

고농도 U-46619에 의한 혈관의 수축에 대한 Resveratrol의 억제 작용에서 MEK 활성화 또는 Rho-kinase 활성의 변화: 내피 비의존적 수축성 조절

제 현 동#

대구가톨릭대학교 약학대학 약물학 교실

(Received December 17, 2010; Revised March 5, 2011; Accepted March 7, 2011)

The Effect of Resveratrol on U-46619 (High Concentration)-induced Vasoconstriction Regulating MEK or Rho-kinase Activity

Hyun Dong Je#

Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Catholic University of Daegu 712-702, Korea

Abstract — The aim of present study was to investigate the possible influence and related mechanism of resveratrol on U-46619 (high concentration)-induced vasoconstriction. Agonist-induced vascular smooth muscle contractions involve the activation of thick or thin filament pathway. However, there are no reports addressing the question whether this pathway is involved in resveratrol-induced relaxation in rat aortae contracted with high U-46619. We hypothesized that MEK or Rho-kinase inhibition plays a role in vascular relaxation evoked by resveratrol in rat aortae. Endothelium-denuded arterial rings from male Sprague-Dawley rats were used and isometric contractions were recorded using a computerized data acquisition system. Resveratrol fully inhibited U-46619 in low concentration-induced contraction regardless of endothelial function. However, resveratrol partially decreased U-46619 in high concentration-induced contraction regardless of endothelial function. Interestingly, only in U-46619 (high concentration)-induced contraction, no significant decrease was observed in phospho-ERK1/2 levels and slight decrease in phospho-MYPT1 levels suggesting that additional pathways different from them or endothelial nitric oxide synthesis might be involved in the vasorelaxation. In conclusion, in high U-46619-contracted rat aortae, resveratrol showed relaxation response regardless of endothelial function significantly but slightly decreasing MYPT1 phosphorylation rather than ERK1/2 phosphorylation.

Keywords □ ERK, MEK, resveratrol, Rho-kinase, vasoconstriction

폴리페놀화합물인 플라보노이드는 식물의 뿌리, 줄기, 열매 등에 함유되어 있으며, 플라보노이드의 항암, 항염증, 항바이러스, 항알러지 등의 생리활성이 보고되었다.¹⁾ 역학적 및 실험적 연구 결과를 종합할 때 이런 플라보노이드들은 심혈관계 질환, 뇌졸중, 암 등에 관련이 깊고 이들 질병을 예방하고 발생을 억제하는 것으로 알려져 많은 건강기능식품들로 시판되고 있고 천연물 신약으로 개발되고 있다. 그 중 resveratrol(3,4,5-trihydroxy-transstilbene)은 포도의 껍질이나 적포도주와 같이 포도로 만든 것에서 주로 발견되는 polyphenol이며(Fig. 1) 포도가 외부의 손상이나 곰팡이, 세균, 바이러스, 자외선 조사, 화학물질들의 자극에 대항하기 위해서 식물체 스스로가 분비하는 phytoalexins 중의

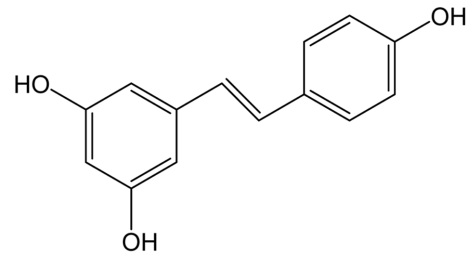


Fig. 1 – The chemical structure of resveratrol.

하나로 알려져 있다.^{2,3)} 포유동물 안에서 resveratrol은 항염증효과와 chemopreventive 효과를 가지고 있는 것으로 알려져 있으며 전립선, 유방, 결장 암세포를 포함한 여러 암세포의 성장과 발암성을 억제시키는 것으로 알려져 있고^{4,5)} 심혈관계 French paradox를 설명하는 물질로 밝혀졌다.⁶⁾ 또한 최근의 연구에 의하면 resveratrol은 sirtuin 유전자를 조절하여 효모의 생명을 연

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

장시키는 물질로 알려졌고⁷⁾ TPA, LPS, H₂O₂와 같은 여러 pro-inflammatory 자극제에 의해서 유도된 NF- κ B 활성화를 억제시켜 염증을 유발하는 물질인 cytokines, COX-2, iNOS의 발현을 억제시키는 것으로 알려져 있다.⁸⁻¹³⁾ 그러나 혈관 수축성에 대한 resveratrol의 정확한 molecular target은 현재까지 잘 알려져 있지 않다.

효능약이나 증가된 혈관내압에 대한 혈관평활근 수축은 칼슘과 칼모듈린에 의한 미오신의 조절성 경사슬의 인산화를 포함하는 고전적인 평활근의 생화학적 경로에 주로 의존한다. 이들 경로의 존재는 분리된 혈관 평활근에서 세포내 칼슘에 대한 형광측정과 전기영동적 평가로 직접적으로 확인되었다. 혈관 평활근 수축의 개시가 미오신의 20 kDa 경사슬 인산화의 칼슘의존적 증가에 의해 전적으로 조절된다고 생각되었지만¹⁴⁾ 다른 경로들도 세포내 칼슘이온의 증가와 상관없이 미오신의 20 kDa 경사슬 인산화를 조절하여 평활근 수축성을 조절한다고 생각된다.¹⁵⁻¹⁷⁾ 미오신 경사슬 인산화는 악틴과 미오신의 상호작용과 평활근 수축을 촉진한다. 그런데 미오신 경사슬 인산화나 수축의 정도는 세포내 칼슘이온농도와 언제나 평행하지는 않다. 효능약 자극에 의한 미오신 경사슬 인산화나 수축력의 정도는 대개 세포내 칼슘이온 농도상 증가에 의한 것보다 더 높고, 이 현상은 소위 칼슘이온 감각이라고 설명된다.¹⁸⁾ 따라서 미오신 경사슬 인산화수준과 수축정도를 조절하는 추가조절기전이 제안되었다. 즉 mitogen-activated protein kinase kinase(MEK)/extracellular signal regulated kinase(ERK) 활성화 또는 Rho GEFs(guanine nucleotide-exchange factors), Rho A, Rho-kinase 등에 의한 미오신 탈인산화효소 myosin phosphatase의 억제가 칼슘이온 감각에서 주요한 경로라는 것이 뒤이은 연구들에서 밝혀졌다.¹⁹⁻²²⁾ MEK/ERK는 악틴 결합성 단백질인 caldesmon의 억제를 차단하여 가는 미세섬유성 조절에 관여하며 Rho-kinase는 미오신 탈인산화효소의 표적 아단위 1(myosin phosphatase targeting subunit 1 MYPT1)를 인산화시켜 미오신 탈인산화효소를 억제하여 굵은 미세섬유성 조절에 관여하는 것으로 생각된다.

Thromboxane A₂는 thromboxane A₂ synthase에 의한 prostaglandin H₂ 이성질체화를 통해 주로 혈소판에서 생성되는 아라키돈산의 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 세포내 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. 이

번 실험에서 세포내 신호전달에 대한 U-46619의 다양한 효과 때문에 플라보노이드에 의한 평활근 이완에 관련된 신호전달경로를 조사하기 위한 유용한 도구로 U-46619를 사용하였다. U-46619에 의한 수축에 RhoA/Rho-kinase 경로 활성화가 포함된다.²³⁾ 그러나 resveratrol 단독에 의한 혈관 평활근 이완에서 이러한 경로가 억제되는지에 대한 문헌상 보고는 없었다. 따라서 이번 실험의 목적은 플라보노이드 resveratrol과 고농도 U-46619를 함께 사용하여 플라보노이드에 의한 내피비의존성 대동맥 혈관 조절 관찰과 이에 대한 항산화 또는 내피에 의한 산화 질소 생성 외에 칼슘이온 탈감작에 대한 MEK 또는 RhoA/Rho-kinase 활성 억제의 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), acetylcholine(Sigma), resveratrol(Sigma), D-(+)-glucose(Sigma), SD(Sprague-Dawley) 쥐(Hyochang Science, Korea). 또한 DTT, TCA 및 acetone는 Fisher Scientific(Hampton, NH, USA)에서 구입되었고 Enhanced chemiluminescence(ECL) kits는 Pierce(Rockford, IL, USA)에서 구입되었다. Phospho-myosin phosphatase targeting subunit 1(phospho-MYPT1), MYPT1, ERK 또는 phospho-ERK에 대한 항체가 Upstate Biotechnology(Lake Placid, NY, USA), BD Biosciences(San Jose, CA, USA) 또는 Cell Signaling Technology(Danvers, MA, USA)에서 구입되었다. 그 외 다른 시약은 특급 또는 일급으로 사용하였다. 약품은 3차 증류수에 용해되어 필요에 따라 Krebs용액이나 생리식염수에 첨가되었다.

실험과정

본 실험은 US National Institute of Health(NIH, 1996)에 의해 출판된 실험동물의 care와 use에 대한 guide에 따라서 수행되었다. 무게 250~350 g의 성숙한 웅성 Sprague-Dawley 쥐가 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 적

서진 천으로 덮었다. 대동맥은 간 근처에서 심장부근까지 적출되었고 즉시 차가운 Krebs 용액에 담귀졌다. 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. 생리적 염류용액인 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 휴

지기 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.

전기영동

평활근 조각은 드라이 아이스/아세톤/TCA/DTT 혼합물에 담겨져 급속 냉동되어 필요시까지 저온에 저장되었다가 필요시 실온에서 아세톤/DTT 혼합물로 세척되었다. 그 다음 20 mM MOPS, 4% SDS, 10% glycerol, 10 mM DTT, 20 mM β-glycerophosphate, 5.5 μM leupeptin, 5.5 μM pepstatin, 20 kIU aprotinin, 2 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF, 100 μM ZnCl₂, 20 μM 4-(2-aminoethyl) benzenesulphonyl fluoride(AEBSF) 및 5 mM

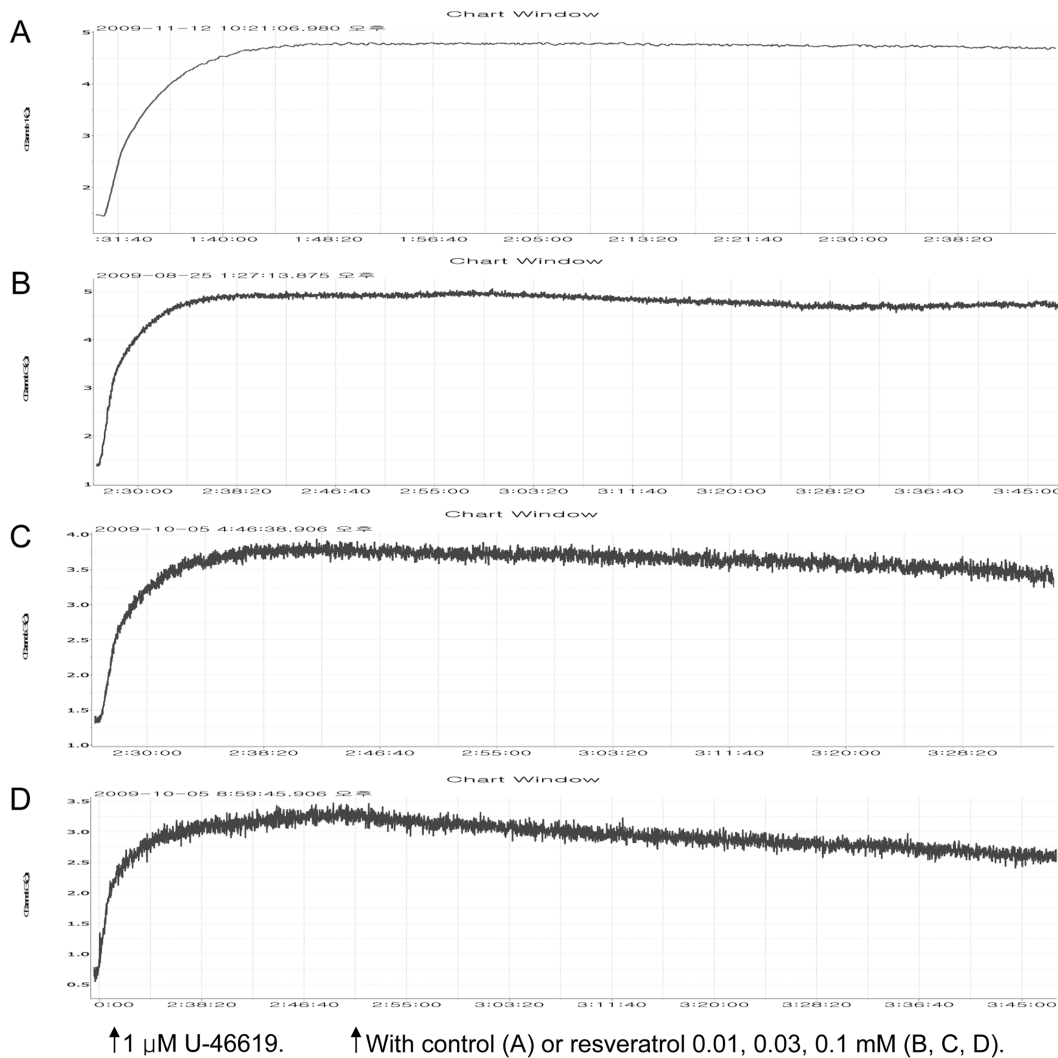


Fig. 2 – A representative tracing of vasorelaxation induced by resveratrol in rat aortic rings denuded and contracted with 1 μM U46619. Each muscle was treated with control (A) or resveratrol 0.01, 0.03, 0.1 mM (B, C, D).

EGTA 등을 포함하는 버퍼에서 균질화되었다. 단백질량에 맞춰 보정된 샘플들(modified Lowry protein assay, DC Protein Assay Kit, Bio-Rad)은 SDS-PAGE(Protogel, National Diagnostics)로 전기영동되었고 PVDF 막에 전달되었고 적절한 항체로 면역염색 및 농도측정되었다. 단백질량 보정은 표준 곡선, 막 Naphthol Blue Black 염색 또는 β -actin 수준으로 확인되었고 보정되었다.

통계 분석

모든 실험결과들은 평균±표준오차로 나타내었고 통계 처리는 Student's t-test를 실시하여 $p < 0.05$ 를 기준으로 유의성 여부를 판정하였다.

실험결과

내피가 제거된 쥐 대동맥에서 고농도 U-46619에 의한 수축에 대한 resveratrol의 이완효과

분리된 쥐 대동맥의 휴지기 장력은 공기를 통한 Krebs 용액 관류 60분 후 안정 상태에 도달하였고 휴지기 장력은 2.0 g으로 조절하였다. 물리적으로 내피가 제거된 쥐 대동맥에서 고농도 U-46619에 의한 수축에 대한 resveratrol의 효과를 조사하였다. 금속 봉을 쥐 대동맥 고리 안에 넣고 3~5회 돌려 내피를 제거하였다. 50 mM KCl에 의한 수축에 대한 1 μ M acetylcholine의 이완이 20% 이하일 경우 내피가 제거되었다고 판단하였다. 내피가 제거된 쥐 대동맥에서 resveratrol의 기저 수축에 대한 효과는 없었고(data not shown) 고농도 U-46619(10^{-6} M)에 의한 수

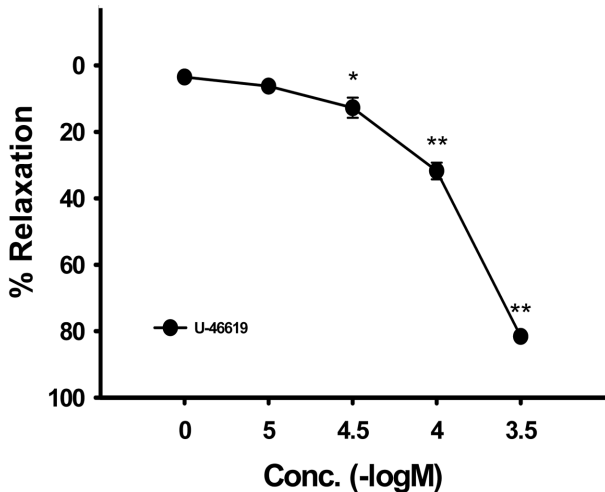


Fig. 3 – The effect of resveratrol on 1 μ M U46619-induced vascular contraction in the absence of endothelium. Relaxation is expressed as a percentage of the maximum contraction to 1 μ M U46619. Data are expressed as means of 3~5 experiments with vertical bars showing SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, presence versus absence of resveratrol.

축에 대해 저농도 resveratrol(0.1 mM 이하)은 유의성 있는 이완 효과가 있었지만 완전하지는 않았다(Fig. 2, Fig. 3). 그런데 저농도 U-46619(10^{-7} M 이하)에서 저농도 resveratrol은 완전한 이완 효과를 보였다(data not shown). 따라서 고농도 U-46619와 저농도 U-46619의 혈관 수축 기전은 다르며 resveratrol 투여에 의한 이완기전에 항산화 및 내피 의존성 기전 즉 endothelial nitric oxide synthase, cyclooxygenase product prostacyclin, endothelium-derived hyperpolarising factor 등의 관여외에 추가적인 기전이 존재한다고 생각된다.

내피가 제거된 쥐 대동맥에서 고농도 U-46619에 의한 수축에 대한 resveratrol의 효과와 관련된 굵은 미세섬유성 분자 기전

평활근 수축성의 굵은 미세섬유성 조절에 대한 효과를 관찰하기 위해 고농도 U-46619에 노출된 후 미오신 탈인산화효소의 표적 아단위 1(myosin phosphatase targeting subunit 1 MYPT1)의 수준과 인산화 수준을 측정하였다. 고농도 U-46619에 노출되어 단백질 인산화 수준이 유의성 있게 증가되었고 이러한 증가는 resveratrol에 의해 억제되었다(Fig. 4). 따라서 굵은 미세섬유성 조절이 고농도 U-46619에 의한 수축 및 resveratrol에 의한

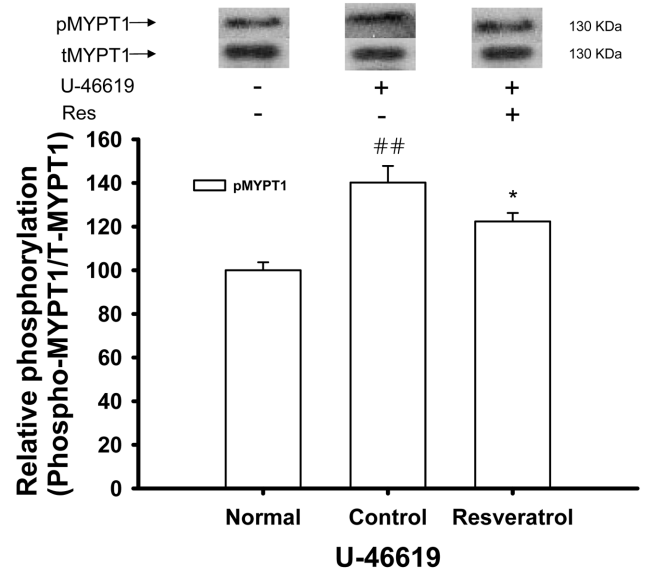


Fig. 4 – The effect of resveratrol on 1 μ M U46619-induced increases in phospho-MYPT1 levels. Phospho-MYPT1 protein levels were significantly decreased in quick frozen resveratrol-treated rat aorta in the absence of endothelium compared to vehicle-treated rat aorta precontracted with 1 μ M U46619. The upper panel shows a typical blot and the lower panel shows average densitometry results for relative levels of phospho-MYPT1. Data are expressed as the means of 3~5 experiments with vertical bars representing SEMs. * $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, versus control or normal group respectively. Res: 0.1 mM resveratrol; U-46619: 1 μ M U-46619.

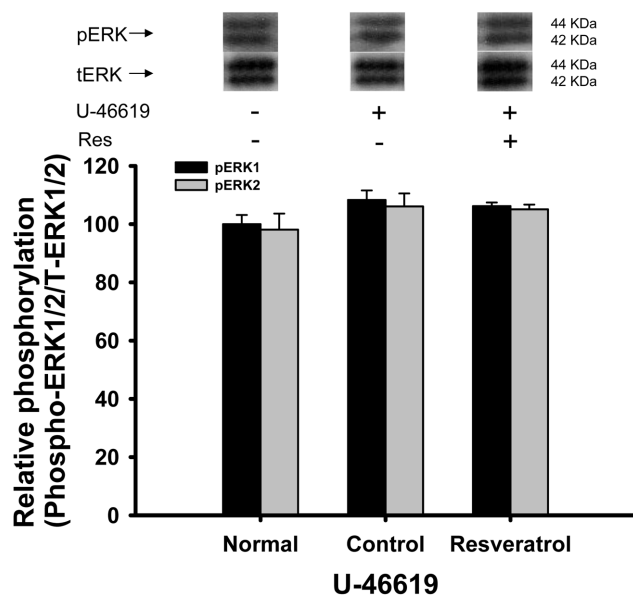


Fig. 5 – The effect of resveratrol on 1 μ M U46619-induced increases in phospho-ERK1/2 levels. Phospho-ERK1/2 protein levels were sustained in quick frozen resveratrol-treated rat aortas in the absence of endothelium compared to vehicle-treated rat aortas precontracted with 1 μ M U46619. The upper panel shows a typical blot and the lower panel shows average densitometry results for relative levels of phospho-ERK1/2. Data are expressed as the means of 3–5 experiments with vertical bars representing SEMs. Res: 0.1 mM resveratrol; U-46619: 1 μ M U-46619.

혈관 이완에 관여되는 것으로 생각된다. 그리고 resveratrol 투여에 의한 이완기전에 비항산화 및 내피 비의존성 추가기전이 존재한다고 생각된다.

내피가 제거된 쥐 대동맥에서 고농도 U-46619에 의한 수축에 대한 resveratrol의 효과와 관련된 가는 미세섬유성 분자 기전

또한 평활근 수축성의 가는 미세섬유성 조절에 대한 효과를 관찰하기 위해 고농도 U-46619에 노출된 후 세포외 신호 조절성 인산화효소의 수준과 인산화 수준을 측정하였다. 흥미롭게도 고농도 U-46619에 노출되어도 단백질 인산화 수준이 유의성 있게 증가되지 않았고 resveratrol의 효과도 없었다(Fig. 5). 따라서 약틴 결합성 단백질 caldesmon의 억제를 차단하여 작용하는 MEK/ERK가 관여하는 가는 미세섬유성 조절이 고농도 U-46619에 의한 수축 및 resveratrol에 의한 혈관 이완에 중요하지 않는 것으로 생각된다.

고찰

식물에 분포하는 플라보노이드에 다양한 생리활성이 있으며 그 중 resveratrol은 항염증, 항암외에⁴⁾ 심혈관계 조절 활성이 있

는 것으로 보고되고 있는데 주로 항산화 또는 내피 산화질소 생성을 통해 작용하는 것으로 알려져 있다. 그런데 노화나 고지혈증, 고혈압, 당뇨병 등 성인병에서 내피가 손상되기 쉬우므로 이번 실험에서 내피를 제거한 혈관을 이용하여 resveratrol의 추가 기전을 조사하게 되었다. 한편 혈관 수축 기전에 효능약 자극에 의한 미오신 경사슬 인산화나 수축력의 정도는 대개 세포내 칼슘이온 농도상 증가에 의한 것보다 더 높으며 이 현상은 소위 칼슘이온 감각이라고 설명된다.¹⁸⁾ 칼슘이온의 증가는 aequorin, fura-2, cameleons의 형광에 의해 측정된다. 따라서 미오신 경사슬 인산화수준과 수축정도를 조절하는 추가조절기전이 제안되었다. 즉 protein kinase C(PKC), MEK에 의한 가는 미세섬유성 조절이나 Rho GEFs(guanine nucleotide-exchange factors), Rho A, Rho-kinase 등에 의한 미오신 탈인산화효소의 억제나 칼슘이온 감각에서 주요한 경로라는 것이 뒤이은 연구들에서 밝혀졌다. 예를 들어 phorbol 12,13-dibutyrate는 주로 MEK, ERK에 의한 가는 미세섬유성 조절을 통해서, U-46619는 주로 L-type 칼슘통로를 통해 칼슘이온 유입을 유도하고 RhoA/Rho-kinase 활성화를 통해 칼슘이온 감각을 일으킨다고 알려져 있다.

이전까지는 resveratrol이 항산화작용이나 내피의존적으로 혈관을 이완시킨다고 보고되었다. 그런데 내피가 제거된 쥐 대동맥에서 Rho-kinase 활성화와 L-type 칼슘 통로를 통한 칼슘 유입으로 작용한다고 보고되었고 본 실험실에서 확인되었으나 보고되지 않았던 U-46619에 의한 수축²³⁾에 대해 resveratrol은 유의성 있는 이완효과를 보였다(Fig. 2, Fig. 3). 따라서 resveratrol에 의한 이완기전에 endothelial nitric oxide synthase, cyclooxygenase product prostacyclin, endothelium-derived hyperpolarising factor 등의 관여 외에 비항산화성 및 내피 비의존성 기전이 포함된다고 생각된다. 또한 전기영동을 통한 기전 연구에서 고농도 U-46619 처치가 대동맥 평활근에서 Rho-kinase 활성을 증가시켰으나 MEK 활성은 증가시키지 않았다(Fig. 4, Fig. 5). 따라서, U-46619에 의한 혈관 평활근 수축과정에서는 MEK/ERK 활성화 경로는 관여하지 않는 것으로 사료된다. 또한 U-46619에 의한 혈관 평활근 수축에서 resveratrol이 L-type 칼슘 통로를 통한 칼슘 유입 또는 Rho-kinase를 억제하여 혈관을 이완시키며(Fig. 5) MEK/ERK 활성화에 대한 효과는 없는 것으로 생각되는데 이는 다른 연구자의 결과와 달랐다.²⁴⁾ Resveratrol이 항산화 또는 내피를 통해 작용한다는 것은 이미 여러 문헌에서 보고되었고 따라서 노화 및 성인병을 흉내내어 내피가 제거된 혈관에 대해 이완을 보이는 것에 혈관 평활근 자체에 대한 활성이 관여될 수 있고 이는 간접적으로 resveratrol에 약틴-미오신 상호작용을 억제하는 추가적인 효과가 있다는 것을 의미하며 이는 전기영동으로 부분적으로 입증되었다.

본 실험에서는 고농도 U-46619와 내피가 손상된 혈관을 이용하여 심혈관계 질환, 뇌졸중 등에 대해 예방과 치료를 목적으로

사용될 수 있는 resveratrol의 혈관 이완 기전에 대해 조사하여 고농도 U-46619의 혈관 수축 기전과 resveratrol의 이완 기전에 서의 주의 및 새로운 가능성을 보고자 하였다. 고농도 U-46619는 가는 미세섬유성 조절에는 효과가 없었고 굵은 미세섬유성 조절을 통해 평활근에 직접 작용하여 악틴-미오신 상호작용을 증가시켜 작용하였고 resveratrol은 항산화나 내피에 대한 작용 외에 가는 미세섬유성 조절에는 효과가 없었고 굵은 미세섬유성 조절을 통해 평활근에 직접 작용하여 악틴-미오신 상호작용을 억제하여 혈관을 이완시켰으며 그 기전은 내피와 상관없이 Rho-kinase 억제제 L-type 칼슘 통로를 통한 칼슘 유입 억제 등을 통해 평활근 자체의 악틴-미오신 상호작용을 억제하여 작용하는 것으로 생각된다.

결 론

본 연구에서는 노화나 고혈압, 당뇨병 등 성인병에서 내피가 손상되기 쉬우므로 내피가 제거된 흰쥐 동맥혈관에 고농도의 U-46619 수축제가 투여되었고 L-type 칼슘 통로를 통한 칼슘 유입 또는 RhoA/Rho-kinase 활성화를 통해 칼슘이온 감작을 일으킨다고 알려져 있는 U-46619(고농도)에 의한 수축에 대해 resveratrol이 약간의 이완효과가 있음을 관찰하였고 저농도 U-46619에 의한 수축에 대해서는 resveratrol은 현저한 수축 억제 효과가 있었다(data not shown). 고농도 U-46619에 의한 수축에서 전기영동 결과 굵은 미세섬유성 조절이 관여되었고 가는 미세섬유성 조절은 관여되지 않았다. 그런데 이전까지는 resveratrol이 항산화작용이나 내피의존적으로 혈관을 이완시킨다고 보고되었지만 결과에 의하면 고농도 U-46619에 의한 혈관 평활근 수축에서의 flavonoids의 이완반응은 내피 작용과 항산화 활성 외에 Rho-kinase 활성 또는 L-type 칼슘 통로를 통한 칼슘 유입에 작용하여 악틴-미오신 상호작용을 불활성화할 가능성이 있으며 이는 전기영동으로 확인되었다. 향후 resveratrol 등의 flavonoids의 혈관 수축성 조절에 추가적으로 17 kDa PKC-potentiated protein phosphatase 1 inhibitor protein(CPI-17), integrin-linked kinase(ILK), zipper-interacting protein kinase(ZIPK) 등의 관련성 등을 생화학적 방법으로 연구하고자 한다.

문 헌

- 1) Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Marin, F. R., Ortuno, A. and Del-Rio, J. A. : *J. Agri. Food Chem.* **45**, 4505 (1997).
- 2) Hain, R., Bieseler, B., Kindl, H., Schroder, G. and Stocker, R. : Expression of a stilbene synthase gene in *Nicotiana tabacum* results in synthesis of the phytoalexin resveratrol. *Plant Mol. Biol.* **15**, 325 (1990).
- 3) Hain, R., Rief, H. J., Krause, E., Langebartels, R., Kindl, H., Vornam, B., Wiese, W., Schmelzer, E., Schreier, P. H., Stocker, R. H. and Stenzel, K. : Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature* **361**, 153 (1993).
- 4) Bhat, K. P. L. and Pezzuto, J. M. : Cancer chemopreventive activity of resveratrol. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **957**, 210 (2002).
- 5) Pervaiz, S. : Resveratrol: From grapevines to mammalian biology. *FASEB J.* **17**, 1975 (2003).
- 6) Kopp, P. : Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the 'French paradox'? *Eur. J. Endocrinol.* **138**, 619 (1998).
- 7) Howitz, K. T., Bitterman, K. J., Cohen, H. Y., Lamming, D. W., Lavu, S., Wood, J. G., Zipkin, R. E., Chung, P., Kisielewski, A., Zhang, L. L., Scherer, B. and Sinclair, D. A. : Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* **425**, 191 (2003).
- 8) Bhat, K. P. and Pezzuto, J. M. : Cancer chemopreventive activity of resveratrol. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **957**, 210 (2002).
- 9) Martinez, J. and Moreno, J. J. : Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochem. Pharmacol.* **59**, 865 (2000).
- 10) Subbaramaiah, K., Chung, W. J., Michaluart, P., Telang, N., Tanabe, T., Inoue, H., Jang, M., Pezzuto, J. M. and Dannenberg, A. J. : Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester- treated human mammary epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 21875 (1998).
- 11) Tsai, S. H., Lin-Shiau, S. Y. and Lin, J. K. : Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NFkappaB in macrophages by resveratrol. *Brit. J. Pharmacol.* **126**, 673 (1999).
- 12) Wadsworth, T. L. and Koop, D. R. : Effects of the wine polyphenolics quercetin and resveratrol on pro-inflammatory cytokine expression in RAW 264.7 macrophages. *Biochem. Pharmacol.* **57**, 941 (1999).
- 13) Chan, M. M., Mattiacci, J. A., Hwang, H. S., Shah, A. and Fong, D. : Synergy between ethanol and grape polyphenols, quercetin, and resveratrol, in the inhibition of the inducible nitric oxide synthase pathway. *Biochem. Pharmacol.* **60**, 1539 (2000).
- 14) Somlyo, A. P. and Somlyo, A. V. : Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* **372**, 231 (1994).
- 15) Somlyo, A. P. and Somlyo, A. V. : From pharmacomechanical coupling to G-proteins and myosin phosphatase. *Acta. Physiol. Scand.* **164**, 437 (1998).
- 16) 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 (1997).
- 17) 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).
- 18) Somlyo, A. P. and Somlyo, A. V. : Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* **372**, 231 (1994).
- 19) 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).
- 20) 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).
- 21) 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).
- 22) 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).
- 23) 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).
- 24) Song, S. H., Min, H. Y. and Lee, S. K. : Suppression of prostaglandin E2-mediated cell proliferation and signal transduction by resveratrol in human colon cancer cells. *Biomol. Ther.* **18**, 402 (2010).