

## Endothelin-1에 의한 phospholipase C 활성화와 세포내 Ca<sup>2+</sup> 이동에 미치는 protein kinase들의 효과

조중형 · 김현준 · 이윤혜 · 박진형 · 장용운 · 이승준 ·

이준한 · 윤정어 · 김창중 · 심상수<sup>#</sup>

중앙대학교 약학대학

(Received February 22, 2000)

## Effects of Protein Kinases on Phospholipase C Activation and Intracellular Ca<sup>2+</sup> Mobilization Induced by Endothelin-1

Jung Hyung Cho, Hyun Jun Kim, Yun Hye Lee, Jin Hyoung Park, Youn Un Jang, Seung June Lee, June Han Lee, Jeong Yi Yoon, Chang Jong Kim and Sang Soo Sim<sup>#</sup>

College of Pharmacy, Chung-Ang University 221, Huksuk-Dong,  
Dongjak-Ku, Seoul 156-756

**Abstract** — To investigate the effects of protein kinases on endothelin-1-induced phospholipase C activation and Ca<sup>2+</sup> mobilization in Rat-2 fibroblast, we measured the formation of inositol phosphates and intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration with [<sup>3</sup>H]inositol and Fura-2/AM, respectively. Endothelin-1 dose-dependently activated phospholipase C and increased intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration. Protein kinase C activator, PMA, significantly inhibited both phospholipase C activity and Ca<sup>2+</sup> mobilization induced by endothelin-1. Tyrosine kinase inhibitor, genistein, inhibited both. On the other hand, cyclic nucleotide (cAMP and cGMP) did not have any influence on the signaling pathway of phospholipase C-Ca<sup>2+</sup> mobilization induced by endothelin-1. These results suggest that protein kinase C and tyrosine kinase counteract on the signaling pathway of phospholipase C-Ca<sup>2+</sup> mobilization induced by endothelin-1 in Rat-2 fibroblast.

**Keywords** □ Phospholipase C, calcium mobilization, protein kinase, cyclic nucleotide.

Endothelin-1은 21개의 아미노산으로 구성된 펩타이드로서 다양한 생리적 활성을 갖고 있다.<sup>1)</sup> 혈관평활근 세포나 fibroblast에서 endothelin-1은 tyrosine kinase와 protein kinase C를 통하여 c-fos나 c-myc과 같은 protooncogene의 발현을 증가시켜 세포의 증식을 일으키며,<sup>2)</sup> 평활근 세포에서는 수용체를 통하여 phospholipase C 및 D를 활성화시켜 혈관을 수축시키는 물질로 알려져 있다.<sup>3,4)</sup> 이와 같이 endothelin-1은 혈관 평활근 세포나 fibroblast에서 여러 가지 신호전달계를 통해 신호를 전달하여 다양한 protein kinase

들을 활성화시키며 이와 동시에 세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도의 변화를 일으킨다.

모든 세포는 신경전달물질이나 호르몬에 의해 자극시 다양한 신호전달계를 통하여 세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도를 증가시킨다. 세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도의 변화는 시간에 따라 2 가지 양상으로 구분할 수 있다. 세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도는 급속히 증가하는 초기 단계 (initial phase)와 이후 세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도는 점차 감소되다가 안정 상태보다는 높은 농도로 일정하게 유지하는 평탄부위(plateau phase)로 나눌 수 있다. 초기단계에서 세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도의 급속한 증가는 세포내 Ca<sup>2+</sup> 유리에 의해 이루어지는데, 이는 phospholipase C에 의해 생성되는 inositol-1,4,5-triphosphate(IP<sub>3</sub>)와 caffeine이나 ryanodine

<sup>#</sup> 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 02-820-5615 (팩스) 02-821-7680

과 같은 물질에 의해 일어난다.<sup>5-7)</sup> 평탄부위에서  $Ca^{2+}$  농도가 일정하게 유지되는 것은 주로 세포외  $Ca^{2+}$  유입에 의해 이루어지는데, 이러한 유입은 막전압 의존성  $Ca^{2+}$  통로와 수용체 의존성  $Ca^{2+}$  통로 및 기계적 자극에 의한  $Ca^{2+}$  통로를 통하여 일어난다.<sup>8)</sup>

이러한 세포내  $Ca^{2+}$  이동은 세포내에 존재하는 여러 가지 protein kinase에 의해 조절된다. 평활근 세포에서 protein kinase C는 phospholipase C를 억제시켜 세포내  $Ca^{2+}$  유리를 일으키는  $IP_3$ 의 생성을 억제하므로써 세포내  $Ca^{2+}$  농도를 감소시키며,<sup>9)</sup> cyclic nucleotide(cAMP와 cGMP)는 세포내  $Ca^{2+}$  유리와 세포외  $Ca^{2+}$ 의 유입을 억제시켜 세포내  $Ca^{2+}$  농도를 감소시키며,<sup>10)</sup> tyrosine kinase는 세포외  $Ca^{2+}$ 의 유입을 촉진하여 세포내  $Ca^{2+}$  농도를 증가시킨다는 보고가 있다.<sup>11)</sup> 그러나 fibroblast에서는 신호전달계에 관련된 특정 물질을 과발현시킨 상태에서 실험이 이루어졌으며 fibroblast 자체의 신호전달계에 관한 연구는 없는 실정이다. 한편 fibroblast는 연결조직을 구성하는 collagen을 생성하며 세포나 조직손상시 손상된 부위를 대신하는 중요한 생리적 기능을 담당하고 있다. 그러므로 fibroblast에서 일어나는 신호전달계의 조절과정을 규명하는 일도 중요한 일이다. 이 실험에서는 endothelin-1이 fibroblast에서 phospholipase C를 통한 신호전달과 세포내  $Ca^{2+}$  이동에 어떠한 영향을 주며, 이러한 신호전달과정에서 여러 가지 protein kinase들이 어떠한 영향을 미치는지를 관찰하였다.

### 실험방법

**실험재료** - Fetal bovine serum, Dulbecco's modified minimal essential medium(DMEM), endothelin-1, phorbol-12-myristate-13-acetate(PMA), genistein, EGTA, forskolin, sodium nitroprusside, Fura-2/AM 들은 Sigma사(St. Louis, USA)로부터 [ $^3H$ ]inositol은 NEN으로부터 구입하였다.

**Rat-2 세포 배양** - Rat-2 세포(rat fibroblast cell line)는 10% fetal bovine serum을 함유한 DMEM 배양액을 이용하여 5%  $CO_2$  배양기에서 배양하였으며,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ 이 없는 phosphate buffered saline 용액과 0.05% trypsin과 0.05% EDTA를 이용하여 계대배양하였다.

**[ $^3H$ ]inositol phosphates의 측정** - 충분히 자란

Rat-2 cell를 trypsin으로 가볍게 처리한 후 Krebs-Ringer 용액(118 mM NaCl, 4.2 mM KCl, 1.2 mM  $KH_2PO_4$ , 1.8 mM  $CaCl_2$ , 0.8 mM  $MgSO_4$ , 20 mM Na-Hepes, pH 7.4, 5 mM  $NaHCO_3$ , 10 mM glucose, 0.1% bovine serum albumin)으로 2회 세척한 다음 Krebs-Ringer 용액 4 ml에 재분산시켰다. 20  $\mu Ci/ml$  [ $^3H$ ]inositol을 가한 후 다시 37°C에서 90분간 배양하였다. 10 mM LiCl를 함유한 Krebs-Ringer 용액으로 3회 세척 후 각각의 유리 tube에  $10^6$  세포씩 소분하였다. 여러 가지 protein kinase 억제제나 활성화제를 5분간 전처리 한후 endothelin-1을 처리하여 20분간 37°C에서 배양하였다. 1 ml의 반응 정지액(chloroform : methanol : c-HCl=2 : 1 : 0.01)을 가하고 여기에 다시 250  $\mu l$ 의 chloroform과 250  $\mu l$ 의 증류수를 가하여 잘 혼합한후 원심분리(2,000 rpm, 5분)를 하였다. 상층액을 Dowex AG1x8 column에 가한후 증류수 10 ml와 60 mM ammonium formate/5 mM sodium borate 20 ml로 세척 후 [ $^3H$ ]inositol phosphates를 1 M ammonium formate/0.1 M formic acid 4 ml로 분리하였다.<sup>12)</sup> [ $^3H$ ]inositol phosphates의 방사능은 liquid scintillation counting으로 측정하였으며, 단백질 농도는 bovine serum albumin을 표준 물질로 하고 BCA method<sup>13)</sup>로 측정하여 실험군 간의 차이를 보정하였으며 실험 결과는 dpm per milligram protein으로 환산하여 대조군에 대한 % increase로 표기하였다.

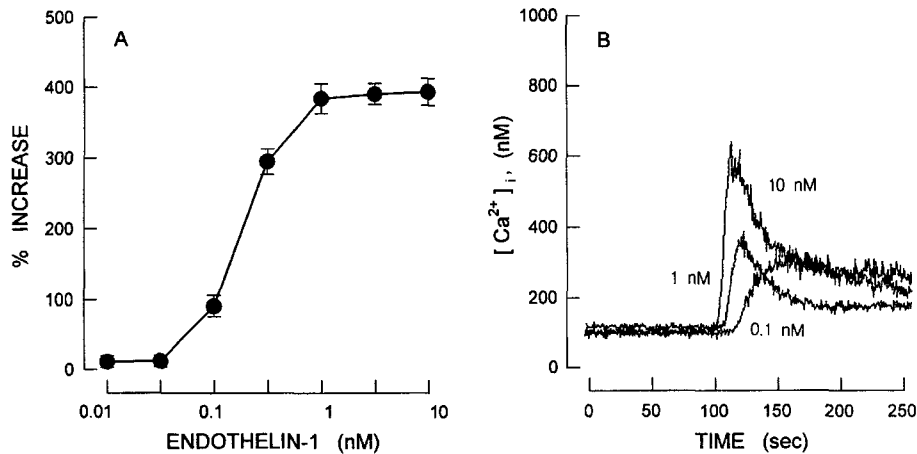
**세포내  $Ca^{2+}$  농도 측정** - trypsin으로 분리한 Rat-2 세포를 Krebs-Ringer 용액 10 ml에 재분산시킨 후 1  $\mu M$  Fura-2/AM 가하여 실온에서 90분간 배양하였다. Fura-2/AM이 없는 Krebs-Ringer 용액으로 3회 세척 후 1 ml의 Krebs-Ringer 용액에 재분산시킨후 얼음 속에 보관하면서 사용하였다. 형광 측정은 33°C에서 PTI fluorescence spectrometer(Photon Technologies Inc., South Brunswick, NJ)를 이용하여 측정하며 excitation은 340과 380 nm에서 emission은 510 nm에서 측정하였다.  $R_{max}$ 와  $R_{min}$  값은 Triton X-100(0.05%, 최종 농도)과 EGTA/Tris, pH 8.5를 이용하여 산출하였다. calcium 농도는 Grynkiewicz들의 방법<sup>14)</sup>에 따라 계산하였다.

**자료분석 및 통계적 검정** - 실험값은 평균±표준편차로 표시하였으며, 실험성적은 t-검정(non-paired Student's t test)으로 분석하였으며, P 값이 5% 미만일 때 통계적으로 유의하다고 간주하였다.

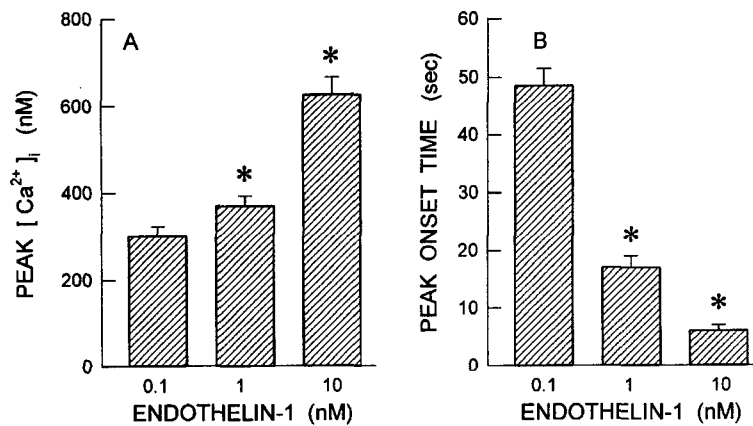
## 결과 및 고찰

**Endothelin-1에 의한 phospholipase C 활성화 및 세포내  $Ca^{2+}$  이동** - Phospholipase C 활성을 간접적으로 측정하기 위하여 [ $^3H$ ]inositol을 이용하여 phospholipase C에 의해 생성되는 inositol phosphates의 변화를 관찰하였다. Rat-2 세포를 [ $^3H$ ]inositol로 표기 한 후 endothelin-1을 처리하지 않은 대조군에서 생성되는 [ $^3H$ ]inositol phosphates의 방사능 값은  $1731 \pm 207$  dpm/mg protein이었다. endothelin-1은 농도에 비례하여 [ $^3H$ ]inositol phosphates의 생성을 증가시켰으며, 1 nM에서 약 383%의 최대 효과를 나타냈다(Fig.

1A). 혈관 평활근세포에서 endothelin-1은 phospholipase C를 활성화시키는 것으로 미루어 볼 때<sup>3)</sup> fibroblast에서도 endothelin-1이 phospholipase C를 활성화시킨다는 것을 보여준다. Fura-2를 이용한 세포내  $Ca^{2+}$  이동에 있어서 endothelin-1을 처리하지 않은 안정 상태에서 세포내  $Ca^{2+}$  농도는  $116 \pm 10$  nM이었다. endothelin-1의 농도가 증가함에 따라 세포내  $Ca^{2+}$  농도도 증가하였으며 10 nM에서 세포내  $Ca^{2+}$  농도는  $626 \pm 41$  nM까지 증가하였다(Figs. 1B & 2A). 한편 세포내  $Ca^{2+}$  농도가 최고치에 도달하는 시간은 농도가 높을수록 빨리 나타났다(Fig. 2B). endothelin-1에 의한 inositol phosphates의 생성은 1 nM에서 최대



**Fig. 1** – Dose-response of inositol phosphates formation to endothelin-1 (A) and intracellular  $Ca^{2+}$  mobilization (B) in Rat-2 cells. Results indicate mean  $\pm$  SD from 6 separate experiments and are expressed as percent increase compared with control values ( $1731 \pm 207$  dpm/mg protein).



**Fig. 2** – Endothelin-1-induced peak values of intracellular  $Ca^{2+}$  concentration (A) and peak onset time (B) in Rat-2 cells. Results indicate mean  $\pm$  SD from 6 separate experiments.

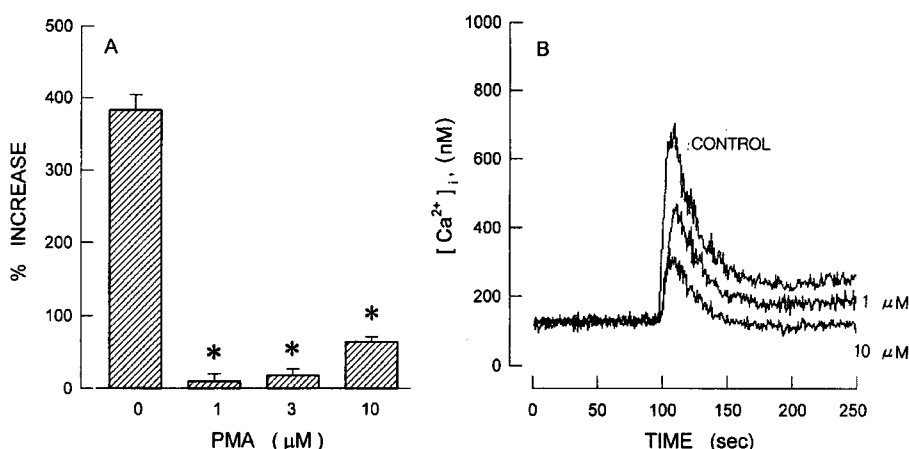


Fig. 3 - Effect of protein kinase C activator, PMA on endothelin-1 (1 nM)-induced inositol phosphates formation (A) and on endothelin-1 (10 nM)-induced  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization (B). \* $P < 0.05$  vs. endothelin-1 alone.

의 효과를 나타내는 반면 세포내  $\text{Ca}^{2+}$  이동에 있어서는 10 nM에서 최대의 효과를 보이고 있다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 inositol phosphates의 생성과  $\text{Ca}^{2+}$  이동 사이에 연관성은 있으나 완전히 종속적인 관계는 아닌 것으로 사료되며, endothelin-1은  $\text{IP}_3$  이외에 또 다른 경로를 통하여  $\text{Ca}^{2+}$  이동을 일으키는 것으로 추정된다.

**Protein kinase C 활성화제가 endothelin-1에 의한 phospholipase C 활성화 및 세포내  $\text{Ca}^{2+}$  이동에 미치는 영향** - protein kinase C 활성화제인 PMA는 endothelin-1에 의한 inositol phosphates의 생성을 유의하게 억제하였으며(Fig. 3A), 세포내  $\text{Ca}^{2+}$  이동에 있어서도 PMA의 농도가 증가할수록 endothelin-1에 의한 세포내  $\text{Ca}^{2+}$  농도의 최고치와 평탄부위(plateau phase)를 이루는  $\text{Ca}^{2+}$  농도를 감소시켰다(Fig. 3B). 이러한 결과는 다른 세포에서 protein kinase C가 phospholipase C를 억제한다는 보고와 잘 일치한다.<sup>9)</sup> 세포내  $\text{Ca}^{2+}$  이동에 있어서 초기의  $\text{Ca}^{2+}$  증가는 주로 세포내  $\text{Ca}^{2+}$  유리에 의해 이루어지며 평탄부위에서의  $\text{Ca}^{2+}$  농도의 증가는 세포외  $\text{Ca}^{2+}$ 의 유입에 의해 이루어지는 것으로 미루어 볼 때 protein kinase C는 세포내  $\text{Ca}^{2+}$  유리 뿐만 아니라 세포외  $\text{Ca}^{2+}$ 의 유입도 억제하는 것으로 사료된다. 흥분성 세포인 혈관 평활근에서는 protein kinase C가 막전압 의존성  $\text{Ca}^{2+}$  통로를 통한 세포외  $\text{Ca}^{2+}$ 의 유입을 촉진한다는 보고와는 상반된다.<sup>15,16)</sup> 이러한 현상은 세포의 종류 차이에 기인될 수 있으며, 세포내 저장된  $\text{Ca}^{2+}$ 의 고갈은

세포외  $\text{Ca}^{2+}$ 을 유입시킨다는 capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry 가설로 미루어 볼 때<sup>17,18)</sup> 세포내 저장된  $\text{Ca}^{2+}$ 이 고갈되지 않았기 때문에 세포외  $\text{Ca}^{2+}$ 의 유입을 일으키지 않은 것으로 생각된다. 그러나 PMA는 1 μM에서 inositol phosphates의 생성을 완전히 억제하였으나 세포내  $\text{Ca}^{2+}$  이동에 있어서는 약간 억제하였으며 10 μM에서 더욱 더 억제하였다. 이와 같이 phospholipase C 활성화와  $\text{Ca}^{2+}$  이동에 있어서 PMA의 효과의 차이는 endothelin-1이  $\text{Ca}^{2+}$  이동을 일으키는 데 있어서 phospholipase C 이외에 다른 경로를 통하여 세포내  $\text{Ca}^{2+}$  유리를 일으키는 것으로 생각된다.  $\text{IP}_3$  이외에 세포내  $\text{Ca}^{2+}$  유리를 일으키는 경로로는 심근세포에서 잘 알려진  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release 경로로서<sup>7)</sup> Rat-2 fibroblast에서도 endothelin-1이 이러한 경로를 통해 세포내  $\text{Ca}^{2+}$  유리를 일으킬 가능성을 배제할 수 없다.

**Tyrosine kinase 억제제가 endothelin-1에 의한 phospholipase C 활성화 및 세포내  $\text{Ca}^{2+}$  이동에 미치는 영향** - endothelin-1이 tyrosine kinase를 활성화시킨다는 것이 보고되었다.<sup>2)</sup> 이 실험에서는 tyrosine kinase 억제제로 널리 사용되는 genistein이 endothelin-1에 의한 phospholipase C 활성화 및 세포내  $\text{Ca}^{2+}$  이동에 미치는 영향을 관찰하였다. genistein은 농도에 비례하여 endothelin-1에 의한 inositol phosphates의 생성을 억제하였으며, 세포내  $\text{Ca}^{2+}$  이동도 유의하게 억제하였다(Figs. 4A & 4B). 세포내  $\text{Ca}^{2+}$  이동에 있어서 초기단계의  $\text{Ca}^{2+}$  농도는 뚜렷하게 농도

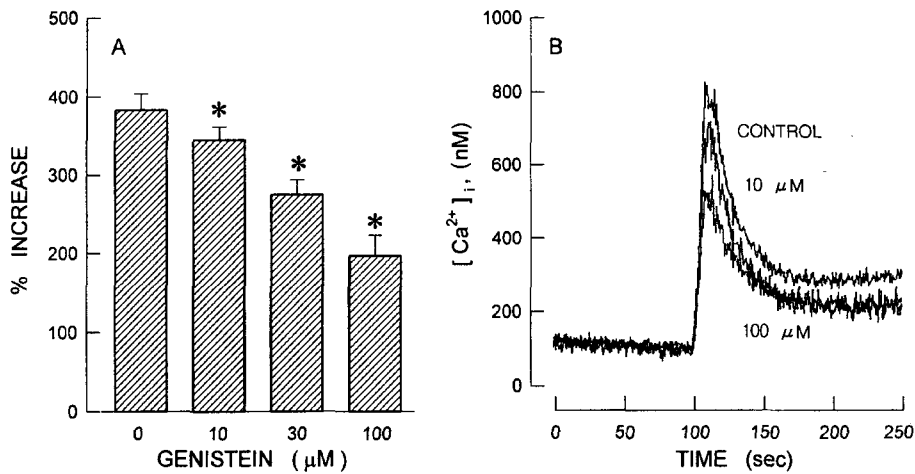


Fig. 4 – Effect of tyrosine kinase inhibitor, genistein on endothelin-1 (1 nM)-induced inositol phosphates formation (A) and on endothelin-1 (10 nM)-induced  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization (B). \* $P < 0.05$  vs. endothelin-1 alone.

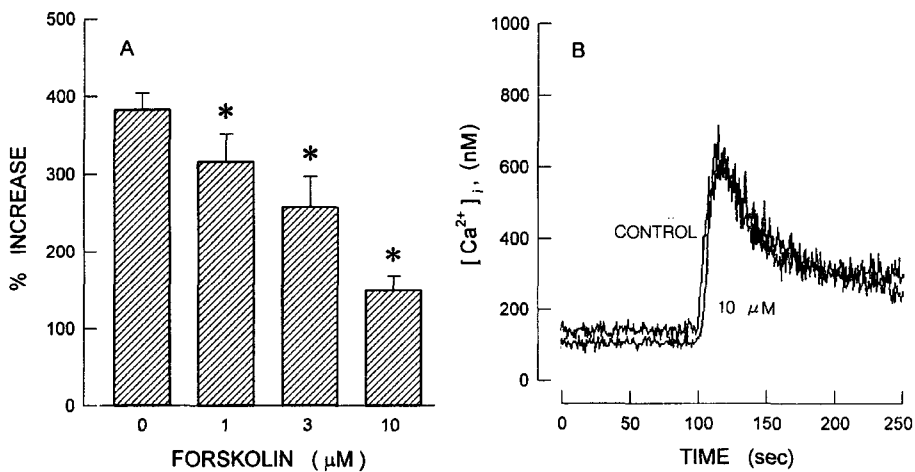


Fig. 5 – Effect of adenylyl cyclase activator, forskolin on endothelin-1 (1 nM)-induced inositol phosphates formation (A) and on endothelin-1 (10 nM)-induced  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization (B). \* $P < 0.05$  vs. endothelin-1 alone.

의존적 효과를 보이고 있으나 평탄부위에서의  $\text{Ca}^{2+}$  농도는 약간의 감소를 나타내나 농도 의존적 효과는 보이지 않고 있다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 Rat-2 세포에서 tyrosine kinase는 phospholipase C 활성화에는 관여하지만 세포의  $\text{Ca}^{2+}$ 의 유입에는 별다른 영향을 주지 않는 것으로 생각된다. 이 결과는 혈관 평활근에서 tyrosine kinase 억제제가 endothelin-1에 의해 생성된  $\text{IP}_3$ 에 의한  $\text{Ca}^{2+}$  유입에 직접적인 영향은 주지 않으며,  $\text{IP}_3$  생성을 억제하므로써  $\text{Ca}^{2+}$  유입을 조절한다는 보고와 잘 일치하고 있다.<sup>19)</sup>

**Forskolin과 sodium nitroprusside가 endothelin-**

**1에 의한 phospholipase C 활성화 및 세포내  $\text{Ca}^{2+}$  이동에 미치는 영향** – cyclic nucleotide(cAMP, cGMP)가 endothelin-1에 의한 phospholipase C 활성화 및 세포내  $\text{Ca}^{2+}$  이동에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 내인성 cyclic nucleotide를 증가시키는 forskolin (adenylyl cyclase 활성화제)과 sodium nitroprusside (nitric oxide를 발생하여 soluble guanylyl cyclase를 활성화시킴)를 사용하였다.<sup>20,21)</sup> cAMP를 증가시키는 forskolin은 농도에 비례하여 inositol phosphates의 생성을 억제하였으나 세포내  $\text{Ca}^{2+}$  이동에는 영향을 주지 않았다(Figs. 5A & 5B). cGMP를 증가시키는

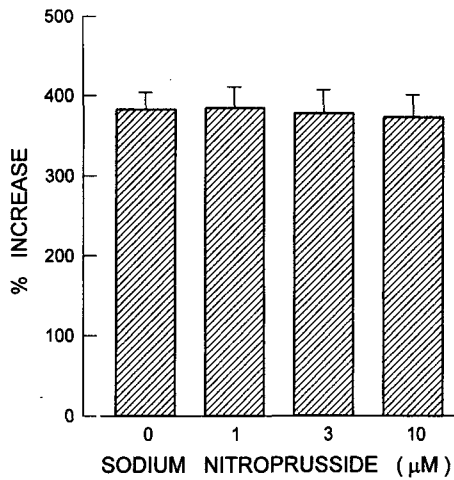


Fig. 6 - Effect of guanylyl cyclase activator, sodium nitroprusside on endothelin-1 (1 nM)-induced inositol phosphates formation.

sodium nitroprusside는 inositol phosphate 생성 및 세포내  $Ca^{2+}$  이동에 아무런 영향을 주지 않았다(Fig. 6). cyclic nucleotide들은 흥분성 세포인 평활근 세포에서 다양한 기전을 통하여 세포내  $Ca^{2+}$  농도를 낮추며 근이완을 일으킨다.<sup>22-24)</sup> 한편 개 위장관 평활근에서 nitric oxide는 endothelin-1의 작용을 약화시킨다는 보고도 있다.<sup>25)</sup> 그러나 fibroblast에서 cyclic nucleotide들이 endothelin-1의 작용에 미치는 영향은 미미한 것으로 관찰되었다. 이러한 세포 특성에 따른 cyclic nucleotide의 작용 차이는 세포의 고유 기능과 연관된 것으로서 fibroblast에서의 phospholipase C- $Ca^{2+}$  이동 사이의 신호전달계에는 cyclic nucleotide가 별로 관여하지 않는 것으로 생각된다.

## 결 론

Rat-2 fibroblast에서 endothelin-1은 phospholipase C를 활성화시키며 세포내  $Ca^{2+}$  농도를 증가시켰다. protein kinase C 활성화제인 PMA는 endothelin-1에 의한 phospholipase C의 활성화와  $Ca^{2+}$  이동을 모두 억제하였다. tyrosine kinase 억제제도 phospholipase C의 활성화와  $Ca^{2+}$  이동을 모두 억제하였다. 한편 cyclic nucleotide들은 phospholipase C- $Ca^{2+}$  이동 사이의 신호전달계에 별다른 영향을 주지 않았다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 endothelin-1에 의한 phospholipase C- $Ca^{2+}$  이동 사이의 신호전달계에

protein kinase C와 tyrosine kinase는 서로 반대 작용을 하는 것으로 생각된다.

## 감사의 말씀

이 논문은 1999학년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

## 문 헌

- 1) Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, K., Mieno, K., Mitsui, R., Yazaki, Y., Goto, K. and Masaki, T. : A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* **332**, 411 (1988).
- 2) Simonson, B. and Herman, W. H. : Protein kinase C and protein tyrosine kinase activity contribute to mitogenic signaling by endothelin-1. *J. Biol. Chem.* **268**, 9347 (1993).
- 3) Takuwa, N., Takuwa, Y., Yanagisawa, M., Kamejiro, Y. and Masaki, T. : A novel vasoactive peptide endothelin stimulates mitogenesis through inositol lipid turnover in Swiss 3T3 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **264**, 7853 (1989).
- 4) Pai, J. K., Dobek, E. A. and Bishop, W. R. : Endothelin-1 activates phospholipase D and thymidine incorporation in fibroblasts overexpressing protein kinase C $\beta$ 1. *Cell Reg.* **2**, 897 (1991).
- 5) Duncan, R. A., Krzanowski, J. J., Davis, J. S., Polson, J. B., Coffey, R. G., Shimoda, T. and Szentivanyi, A. : Polyphosphoinositide metabolism in canine tracheal smooth muscle (CTSM) in response to a cholinergic stimulus. *Biochem. Pharmacol.* **36**, 307 (1987).
- 6) Sim, S. S., Jo, Y. H., Hahn, S. J., Yoon, S. H., Rhie, D. J. and Kim, M. S. :  $H_1$  receptor mediates inositol phosphates response to histamine in gastric smooth muscle of guinea pigs. *Scand. J. Gastroenterol.* **28**, 69 (1993).
- 7) Iino, M. : Calcium-induced calcium release mechanism in guinea pig taenia caeci. *J. Gen. Physiol.* **94**, 368 (1989).
- 8) Ozaki, H., Stevens, R. J., Blondfield, D. P., Puvlicover, N. G. and Sanders, K. M. : Simultaneous measurement of membrane potential cytosolic  $Ca^{2+}$  and

- tension in intact smooth muscles. *Am. J. Physiol.* **260**, C917 (1991).
- 9) Tojo, Y., Tanimura, A. and Matsumoto, Y. : Modulatory effect of 4 $\beta$ -phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) on carbachol-induced Ca<sup>2+</sup> mobilization in rat parotid acinar cells. *Biochem. Pharmacol.* **47**, 2055 (1994).
  - 10) Nakamura, K., Kimura, M. and Aviv, A. : Role of nucleotides in store-mediated external Ca<sup>2+</sup> entry in human platelets. *Biochem. J.* **310**, 263 (1995).
  - 11) Yule, D. I., Kim, E. T. and Williams J. A. : Tyrosine kinase inhibitors attenuate capacitative Ca<sup>2+</sup> influx in rat pancreatic acinar cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **202**, 1697 (1994).
  - 12) Gu, H., Marthin, H., Barsotti, R. J. and Labell E. F. : Rapid increase in inositol phosphate levels in norepinephrine-stimulated vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol.* **261**, C17 (1991).
  - 13) Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K. and Gartner, F. H. : Measurement of protein using Bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76 (1985).
  - 14) Grynkiewicz, G., Ponie, M. and Tsien, R. Y. : A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**, 3440 (1986).
  - 15) Litten, R. Z., Suba, E. A. and Roth, B. L. : Effects of a phorbol ester on rat aortic contraction and calcium influx in the presence and absence of Bay K 8644. *Eur. J. Pharmacol.* **144**, 185 (1987).
  - 16) Fish, R. D., Sperti, G., Colucci, W. S. and Clapham, D.E. : phorbol ester increases the dihydropyridine-sensitive calcium conductance in a vascular smooth muscle cell line. *Circ. Res.* **62**, 1049 (1988).
  - 17) Putney, J. W. Jr. : A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium.* **7**, 1 (1986).
  - 18) Putney, J. W. Jr. : Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium.* **11**, 61 (1990).
  - 19) 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).
  - 20) Insel, P. A., Stengel, D., Ferry, N. and Hanoune, J. : Regulation of adenylate cyclase of human platelet membranes by forskolin. *J. Biol. Chem.* **257**, 7485 (1982).
  - 21) Arnold, W. P., Mittal, C., Katsuki, S. and Murad, F. : Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3',5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **74**, 3203 (1977).
  - 22) Abe, A. and Karaki, H. : Mechanisms underlying the inhibitory effect of dibutyryl cyclic AMP in vascular smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* **211**, 305 (1992).
  - 23) Bolotina, V. M., Najibi, S., Palacino, J. J., Pagano, P. J. and Cohen, R. A. : Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* **368**, 850 (1994).
  - 24) Chen, X. L. and Rembold, C. M. : Cyclic nucleotide-dependent regulation of Mn<sup>2+</sup> influx, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, and arterial smooth muscle relaxation. *Am. J. Physiol.* **263**, C468 (1992).
  - 25) Wood, J. G., Zhang, Q., Yan, Z. Y. and Cheung, L. Y. : Nitric oxide attenuates endothelin-1-induced vasoconstriction in canine stomach. *Am. J. Physiol.* **271**, G27 (1996).