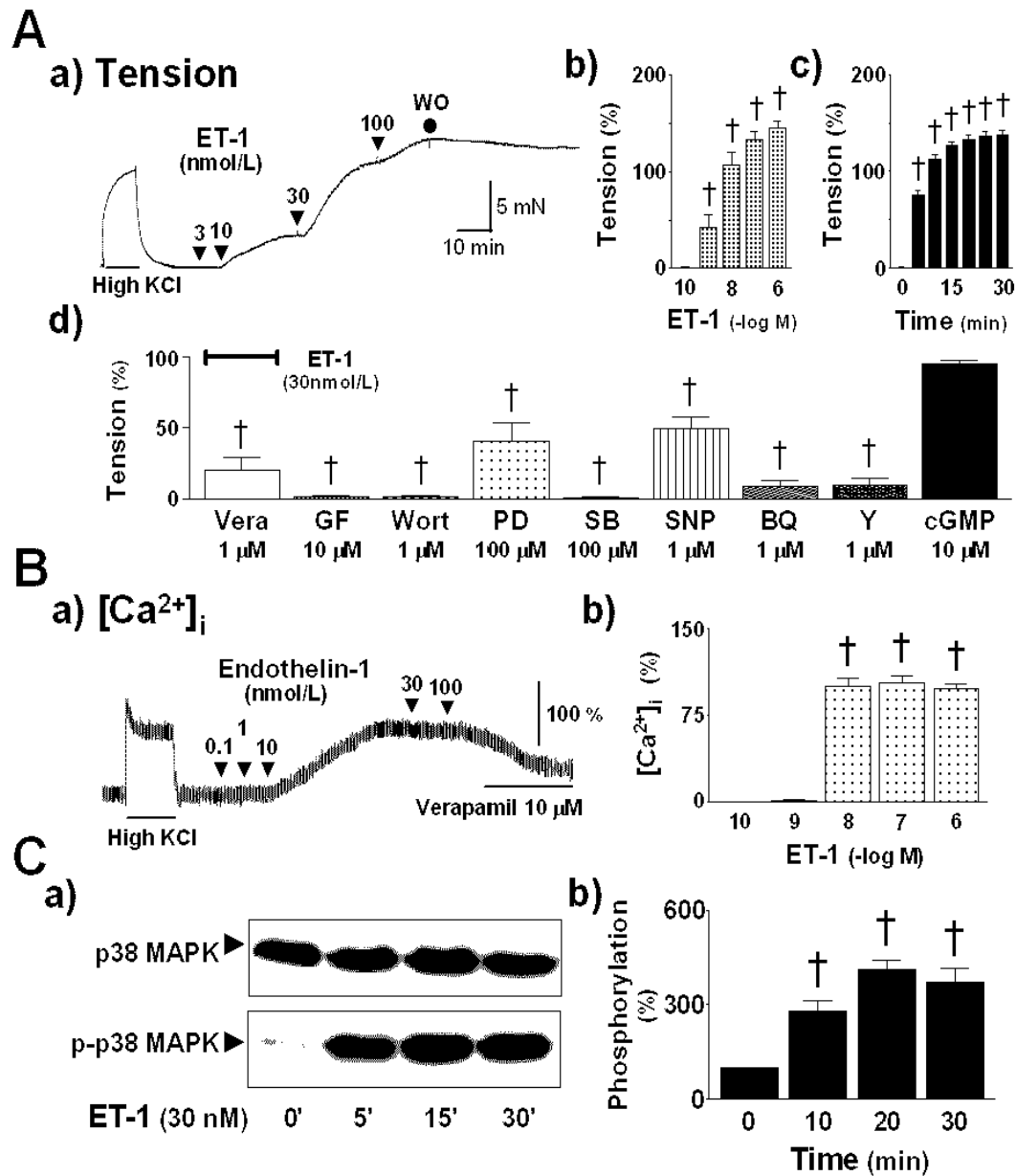


그림 3. Effects of endothelin-1 on isometric tension, intracellular Ca²⁺, and p38 mitogen-activated protein kinase to rat aortic smooth muscle.

ET-1; endothelin-1, Vera; verapamil hydrochloride (inhibitor of L-type Ca²⁺ channel), GF; GF109203X (inhibitor of protein kinase C), Wort; wortmannin (inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase), PD; PD098059 (inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase, MAPKK/MEK), SB; SB203580 (inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase), SNP; sodium nitroprusside (nitric oxide donor), BQ; BQ-123 (ETA endothelin receptor antagonist), Y; Y-27632 dihydrochloride (inhibitor of the Rho-associated protein kinase p160ROCK), cGMP; 8-bromo-cyclic guanosine 3',5'-monophosphate (membrane permeable cGMP analogue), [Ca²⁺]_i; intracellular Ca²⁺, p38 MAPK; p38 mitogen-activated protein kinase.

1989; Gokin 등, 2001; Houck 등, 2004). 또한 ET-1은 *Capsaicin*과 같은 유해-화학적 자극으로 유발되는 반응의 감수성을 증가시키는 반면, 어떤 통증 모델의 경우 ET-1-유도 유해 자극의 출현이 *Prostaglandins*의 억제제인 *Indomethacin*으로 억제되지 않은 결과로 미루어 ET-1 반응에 *prostaglandin*-비의존적임을 주장하는 내용이 보고되었다(Raffa와 Jacoby, 1991; Dymshitz와 Vasko, 1994; Piovezan 등, 1998; Yamamoto 등, 2006).

한편, ET-1-유도 다류성-C 유해 수용기 (*polymodal-C nociceptors*) 활성화 기전의 경우, ET-1_A 수용체가 활성화 되고 이어서 삼량체 GTP-결합 단백질의 활성화 및 모양변화의 과정을 거쳐 인지질 분해효소인 PLC를 활성화 시킨다. 이렇게 활성화된 PLC는 IP₃의 생성-활성화 및 Ca²⁺ 저장고로부터 Ca²⁺의 유리를 촉발시키게 된다(Greenberg 등, 1992; Lin 등, 1992; Zochodne 등, 1992; McLarnon 등, 1999; Zhou 등, 2001). 따라서 결과적으로 통증과 밀접한 연관성이 있는 *tetrodotoxin*-저항성 전압-개폐 나트륨 전류(*tetrodotoxin-resistant (TTX-R) voltage-gated Na⁺ currents*)의 증폭을 초래함으로써 통증이 유발되는 것으로 알려져 있다(Gokin 등, 2001; Renganathan 등, 2001; Zhou 등, 2002)(그림 2B). 또한 ET-1-유도 PLC의 활성화로 IP₃와 함께 생성된 DG는 전형적 *serine-threonine kinase*인 PKC를 활성화시키게 되는데 이 기작에는 세포질에 존재하던 PKC가 DG의 자극으로 세포막 측으로 이동되는 "Translocation"과정을 거쳐 하위체계의 효소(*downstream*)가 일련의 "Cascade" 과정으로 활성화를 나타낸다(Cesare 등, 1999; Yamamoto 등, 2006). 이렇게 활성화된 PKC는 Ca²⁺ 이온에 선택적인 TRPV1(*transient receptor potential vanilloid 1* 혹은 *vanilloid receptor subtype-1*) 수용체와 TTX-R Na⁺ 통로를 활성화시키는 것으로 보고되어 있다(Gold 등, 1998; Bolcskei 등, 2005; Hong과 Wiley, 2005; Ikeda 등, 2005)(그림 2B). 여기서 TRPV1은 *Capsaicin*이나 43°C 이상의 유해적 열자

극 및 *bradykinin*과 같은 활성물질의 자극 등으로 활성화되며, TTX-R Na⁺ 통로는 염증으로부터 유도되는 통각과민이나 에피네프린, *prostaglandin E₂* 및 세로토닌의 적용 등으로 인하여 활성화되는 전형적 통증관련 수용체로 알려져 있다(Khasar 등, 1999; Gold 등, 2002; Plant 등, 2006). 또한 PKC는 지연성 K⁺ 전류(*delayed rectifier K⁺ currents, I_K*)를 억제시킴으로써 결국 막전압의 탈분극(*depolarization*)을 유도하는 결과를 초래하게 되어 활동전압의 생성 및 통증전달의 양상을 나타내게 된다(Doerner 등, 1988; Linden 등, 1992)(그림 2B). 이러한 내용은 *Opioid* 수용체의 활성화로 유도되는 G-단백-개폐 내향성 K⁺ 통로(*G-protein-gated inward-rectifier K⁺ channel, GIRK*)의 활성화 및 그로 인해 형성되는 I_K의 활성화증가 즉, 막전압이 과분극(*hyperpolarization*)된다는 내용으로 그 의의가 주목을 받는다(Chen 등, 2001; Kelly 등, 2002; Torrecilla 등, 2002).

5. Endothelin-1-유도 근조직의 반응특성과 통증의 상관성

근 조직 특히 평활근 조직에서 나타나는 과도수축은 고혈압(*hypertension*), 심근경색(*myocardial infarction*), 뇌혈관경련(*cerebral vasospasm*), 월경통-연관 자궁수축(*menorrhagia-related uterine contraction*), 천식(*asthma*) 및 기능적 혈관경련성 과민반응과 통증을 동반하는 레이노드 병(*Raynaud's disease*) 등의 발병 혹은 악화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Shirao 등, 2002; Bachar 등, 2005; Furspan 등, Khalil 등, 2005; 2005; Kim 등, 2003, 2004a, 2005). 특히, ET-1-유도 혈관수축으로 야기되는 허혈 및 재관류 현상(*ischemia/reperfusion*)은 심혈관질환을 비롯한 염증반응-유도 통증유발 기전에 중요한 위험인자로 작용한다(Lockowandt 등, 2002; Taylor 등, 2004; Tsui와 Dashwood, 2005).

따라서 본 연구자들은 이전에 발표했던 ET-1을 포

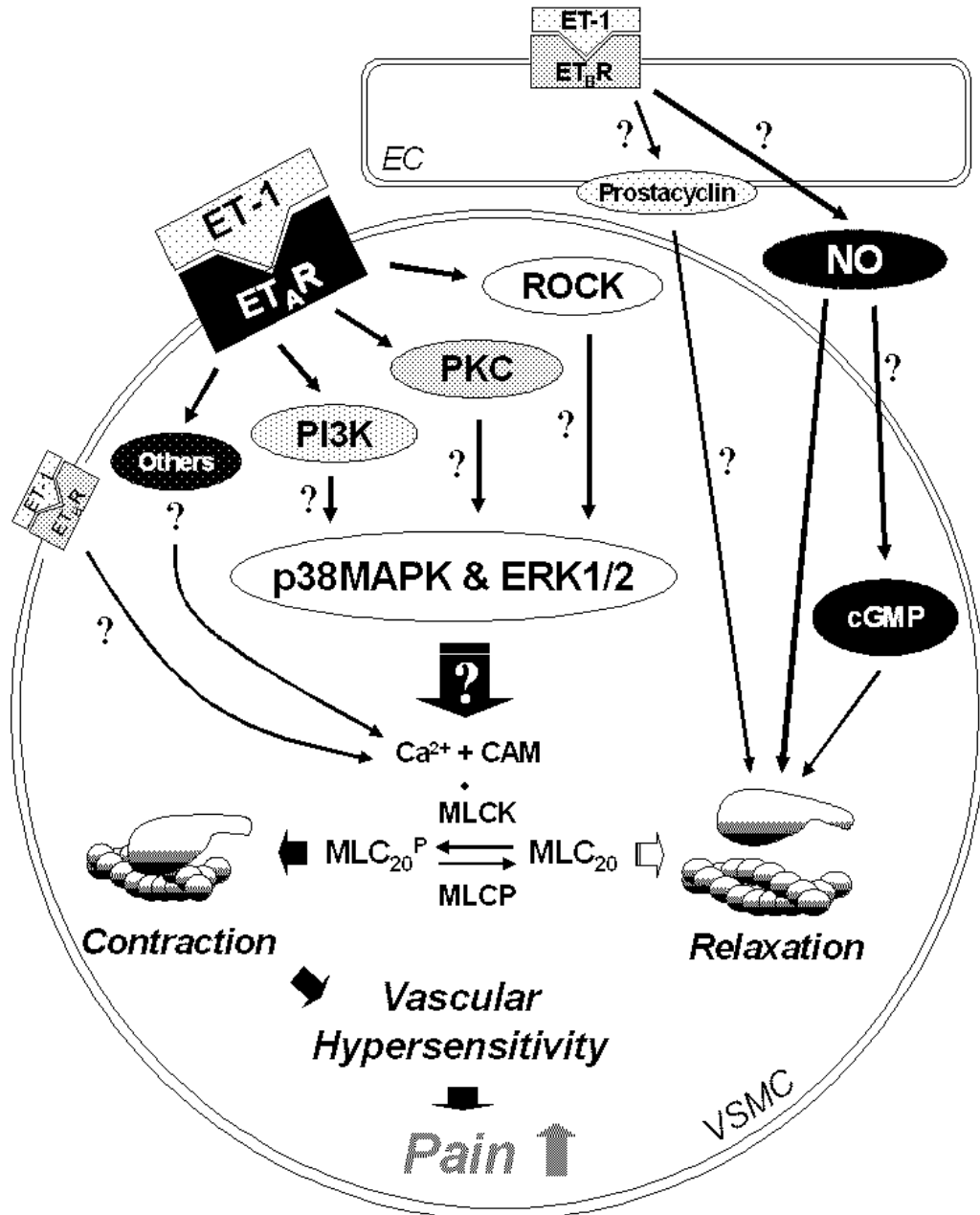


그림 4. Schematic representation of the activation mechanisms by endothelin-1/endothelin receptor in smooth muscle.

ET-1; endothelin-1, ET_AR; endothelinA receptor, ET_BR; endothelinB receptor, CAM; calmodulin, MLCK; myosin light chain kinase, MLCP; myosin light chain phosphatase, MLC₂₀; 20-kD myosin light chain, MLC₂₀^P; phosphorylated 20-kD myosin light chain, PKC; protein kinase C, PI3K; phosphatidylinositol 3-kinase, ROCK; Rho-associated protein kinase, p38 MAPK; p38 mitogen-activated protein kinase, ERK1/2; extracellular-signal-regulated protein kinase 1 and 2, ER; NO; nitric oxide, cGMP; cyclic guanosine monophosphate, endoplasmic reticulum, EC; endothelial cell, VSMC; vascular smooth muscle cell.

합한 효현제(agonist) 유도-근수축반응에 대한 내용과 보충-실험결과를 제시하였다(Park 등, 2003; Kim 등, 2003, 2004a, 2004b, 2005; Choi 등, 2005; Lee 등, 2006)(그림 3). 특히, ET-1-유도 근수축반응 및 그 기전에 관여하는 매개체를 조사한 결과 다음과 같았다. 혈관조직에 대한 ET-1의 반응은 농도-의존적으로 근 수축이 증가하는 양상을 나타내며 동시에 시간-의존적으로 유의한 증가를 확인할 수 있었다(그림 3A-a, 3A-b, 3A-c). 이러한 ET-1-유도 근수축반응은 각각 L-형 Ca^{2+} 통로 억제제(verapamil 1 μM)와 PKC 억제제(GF109203X 10 μM), PI3K 억제제(Wortmannin 1 μM), MEK 억제제(PD098059 100 μM), p38 MAPK 억제제(SB203580 100 μM), ET_A 수용체 억제제(BQ123 1 μM), Rho kinase 억제제(Y-27632 1 μM) 및 NO(nitric oxide, sodium nitroprusside, SNP 1 μM) 제공제의 처리로 유의한 감소가 나타남을 관찰할 수 있었다(그림 3A-d). 이러한 본 실험의 결과는 극히 부분적인 결과이나 ET-1 적용으로 유발되는 수축기전에 L-형 Ca^{2+} 통로를 통한 Ca^{2+} 의 유입이 관여함을 제시함과 동시에 Ca^{2+} -의존성 PKC, PI3K, ERK1/2, p38 MAPK, Rho-kinase, 외인성 NO 및 ET A형 수용체를 통한 신호전달체계를 유추할 수 있었다. 또한 ET-1 적용으로 변동되는 세포 내 Ca^{2+} 을 직접 측정함으로써 제2 전령계로서의 Ca^{2+} 의 관여 유무를 확인하였다. 결과 누적적으로 처리한 ET-1에 농도-의존적으로 유의한 증가를 나타냄을 확인할 수 있었다(그림 3B-a, 3B-b). 한편, ET-1-유도 근수축의 증가에 관여하는 신호전달 기전에 MAPK가 관여함을 근장력 측정으로 확인할 수 있었다. 그러나 이러한 ET-1-유도 근수축 증가에 MAPK의 인산화가 과연 비례적으로 움직이는지의 유무를 확인하기 위하여 p38 MAPK의 활성을 측정하였다. 결과 ET-1 30nM 단일 농도에 대해 시간-의존적으로 활성이 유의한 증가를 나타냄을 확인할 수 있었다(그림 3C-a, 3C-b). 따라서 ET-1-유도 근수축반응에 세포 내 Ca^{2+} 의 증가와 p38 MAPK의 활성 및 기타 여러 요소가 관여하

고 있음을 확인할 수 있었다(그림 4). 즉 이러한 ET-1 유도 신호전달기전의 체계는 심혈관질환을 비롯한 통증 유발 및 악화에 중요한 기전임을 관찰할 수 있었다.

6. ET-1-유도 근수축 및 통증기전 연구를 통한 물리치료 연구의 접근과 방향

지금까지 ET-1-유도 근수축반응과 통증 기전의 고찰은 ET-1으로 유발될 수 있는 심혈관질환 및 허혈-유인성 통증유발 및 기타 병리적 병변과 밀접한 관련성이 있음을 확인할 수 있었다. 더욱이 극히 일부에 지나지 않은 유발인자이지만 통증 및 심혈관질환 전문 물리치료영역에서 체계적이고 심도 있는 연구가 성공적으로 이루어질 경우, 적지 않은 물리치료의 발전을 도모할 수 있으리라 사료된다.

따라서 향후 보다 체계적인 실험적, 임상적 연구방법으로 접근할 필요성이 있음을 제시해 본다.

참고문헌

- 김중환, 천기영, 민경옥. 단백질 부활효소 C 활성 효현제-유도 조직의 반응성과 통증신호-전달에 대한 단백질 부활효소 C 동위효소의 상관성-통증전문 물리치료 연구를 위한 기초의학적 접근-. 대한물리치료 학회지, 12(1), 29-39, 2005a.
- 김중환, 천기영, 민경옥, 김순희. 통각과민과 이질통에 대한 유사분열-활성 단백질 부활효소 (Mitogen-Activated Protein Kinase)의 상관성 연구-통증전문물리치료 연구를 위한 기초의학적 접근-. 대한물리치료학회지, 12(1), 87-96, 2005b.
- Ahn GY, Butt KI, Jindo T, Yaguchi H, Tsuboi R, and Ogawa H. The expression of endothelin-1 and its binding sites in mouse skin increased after ultraviolet B irradiation or local injection of tumor necrosis factor α . J Dermatol. 25(2),

- 78-84, 1998.
- Alberts GF, Peifley KA, Johns A, Kleha JF, and Winkles JA. Constitutive endothelin-1 overexpression promotes smooth muscle cell proliferation via an external autocrine loop. *J. Biol. Chem.* 269(13), 10112-10118, 1994.
- Ansari HR, Kaddour-Djebbar I, and Abdel-Latif AA. Involvement of Ca²⁺ channels in endothelin-1-induced MAP kinase phosphorylation, myosin light chain phosphorylation and contraction in rabbit iris sphincter smooth muscle. *Cell Signal.* 16(5), 609-619, 2004.
- Arai H, Nakao K, Takaya K, Hosoda K, Ogawa Y, Nakanishi S, and Imura H. The human endothelin-B receptor gene. Structural organization and chromosomal assignment. *J. Biol. Chem.* 268(5), 3463-3470, 1993.
- Arinami T, Ishikawa M, Inoue A, Yanagisawa M, Masaki T, Yoshida MC, and Hamaguchi H. Chromosomal assignments of the human endothelin family genes: the endothelin-1 gene (EDN1) to 6p23-p24, the endothelin-2 gene (EDN2) to 1p34, and the endothelin-3 gene (EDN3) to 20q13.2-q13.3. *Am. J. Hum. Genet.* 48(5), 990-996, 1991.
- Attinà T, Camidge R, Newby DE, and Webb DJ. Endothelin antagonism in pulmonary hypertension, heart failure, and beyond. *Heart.* 91(6), 825-831, 2005.
- Bachar O, Rose AC, Adner M, Wang X, Prendergast CE, Kempf A, Shankley NP, and Cardell LO. TNF α reduces tachykinin, PGE2-dependent, relaxation of the cultured mouse trachea by increasing the activity of COX-2. *Br J Pharmacol.* 144(2), 220-230, 2005.
- Berridge MJ. The Albert Lasker Medical Awards. Inositol trisphosphate, calcium, lithium, and cell signaling. *JAMA.* 262, 1834-1841, 1989.
- Boarder MR and Marriott DB. Characterization of endothelin-1 stimulation of catecholamine release from adrenal chromaffin cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 13 (Suppl 5), S223-S224, 1989.
- Bolcskei K, Helyes Z, Szabo A, Sandor K, Elekes K, Nemeth J, Almasi R, Pinter E, Petho G, and Szolcsanyi J. Investigation of the role of TRPV1 receptors in acute and chronic nociceptive processes using gene-deficient mice. *Pain.* 117(3), 368-376, 2005.
- Cesare P, Dekker LV, Sardini A, Parker PJ, and McNaughton PA. Specific involvement of PKC- ϵ in sensitization of the neuronal response to painful heat. *Neuron.* 23(3), 617-624, 1999.
- Chen X, Marrero HG, and Freedman JE. Opioid receptor modulation of a metabolically sensitive ion channel in rat amygdala neurons. *J Neurosci.* 21(23), 9092-9100, 2001.
- Choi WH, Kim J, Lee YR, Lee CK, Kim YS, Kim J, Choi YJ, Woo NS, Cho S, and Kim B. Cdc42 contributes to phorbol ester-induced Ca²⁺-independent contraction of pulmonary artery smooth muscle. *J Vet Med Sci.* 67(8), 787-793, 2005.
- Cody RJ, Haas GJ, Binkley PF, Capers Q, and Kelley R. Plasma endothelin correlates with the extent of pulmonary hypertension in patients with chronic congestive heart failure. *Circulation.* 85(2), 504-509, 1992.
- Cozza EN, Gomez-Sanchez CE, Foecking MF, and Chiou S. Endothelin binding to cultured calf adrenal zona glomerulosa cells and stimulation of aldosterone secretion. *J. Clin. Invest.* 84(3), 1032-1035, 1989.

- Cyr C, Huebner K, Druck T, and Kris R. Cloning and chromosomal localization of a human endothelin ETA receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181(1), 184-190, 1991.
- D'Amico M, Berrino L, Maione S, Filippelli A, de Novellis V, and Rossi F. Endothelin-1 in periaqueductal gray area of mice induces analgesia via glutamatergic receptors. *Pain.* 65(2-3), 205-209, 1996.
- Damon DH. Postganglionic sympathetic neurons express endothelin. *Am J Physiol.* 274(3 Pt 2), R873-R878, 1998.
- De-Melo JD, Tonussi CR, D'Orleans-Juste P, and Rae GA. Articular nociception induced by endothelin-1, carrageenan and LPS in naive and previously inflamed knee-joints in the rat: inhibition by endothelin receptor antagonists. *Pain.* 77(3), 261-269, 1998.
- Dashwood MR and Tsui JC. Endothelin-1 and atherosclerosis: potential complications associated with endothelin-receptor blockade. *Atherosclerosis.* 160(2), 297-304, 2002.
- Davar G. Endothelin-1 and metastatic cancer pain. *Pain Med.* 2(1), 24-27, 2001.
- Davar G, Hans G, Fareed MU, Sinnott C, and Strichartz G. Behavioral signs of acute pain produced by application of endothelin-1 to rat sciatic nerve. *Neuroreport.* 9(10), 2279-2283, 1998.
- Doerner D, Pitler TA, and Alger BE. Protein kinase C activators block specific calcium and potassium current components in isolated hippocampal neurons. *J Neurosci.* 8(11), 4069-4078, 1988.
- Dymshitz J and Vasko MR. Endothelin-1 enhances capsaicin-induced peptide release and cGMP accumulation in cultures of rat sensory neurons. *Neurosci Lett.* 167(1-2), 128-132, 1994.
- Emoto N and Yanagisawa M. Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J. Biol. Chem.* 270(25), 15262-15268, 1995.
- Enoki T, Miwa S, Sakamoto A, Minowa T, Komuro T, Kobayashi S, Ninomiya H, and Masaki T. Long-lasting activation of cation current by low concentration of endothelin-1 in mouse fibroblasts and smooth muscle cells of rabbit aorta. *Br J Pharmacol.* 115(3), 479-485, 1995.
- Ferreira SH, Romitelli M, and de Nucci G. Endothelin-1 participation in overt and inflammatory pain. *J Cardiovasc Pharmacol.* 13 Suppl 5, S220-S222, 1989.
- Furspan PB, Chatterjee S, Mayes MD, and Freedman RR. Cooling-induced contraction and protein tyrosine kinase activity of isolated arterioles in secondary Raynaud's phenomenon. *Rheumatology.* 44(4), 488-494, 2005.
- Gandhi CR, Berkowitz DE, and Watkins WD. Endothelins. Biochemistry and pathophysiologic actions. *Anesthesiology.* 80(4), 892-905, 1994.
- Giaid A, Gibson SJ, Herrero MT, Gentleman S, Legon S, Yanagisawa M, Masaki T, Ibrahim NB, Roberts GW, and Rossi ML. Topographical localisation of endothelin mRNA and peptide immunoreactivity in neurones of the human brain. *Histochemistry.* 95(3), 303-314, 1991.
- Giaid A, Gibson SJ, Ibrahim BN, Legon S, Bloom SR, Yanagisawa M, Masaki T, Vardell IM,

- and Polak JM. Endothelin 1, an endothelium-derived peptide, is expressed in neurons of the human spinal cord and dorsal root ganglia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86(19), 7634-7638, 1989.
- Gohla A, Schultz G, and Offermanns S. Role for G12/G13 in agonist-induced vascular smooth muscle cell contraction. *Circ Res.* 87(3), 221-227, 2000.
- Gokin AP, Fareed MU, Pan HL, Hans G, Strichartz GR, and Davar G. Local injection of endothelin-1 produces pain-like behavior and excitation of nociceptors in rats. *J. Neurosci.* 21(14), 5358-5366, 2001.
- Gold MS, Levine JD, and Correa AM. Modulation of TTX-R INa by PKC and PKA and their role in PGE2-induced sensitization of rat sensory neurons in vitro. *J Neurosci.* 18(24), 10345-10355, 1998.
- Gold MS, Zhang L, Wrigley DL, and Traub RJ. Prostaglandin E2 modulates TTX-R INa in rat colonic sensory neurons. *J Neurophysiol.* 88(3), 1512-1522, 2002.
- Goraca A. New views on the role of endothelin. *Endocr. Regul.* 36(4), 161-167, 2002.
- Greenberg DA, Chan J, and Sampson HA. Endothelins and the nervous system. *Neurology.* 42(1), 25-31, 1992.
- Haak T, Jungmann E, Felber A, Hillmann U, and Usadel KH. Increased plasma levels of endothelin in diabetic patients with hypertension. *Am J. Hypertens.* 5(3), 161-166, 1992.
- Hartshorne DJ and Siemankowski RF. Regulation of smooth muscle actomyosin. *Annu Rev Physiol.* 43, 519-530, 1981.
- Haynes WG, Strahan FE, and Webb DJ. Endothelin ETA and ETB receptors cause vasoconstriction of human resistance and capacitance vessels in vivo. *Circulation.* 92(3), 357-363, 1995.
- Haynes WG and Webb DJ. Endothelin as a regulator of cardiovascular function in health and disease. *J. Hypertens.* 16(8), 1081-1098, 1998.
- Hickey KA, Rubanyi G, Paul RJ, and Highsmith RF. Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 248(5 Pt 1), C550-C556, 1985.
- Hong S and Wiley JW. Early painful diabetic neuropathy is associated with differential changes in the expression and function of vanilloid receptor 1. *J Biol Chem.* 280(1), 618-627, 2005.
- Hosoda K, Nakao K, Hiroshi-Arai, Suga S, Ogawa Y, Mukoyama M, Shirakami G, Saito Y, Nakanishi S, and Imura H. Cloning and expression of human endothelin-1 receptor cDNA. *FEBS Lett.* 287(1-2), 23-26, 1991.
- Houck CS, Khodorova A, Reale AM, Strichartz GR, and Davar G. Sensory fibers resistant to the actions of tetrodotoxin mediate nocifensive responses to local administration of endothelin-1 in rats. *Pain.* 110(3), 719-726, 2004.
- Huang XN, Hisayama T, and Takayanagi I. Endothelin-1 induced contraction of rat aorta: contributions made by Ca²⁺ influx and activation of contractile apparatus associated with no change in cytoplasmic Ca²⁺ level. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 341(1-2), 80-87, 1990.
- Ikeda M, Yoshida S, Kadoi J, Nakano Y, and

- Mastumoto S. The effect of PKC activity on the TTX-R sodium currents from rat nodose ganglion neurons. *Life Sci.* 78(1), 47-53, 2005.
- Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, and Masaki T. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86(8), 2863-2867, 1989a.
- Inoue A, Yanagisawa M, Takuwa Y, Mitsui Y, Kobayashi M, and Masaki T. The human preproendothelin-1 gene. Complete nucleotide sequence and regulation of expression. *J. Biol. Chem.* 264(25), 14954-14959, 1989b.
- Inui T, Ninomiya H, Sasaki Y, Makatani M, Urade Y, Masaki T, and Yamamura T. Selective activation of excitation-contraction coupling pathways by ETA and ETB receptors in guinea-pig tracheal smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 126(4), 893-902, 1999.
- Ishihata A, Tasaki K, and Katano Y. Involvement of p44/42 mitogen-activated protein kinases in regulating angiotensin II- and endothelin-1-induced contraction of rat thoracic aorta. *Eur J Pharmacol.* 445(3), 247-256, 2002.
- Jarvis MF, Wessale JL, Zhu CZ, Lynch JJ, Dayton BD, Calzadilla SV, Padley RJ, Opgenorth TJ, and Kowaluk EA. ABT-627, an endothelin ET(A) receptor-selective antagonist, attenuates tactile allodynia in a diabetic rat model of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol.* 388(1), 29-35, 2000.
- Josko J, Hendryk S, Jedrzejowska-Szypulka H, Slowinski J, Gwozdz B, Lange D, and Harabin-Slowinska M. Effect of endothelin-1 receptor antagonist BQ-123 on basilar artery diameter after subarachnoid hemorrhage (SAH) in rats. *J. Physiol. Pharmacol.* 51(2), 241-249, 2000.
- Kamei J, Hitosugi H, Kawashima N, Misawa M, and Kasuya Y. Antinociceptive effects of intrathecally administered endothelin-1 in mice. *Neurosci. Lett.* 153(1), 69-72, 1993.
- Kar S, Chabot JG, and Quirion R. Quantitative autoradiographic localisation of [¹²⁵I]endothelin-1 binding sites in spinal cord and dorsal root ganglia of the rat. *Neurosci. Lett.* 133(1), 117-120, 1991.
- Karaki H, Ozaki H, Hori M, Mitsui-Saito M, Amano K, Harada K, Miyamoto S, Nakazawa H, Won KJ, and Sato K. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. *Pharmacol Rev.* 49(2), 157-230, 1997.
- Katoch SS, Ruegg JC, and Pfitzer G. Differential effects of a K⁺ channel agonist and Ca²⁺ antagonists on myosin light chain phosphorylation in relaxation of endothelin-1-contracted tracheal smooth muscle. *Pflügers Arch.* 433(4), 472-477, 1997.
- Kawanabe Y and Nauli SM. Involvement of extracellular Ca²⁺ influx through voltage-independent Ca²⁺ channels in endothelin-1 function. *Cell Signal.* 17(8), 911-916, 2005.
- Kawanabe Y, Hashimoto N, and Masaki T. Characterization of Ca²⁺ channels involved in endothelin-1-induced contraction of rabbit basilar artery. *J Cardiovasc Pharmacol.* 40(3), 438-447, 2002a.
- Kawanabe Y, Okamoto Y, Nozaki K, Hashimoto N, Miwa S, and Masaki T. Molecular mechanism for endothelin-1-induced stress-fiber formation: analysis of G proteins using a mutant endothelin(A) receptor. *Mol*

- Pharmacol. 61(2), 277-284, 2002b.
- Kelly MJ, Qiu J, Wagner EJ, and Ronnekleiv OK. Rapid effects of estrogen on G protein-coupled receptor activation of potassium channels in the central nervous system (CNS). *J Steroid Biochem Mol Biol*. 83(1-5), 187-193, 2002.
- Kelso EJ, McDermott BJ, Silke B, and Spiers JP. EndothelinA receptor subtype mediates endothelin-induced contractility in left ventricular cardiomyocytes isolated from rabbit myocardium. *J Pharmacol Exp Ther*. 294(3), 1047-1052, 2000.
- Khalil PN, Neuhof C, Huss R, Pollhammer M, Khalil MN, Neuhof H, Fritz H, and Siebeck M. Calpain inhibition reduces infarct size and improves global hemodynamics and left ventricular contractility in a porcine myocardial ischemia/reperfusion model. *Eur J Pharmacol*. 528(1-3), 124-131, 2005.
- Khasar SG, Lin YH, Martin A, Dadgar J, McMahon T, Wang D, Hundle B, Aley KO, Isenberg W, McCarter G, Green PG, Hodge CW, Levine JD, and Messing RO. A novel nociceptor signaling pathway revealed in protein kinase C ϵ mutant mice. *Neuron*. 24(1), 253-260, 1999.
- Kim B, Kim J, Bae YM, Cho SI, Kwon SC, Jung JY, Park JC, and Ahn HY. p38 mitogen-activated protein kinase contributes to the diminished aortic contraction by endothelin-1 in DOCA-salt hypertensive rats. *Hypertension*. 43(5), 1086-1091, 2004a.
- Kim B, Kim J, Kim A, Kim YS, Lee YR, Bae YM, Cho S, and Rhyu MR. Ligusticum wallichii-induced vasorelaxation mediated by mitogen-activated protein kinase in rat aortic smooth muscle. *J. Ethnopharmacol*. 90(2-3), 397-401, 2004b.
- Kim B, Kim YS, Ahn J, Kim J, Cho S, Won KJ, Ozaki H, Karaki H, and Lee SM. Conventional-type protein kinase C contributes to phorbol ester-induced inhibition of rat myometrial tension. *Br J Pharmacol*. 139(2), 408-414, 2003.
- Kim BK, Mitsui M, and Karaki H. The long-term inhibitory effect of a Ca²⁺ channel blocker, nisoldipine, on cytosolic Ca²⁺ and contraction in vascular smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol*. 223(2-3), 157-162, 1992.
- Kim J, Lee YR, Lee CH, Choi WH, Lee CK, Kim J, Bae YM, Cho S, and Kim B. Mitogen-activated protein kinase contributes to elevated basal tone in aortic smooth muscle from hypertensive rats. *Eur. J. Pharmacol*. 514(2-3), 209-215, 2005.
- Kimura S, Kasuya Y, Sawamura T, Shinimi O, Sugita Y, Yanagisawa M, Goto K, and Masaki T. Conversion of big endothelin-1 to 21-residue endothelin-1 is essential for expression of full vasoconstrictor activity: structure-activity relationships of big endothelin-1. *J. Cardiovasc. Pharmacol*. 13 Suppl 5, S5-S7, 1989.
- Kurokawa K, Yamada H, and Ochi J. Topographical distribution of neurons containing endothelin type A receptor in the rat brain. *J Comp Neurol*. 389(2), 348-360, 1997.
- Lee YR, Lee CK, Park HJ, Kim H, Kim J, Kim J, Lee KS, Lee YL, Min KO, and Kim B. c-Jun N-terminal kinase contributes to norepinephrine-induced contraction through phosphorylation of caldesmon in rat aortic smooth muscle. *J Pharmacol Sci*. 100(2), 119-125, 2006.

- Levin ER. Endothelins. *N. Engl. J. Med.* 333(6), 356-363, 1995.
- Lin WW, Kiang JG, and Chuang DM. Pharmacological characterization of endothelin-stimulated phosphoinositide breakdown and cytosolic free Ca^{2+} rise in rat C6 glioma cells. *J Neurosci.* 12(3), 1077-1085, 1992.
- Linden DJ, Smeyne M, Sun SC, and Connor JA. An electrophysiological correlate of protein kinase C isozyme distribution in cultured cerebellar neurons. *J Neurosci.* 12(9), 3601-3608, 1992.
- Liu J, Chen R, Casley DJ, and Nayler WG. Ischemia and reperfusion increase ^{125}I -labeled endothelin-1 binding in rat cardiac membranes. *Am. J. Physiol.* 258(3 Pt 2), H829-H835, 1990.
- Lockowandt U, Bjessmo S, Ivert T, and Franco-Cereceda A. Plasma levels and vascular effects of endothelin and big endothelin in patients with stable and unstable angina pectoris undergoing coronary bypass grafting. *Eur J Cardiothorac Surg.* 21(2), 218-223, 2002.
- Masaki T. Historical review: Endothelin. *Trends. Pharmacol. Sci.* 25(4), 219-224, 2004.
- Masaki T, Miwa S, Sawamura T, Ninomiya H, and Okamoto Y. Subcellular mechanisms of endothelin action in vascular system. *Eur J Pharmacol.* 375(1-3), 133-138, 1999.
- Mayes MD. Endothelin and endothelin receptor antagonists in systemic rheumatic disease. *Arthritis Rheum.* 48(5), 1190-1199, 2003.
- McLarnon JG, Wang X, Bae JH, and Kim SU. Endothelin-induced changes in intracellular calcium in human microglia. *Neurosci Lett.* 263(1), 9-12, 1999.
- Minowa T, Miwa S, Kobayashi S, Enoki T, Zhang XF, Komuro T, Iwamuro Y, and Masaki T. Inhibitory effect of nitrovasodilators and cyclic GMP on ET-1-activated Ca^{2+} -permeable nonselective cation channel in rat aortic smooth muscle cells. *Br J Pharmacol.* 120(8), 1536-1544, 1997.
- Miwa S, Iwamuro Y, Zhang XF, Inoki T, Okamoto Y, Okazawa M, and Masaki T. Ca^{2+} entry channels in rat thoracic aortic smooth muscle cells activated by endothelin-1. *Jpn J Pharmacol.* 80(4), 281-288, 1999.
- Miwa S, Kawanabe Y, Okamoto Y, and Masaki T. Ca^{2+} entry channels involved in endothelin-1-induced contractions of vascular smooth muscle cells. *J Smooth Muscle Res.* 41(2), 61-75, 2005.
- Miyauchi T, Suzuki N, Kurihara T, Yamaguchi I, Sugishita Y, Matsumoto H, Goto K, and Masaki T. Endothelin-1 and endothelin-3 play different roles in acute and chronic alterations of blood pressure in patients with chronic hemodialysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178(1), 276-281, 1991.
- Morise T, Takeuchi Y, Kawano M, Koni I, and Takeda R. Increased plasma levels of immunoreactive endothelin and von Willebrand factor in NIDDM patients. *Diabetes Care.* 18(1), 87-89, 1995.
- Munaron L, Antoniotti S, Fiorio Pla A, and Lovisolo D. Blocking Ca^{2+} entry: a way to control cell proliferation. *Curr Med Chem.* 11(12), 1533-1543, 2004.
- Murphy RA. Contraction in smooth muscle cells. *Annu Rev Physiol.* 51, 275-283, 1989.
- Nakamura S, Naruse M, Naruse K, Demura H, and Uemura H. Immunocytochemical localization of endothelin in cultured bovine endothelial

- cells. *Histochemistry*. 94(5), 475-477, 1990.
- Nambi P, Pullen M, Contino LC, and Brooks DP. Upregulation of renal endothelin receptors in rats with cyclosporine A-induced nephrotoxicity. *Eur. J. Pharmacol.* 187(1), 113-116, 1990.
- Nikolov R, Semkova I, Maslarova J, and Moyanova S. Antinociceptive effect of centrally administered endothelin-1 and endothelin-3 in the mouse. *Methods. Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 15(7), 447-453, 1993.
- Okamoto Y, Ninomiya H, Tanioka M, Sakamoto A, Miwa S, and Masaki T. Palmitoylation of human endothelinB. Its critical role in G protein coupling and a differential requirement for the cytoplasmic tail by G protein subtypes. *J Biol Chem.* 272(34), 21589-21596, 1997.
- Omland T, Lie RT, Aakvaag A, Aarsland T, and Dickstein K. Plasma endothelin determination as a prognostic indicator of 1-year mortality after acute myocardial infarction. *Circulation.* 89(4), 1573-1579, 1994.
- Ortega Mateo A and de Artiñano AA. Highlights on endothelins: a review. *Pharmacol. Res.* 36(5), 339-351, 1997.
- Park S, Kim B, Kim J, Won KJ, Lee S, Kwon S, and Cho S. Tamoxifen induces vasorelaxation via inhibition of mitogen-activated protein kinase in rat aortic smooth muscle. *J Vet Med Sci.* 65(11), 1155-1160, 2003.
- Piovezan AP, D'Orleans-Juste P, Tonussi CR, and Rae GA. Effects of endothelin-1 on capsaicin-induced nociception in mice. *Eur J Pharmacol.* 351(1), 15-22, 1998.
- Plant TD, Zollner C, Mousa SA, and Oksche A. Endothelin-1 Potentiates Capsaicin-Induced TRPV1 Currents Via the Endothelin A Receptor. *Exp Biol Med (Maywood).* 231(6), 1161-1164, 2006.
- Pomonis JD, Rogers SD, Peters CM, Ghilardi JR, and Mantyh PW. Expression and localization of endothelin receptors: implications for the involvement of peripheral glia in nociception. *J. Neurosci.* 21(3), 999-1006, 2001.
- Raffa RB and Jacoby HI. Endothelin-1, -2 and -3 directly and big-endothelin-1 indirectly elicit an abdominal constriction response in mice. *Life Sci.* 48(17), PL85-PL90, 1991.
- Renganathan M, Cummins TR, and Waxman SG. Contribution of Na(v)1.8 sodium channels to action potential electrogenesis in DRG neurons. *J Neurophysiol.* 86(2), 629-640, 2001.
- Roubert P, Gillard V, Plas P, Guillon JM, Chabrier PE, and Braquet P. Angiotensin II and phorbol-esters potently down-regulate endothelin (ET-1) binding sites in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164(2), 809-815, 1989.
- Rubanyi GM and Polokoff MA. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev.* 46(3), 325-415, 1994.
- Saida K and van Breemen C. GTP requirement for inositol-1,4,5-trisphosphate-induced Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum in smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* 144(3), 1313-1316, 1987.
- Saito Y, Kazuwa N, Shirakami G, Mukoyama M, Arai H, Hosoda K, Suga S, Ogawa Y, and Imura H. Endothelin in patients with chronic renal failure. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 17 Suppl 7, S437-S439, 1991.

- Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K, and Masaki T. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature*. 348(6303), 732-735, 1990.
- Shin CY, Lee YP, Lee TS, Je HD, Kim DS, and Sohn UD. The signal transduction of endothelin-1-induced circular smooth muscle cell contraction in cat esophagus. *J Pharmacol Exp Ther*. 302(3), 924-934, 2002.
- Shirao S, Kashiwagi S, Sato M, Miwa S, Nakao F, Kurokawa T, Todoroki-Ikeda N, Mogami K, Mizukami Y, Kuriyama S, Haze K, Suzuki M, and Kobayashi S. Sphingosylphosphorylcholine is a novel messenger for Rho-kinase-mediated Ca^{2+} sensitization in the bovine cerebral artery: unimportant role for protein kinase C. *Circ Res*. 91(2), 112-119, 2002.
- Somlyo AP and Himpens B. Cell calcium and its regulation in smooth muscle. *FASEB J*. 3(11), 2266-2276, 1989.
- Takagi Y, Ninomiya H, Sakamoto A, Miwa S, and Masaki T. Structural basis of G protein specificity of human endothelin receptors. A study with endothelinA/B chimeras. *J Biol Chem*. 270(17), 10072-10078, 1995.
- Taylor AJ, Bobik A, Richards M, Kaye D, Raines G, Gould P, and Jennings G. Myocardial endothelin-1 release and indices of inflammation during angioplasty for acute myocardial infarction and stable coronary artery disease. *Am Heart J*. 148(2), e10, 2004.
- Taylor DA and Stull JT. Calcium dependence of myosin light chain phosphorylation in smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 263(28), 14456-14462, 1988.
- Torreccilla M, Marker CL, Cintora SC, Stoffel M, Williams JT, and Wickman K. G-protein-gated potassium channels containing Kir3.2 and Kir3.3 subunits mediate the acute inhibitory effects of opioids on locus ceruleus neurons. *J Neurosci*. 22(11), 4328-4334, 2002.
- Tsui JC and Dashwood MR. A role for endothelin-1 in peripheral vascular disease. *Curr Vasc Pharmacol*. 3(4), 325-332, 2005.
- Valdenaire O, Rohrbacher E, and Mattei MG. Organization of the gene encoding the human endothelin-converting enzyme (ECE-1). *J. Biol. Chem*. 270(50), 29794-29798, 1995.
- Wanebo JE, Arthur AS, Louis HG, West K, Kassell NF, Lee KS, and Helm GA. Systemic administration of the endothelin-A receptor antagonist TBC 11251 attenuates cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage: dose study and review of endothelin-based therapies in the literature on cerebral vasospasm. *Neurosurgery*. 43(6), 1409-1417, 1998.
- Woodsome TP, Polzin A, Kitazawa K, Eto M, and Kitazawa T. Agonist- and depolarization-induced signals for myosin light chain phosphorylation and force generation of cultured vascular smooth muscle cells. *J Cell Sci*. 119(Pt 9), 1769-1780, 2006.
- Wu X, Zhang T, Bossuyt J, Li X, McKinsey TA, Dedman JR, Olson EN, Chen J, Brown JH, and Bers DM. Local $InsP_3$ -dependent perinuclear Ca^{2+} signaling in cardiac myocyte excitation-transcription coupling. *J Clin Invest*. 116(3), 675-682, 2006.
- Xu D, Emoto N, Giaid A, Slaughter C, Kaw S,

- deWit D, and Yanagisawa M. ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell*. 78(3), 473-485, 1994.
- Yamamoto H, Kawamata T, Ninomiya T, Omote K, and Namiki A. Endothelin-1 enhances capsaicin-evoked intracellular Ca^{2+} response via activation of endothelin a receptor in a protein kinase C ϵ -dependent manner in dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience*. 137(3), 949-960, 2006.
- Yamamoto T, Shimoyama N, Asano H, and Mizuguchi T. Analysis of the role of endothelin-A and endothelin-B receptors on nociceptive information transmission in the spinal cord with FR139317, an endothelin-A receptor antagonist, and sarafotoxin S6c, an endothelin-B receptor agonist. *J Pharmacol Exp Ther*. 271(1), 156-163, 1994.
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, and Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*. 332(6163), 411-415, 1988.
- Zhou QL, Strichartz G, and Davar G. Endothelin-1 activates ET(A) receptors to increase intracellular calcium in model sensory neurons. *Neuroreport*. 12(17), 3853-3857, 2001.
- Zhou Z, Davar G, and Strichartz G. Endothelin-1 (ET-1) selectively enhances the activation gating of slowly inactivating tetrodotoxin-resistant sodium currents in rat sensory neurons: a mechanism for the pain-inducing actions of ET-1. *J Neurosci*. 22(15), 6325-6330, 2002.
- Zochodne DW, Ho LT, and Gross PM. Acute endoneurial ischemia induced by epineurial endothelin in the rat sciatic nerve. *Am J Physiol*. 263(6 Pt 2), H1806-H1810, 1992.
- Zubkov A, Miao L, and Zhang J. Signal Transduction of ET-1 in Contraction of Cerebral Arteries. *J Cardiovasc Pharmacol*. 44 Suppl 1, S24-S26, 2004.