

## 강황 유래 Curcumin의 Rho-kinase 억제를 통한 혈관이완작용

제 현 동#

대구가톨릭대학교 약학대학 약물학교실

(Received August 9, 2013; Revised October 5, 2013; Accepted October 22, 2013)

### Effect of Curcuma Longa Derived-curcumin on Vascular Tension

Hyun Dong Je#

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

**Abstract** — The present study was undertaken to investigate the influence of curcumin on vascular smooth muscle contractility and to determine the mechanism involved. We hypothesized that curcumin, the primary ingredient of *Curcuma longa*, plays a role in vascular relaxation through inhibition of Rho-kinase in rat aortae. Denuded arterial rings from male Sprague-Dawley rats were used and isometric tensions were recorded using a computerized data acquisition system. Interestingly, curcumin inhibited fluoride-induced contraction but didn't inhibit phorbol ester-induced contraction suggesting that additional pathways different from endothelial nitric oxide synthesis might be involved in the vasorelaxation. Furthermore, curcumin significantly inhibited fluoride-induced increases in pMYPT1 levels. On the other hand, it didn't significantly inhibit phorbol ester-induced increases in pERK1/2 levels suggesting the mechanism involving inhibition of fluoride-induced MYPT1 phosphorylation. This study provides evidence that curcumin induces vascular relaxation through inhibition of Rho-kinase in rat aortae.

**Keywords** □ curcumin, endothelium, fluoride, MYPT1, phorbol ester, Rho-kinase, vasoconstriction

고혈압은 만성 순환기계 질환 중 발생빈도가 높으며 원인불명의 본태성 고혈압이 전체 고혈압의 약 80%에 해당한다. 최근 급증하는 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 연령, 비만, 식습관, 신체 활동, 흡연, 음주, 스트레스, 가족력 등이 있다고 생각된다.<sup>1)</sup> 게다가 노화와 고혈압, 죽상경화증, 당뇨병 등 대사성 질병에서 내피의 손상 및 기능장애가 관찰되므로 이 경우에 혈압조절 기능이 더 악화된다. 고혈압에 대해 일반적으로 베타 차단제, 칼슘통로 차단제, 안지오텐신 수용체 차단제 또는 이뇨제가 사용되고 있으나 현재까지도 더 나은 물질을 찾으려고 노력하고 있으며 이러한 노력은 고혈압 발병과 관련된 기전을 이해하는데 도움이 된다.

본 연구 대상인 강황(*Curcuma longa*, *Curcuma aromatica*)은

원산지가 인도이며, 생강과의 다년생 초본식물로 인도, 대만, 인도네시아, 일본 등지에서 일부 재배되고 있으며, 주로 향신료, 방향건위, 이담 등 생약으로 사용하는 약용식물로 이용되고 있다. 최근 강황의 curcuminoid의 생리기능효과가 알려짐에 따라 항산화, 해독작용, 항균작용, 항암 등에 대한 다양한 연구가 활발히 이루어지고 있다.<sup>2)</sup> 특히 curcuminoids의 curcumin(Fig. 1, MW=368), demethoxycurcumin(MW=338), bisdemethoxycurcumin(MW=308)은 주된 생리활성물질로 보고되었다.<sup>3)</sup>

효능약이나 증가된 혈관내압에 대한 혈관평활근 수축은 칼슘과 칼모듈린에 의한 미오신의 조절성 경사슬의 인산화를 포함하는 평활근의 생화학적 경로에 의존하며 이들의 존재는 분리된 혈

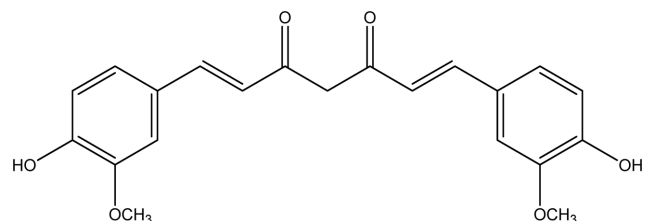


Fig. 1 – Chemical structure of curcumin.

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

관 평활근에서 세포내 칼슘에 대한 형광 측정과 전기영동적 평가로 직접적으로 확인되었다. 혈관 평활근 수축의 개시가 미오신의 20 kDa 경사슬 인산화의 칼슘의존적 증가에 의해 조절된다고 생각되었지만<sup>4)</sup> 다른 경로들도 세포내 칼슘이온의 증가와 상관없이 미오신의 20 kDa 경사슬 인산화를 조절하여 평활근 수축성을 조절한다고 생각된다.<sup>5-7)</sup> 미오신 경사슬 인산화가 약틴과 미오신의 상호작용과 평활근 수축을 촉진하지만 미오신 경사슬 인산화나 수축의 정도는 세포내 칼슘이온농도와 언제나 일치하지는 않다. 효능약 자극에 의한 미오신 경사슬 인산화나 수축력의 정도는 대개 세포내 칼슘이온 농도상 증가에 의한 것보다 더 높아서 소위 칼슘이온 감각이라고 설명된다.<sup>4)</sup> 따라서 미오신 경사슬 인산화수준과 수축정도를 조절하는 추가조절기전이 제안되었다. 즉 guanine nucleotide-exchange factors(Rho GEFs), Rho A, Rho-kinase 등에 의한 미오신 탈인산화효소의 억제<sup>8-11)</sup> 또는 mitogen activated protein kinase kinase/Extracellular signal regulated kinase(MEK/ERK) 등이 관여되는 가는 미세섬유성(약틴 섬유성) 조절 등이 칼슘이온 감각에서 주요한 경로라는 것이 뒤이은 연구들에서 밝혀졌다.<sup>12)</sup>

따라서 본 연구의 목적은 curcumin을 사용하여 curcumin에 의한 내피비의존성 대동맥 혈관 수축 조절 관찰과 이에 대한 내피에 의한 산화 질소 생성외에 칼슘이온 탈감작에 대한 MEK/ERK 또는 RhoA/Rho-kinase 활성 억제의 역할을 설명하는 것이다. 수축제에 의한 혈관 수축에 가는 미세섬유성(약틴 섬유성) 조절과 굵은 미세섬유성(미오신 섬유성) 조절이 포함되는데 수축제 fluoride에 의한 수축에 RhoA/Rho-kinase 경로 활성화가 포함되며 이와 대조적으로 phorbol ester에서 주로 가는 미세섬유성 조절을 통해 작용하는 것으로 보고되었는데<sup>12,13)</sup> 이러한 수축제에 의한 혈관 수축에서 curcumin에 의한 이완에 이런 경로가 관여되었다는 보고는 없었다. 따라서 우리는 curcumin이 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.

노인이나 고혈압이나 당뇨병 등 성인병을 지닌 환자에서 내피가 손상되어 내피의 기능이 억제되는데 만일 curcumin이 내피에만 작용한다면 curcumin은 노인이나 성인병 환자에서 효과가 없을 것이다. 그런데 내피가 제거된 혈관에서 curcumin이 효과가 있다면 내피를 통한 산화질소 생성외에 curcumin이 혈관평활근에 직접 작용하여 노인이나 성인병 환자에서 효과가 있을 것이다. 따라서 curcumin 섭취가 혈압 조절에 중요한 역할을 수행하며 기존의 혈압조절제와의 병용투여시 다양한 상호작용이 나타날 수 있을 것이다. 여러 성인병에서 손상되기 쉬운 혈관 내피의 중요성을 인식하고 curcumin의 내피 비의존성 혈관 긴장도 조절 효과를 조사하였다.

## 실험방법

### 재료, 시약 및 기기

다음과 같은 약품이 사용되었다. Potassium chloride(Sigma, St. Louis, MO, USA), sodium bicarbonate(Sigma), curcumin(Sigma), pentobarbital sodium(Dongwon, Korea), sodium fluoride(Sigma), phorbol 12,13-dibutyrate(PDBu)(Sigma), acetylcholine(Sigma), D-(+)-glucose(Sigma), SD(Sprague-Dawley) 쥐(Hyochang Science, Korea). 그 외 다른 시약은 특급 또는 일급으로 사용하였다. 약품은 3차 증류수에 용해되어 필요에 따라 Krebs 용액이나 생리식염수에 첨가되었다.

### 실험과정

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 공급되었고 점진적인 적응기를 거쳐 실험에 사용되었다. 실험 당일 pentobarbital sodium(50 mg/kg)을 복강으로 투여하여 마취시키고 고정시켰다.

### 대동맥 적출

흉부 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 담귀졌다. 대동맥내 혈액과 각종 결체조직은 제거되었다. 대동맥은 4 mm 길이의 고리로 잘려졌고 대동맥 고리의 안쪽으로 cell scraper가 놓여져 부드럽게 3~5회 긁어서 내피가 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 10 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 평형기간 동안 휴지기 장력은 2.0 g으로 조절되었다. 평형기간 후 대동맥 고리는 50 mM KCl로 자극되었고 근육이 충분히 수축하고 1 μM acetylcholine에 의해 20% 이하로 이완될 경우 내피가 제거된 것으로 판단하고 실험이 시작되었다. 6 mM NaF 또는 1 μM PDBu에 의한 혈관

수축이 평형에 도달한 후 일부의 혈관에 curcumin(10, 30, 100  $\mu$ M)을 투여하여 일어나는 혈관이완의 정도는 6 mM NaF 또는 1  $\mu$ M PDBu에 의한 혈관 수축을 기준(100%)으로 하여 표시하였습니다.

### 전기 영동

60분 동안 안정화된 후에 6 mM NaF 또는 1  $\mu$ M PDBu를 투여하여 점차 수축되다가 대략 50분(NaF) 또는 25분 후(PDBu)에 혈관 수축이 평형에 도달한 후 curcumin을 투여하여 60분 동안 충분히 이완된 대동맥 조직을 미리 냉동된 dithiothreitol, trichloroacetic acid, acetone으로 얼리고(-80°C) 1시간 후 dithiothreitol, acetone으로 세척하고 20 mM MOPS, 4% SDS, 10% glycerol, 10 mM DTT, 20 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 5.5  $\mu$ M leupeptin, 5.5  $\mu$ M pepstatin, 20 kIU aprotinin, 2 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 mM NaF, 100  $\mu$ M  $\text{ZnCl}_2$ , 20  $\mu$ M 4-(2-aminoethyl) benzenesulphonyl fluoride(AEBSF) 및 5 mM EGTA를 함유한 homogenizing buffer를 가해 균질화시킨다. 이를 원심분리하고 상층액을 얻은 다음 단백질 정량을(BioRad) 실시한다. 동량의 gel loading buffer와 혼합한 후 4분간 끓인 각각의 sample을 SDS-polyacrylamide mini-gel에서 전기 영동시킨다. 전개된 gel을 PVDF membrane에 transfer시키고 각각의 1차 항체와 실온에서 2시간 동안 반응시킨다. Washing buffer로 3회 세척하고 horseradish-peroxidase가 결합된 2차 항체와 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. Washing buffer로 3회 세척 후 ECL detection reagent를 가하여 1분간 반응시켜 X-ray 필름에 감광시켜 현상

하여 밴드를 확인한다. 1차 항체로 phospho-myosin phosphatase targeting subunit protein 1(phospho-MYPT1) at Thr855 (1:5,000)와 MYPT1(total MYPT1)에 대한 항체가 RhoA/Rho-kinase 활성 정도를 확인하기 위해 사용되었고<sup>14,15</sup> ERK 또는 phosphoERK at Thr202/Tyr204에 대한 항체가 MEK 활성 정도를 확인하기 위해 사용되었다(Cell Signaling Technology(Danvers, MA, USA) 또는 Upstate Biotechnology(Lake Placid, NY, USA)).

### 통계 분석

모든 실험결과들은 평균 $\pm$ 표준오차로 나타내었고 통계 처리는 two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test(Fig. 2와 Fig. 3) 또는 Student's t-test를 실시하여  $p < 0.05$ 를 기준으로 유의성 여부를 판정하였다.

## 실험 결과

### 내피가 제거된 쥐 혈관에서 fluoride에 의한 수축에 대한 curcumin의 효과

분리된 쥐 대동맥의 휴지기 장력은 60분 후 안정 상태에 도달하였고 휴지기 장력은 2.0 g으로 조절하였다. 물리적으로 내피가 제거된 쥐 대동맥에서 fluoride(6 mM)에 의한 수축에 대해 curcumin은 유의성 있는 억제 효과가 있었다(Fig. 2). 따라서 curcumin은 내피 의존성 산화질소 생성외에 Rho-kinase 활성 억제 효과가 있는 것으로 생각된다.

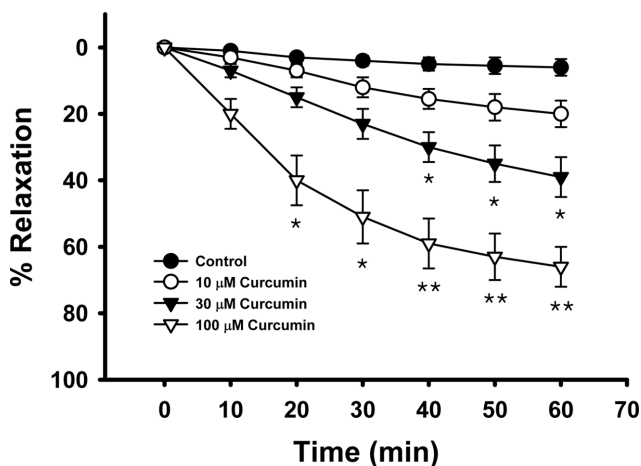


Fig. 2 – The effect of curcumin on 6 mM fluoride-induced vascular contraction in the denuded muscle. After 6 mM NaF-induced contraction had reached plateau, various concentrations (10, 30, 100  $\mu$ M) of curcumin were added into organ bath. Developed tension is expressed as a percentage of the maximum contraction to 6 mM fluoride. Data are expressed as means of 3-5 experiments with vertical bars showing SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , presence versus control.

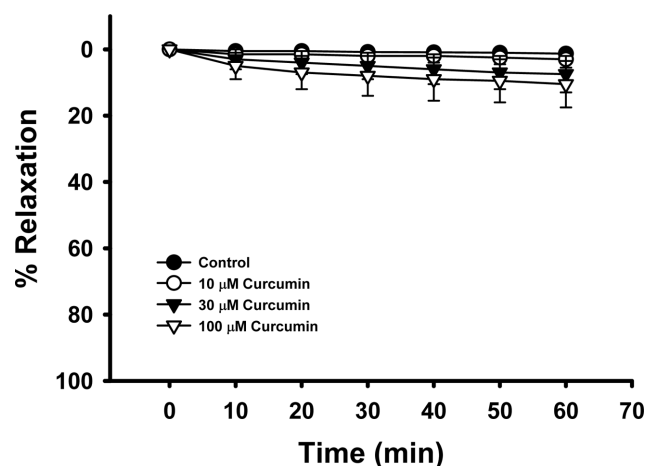


Fig. 3 – The effect of curcumin on 1  $\mu$ M phorbol 12,13-dibutyrate-induced vascular contraction in the absence of endothelium. After 6 mM NaF-induced contraction had reached plateau, various concentrations (10, 30, 100  $\mu$ M) of curcumin were added into organ bath. Developed tension is expressed as a percentage of the maximum contraction to 1  $\mu$ M phorbol 12,13-dibutyrate. Data are expressed as means of 3-5 experiments with vertical bars showing SEM.

### 내피가 제거된 쥐 혈관에서 phorbol ester에 의한 수축에 대한 curcumin의 효과

Phorbol ester(PDBu)의 경우 주로 MEK/ERK가 관여되는 미세섬유성(약틴 섬유성) 조절을 활성화시켜 혈관 평활근을 수축시킨다고 알려져 있다. 물리적으로 내피가 제거된 쥐 대동맥에서 phorbol 12,13-dibutyrate(PDBu)( $10^{-6}$  M)에 의한 수축에 대해 curcumin은 억제 효과가 없었다(Fig. 3). 따라서 curcumin에 MEK/ERK 등이 관여하는 미세섬유성 조절 기능이 없는 것으로 생각된다.

### Fluoride에 의한 MYPT1 인산화에 대한 억제 효과

Fluoride(6 mM)는 MYPT1 인산화를 증가시켰고 curcumin(100  $\mu$ M)은 fluoride에 의한 MYPT1 인산화를 억제하였다(Fig. 4). MYPT1은  $Ca^{2+}$  비의존적인 수축기전 중의 myosin 미세섬유 조절 경로에서 Rho-kinase의 기질로 작용한다. Rho-kinase의 활성화에 의해 myosin light chain phosphatase(MLCP)의 target subunit인 MYPT1이 인산화되어 MLCP를 불활성화시켜서 인산화된 myosin의 탈인산화를 억제하여 혈관이 수축된다. Fluoride에 의해 수축이 유도된 normal, control, curcumin 처리 군에 대해 western blot을 통한 total-MYPT1, phospho-

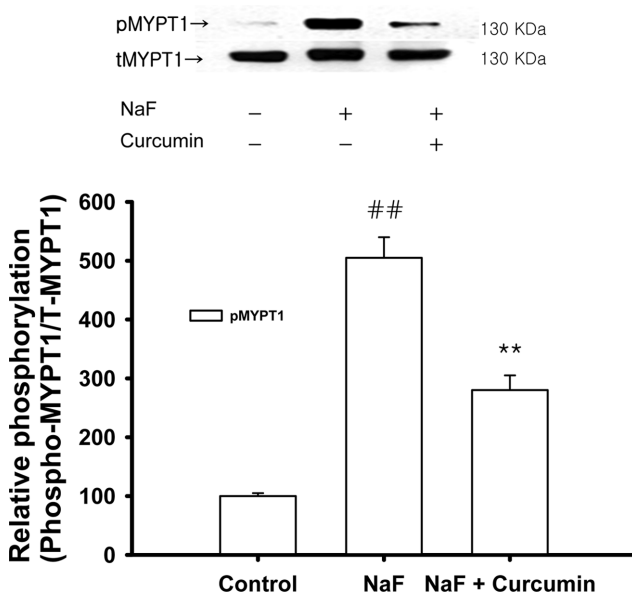


Fig. 4 – Effect of curcumin (0.1 mM) on fluoride (6 mM)-induced increases in phospho-MYPT1 levels. Phospho-MYPT1 protein levels were significantly decreased in quick frozen curcumin-treated rat aorta in the absence of endothelium compared to vehicle-treated rat aorta precontracted with fluoride. The 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 lines representing SEMs. ## $P < 0.01$  versus control. \*\* $P < 0.01$  versus NaF alone.

MYPT1의 농도를 확인하였는데 curcumin 처리 군에서 MYPT1의 인산화를 유의성 있게 억제함을 확인할 수 있었다. 그런데 sodium fluoride가 Rho-kinase에 대한 full activator로 알려져 있기 때문에 curcumin은 주로 Rho-kinase 활성화와 MLCP의 target subunit인 MYPT1의 인산화를 억제하여 작용하는 것으로 생각된다.

### Phorbol ester에 의한 ERK1/2 인산화에 대한 억제 효과

Phorbol ester(PDBu, 1  $\mu$ M)는 ERK1/2 인산화를 증가시켰지만 curcumin(100  $\mu$ M)은 PDBu에 의한 ERK1/2 인산화에 영향을 미치지 않았다(Fig. 5). ERK1/2는  $Ca^{2+}$  비의존적인 수축기전 중의 actin 미세섬유 조절 경로에서 MEK의 기질로 작용한다. MEK에 의해 MAPK 중 하나인 ERK1/2가 인산화되어 caldesmon을 인산화시켜 약틴-미오신 상호작용을 증가시켜 혈관 수축이 증대된다. MAPK 경로의 full activator인 phorbol ester에 의해 수축이 유도된 normal, control, curcumin 처리 군에 대해 western blot을 통한 total-ERK1/2, phospho-ERK1/2의 농도를 확인하였는데 curcumin 처리 군에서 ERK1/2의 인산화가 유의성 있게 억제되지 않았다. 따라서 curcumin은 MEK 활성화와 ERK1/2의 인산화를 억제하여 작용하지 않는 것으로 생각된다.

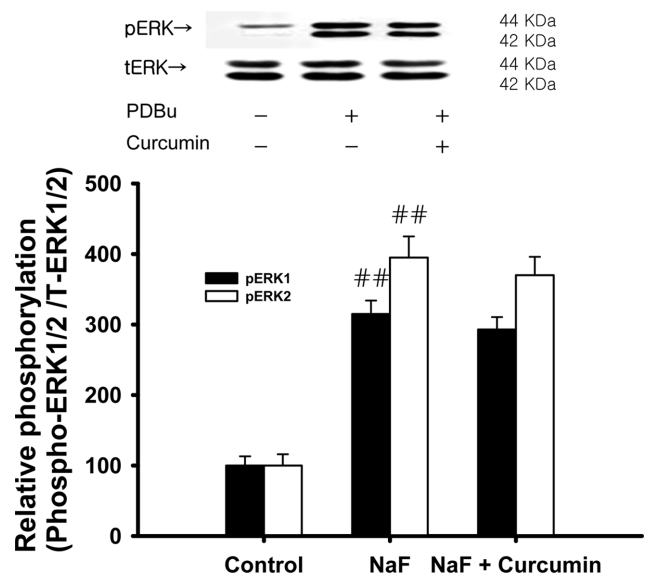


Fig. 5 – Effect of curcumin (0.1 mM) on phorbol ester (1  $\mu$ M)-induced increases in phospho-ERK1/2 levels. Phospho-ERK1/2 protein levels were not decreased in quick frozen curcumin-treated rat aortas in the absence of endothelium compared to vehicle-treated rat aortas precontracted with phorbol ester. 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 lines representing SEMs. ## $P < 0.01$  versus control.

## 고 찰

일상에서 흔히 접하는 강황의 경우 한방에서 방향건위, 이담 등의 목적으로 사용되는 것으로 알려져 있으나 최근 연구 결과에 따르면 항균 및 항암효과까지 나타내는 것으로 밝혀졌다.<sup>16)</sup> 따라서 이번 실험에서 내피를 제거한 혈관을 이용하여 유효 성분인 curcumin의 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.<sup>4)</sup> 따라서 미오신 경사슬 인산화수준과 수축정도를 조절하는 추가조절기전이 제안되었다. 즉 protein kinase C(PKC), MEK에 의한 가는 미세섬유성 조절이나 Rho GEFs, Rho A, Rho-kinase 등에 의한 미오신 탈인산화효소의 억제가 칼슘이온 감각에서 주요한 경로라는 것이 뒤이은 연구들에서 밝혀졌다. 예를 들어 phorbol ester는 MEK, ERK에 의한 가는 미세섬유성 조절을 통해서, fluoride, thromboxane A<sub>2</sub>, phenylephrine 등은 RhoA/ Rho-kinase 활성화를 통해 칼슘이온 감각을 일으킨다고 알려져 있다.

그 중 fluoride는 RhoA/Rho-kinase를 활성화시켜 혈관 평활근을 수축시킨다고 알려져 있는데 내피가 제거된 쥐 대동맥에서 curcumin은 fluoride에 의한 수축에 대해 억제효과를 보였다(Fig. 2). 따라서 적어도 fluoride에 의한 혈관 평활근 수축에서 curcumin은 RhoA/Rho-kinase를 불활성화시켜서 작용하는 것으로 생각되었고 이는 전기영동에서 확인되었다(Fig. 4). 한편 phorbol ester는 MEK, ERK 등을 활성화시켜 혈관 평활근을 수축시킨다고 알려져 있는데 내피가 제거된 쥐 대동맥에서 curcumin은 phorbol ester에 의한 수축에 대해 억제효과를 보이지 않았다(Fig. 3). 따라서 적어도 phorbol ester에 의한 혈관 평활근 수축에서 curcumin은 MEK, ERK 등을 불활성화시키지 않는 것으로 생각되었고 이는 전기영동에서 확인되었다(Fig. 5).

## 결 론

본 실험에서는 심혈관계 질환, 뇌졸중 등에 대해 예방과 치료를 목적으로 사용될 수 있는 curcumin에서의 혈관 이완 기전에 대해 조사하여 천연물 유래 curcumin의 투여에서의 주의 및 새로운 가능성을 확인하고자 하였다. Curcumin은 내피에 대한 작용외에 추가적인 기전으로 평활근 자체의 악틴-미오신 상호작용을 억제하여 작용하는 것으로 생각되며 구체적으로 Rho-kinase 불활성화에 관여하는 것으로 생각된다. 향후에 aequorin이나 fura-2 등의 광단백질로 curcumin의 Ca<sup>2+</sup> 유입에 대한 효과를 관찰하고 confocal microscope 등으로 효소 단백질의 membrane translocation을 관찰하여 curcumin의 RhoA/Rho-kinase 활성 억제효과, MEK, ERK 의존성 가는 미세섬유성 조절 경로 등을 보

다 직접적인 방법으로 확인하고자 한다.

## 사 사

이 논문은 2013년도 대구가톨릭대학교 교내연구비 지원에 의한 것이며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- 1) Lydakis, C., Lip, G. Y. H., Beevers, M. and Beevers, D. G. : Diet, lifestyle and blood pressure. *Coronary Health Care* **1**, 130 (1997).
- 2) Singh, M. and Singh, N. : Curcumin counteracts the proliferative effect of estradiol and induces apoptosis in cervical cancer cells. *Mol. Cell. Biochem.* **347**, 1 (2011).
- 3) Li, R., Xiang, C., Ye, M., Li, H. F., Zhang, X. and Guo, D. A. : Qualitative and quantitative analysis of curcuminoids in herbal medicines derived from Curcuma species. *Food Chemistry* **126**, 1890 (2011).
- 4) Somlyo, A. P. and Somlyo, A. V. : Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* **372**, 231 (1994).
- 5) Somlyo, A. P. and Somlyo, A. V. : From pharmacomechanical coupling to G-proteins and myosin phosphatase. *Acta. Physiol. Scand.* **164**, 437 (1998).
- 6) 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).
- 7) Sakurada, S., Takuwa, N., Sugimoto, N., Wang, Y., Seto, M., Sasaki, Y. and Takuwa, Y. : Ca<sup>2+</sup>-dependent activation of Rho and Rho-kinase in membrane depolarization-induced and receptor stimulation-induced vascular smooth muscle contraction. *Circ. Res.* **93**, 548 (2003).
- 8) 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).
- 9) 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).
- 10) 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).
- 11) 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).
- 12) Wier, W. G. and Morgan, K. G. : Alpha1-adrenergic signaling mechanisms in contraction of resistance arteries. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **150**, 91 (2003).
- 13) Jeon, S. B., Jin, F., Kim, J. I., Kim, S. H., Suk, K., Chae, S. C., Jun, J. E., Park, W. H. and Kim, I. K. : A role for Rho kinase in vascular contraction evoked by sodium fluoride. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **343**, 27 (2006).
- 14) Wilson, D. P., Susnjar, M., Kiss, E., Sutherland, C. and Walsh, M. P. : Thromboxane A<sub>2</sub>-induced contraction of rat caudal arteria lsmooth muscle involves activation of Ca<sup>2+</sup> entry and Ca<sup>2+</sup> sensitization: Rho-associated kinase-mediated phosphorylation of MYPT1 at Thr-855, but not Thr-697. *Biochem. J.* **389**, 763 (2005).
- 15) Wooldridge, A. A., MacDonald, J. A., Erdodi, F., Ma, C., Borman, M. A., Hartshorne, D. J. and Haystead, T. A. : Smooth muscle phosphatase is regulated in vivo by exclusion of phosphorylation of threonine 696 of MYPT1 by phosphorylation of Serine 695 in response to cyclic nucleotides. *J. Biol. Chem.* **279**, 34496 (2004).
- 16) Park, W., Amin, A. R., Chen, Z. G. and Shin, D. M. : New Perspectives of Curcumin in Cancer Prevention. *Cancer Prev. Res. (Phila)*. **6**, 387 (2013).