

## 저농도 및 고농도의 알코올의 투여와 혈관수축성의 조절

제 현 동#

대구가톨릭대학교 약학대학 약물학교실

(Received April 23, 2012; Revised May 25, 2012; Accepted May 30, 2012)

## Concentration Dependent Effects of Alcohol on 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 and related mechanism of alcohol on the arterial contraction. Vascular contraction involves the activation of thick or thin filament pathway. However, there are no reports addressing the question whether this pathway is involved in alcohol-induced regulation. We hypothesized that alcohol plays a role in vascular contraction evoked by a vasoconstrictor in rat aortae regardless of endothelial function. Denuded arterial rings from male rats were used and isometric contractions were recorded using a computerized data acquisition system. Interestingly, alcohol at a low concentration (3% v/v) inhibited thromboxane A<sub>2</sub> or phorbol ester-induced contraction with endothelial function but at a high concentration (10%) didn't inhibit and rather increased the contraction in the denuded muscle. Therefore, alcohol at a low concentration decreases the contraction and alcohol at a high concentration increases the contraction suggesting that additional pathways different from endothelial nitric oxide synthesis might be involved in the regulation of contractility. In conclusion, alcohol has some effect on the regulation of contractility regardless of endothelial function.

**Keywords** □ alcohol, endothelial function, thromboxane A<sub>2</sub>, vasoconstriction

침묵의 살인자이며 치명적인 고혈압은 그 자체로는 증상이 없으나 동맥경화, 협심증, 부정맥, 뇌졸중, 대동맥류 등 심혈관계 질환과 밀접한 관계가 있다. 따라서 평소 적절한 혈압 관리가 중요하며 이러한 혈압에 영향을 주는 요인으로 나이, 경제적 수준, 비만, 식습관, 신체 활동, 흡연, 음주, 스트레스, 가족력 등이 있다고 생각된다.<sup>1)</sup> 특히 음주의 경우 적정량의 알코올을 섭취하면 심혈관질환의 위험을 다소 감소시키는 것으로 보고되고 있고<sup>2,3)</sup> 반면에 과량 또는 만성 섭취의 경우 그 위험성이 증가되는 것으로 생각되었다.<sup>4)</sup> 그런데 이것은 주로 내피세포에 의한 산화질소 유리와 관련이 있는 것으로 보고되었는데 저용량의 알코올은 내피세포에 의한 산화질소 유리를 증가시켰고(Fig. 1) 반대로 고용량의 알코올이나 만성 섭취는 내피 기능을 손상시켜 산화질소의 유용성을 감소시켜<sup>5)</sup> 반대로 작용하는 것으로 생각되었다. 게다가 노화와 고혈압, 죽상경화증, 당뇨병 등 대사성 질병에서 내피의 손상 및 기능장애가 관찰되므로 이 경우에 알코올의 효과는

상쇄된다.

따라서 이번 실험의 목적은 저농도 및 고농도의 알코올을 사용하여 알코올에 의한 내피비의존성 대동맥 혈관 조절 관찰과 이

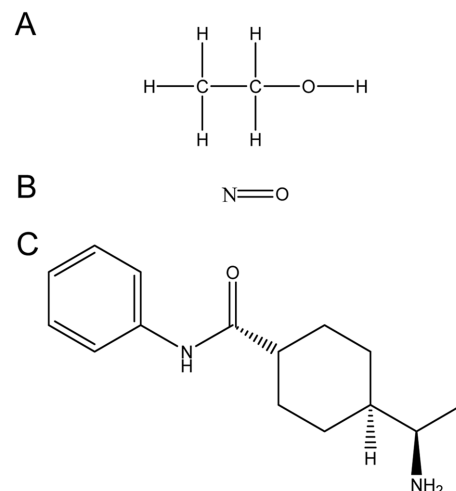


Fig. 1 – Chemical structure of ethanol (A), nitric oxide (B) or Y-27632 (C).

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

에 대한 내피에 의한 산화질소 생성 외에 칼슘이온 탈감작에 대한 MEK 또는 RhoA/Rho-kinase 활성 억제의 역할을 설명하는 것이다. 과거에 적정량의 알코올을 섭취하면 심혈관질환의 위험을 감소시키는 것으로 보고되었고<sup>2,3)</sup> 과량 또는 만성 섭취의 경우 그 위험성이 증가되는 것으로 생각되었다.<sup>4)</sup> 그런데 이것은 주로 내피세포에 의한 산화질소 유리와 관련이 있는 것으로 생각되며 실제 저용량의 알코올은 내피세포에 의한 산화질소 유리를 증가시켰고 고용량 알코올이나 만성 섭취는 내피 기능을 손상시켜 산화질소의 유용성을 감소시켜<sup>5)</sup> 작용하는 것으로 보고되었는데 이번 실험을 통해 추가적으로 내피와 상관없는 알코올성 혈관 수축성 조절을 관찰하고 그 기전을 조사하게 되었다. 수축제에 의한 혈관 수축에 가는 미세섬유성 조절과 굵은 미세섬유성 조절이 포함되는데<sup>6)</sup> 기전이 다른 여러 수축제에 의한 혈관 수축에서 알코올에 의한 이완(또는 수축성 증대)에 이런 경로가 관여되었다는 보고는 없었다. 따라서 우리는 섭취된 알코올이 내피가 제거된 혈관 이완에 어떤 역할을 수행할 것으로 가설을 세웠고 혈관내피도 혈관 수축성 조절에 관여하므로 혈관내피가 제거된 혈관이 사용되었고 수축에 대한 기계적 신호는 전기적 신호로 바뀌어 컴퓨터에 기록되었다.

한편 수축제 thromboxane A<sub>2</sub>에 의한 수축에 RhoA/Rho-kinase 경로 활성화가 포함되며 이와 대조적으로 phorbol ester에서 주로 thin filament 조절을 통해 작용하는 것으로 보고되었다.<sup>7)</sup> 그러나 현재까지 ethanol 투여에 의한 혈관 평활근 이완에서 이러한 경로가 억제되는지에 대한 문헌상 보고는 없었다. 알코올은 매우 오래된 식품이지만 항정신성 약품이면서 독성 물질이다. 즉 알코올 과량 섭취 또는 만성 중독의 경우 고혈압, 동맥경화 등 심혈관계 질환을 초래하는 것으로 알려져 있다. 그런데 저농도 알코올의 혈관 이완 효과의 경우 내피에 의한 산화질소 생성<sup>5)</sup> 이외에 알려진 바가 없었다.

그리고 효능약이나 증가된 혈관내압에 대한 혈관평활근 수축은 칼슘과 칼모듈린에 의한 마이오신의 조절성 경사슬의 인산화를 포함하는 고전적인 평활근의 생화학적 경로에 주로 의존한다.<sup>8)</sup> 이들 경로의 존재는 분리된 혈관 평활근에서 세포내 칼슘에 대한 형광 측정과 전기영동적 평가로 직접적으로 확인되었다. 혈관 평활근 수축의 개시가 마이오신의 20 kDa 경사슬 인산화의 칼슘의존적 증가에 의해 주로 조절된다고 생각되었지만<sup>9)</sup> 다른 경로들도 세포내 칼슘이온의 증가와 상관없이 마이오신의 20 kDa 경사슬 인산화를 조절하여 평활근 수축성을 조절한다고 생각된다.<sup>10-12)</sup> 마이오신 경사슬 인산화는 약틴과 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 감작이라고 설명된다.<sup>9)</sup> 따라서 마이오신

경사슬 인산화수준과 수축정도를 조절하는 추가조절기전이 제안되었다. 즉 Rho GEFs(guanine nucleotide- exchange factors), Rho A, Rho-kinase 등에 의한 마이오신 탈인산화효소의 역제가 칼슘이온 감작에서 주요한 경로라는 것이 뒤이은 연구들에서 밝혀졌다.<sup>13-16)</sup>

노인이나 고혈압이나 당뇨병 등 성인병을 지닌 환자에서 내피가 손상되어 내피의 기능이 억제된다. 따라서 내피에 작용한다는 기존 연구에 의하면<sup>5,17)</sup> 저농도의 알코올은 노인이나 성인병 환자에서 효과가 없다. 그런데 노인이나 성인병 환자에서 저농도의 알코올이 효과가 있다면 내피를 통한 산화질소 생성 외에 저농도의 알코올이 혈관평활근에 직접 작용할 수 있을 것이다. 따라서 저농도의 알코올 섭취가 혈압 조절에 중요한 역할을 수행하며 기존의 혈압조절제와의 병용투여 시 다양한 상호작용이 나타날 수 있을 것이다. 여러 성인병에서 손상되기 쉬운 혈관 내피의 중요성을 인식하고 농도와 관련하여 저농도 및 고농도의 알코올의 내피의존 및 비의존성 조절 효과를 관찰한다.

## 실험방법

### 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), U-46619(Sigma), phorbol 12,13-dibutyrate(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 생리 식염수에 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. 그 다음 무작위로 대조군, 저농도 알코올군 및 고농도 알코올군으로 분류되고 점진적인 적응기를 거쳐 저농도 알코올 군에서 SD 쥐에 3%(v/v) 에탄올이 음용수에 1개월간 투여되었고 고농도 알코올 군에서 쥐에 10%(v/v) 에탄올이 1개월간 투여되었다. 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 담겨졌다. 대동맥내 혈액과 각종 결체조직은 제거되었다. 대동맥은 4 mm 길이의 고리로 잘려졌고 내피는 물리적으로 제거되었다.

### 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% O<sub>2</sub>와 5% CO<sub>2</sub>로 포화되었다. Krebs 용액의 조성은 다음과 같다. NaCl, 118.4; KCl, 4.7; CaCl<sub>2</sub>, 2.5; MgCl<sub>2</sub>, 1.18; NaHCO<sub>3</sub>, 25; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 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  $p < 0.05$ 를 기준으로 유의성 여부를 판정하였다.

## 실험결과

### 내피가 유지된 쥐 혈관에서 U-46619에 의한 수축에 대한 저농도 알코올의 효과

분리된 쥐 대동맥의 휴지기 장력은 공기를 통한 Krebs 용액 관류 60분 후 안정 상태에 도달하였고 휴지기 장력은 2.0 g으로 조절하였다. 내피가 유지된 쥐 대동맥에서 알코올 투여의 기저 수축에 대한 효과는 없었고(data not shown) U-46619(0.1 μM)에 의한 수축에 대해 저농도의 알코올은 억제 효과가 있었다(Fig. 2). 따라서 알코올 투여에 의한 이완기전은 주로 내피 의존성이며 endothelial nitric oxide synthase, cyclooxygenase product prostacyclin, endothelium-derived hyperpolarising factor 등이 관여한다고 생각된다.

### 내피가 유지된 쥐 혈관에서 U-46619에 의한 수축에 대한 고농도 알코올의 효과

분리된 쥐 대동맥의 휴지기 장력은 공기를 통한 Krebs 용액 관류 60분 후 안정 상태에 도달하였고 휴지기 장력은 2.0 g으로 조

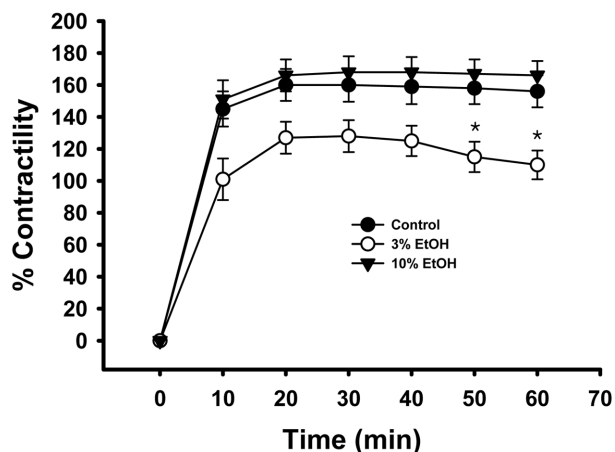


Fig. 2 – The effect of ethanol at a low and a high concentration on 0.1 μM U-46619-induced vascular contraction in the intact muscle. Developed tension is expressed as a percentage of the maximum contraction to 50 mM KCl. Data are expressed as means of 3~5 experiments with vertical bars showing SEM. \* $p < 0.05$ , presence versus absence of ethanol.

절하였다. 내피가 유지된 쥐 대동맥에서 알코올 투여의 기저 수축에 대한 효과는 없었고(data not shown) U-46619(0.1 μM)에 의한 수축에 대해 고농도 알코올은 효과가 없었다(Fig. 2). 따라서 고농도 알코올은 오히려 내피의 기능을 억제하는 것으로 생각된다.

### 내피가 제거된 쥐 혈관에서 U-46619에 의한 수축에 대한 저농도 및 고농도 알코올의 효과

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 알코올 투여의 기저 수축에 대한 효과는 없었고(data not shown) U-46619(0.1 μM)에 의한 수축에 대해 저농도 알코올은 억제 효과가 없었고 고농도 알코올은 오히려 수축을 약간 증대시켰고 이는 Y-27632로 부분적으로 억제되었다(Fig. 3, Fig. 4). 따라서 적어도 고농도 알코올은 Rho-kinase 활성화 또는 Ca<sup>2+</sup> 유입에 대한 증대 효과가 있는 것으로 생각된다. 또한 저농도 알코올 투여에 의한 이완기전은 주로 내피 의존성이며 endothelial nitric oxide synthase, cyclooxygenase product prostacyclin, endothelium-derived hyperpolarising factor 등이 관여한다고 생각된다.

### 내피가 제거된 쥐 혈관에서 phorbol ester에 의한 수축에 대한 저농도 및 고농도 알코올의 효과

Phorbol ester의 경우 주로 thin filament regulation를 활성화시켜 혈관 평활근을 수축시킨다고 알려져 있다. 물리적으로 내피가 제거된 쥐 대동맥에서 알코올 투여의 기저 수축에 대한 효과는 없었고(data not shown) phorbol 12,13-dibutyrate(10<sup>-6</sup> M)

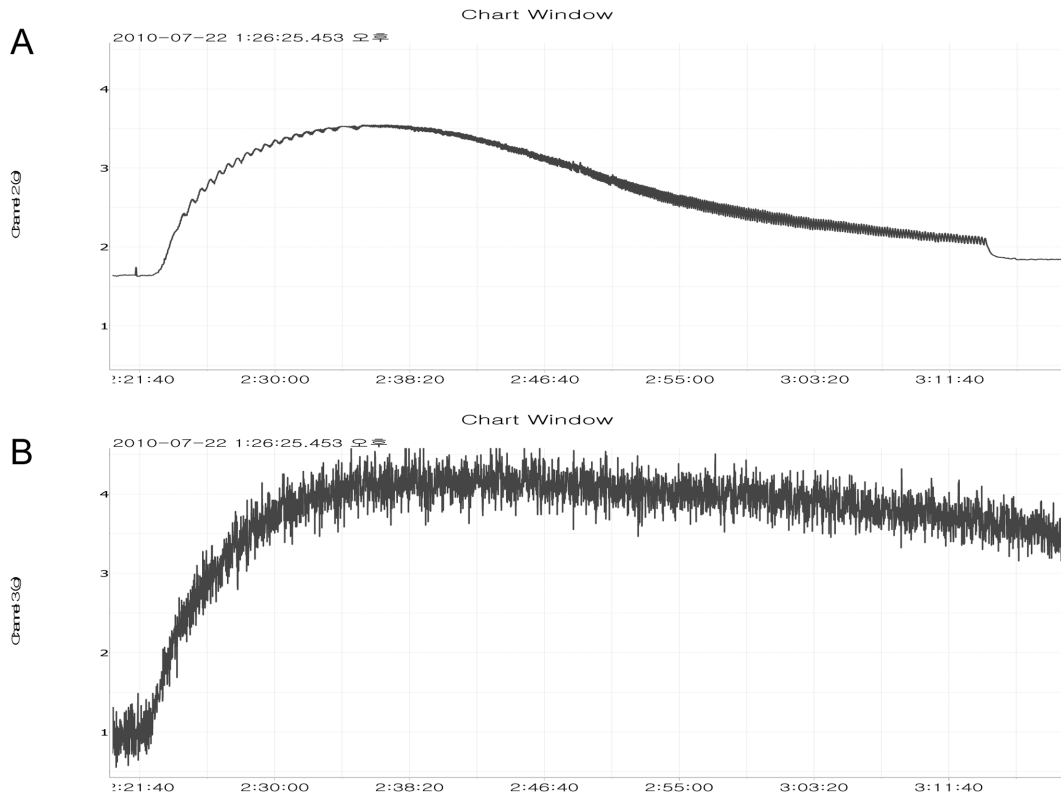


Fig. 3 – A representative tracing of vasoconstriction induced by pretreated alcohol (10% v/v) in the denuded muscle contracted with 0.1  $\mu$ M U-46619. Each muscle was pretreated with control (A) or ethanol at a high concentration (B).

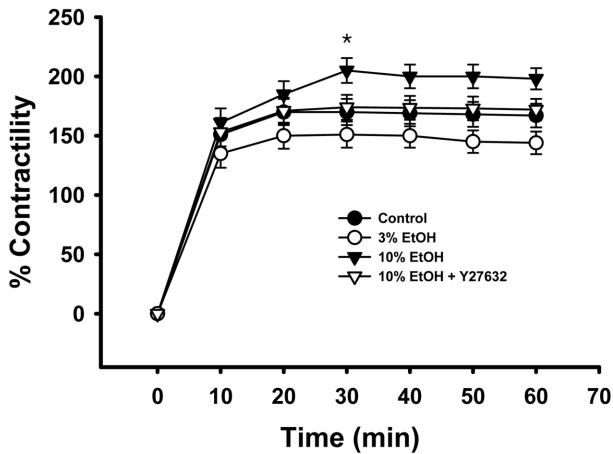


Fig. 4 – The effect of ethanol at a low and a high concentration (and Y-27632) on 0.1  $\mu$ M U-46619-induced vascular contraction in the denuded muscle. Developed tension is expressed as a percentage of the maximum contraction to 50 mM KCl. Data are expressed as means of 3~5 experiments with vertical bars showing SEM. \* $p$ <0.05, presence versus absence of ethanol.

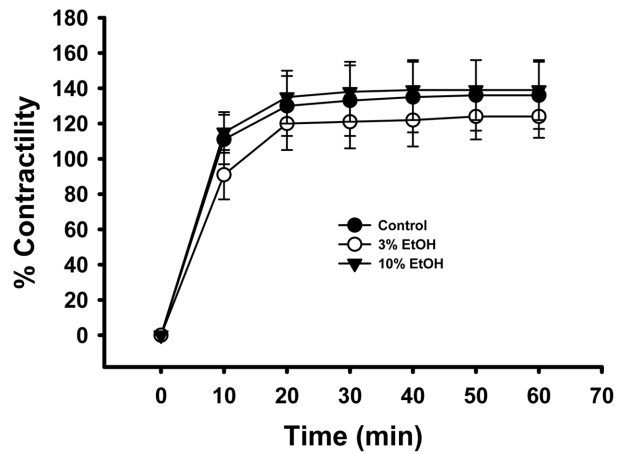


Fig. 5 – The effect of ethanol at a low and a high concentrations on 1  $\mu$ M phorbol 12,13-dibutyrate-induced vascular contraction in the absence of endothelium. Developed tension is expressed as a percentage of the maximum contraction to 50 mM KCl. Data are expressed as means of 3~5 experiments with vertical bars showing SEM.

에 의한 수축에 대해 저농도 알코올은 억제 효과가 없었고 고농도 알코올도 증대 효과가 없었다(Fig. 5). 따라서 알코올에 thin filament 조절 억제 기능이 없는 것으로 생각된다. 또한 저농도

알코올 투여에 의한 이완기전은 주로 내피 의존성이며 endothelial nitric oxide synthase, cyclooxygenase product prostacyclin, endothelium-derived hyperpolarising factor 등이 관여한다고 생각된다.

## 고 찰

일상에서 흔히 접하는 알코올의 경우 심혈관계 질환을 악화시키는 것으로 알려져 있으나 최근 연구 결과에 따르면 저농도에서 내피의 산화질소 생성으로 오히려 혈압을 저하시키는 것으로 밝혀졌다.<sup>5)</sup> 따라서 이번 실험에서 내피 유지 및 내피를 제거한 혈관을 이용하여 알코올의 추가 기전을 조사하게 되었다. 한편 혈관 수축 기전에 효능약 자극에 의한 마이오신 경사슬 인산화나 수축력의 정도는 대개 세포내 칼슘이온 농도상 증가에 의한 것보다 더 높으며 이 현상은 소위 칼슘이온 감작이라고 설명된다.<sup>9)</sup> 따라서 마이오신 경사슬 인산화수준과 수축정도를 조절하는 추가조절기전이 제안되었다. 즉 PKC, MEK에 의한 thin filament 조절이나 Rho GEFs(guanine nucleotide-exchange factors), Rho A, Rho-kinase 등에 의한 마이오신 탈인산화효소의 억제가 칼슘이온 감작에서 주요한 경로라는 것이 뒤이은 연구들에서 밝혀졌다.<sup>10-12)</sup> 예를 들어 phorbol ester는 MEK, ERK에 의한 thin filament 조절을 통해서, thromboxane A<sub>2</sub>, phenylephrine 등은 일부 RhoA/Rho-kinase 활성화를 통해 칼슘이온 감작을 일으킨다고 알려져 있다.

이전까지는 알코올이 내피 의존적으로 혈관을 이완시킨다고 보고되었다. 그런데 내피가 제거된 쥐 대동맥에서 thromboxane A<sub>2</sub>에 의한 수축에 대해 저농도의 알코올은 효과가 없었고 고농도의 알코올은 오히려 수축을 증대시켰는데 이전에 보고된 이완 효과는 내피를 통한 기전으로 생각된다. 알코올이 내피를 통해 작용한다는 것은 이미 여러 문헌에서 보고되었고,<sup>5,17)</sup> 따라서 내피가 유지된 혈관에서 이완을 보이고 내피가 제거된 혈관에 대해 이완을 보이지 않는 것에 혈관 평활근 자체에 대한 활성이 관여되지 않을 수 있고 이는 간접적으로 저농도 알코올에 악틴-마이오신 상호작용을 억제하는 추가적인 효과가 없다는 것을 의미한다. 따라서 노화 또는 당뇨병, 비만, 고혈압, 동맥경화, 고지혈증 등 성인병에서 내피가 손상되기 쉬운데 이 경우에는 적절한 음주도 혈압 조절 효과가 없는 것으로 생각된다. 그런데 고농도 알코올의 경우 thromboxane A<sub>2</sub>에 의한 수축을 증대시켰는데 이는 내피 기능을 억제시켰거나 Rho-kinase 활성화 또는 Ca<sup>2+</sup> 유입 증가가 의심되며 과도한 음주가 고혈압을 유발하는 기전의 일부를 설명하는 것으로 생각된다.

또 다른 수축제인 phorbol ester는 MEK, ERK 등을 활성화시켜 혈관 평활근을 수축시킨다고 알려져 있다.<sup>7)</sup> 내피가 제거된 쥐 대동맥에서 전처치된 저농도의 알코올은 phorbol ester에 의한 수축에 대해 억제효과를 보이지 않았고 고농도의 알코올도 증대 또는 억제효과를 보이지 않았다(Fig. 5). 따라서 적어도 phorbol ester에 의한 혈관 평활근 수축에서 저농도 및 고농도의 알코올은 MEK, ERK 등을 불활성화 또는 활성화시키지 않는 것으로 생각된다.

## 결 론

본 실험에서는 심혈관계 질환, 뇌졸중 등에 대해 예방과 치료를 목적으로 사용될 수 있는 저농도의 알코올에서의 혈관 이완 기전과 고농도의 알코올의 수축 기전에 대해 조사하여 농도별 알코올의 섭취에서의 주의 및 새로운 가능성을 확인하고자 하였다. 저농도의 알코올은 내피에 대한 작용 외에 평활근에 대한 직접 작용이 없는 것으로 생각되며 고농도의 알코올은 오히려 내피를 억제하거나 Rho-kinase나 Ca<sup>2+</sup> 유입에 관여하는 것으로 생각된다. 따라서 과도한 음주는 고혈압 등 심혈관계 질환을 악화시킬 수 있으며 그 기전은 내피와 상관없이 추가적인 기전으로 평활근 자체의 악틴-마이오신 상호작용을 촉진시켜 작용하는 것으로 생각된다. 향후 알코올의 농도와 관련하여 알코올의 RhoA/Rho-kinase 활성 억제효과, myosin phosphatase 활성증대 효과, MEK, ERK 의존성 thin filament 조절 경로 등을 생화학적 방법으로 확인하고자 한다.

## 참고문헌

- 1) Henriksson, K.M., Lindblad, U., Gullberg, B., Agren, B., Nilsson-Ehle, P. and Rastam, L. : Body composition, ethnicity and alcohol consumption as determinants for the development of blood pressure in a birth cohort of young middle-aged men. *Eur. J. Epidemiol.* **18**, 955 (2003).
- 2) Agarwal, D. P. and Srivastava, L. M. : Does moderate alcohol intake protect against coronary heart disease? *Indian Heart J.* **53**, 224 (2001).
- 3) Agarwal, D. P. : Cardioprotective effects of light-moderate consumption of alcohol: a review of putative mechanism. *Alcohol. Alcohol.* **37**, 409 (2002).
- 4) Corrao, G., Rubbiati, L., Bagnardi, V., Zamboni, A. and Poikolainen, K. : Alcohol and coronary heart disease: a meta analysis. *Addiction* **95**, 1505 (2000).
- 5) Toda, N. and Ayajiki, K. : Vascular actions of nitric oxide as affected by exposure to alcohol. *Alcohol. Alcohol.* **45**, 347 (2010).
- 6) Wier, W. G. and Morgan, K. G. :  $\alpha$ 1-Adrenergic signaling mechanisms in contraction of resistance arteries. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **150**, 91 (2003).
- 7) Morgan, K. G. and Gangopadhyay, S. S. : Invited review: cross-bridge regulation by thin filament-associated proteins. *J. Appl. Physiol.* **91**, 953 (2001).
- 8) Hirano, K., Derkach, D. N., Hirano, M., Nishimura, J. and Kanaide, H. : Protein kinase network in the regulation of phosphorylation and dephosphorylation of smooth muscle myosin light chain. *Mol. Cell. Biochem.* **248**, 105 (2003).
- 9) Somlyo, A. P. and Somlyo, A. V. : Signal transduction and

- regulation in smooth muscle. *Nature* **372**, 231 (1994).
- 10) Somlyo, A. P. and Somlyo, A. V. : From pharmacomechanical coupling to G-proteins and myosin phosphatase. *Acta. Physiol. Scand.* **164**, 437 (1998).
  - 11) 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).
  - 12) 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).
  - 13) 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).
  - 14) 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).
  - 15) 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).
  - 16) 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).
  - 17) Sahn, E., Kurcer, Z., Ozturk, F., Cengiz, N., Vardi, N., Birincioglu, M. and Olmez, E. : Effects of chronic ethanol consumption on  $\alpha$ -adrenergic-induced contractions and endothelium-dependent relaxations in rat thoracic aorta. *Pharmacol. Res.* **41**, 629 (2000).