

## Expression of Endothelin-1 by Stimulation with CXCL8 in Mouse Peritoneal Macrophages

Jei-Jun Bae<sup>1</sup>, Jung-Hae Kim<sup>2</sup>, Hoon Kim<sup>3</sup> and Hee-Sun Kim<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, and <sup>2</sup>Department of Microbiology, College of Medicine, Yeungnam University, Daegu, Korea, <sup>3</sup>Department of Emergency Medicine, College of Medicine, Inha University, Incheon, Korea

Endothelin-1 (ET-1) has been characterized as a potent vasoconstrictor secreted by the endothelium, and play a major role in the regulation of vascular tone. It has been also known to participate in inflammatory reactions. The production of ET-1 by macrophages during infection and inflammation is related to tissue perfusion and leukocyte extravasation. The aim of this study is to investigate the role of IL-8/CXCL8, as a major inflammatory chemokine, for ET-1 expression in macrophages. Expression of ET-1 mRNA in mouse peritoneal macrophages (PeMφ) was weaker than that in vascular smooth muscle cells (VSMCs) from spontaneously hypertensive rats (SHR) and normotensive Wistar-Kyoto rats (WKY). However, expression of IL-8/CXCL8-induced ET-1 mRNA in PeMφ was much more stronger than that in SHR and WKY VSMCs. Maximum expression of ET-1 mRNA was observed at 50 ng/ml dose of IL-8/CXCL8 and occurred at 2 h after addition of IL-8/CXCL8. Expression of ET-1 by IL-8/CXCL8 was dependent on NF-κB activation and ERK1/2 phosphorylation. Baicalein, a 12-lipoxygenase (LO) inhibitor, inhibited the expression of IL-8/CXCL8-induced ET-1 mRNA. This inhibitory action of baicalein was mediated via ERK1/2 inactivation. Induction of 12-LO mRNA by IL-8/CXCL8 and expression of ET-1 mRNA by 12-LO metabolite, 12(S)-HETE were also detected. The expression of IL-8/CXCL8-induced ET-1 mRNA was not detected in PeMφ transfected with 12-LO siRNA. These results suggest that IL-8/CXCL8 can act as one of main inducers of ET-1 in vascular inflammatory reactions, and ET-1 expression by IL-8/CXCL8 is related to 12-LO pathway in PeMφ.

**Key Words:** Endothelin-1, IL-8/CXCL8, Mouse peritoneal macrophages, 12-lipoxygenase

### 서 론

혈관내피세포는 다양한 혈관이완 물질과 수축 물질들을 분비한다 (1). 이들 가운데 endothelin (ET)은 폐지의 대동맥 내피세포에서 처음 분리된 대표적 혈관수축 물질

이다 (2). ET계에는 ET-1, ET-2, ET-3가 있으며 이들은 각각 21개의 아미노산을 보유한 펩타이드형이다. 이 가운데 ET-1은 가장 강력한 혈관수축 인자로 주로 내피에서 분비되는 것으로 알려져 왔다 (3, 4). ET-1은 허혈 또는 혈관 손상 시 내피층에서 분비되어 혈관 평활근 수축을 유도하여 혈압을 높이는 것으로 알려져, ET-1의 발현이나 작용에 대한 대부분의 연구는 혈관내피세포나 혈관 평활근세포를 대상으로 혈관수축에 국한되어져 왔다 (5). 그러나 ET-1은 정상적으로 또는 병리적인 상태에서 혈관 세포 뿐 아니라 다양한 세포 및 조직에서도 분비되고, 이들의 기능 또한 혈관의 수축 외에 혈관 평활근세포의 증식, 내피세포에서의 혈관부착분자들의 발현 조절, 호중구의 이동, 면역세포의 조절 등 다양한 기능을 하는 것으

Received: June 5, 2009/ Revised: June 23, 2009

Accepted: July 3, 2009

\*Corresponding author: Hee Sun Kim, M.D., Ph.D. Department of Microbiology, College of Medicine, Yeungnam University 317-1 Daemyungdong, Namgu, Daegu, 705-717, Korea.  
Phone: +82-53-620-4363, Fax: +82-53-653-6628  
e-mail: heesun@med.yu.ac.kr

\*\*This work was supported by a grant of the Yeungnam University research grants in 2008.

로 밝혀졌다 (6~8). 뿐만 아니라 ET-1은 심근경색증, 기관지 천식, 폐 고혈압, 신부전, 동맥경화 및 폐혈증과 같은 다양한 질환의 병인에 관여하는 것으로 추측되며 (6, 7, 9, 10) 이들 질환의 진행 시 혈장 내 고농도의 ET-1을 확인할 수 있다. Ebihara 등 (11)은 폐혈증 환자의 치사율과 혈장 ET-1의 농도 간에 매우 높은 상관관계가 있다고 보고하였다.

ET-1의 생산세포로서 대식세포나 단핵구의 잠재적 중요성은 폐혈증, 내독소혈증 (endotoxemia) 환자 또는 실험동물 모델을 통하여 관찰되었다. 폐혈증 환자 말초혈액 단핵구는 정상인들에 비해 ET-1 mRNA를 매우 높게 발현하고, 내독소혈증 실험동물 모델의 경우 간의 쿠퍼 세포에서 ET-1의 합성과 분비가 관찰되었다 (11, 12). 또한 쥐를 모델로 하여 복막염 유발 시 염증성 세포 침윤 부위에 고농도의 ET-1을 측정할 수 있었다 (13). 이러한 일련의 연구 결과들을 토대로 Wahl 등 (14)은 골수 유래 마우스 대식세포에 그람 음성균과 양성균을 감염시켜 이들 대식세포로부터 ET-1의 발현을 직접 확인하고, 감염이나 염증반응 동안 대식세포로부터의 ET-1 생성은 조직 관류, 백혈구 혈관 외 유출, 면역세포기능 등에 영향을 끼칠 수 있다고 하였다.

케모카인 IL-8/CXCL8은 대표적인 염증성 사이토카인 중 하나로 호중구를 활성화시키고 동맥경화 초기 혈관 내피층 아래로 단핵구들을 이동시키는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (15, 16). IL-8/CXCL8의 체내 농도가 높은 경우 심장동맥질환 유발 위험이 매우 큰 것으로 보고되었다 (16). 고혈압 쥐 혈관 평활근세포에서 IL-8/CXCL8의 발현이 정상혈압 쥐에 비해 높게 나타나고 본태성 고혈압의 혈관 평활근 수축에 IL-8/CXCL8이 작용하는 것으로 보고되어 (17), 현재 고혈압 발생 기전에 CCL2와 함께 중요한 역할을 하는 케모카인으로 생각된다.

지다당질, phorbol esters, 인터페론 감마 등 다양한 자극인자들을 이용한 사람, 쥐, 기니픽의 혈관내피세포나 혈관 평활근세포에서 ET-1의 발현 연구는 이미 많이 이루어져 있다 (18~22). 그러나 대식세포에서의 ET-1 생성의 중요성과 그 의의에 대한 연구 보고는 극히 드물다. 특히 고혈압 유도 혈관질환 발생 기전의 주요 인자들 중 하나로 추측되는 IL-8/CXCL8이 강력한 혈관수축인자로 알려진 ET-1 발현에 어떠한 영향을 미치는가에 대한 연구 보고는 아직 없는 실정이다. 혈관 손상으로 인한 혈

관 염증의 진행 과정에서 혈관내피는 ET-1을 다량 분비하게 되고, 이와 함께 혈관 내피층에 대식세포와 단핵구의 침착이 이루어지며 이들 세포로부터 염증매개물질들의 분비 및 이에 따른 염증반응의 지속적 진행을 고려해볼 때, 대식세포에서의 ET-1 발현 유무 및 대식세포에서 분비되는 염증매개물질들에 의한 ET-1의 발현 기전 연구는 ET-1의 생체 내 다양한 작용 기전의 정립에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서는 마우스 복강 내 대식세포에서 케모카인 IL-8/CXCL8에 의한 ET-1의 발현 여부 및 발현 기전을 분석하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험 재료

Total RNA 분리는 Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하였다. Phosphate-buffered saline (PBS), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), penicillin-streptomycin과 fetal bovine serum (FBS)는 Gibco/BRL (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였다. Recombinant human IL-8/CXCL2는 R&D systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구입하였다. Baicalein은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. (E)3-[(4-methylphenyl)sulfonyl]-2-propenenitrile (Bay11-7082)와 MEK1/2 inhibitor, 2'-amino-3'-methoxyflavone (PD-98059)는 Calbiochem (San Diego, CA, USA)로부터 구입하였다. 12(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid (12(S)-HETE)는 Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)로부터 구입하였다. Nitrocellulose transfer membrane은 Schleicher & Schuell Bioscience (Dassel, Germany)에서 구입하였다. 중합효소 연쇄반응을 위한 ET-1, 12-lipoxygenase (12-LO),  $\beta$ -actin oligonucleotide primer는 Bionics (Seoul, Korea)로부터 합성하여 구입하였다. LightCycler FastStart DNA SYBR Green I Mix는 Roche (Mannheim, Germany)에서 구입하였다. Phospho-ERK와 ERK 항체는 Cell Signaling (Danvers, MA, USA)에서 구입하였다. ET-1 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다.  $\gamma$ -tubulin 항체는 Sigma Chemical Co.로 부터 구입하였다.

### 실험동물

생후 8~9주령의 specific pathogen free (SPF) 암컷 inbred B57BL/6 마우스를 효창 과학 (대구, 한국)에서 구입하여

사용하였다. 마우스에 실험동물 사료 (삼양유지사료, 원주, 한국)와 멸균 음용수를 공급하고 가능한 스트레스와 환경적으로 큰 변화를 받지 않도록 하였으며, 영남대학교 병원의 실험동물 윤리위원회의 규정에 준하여 영남의대 실험동물실에서 사육하였다. 고혈압 쥐 (spontaneously hypertensive rat, SHR)와 정상혈압 쥐 (normotensive Wistar-Kyoto rats, WKY)는 각각 13주령을 사용하였고, Japan SLC Inc. (Shizuoka, Japan)으로부터 구입하였다.

#### 마우스 복강 내 대식세포 분리

Hamilton 등의 방법 (23)에 따라 C57BL/6 마우스에 Brewer's thioglycollate broth를 2 ml씩 복강 내로 주입하고, 3일 후 마우스를 경주 분리법으로 희생시킨 다음 heparin (5 U/ml)이 첨가된 차가운 Hank's balanced salt solution (HBSS) 10 ml를 복강 내에 넣고 복강을 마사지하였다. 마사지 후 23 G 10 ml 주사기를 이용하여 복강 내 세포를 빼내어 원심분리하였다. 이를 차가운 HBSS로 한 번 세척 후, 10% FBS, penicillin (100 U/ml)과 streptomycin (100 µg/ml)이 함유된 RPMI 1640 완전배지에 부유시켜 6 well 배양접시에 분주 후, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 2시간 동안 배양 후, 부착되지 않은 세포를 제거하기 위하여 RPMI 1640으로 3회 세척 후, 부착된 마우스 복강 대식세포에 완전배지를 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에 18시간 정치 배양한 후 반응세포로 사용하였다.

#### 혈관 평활근세포의 분리

생후 13주된 수컷 정상혈압 쥐와 고혈압 쥐의 흉부 대동맥으로부터 혈관 평활근세포를 일차 배양하였다 (24). 혈관 평활근세포는 10% FBS, penicillin (100 U/ml)과 streptomycin (100 µg/ml)이 함유된 DMEM 배지에서 배양하였다. 세포는 0.25% trypsin/EDTA를 이용하여  $1 \times 10^5$  cell/ml의 농도로 75-cm<sup>2</sup> 배양 플라스크에 분주하고 계대 배양하였다. 모든 실험에서 사용된 세포는 4대지 7계대의 세포이다. 실험 전 혈관 평활근세포는 FBS가 첨가되지 않은 DMEM 배지로 16~18시간 동안 배양하였다. 세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에 실험 반응 시간에 따라 정치 배양하였다.

#### 총 RNA의 분리

대식세포가 있는 배양접시의 배지를 제거한 후 Trizol 1 ml와 클로로포름 200 µl를 섞어서 15분간 얼음에 정치

시켰다. 그 후, 4°C에서 12,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 윗층을 조심스럽게 취한 뒤 동량의 isopropanol을 첨가하여 -20°C에서 45분간 정치시킨 후, 원심분리하여 얻어진 침전물을 에탄올로 세척한 후에 공기 중에서 말린 뒤 0.1% diethylpyrocarbonate (DEPC)가 첨가된 증류수에 녹여 RNA의 농도를 측정하였다.

역전사 중합효소 연쇄반응 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)과 실시간 중합효소 연쇄반응 (real-time PCR)

12-LO siRNA의 세포 내 주입 확인을 위해 12-LO 유전자 발현 유무를 RT-PCR을 통해 관찰하였다. PCR 튜브에 농도가 100 ng/µl의 RNA 3 µl, 25 mM MgCl<sub>2</sub> 4 µl, 10 × PCR buffer 2 µl, dNTP 각각 2 µl씩 8 µl, RNase inhibitor 1 µl, reverse transcriptase (M-MuVRT: RAV-2) 1 µl, oligo(dT) 1 µl가 혼합된 RT 시료 17 µl를 넣고 그 위에 mineral oil을 중첩시킨 후 42°C에서 15분간 반응시켜 cDNA를 합성시켰다. 그 후 99°C에서 5분간, 5°C에서 5분간 반응시켜 reverse transcriptase를 불활성화시킨 다음 PCR을 실시하였다. PCR master mixture는 25 mM MgCl<sub>2</sub> 4 µl, 10 × PCR buffer 8 µl 그리고 Taq polymerase 0.5 µl와 멸균 증류수 65.5 µl를 혼합하여 전체 78 µl가 되도록 하였다. 여기에 각각 20 µM의 sense primer와 antisense primer를 1 µl 첨가하여 PCR을 실시하였다. PCR은 thermal cycler (Perkin Elmer, Boston, MA, USA)를 이용하여 실시하였으며, 처음의 thermal cycling 단계는 94°C에서 45초 동안 불활성화 단계, 57°C에서 15초 동안 결합 반응 단계와 72°C에서 30초 동안 핵산 중합 단계로 구성하였다. 35회의 thermal cycling 후 별도로 72°C에서 5분 동안 더 핵산 중합 반응을 실시하여 부분적으로 신장된 산물을 완전한 가닥으로 완성시켜 주는 단계로 하였다. 증폭된 상보 DNA는 1.5% agarose gel (ethidium bromide 1 µg/ml 첨가) 상에서 0.5 × TBE buffer로 100 volt, 30분간 전기영동시킨 후 관찰하였다. DNA marker로는 100 bp DNA ladder를 사용하였다.

ET-1 및 12-LO 유전자 발현 확인을 위해 실시한 real-time PCR은 Roche사 (Mannheim, Germany)의 LightCycler를 이용하여 수행하였다. 분리된 total RNA 농도를 각각 1 µg으로 조정하고 역전사를 실시하여 cDNA를 합성시킨 후 real-time PCR 시료로 사용하였다. PCR 과정은 Roche사에서 제시한 실험의 방법에 준하여 실행하였다. PCR

**Table 1.** Primer sequences for real-time PCR

Gene		Sequence ( 5' → 3')	Length
ET-1	Sense	GGAAACTACGAAGGTTGGAGGC	234 bp
	Antisense	CTGTAGAAGCCACACAGATGGTCT	
12-LO	Sense	TGGGGCAACTGGAAGG	312 bp
	Antisense	AGAGCGCTTCAGCACCAT	
$\beta$ -actin	Sense	TACTGCCCTGGCTCCTAGCA	101 bp
	Antisense	TGGACAGTGAGGCCAGGATAG	

master mixture의 구성은 25 mM  $MgCl_2$  1.2  $\mu$ l, LightCycler FastStart primer를 각각 0.4  $\mu$ l, cDNA 2  $\mu$ l와 멸균 증류수 5  $\mu$ l를 혼합하여 전체 양이 10  $\mu$ l가 되도록 하여 PCR를 실시하였다. Pre-incubation 단계는 95°C에서 10분 반응 뒤, 본격적인 증폭을 하였다. 변성 과정은 95°C에서 10초, 연결 과정은 primer에 따른 적정온도에서 5초, 신장 과정을 72°C에서 10초간 총 45회를 실시한 뒤 매 회마다 fluorescence detection을 수행하였다. 이 후 65~95°C의 범위에서 계속적인 fluorescence detection을 동반한 melting point 분석을 실시하였다. 이때 발현 정도를 비교하기 위한 normalization gene으로  $\beta$ -actin을 사용하였다. Primer의 염기서열은 Table 1과 같다.

#### Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

반응시킨 세포를 수거하여 hypotonic buffer A (10 mM HEPES, pH 7.5, 10 mM KCl, 1.5 mM  $MgCl_2$ , 0.5 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 10  $\mu$ g/ml pepstatin, 10  $\mu$ g/ml leupeptin, 10  $\mu$ g/ml autipain 및 10  $\mu$ g/ml aprotinin)를 이용하여 1차 용해시킨 뒤 12,000 g에서 15초간 원심분리하였다. 상층액을 버린 후 얻어진 pellet에 hypotonic buffer B (20 mM HEPES, pH 7.5, 25% glycerol, 0.4% NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.0, 1 mM EGTA, 0.5 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 10  $\mu$ g/ml pepstatin, 10  $\mu$ g/ml leupeptin, 10  $\mu$ g/ml autipain, 10  $\mu$ g/ml aprotinin)를 이용하여 2차 용해 후 12,000 g에서 10분간 원심하여 핵 내 단백질을 수거하였다. Bradford (Bio-Rad, Richmond, CA, USA)법으로 정량한 후 -70°C에서 보관하여 EMSA를 위한 재료로 사용하였다. NF- $\kappa$ B DNA binding을 위한 oligonucleotide probe (5'-AGTTGAGGGGACTTTAGGC-3')는 Santa Cruz Biotechnology로부터 구입하였다. 탐지자의 표식은 random-primed DNA labelling kit (Roche)를 사용하였다. 핵내 단백질에 50000 cpm 탐지자를 첨가하여 20

분간 반응용액 (200 mM HEPES, pH 7.5, 500 mM KCl, 10 mM EDTA, pH 8.0, 50% glycerol, 10 mM DTT, 1 mg/ml BSA, 1  $\mu$ g/ $\mu$ l poly [dI-dC])에 반응시킨 후 4% polyacrylamide gel에서 전기영동하고 3M 종이에 전이하였다. 이를 X-선 감광 필름과 같이 필름카세트에 넣어 -70°C에서 자가방사 기록 후 관찰하였다.

#### 웨스턴 블롯팅

반응시킨 세포를 수거하여 PRO-PREP buffer (iNtRON, Seongnam, Korea)를 이용하여 세포를 용해시킨 후 13,000 rpm으로 10분 동안 원심하여 상층액을 수거하였다. Bradford 법으로 단백질을 정량한 후 -70°C에서 보관하여 웨스턴 블롯팅을 위한 재료로 사용하였다. 30  $\mu$ g의 단백질을 10% SDS-PAGE gel에서 전기영동하고 nitrocellulose membrane에 전이하였다. 5% 탈지유에 적정 항체를 희석하여 4°C에서 16~18시간 동안 반응시키고 0.05% Tween 20이 함유된 인산완충용액으로 3회 세척한 후 2차 항체를 5% 탈지유에 희석하여 실온에서 1시간 반응시켰다. 반응이 끝난 흡착지를 인산완충용액으로 3회 세척 후 chemiluminescence detection system (LAS-3000, Fujifilm, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

#### Small interfering RNA (siRNA)

ET-1의 발현에 대한 12-LO의 작용을 확인하기 위하여 Lipofectamine 2000 (Invitrogen)을 이용하여 mouse 12-LO siRNA와 negative control (Bioneer, Daejeon, Korea)을 대식 세포에 주입시켰다. 마우스로부터 분리한 대식세포를 6-well 배양접시에 24시간 동안 세포를 안정화시킨 뒤, 배양액을 Opti-MEM (Gibco/BRL, Life Technologies)으로 교체한 후, 12-LO siRNA (50 nmol/l)를 lipofectamine 2000을 사용하여 24시간 동안 주입한 후 10% FBS DMEM

으로 배양액을 교체하여 안정화시킨 후, total RNA를 추출하여 real-time PCR 방법으로 유전자 발현을 확인하였다. 마우스 12-LO siRNA sequence는 다음과 같다. Sense, 5'-GUGUGUGACUAUGUCCAA-3'; antisense, 5'-UUGGAACAUAAGUCACACAC-3'.

#### 통계처리

결과분석은 SPSS 프로그램을 이용하여 Wilcoxon signed rank test로 처리하였으며, 유의 수준  $p < 0.05$ 에서 검정하였다.

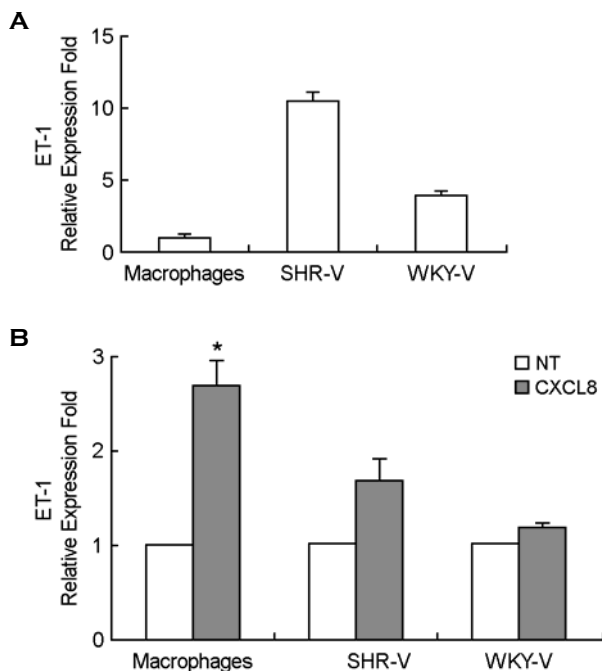
### 결 과

#### 마우스 복강 내 대식세포에서 ET-1의 발현

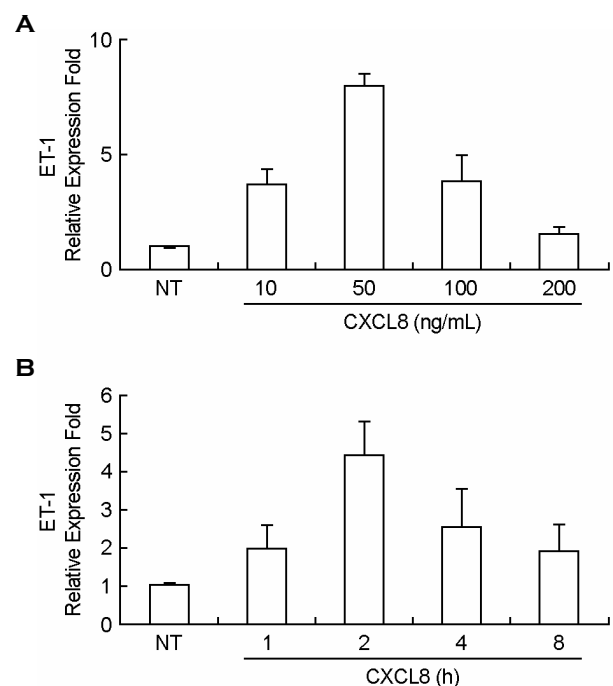
IL-8/CXCL8의 ET-1 발현 기전 실험을 진행하기에 앞서 먼저 ET-1의 발현이 알려진 혈관 평활근세포와 비교하여 마우스 복강 내 대식세포에서 ET-1 발현 정도를

확인하였다. 혈관 평활근세포는 고혈압 쥐 혈관 평활근세포와 정상혈압 쥐 혈관 평활근세포 두 종류를 사용하여 실시간 중합효소 연쇄반응으로 그 발현 정도를 비교하였다. ET-1의 발현은 고혈압 쥐 혈관 평활근세포에서 가장 강하게 나타나고, 대식세포의 경우 정상혈압 쥐의 혈관 평활근세포 보다 약하게 나타났다 (Fig. 1A). 복강 내 대식세포에서의 ET-1 내재적 발현이 비록 혈관 평활근세포에 비해 약하였으나, ET-1의 발현이 확인됨에 따라 IL-8/CXCL8에 의한 대식세포에서의 ET-1 mRNA 발현 유도 실험을 진행하였다. 마우스 복강 내 대식세포와 각각의 혈관 평활근세포에 IL-8/CXCL8을 50 ng/ml의 농도로 두 시간 반응시킨 뒤 ET-1 mRNA의 발현을 관찰한 결과 IL-8/CXCL8의 ET-1 발현 유도능은 혈관 평활근세포들에 비해 대식세포에서 더 높게 나타났다 (Fig. 1B).

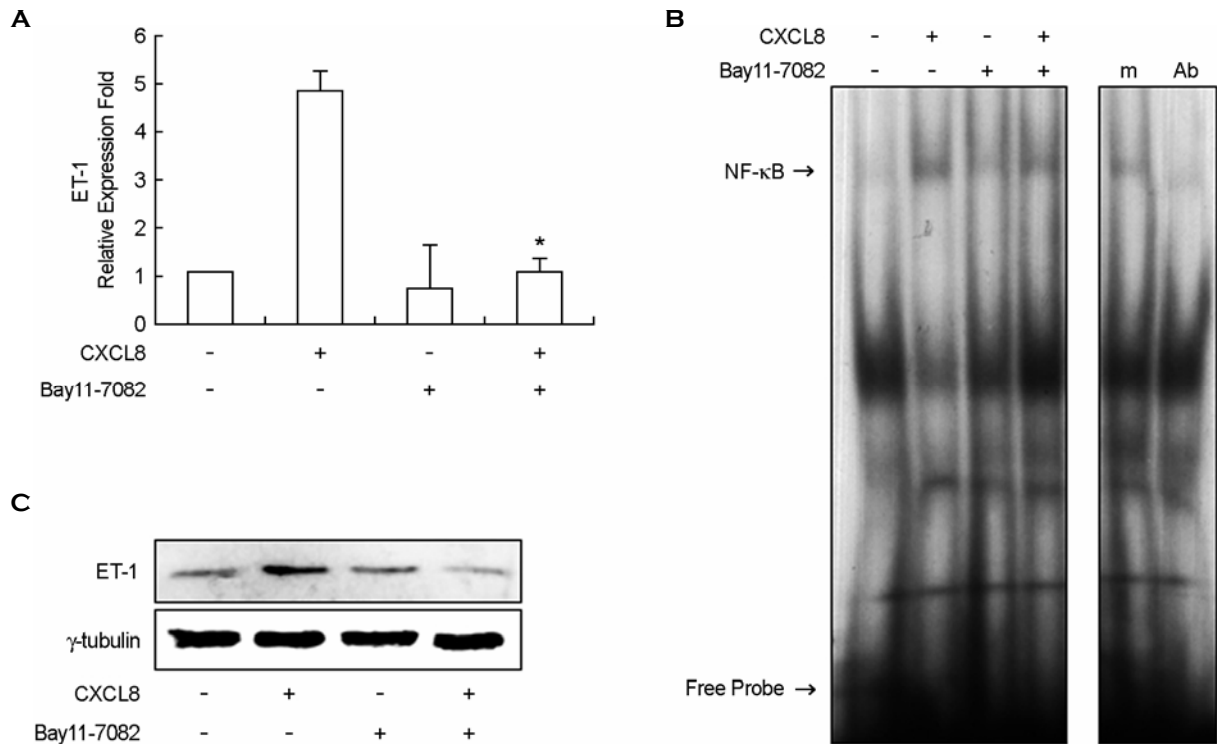
마우스 복강 내 대식세포에서의 IL-8/CXCL8에 의한 ET-1의 강한 발현이 확인됨에 따라 이들 세포에서의 IL-8/CXCL8 처리 농도와 반응 시간에 따른 ET-1 발현



**Figure 1.** Expression of ET-1 mRNA in mouse peritoneal macrophages. **A:** Real-time PCR for constitutive expression of ET-1 mRNA in thioglycollate-elicited mouse peritoneal macrophages (TG-PeMφ) and vascular smooth muscle cells from SHR (SHR-V) and WKY (WKY-V). **B:** TG-PeMφ, SHR-V and WKY-V were untreated (NT) or treated with IL-8/CXCL8 (50 ng/ml) for 2 h. The total RNAs were isolated and real time PCR was performed. Bars represent means  $\pm$  SD from three independent experiments \* $p < 0.05$  vs. untreated PeMφ.



**Figure 2.** Dose response of IL-8/CXCL8 on the expression of ET-1 mRNA and time course of IL-8/CXCL8-induced ET-1 mRNA expression in mouse peritoneal macrophages. TG-PeMφ were untreated (NT) or treated with 0, 10, 50, 100 or 200 ng/ml of IL-8/CXCL8 for 2 h (**A**), and TG-PeMφ were treated with IL-8/CXCL8 (50 ng/ml) for 0, 1, 2, 4, or 8 h (**B**). Total RNAs were isolated and real-time PCR was performed. Bars represent means  $\pm$  SD from three separate experiments.



**Figure 3.** Production of IL-8/CXCL8-induced ET-1 is dependent on NF- $\kappa$ B activation in mouse peritoneal macrophages. **A:** TG-PeM $\phi$  were untreated or treated with IL-8/CXCL8 (50 ng/ml) in the absence or presence of Bay11-7082 (10  $\mu$ M) for 2 h. Total RNAs were prepared, and real-time PCR was performed. **B:** Specific binding activity of NF- $\kappa$ B from nuclear extracts was assessed by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). For positive or negative control, aliquots of nuclear extract were incubated with a 100-fold excess of mutant probe (m) or with 2  $\mu$ g of anti NF- $\kappa$ B Ig (Ab) before EMSA. **C:** Cell lysates were separated on 10% SDS-polyacrylamide gels and then immunoblotted with ET-1 antibody. Data shown are representatives of three independent experiments. Bars represent means  $\pm$  SD from three independent experiments. \* $p$  < 0.05 vs. treated with IL-8/CXCL8.

변화를 실시간 중합효소 연쇄반응법을 사용하여 관찰하였다. IL-8/CXCL8을 10, 50, 100, 200 ng/ml의 농도로 각각 두 시간 반응시킨 뒤 대식세포에서의 ET-1 발현 양상을 관찰한 결과 IL-8/CXCL8의 농도 50 ng/ml 반응에서 ET-1의 발현이 가장 높게 나타나고 그 이후의 농도부터 ET-1의 발현은 떨어졌다 (Fig. 2A). IL-8/CXCL8의 반응 시간에 따른 ET-1의 발현을 보기 위해 IL-8/CXCL8의 농도를 50 ng/ml로 하여 0, 1, 2, 4, 8시간 처리하였다. 반응 두 시간째 가장 강한 ET-1의 발현이 관찰되었다 (Fig. 2B). 따라서 이후의 실험은 IL-8/CXCL8의 농도는 50 ng/ml, 반응 시간은 두 시간으로 하여 실시하였다.

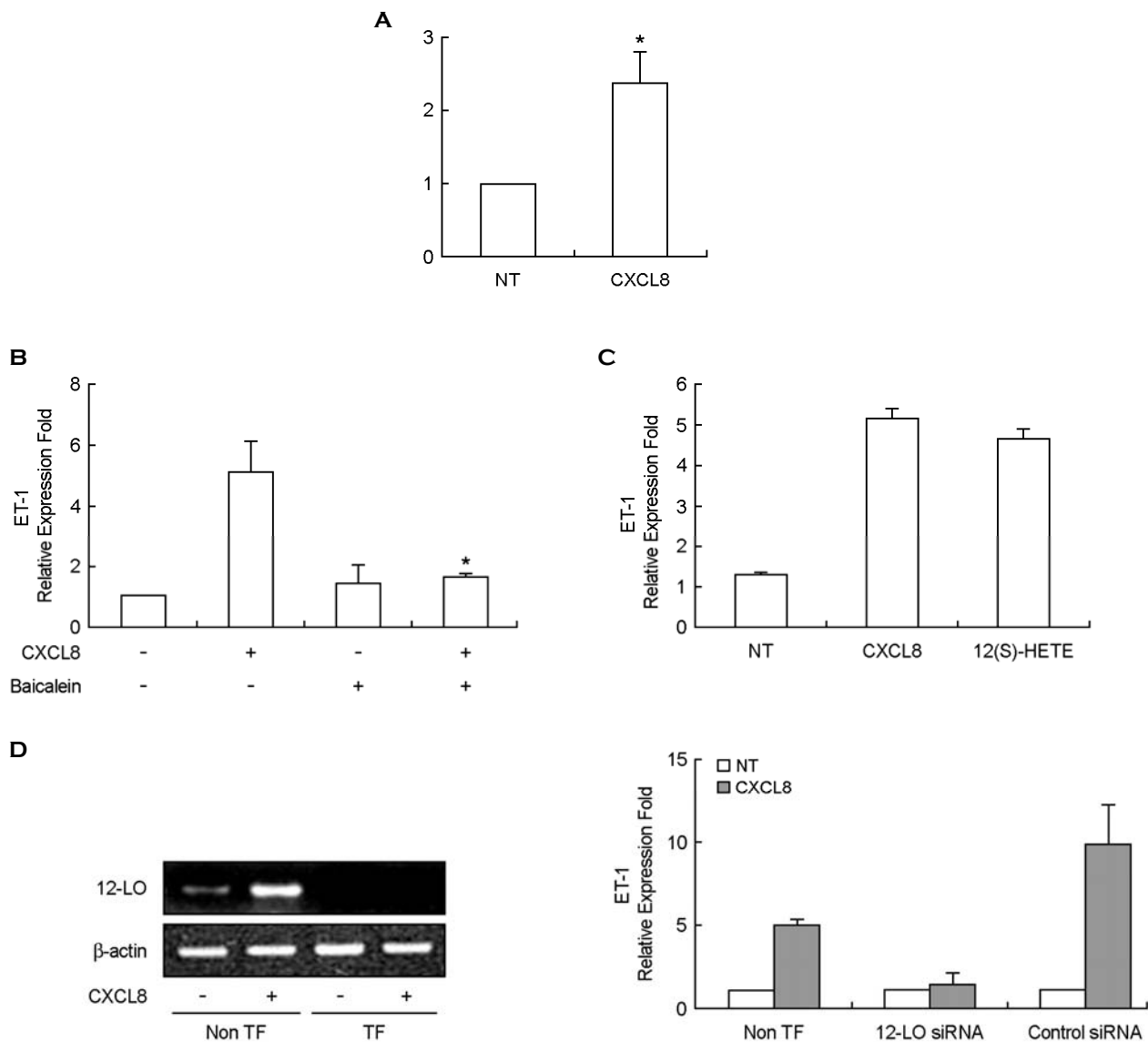
#### IL-8/CXCL8에 의한 ET-1 발현과 NF- $\kappa$ B의 활성화

대식세포에서 IL-8/CXCL8에 의한 ET-1의 발현 기전을 밝히기 위해 전사인자인 NF- $\kappa$ B의 관여 여부를 확인하였다. 대식세포에 IL-8/CXCL8을 처리 시 NF- $\kappa$ B 활성화가

제제인 Bay11-7082를 함께 처리하여 ET-1 mRNA의 발현 변화를 확인한 결과, Bay11-7082 처리 시 IL-8/CXCL8에 의한 ET-1 mRNA의 발현이 완전히 억제되는 것으로 나타났다 (Fig. 3A). 이 결과를 확인하기 위해 NF- $\kappa$ B 활성화 여부를 관찰할 수 있는 EMSA를 시행하였다. 그 결과 IL-8/CXCL8 처리 시 NF- $\kappa$ B가 활성화되는 것을 확인하였다 (Fig. 3B). 또한 ET-1 항체를 이용한 웨스턴 블롯팅을 통하여 대식세포에 IL-8/CXCL8 처리 시 ET-1 단백질의 생성을 확인하고 IL-8/CXCL8과 Bay11-7082를 함께 처리하면 ET-1 단백질 생성이 소실되는 것을 확인하였다 (Fig. 3C). 이러한 결과들을 통해서 마우스 대식세포에서 IL-8/CXCL8에 의한 ET-1의 발현에 NF- $\kappa$ B 활성화가 필요한 것을 확인하였다.

#### IL-8/CXCL8에 의한 ET-1의 발현에서 12-LO의 작용

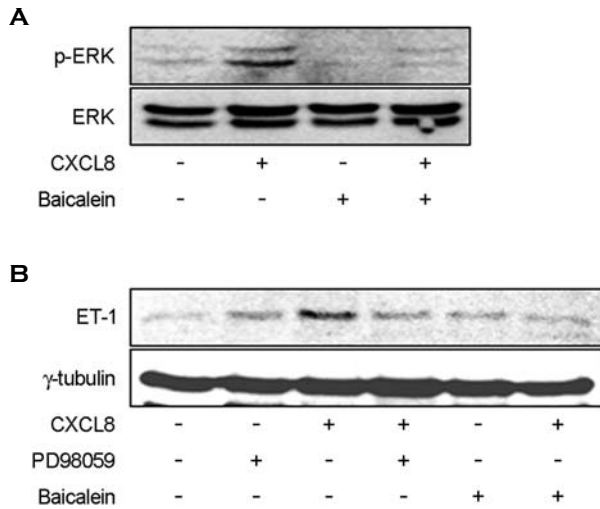
IL-8/CXCL8에 의한 ET-1의 유도 발현 기전 가운데 혈



**Figure 4.** Expression of IL-8/CXCL8-induced ET-1 mRNA is mediated by 12-LO pathway in mouse peritoneal macrophages. **A:** TG-PeM $\phi$  were untreated (NT) or treated with IL-8/CXCL8 (50 ng/ml) for 2 h. After total mRNAs were isolated, real-time PCR for 12-LO mRNA expression was performed. Bars represent means  $\pm$  SD from three independent experiments. \* $p < 0.05$  vs. untreated cells. **B:** TG-PeM $\phi$  were untreated or treated with IL-8/CXCL8 (50 ng/ml) in the presence or absence of baicalein (10  $\mu$ M) for 2 h. After total mRNAs were isolated, real-time PCR was performed. Bars represent means  $\pm$  SD from three independent experiments. \* $p < 0.05$  vs. cells treated with IL-8/CXCL8. **C:** TG-PeM $\phi$  were untreated (NT) or treated with IL-8/CXCL8 (50 ng/ml) or 12(S)-HETE (500 nM) for 2 h. After total mRNAs were isolated, real-time PCR was performed. **D:** TG-PeM $\phi$  were plated on 24-well plates, grown to 90% confluence and then transfected with 12-LO siRNA oligomers (50 nmol/l). TG-PeM $\phi$  were then untreated or treated with IL-8/CXCL8 (50 ng/ml) for 2 h. After total RNAs were isolated, RT-PCR and real-time PCR were performed. non TF; non-transfected cells. TF; 12-LO siRNA-transfected cells. Bars represent means  $\pm$  SD from three independent experiments.

관수축인자 12-LO가 관여하는지 관찰하였다. 먼저, 마우스 복강 내 대식세포가 IL-8/CXCL8에 의해 12-LO mRNA를 발현하는지 관찰한 결과 IL-8/CXCL8을 처리한 대식세포의 실시간 중합효소 연쇄반응에서 12-LO 유전자의 뚜렷한 발현이 관찰되었다 (Fig. 4A). 대식세포에서 IL-8/

CXCL8에 의한 12-LO 유전자의 발현을 확인한 후, 대식세포에 12-LO 억제제인 baicalein을 IL-8/CXCL8과 함께 처리한 뒤 IL-8/CXCL8의 ET-1 mRNA 발현능을 관찰한 결과 baicalein은 IL-8/CXCL8의 ET-1 유전자 발현을 현저하게 억제시켰다 (Fig. 4B). 이 결과를 좀 더 확인하기 위



**Figure 5.** Expression of IL-8/CXCL8-induced ET-1 mRNA is dependent on ERK1/2 activation, and inhibitory action of baicalein on the expression of IL-8/CXCL8-induced ET-1 mRNA is mediated via ERK1/2 inactivation in mouse peritoneal macrophages. **A:** TG-PeMφ were untreated or treated with IL-8/CXCL8 (50 ng/ml) and/or baicalein (10 μM) for 2 h. Cell lysates were separated on 10% SDS-polyacrylamide gels and then immunoblotted with phospho-ERK1/2 antibody. **B:** TG-PeMφ were untreated or pretreated with PD98059 (MEK1/2 inhibitor, 10 μM) for 30 min. Cells were left untreated or treated with IL-8/CXCL8 (50 ng/ml) and/or baicalein (10 μM) for 2 h. Cell lysates were separated on 10% SDS-polyacrylamide gels and then immunoblotted with ET-1 antibody. Data shown are representatives of three independent experiments.

하여 12-LO의 대사산물인 12(S)-HETE을 대식세포에 처리한 뒤 ET-1의 발현을 관찰한 결과, 12(S)-HETE에 의한 ET-1 유전자의 발현이 관찰될 뿐만 아니라 그 발현 정도도 IL-8/CXCL8에 의한 ET-1의 발현과 큰 차이가 없었다 (Fig. 4C). 그 후 마우스 대식세포 내에 12-LO 유전자가 발현되지 못하도록 12-LO siRNA를 세포 내로 주입시킨 뒤 IL-8/CXCL8을 처리하여 이를 IL-8/CXCL8가 처리된 정상 대식세포와 ET-1의 발현능을 비교하였다. 이에 앞서, 12-LO siRNA의 세포 내 주입이 제대로 되었는지를 RT-PCR법을 이용하여, 12-LO siRNA 주입 세포들의 경우 IL-8/CXCL8의 자극에도 불구하고 12-LO의 mRNA가 소실된 것을 확인하였다. 12-LO siRNA가 주입된 대식세포에서 IL-8/CXCL8은 ET-1의 발현을 유도하지 못하였다 (Fig. 4D). 따라서 IL-8/CXCL8에 의한 ET-1의 발현에 12-LO 경로가 관여함을 확인하였다.

MAP kinase 활성화를 통한 IL-8/CXCL8에 의한 ET-1의 발현

대식세포에서 IL-8/CXCL8에 의한 ET-1의 발현과 Fig. 4에서 관찰된 baicalein의 ET-1 발현 억제 작용에 MAP kinase extracellular signal regulated kinase (ERK)1/2의 활성화 관련 여부를 확인하고자 ERK1/2 인산화 항체를 사용한 웨스턴 블롯팅을 실시하였다. 실험 결과, IL-8/CXCL8에 의한 ERK1/2의 인산화가 확인되었고, IL-8/CXCL8과 baicalein의 병행 처리 시 ERK1/2의 인산화가 급격히 떨어지는 것이 관찰되었다 (Fig. 5A). 이후, baicalein과 ERK1/2 활성화 억제를 위한 MEK1/2 억제제인 PD98059를 처리하여 IL-8/CXCL8에 의한 ET-1 단백질 생성 여부를 관찰하였다. IL-8/CXCL8에 의한 ET-1 단백질 생성은 PD-98059와 baicalein에 의해 각각 ET-1 생성이 현저히 감소되는 것이 관찰되었다 (Fig. 5B). 이 결과들은 IL-8/CXCL8에 의한 ET-1 유전자 발현은 ERK1/2 신호전달 경로를 통하여, IL-8/CXCL8에 의해 발현된 ET-1 유전자에 대한 baicalein의 억제 작용은 ERK1/2 불활성화에 따른 것임을 의미한다.

## 고 찰

강력한 혈관수축 작용으로 혈관 긴장을 조성하고, 혈압을 높이며, 심근허혈, 심실 부정맥 등을 초래하는 ET-1의 병태생리학적 작용 특성상 ET-1의 연구는 주로 내피세포 또는 혈관 평활근세포를 대상으로 다양하게 진행되었다 (1, 3, 5, 25, 26). 그러나 ET-1이 단백질로부터 다양한 사이토카인 분비의 자극인자로 작용하고, 심장동맥 내피세포에 호중구 부착을 증가시키는 등, 염증 작용에도 일련의 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (27~30). 따라서 염증 시 대표적인 작동세포들 중 하나인 대식세포에서의 ET-1의 분비 또한 주목할 만하나, 대식세포에서의 ET-1 발현 연구 보고는 매우 드물다. Wahl 등 (14)이 마우스의 골수 유래 대식세포에 다양한 세균들을 자극시켜 ET-1의 발현을 관찰한 연구가 있을 뿐이다. 따라서 본 연구에서는 염증 환경에서 고농도로 분비되는 IL-8/CXCL8이 대식세포를 자극할 경우 ET-1의 발현 유도가 가능한지 알아보고자 하였다.

혈관수축으로 인한 고혈압의 주된 인자 중 하나가 ET-1이고, 이의 주된 생산세포가 혈관세포 (5)이기에 대



식세포에서의 ET-1 발현 정도를 고혈압 쥐 및 정상혈압 쥐의 혈관 평활근세포와 비교하였다. 혈관 평활근세포에서 ET-1의 발현에 관한 연구 보고는 많으나 (26, 31, 32) 고혈압 쥐와 정상혈압 쥐의 혈관 평활근세포 간의 ET-1 발현 비교나 이들 세포에서 IL-8/CXCL8에 의한 ET-1 발현에 관한 보고는 드물었다. 실험의 결과 고혈압 쥐 및 정상혈압 쥐의 혈관 평활근세포와 마우스 복강 내 대식세포 가운데 ET-1의 발현은 고혈압 혈관 평활근세포에서 가장 높게 나타나고 대식세포에서 가장 낮게 나타났다. 이는 혈관세포가 ET-1의 주된 생산세포이고, 고혈압 시 혈관세포에서 과발현되므로 이에 따른 것으로 해석할 수 있다. 그러나 IL-8/CXCL8에 의한 ET-1의 유도 발현은 대식세포에서 가장 높게 나타나 염증 작용의 주요 작동세포로서의 대식세포 역할을 생각할 때 대식세포에서의 ET-1 발현 연구는 의미가 있는 것으로 생각되었다.

혈관내피세포에서의 ET-1 발현 연구는 주로 사람의 태반 정맥 내피세포 (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)을 이용하여 연구되었다. Molet 등 (33)은 HUVEC에서 IL-8/CXCL8, MCP-1 및 RANTES에 의한 ET-1 발현 여부를 확인하였으나 그 발현 기전에 대한 연구는 하지 않았다. Cheng 등 (34)은 HUVEC에 IL-8/CXCL8 농도를 50, 100, 200 ng/ml로 하여 각각 12, 24시간으로 반응시켰을 때 농도 의존적으로 ET-1의 발현이 관찰된다고 하였다. 이 결과는 50 ng/ml에서 가장 높은 ET-1 유전자 발현을 보인 본 실험의 결과와는 달랐다. Ros 등 (35)은 지다당질에 의한 ET-1의 발현이 지다당질 저농도 (10 ng/ml)에서 높게 나타나고 고농도 (250~1000 ng/ml)에서는 낮아져 ET-1의 발현이 농도 의존적이지는 않다고 보고하였다. 따라서 혈관내피세포와 대식세포의 차이, 반응 시간, 자극인자의 종류 등에 따라 ET-1의 발현 양상은 다양할 것이라 생각된다.

일반적으로 특정 자극인자들의 자극으로 인해 대식세포가 다양한 단백질을 생산하는 과정에는 세포 내 전사인자들의 활성화가 필수적이다. 이 가운데 사이토카인 자극에 따른 염증 매개 유전자 발현에 관여하는 대표적인 전사인자 중 하나는 NF- $\kappa$ B이다 (15). 다양한 자극인자들의 작용에 따른 대식세포에서의 NF- $\kappa$ B의 활성화는 흔하게 관찰된다 (36~38). 본 연구에서도 IL-8/CXCL8에 의한 ET-1의 유도 발현에도 NF- $\kappa$ B의 활성화가 관련되어 있음을 확인할 수 있었다. 전사인자의 활성화와 더불어 MAP kinase들의 활성화 또한 대식세포에서의 염증매개물질들

생산을 위한 일련의 중요한 과정 중 하나이다 (39~41). MAP Kinase 작용에 따른 ET-1 발현 기전 관련 연구들 가운데 쥐의 혈관 평활근세포에서 angiotensin II (Ang II)와 요산에 의한 ET-1의 발현이 MAP Kinase ERK1/2의 활성화에 의한다는 보고 (31, 32)가 있으며, Sen 등 (42)은 혈관내피세포에서 섬유소원에 의해 발현되는 ET-1이 ERK1/2의 활성화를 통해 이루어진다고 하였다. 그러나 대식세포에서 ET-1 발현에 관여하는 MAP kinase 신호전달에 대한 연구 보고는 드물었다. 본 연구의 결과 IL-8/CXCL8에 의한 ET-1 유전자 발현과 단백질 생성이 ERK1/2 억제제에 의해 현저히 떨어짐에 따라 IL-8/CXCL8에 의한 마우스 대식세포에서의 ET-1 발현의 주된 신호전달 경로는 ERK1/2 경로를 통하여 이루어지는 것으로 생각된다. 이는 비록 자극인자와 대상 세포의 종류는 다르나, 다른 연구 결과들과 같이 ET-1의 발현에 관여하는 MAP kinase 경로가 ERK1/2 경로인 것은 일치하였다.

12-LO는 arachidonic acid의 lipoygenase 대사 경로를 통하여 생성되며 이의 대사산물은 12(S)-HETE이다. 12-LO는 혈관세포의 증식과 혈관의 수축 작용에 따른 고혈압 발생 및 유지매개 물질이다 (43, 44). 돼지와 사람의 혈관 평활근세포에서 12-LO 활성화와 발현의 강력한 조절인자로 Ang II가 알려져 있고, 고혈압 쥐의 혈장이나 혈관 평활근세포에서 증가된 12-LO의 생성을 관찰할 수 있다 (43, 45). 돼지의 동맥 혈관 평활근세포에서 IL-8/CXCL8이 12-LO의 발현 및 생성을 증가시킨다는 보고가 있었으며 (43), 본 연구자 또한 다른 연구 과정에서 IL-8/CXCL8이 고혈압 쥐의 혈관 평활근세포에서 12-LO를 정상혈압 쥐의 혈관 평활근세포에 비해 현저하게 높게 발현시키는 것을 관찰하였다. 따라서, ET-1은 12-LO와 함께 혈관수축작용을 통한 고혈압 매개 물질이고, 비록 대상 세포는 혈관 평활근세포였으나 IL-8/CXCL8이 12-LO를 강하게 발현시키는 것으로 알려져 있으므로, IL-8/CXCL8에 의한 ET-1의 발현에 혹시 12-LO가 작용하지 않을까 생각되어 12-LO에 대한 실험을 진행하였다. 실험 결과 대식세포에 12-LO 억제제인 baicalein을 처리 시 IL-8/CXCL8은 ET-1의 발현을 유도할 수 없었으며, ERK1/2 인산화 또한 억제된 상태로 관찰되었다. 현재까지 ET-1의 발현과 12-LO의 상관관계에 관한 정보는 미진한 상태이다. 따라서 12-LO의 작용이 추측되는 이 결과를 확실히 하고자, 12-LO 대사산물인 12(S)-HETE이 ET-1 유도 발현에 직접적으로 관여하는지를 관찰하였고, 12-LO

siRNA를 주입시킨 대식세포에서 IL-8/CXCL8이 ET-1 발현을 유도하지 못함을 관찰하였다. 즉, 마우스 복강 내 대식세포에서 IL-8/CXCL8에 의한 ET-1의 발현 유도는 IL-8/CXCL8에 의한 12-LO의 활성화와 관련 있음을 추측할 수 있었다. Ang II에 의한 혈관수축은 arachidonic acid 대사 경로 중 12-LO나 monooxygenase 대사 경로에 의하고, ET-1에 의한 혈관수축은 cyclooxygenase 대사 경로와 관련이 있다는 보고가 있다 (46, 47). 즉, ET-1이 12-LO가 아닌 다른 경로를 통해 혈관수축 작용을 유발한다고 하나 대식세포에서 IL-8/CXCL8에 의한 ET-1의 발현 유도에는 12-LO 활성화 의존적으로 나타나, ET-1의 생성에 있어 12-LO의 작용 기전에 관한 연구는 추후 필요한 것으로 생각된다.

대식세포에서의 IL-8/CXCL8에 의한 ET-1의 발현 기전에 대한 연구 보고가 흔하지 않은 상태에서 ET-1의 발현 과정에 12-LO가 작용한다는 보고는 의미 있게 생각된다. 따라서 IL-8/CXCL8에 의한 ET-1 발현 기전에 대한 정보가 미비한 상태에서 본 연구는 염증 환경에서 케모카인 IL-8/CXCL8과 ET-1의 상관관계를 분석하는데 중요한 정보가 될 것이며 혈관 내 염증 반응 시 혈관세포들뿐 아니라 대식세포로부터 ET-1 생성의 중요성을 부각시킬 수 있는 의미 있는 연구 결과라 생각된다.

## 참 고 문 헌

- 1) Agapitov AV, Haynes WG. Role of endothelin in cardiovascular disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2002;3:1-15.
- 2) Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988;332:411-5.
- 3) Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:2863-7.
- 4) Inoue A, Yanagisawa M, Takuwa Y, Mitsui Y, Kobayashi M, Masaki T. The human preproendothelin-1 gene. Complete nucleotide sequence and regulation of expression. *J Biol Chem* 1989;264:14954-9.
- 5) Schiffrin EL. Vascular endothelin in hypertension. *Vascul Pharmacol* 2005;43:19-29.
- 6) Battistini B, Forget MA, Laight D. Potential roles for endothelins in systemic inflammatory response syndrome with a particular relationship to cytokines. *Shock* 1996;5:167-83.
- 7) Wanecek M, Weitzberg E, Rudehill A, Oldner A. The endothelin system in septic and endotoxin shock. *Eur J Pharmacol* 2000;407:1-15.
- 8) Kedzierski RM, Yanagisawa M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001;41:851-76.
- 9) Boussette N, Giaid A. Endothelin-1 in atherosclerosis and other vasculopathies. *Can J Physiol Pharmacol* 2003;81:578-87.
- 10) Black SM, Kumar S, Wiseman D, Ravi K, Wedgwood S, Ryzhov V, Fineman JR. Pediatric pulmonary hypertension: Roles of endothelin-1 and nitric oxide. *Clin Hemorheol Microcirc* 2007;37:111-20.
- 11) Ebihara I, Nakamura T, Shimada N, Shoji H, Koide H. Effect of hemoperfusion with polymyxin B-immobilized fiber on plasma endothelin-1 and endothelin-1 mRNA in monocytes from patients with sepsis. *Am J Kidney Dis* 1998;32:953-61.
- 12) Liu B, Zhou J, Chen H, Wang D, Hu D, Wen Y, Xiao N. Expression and cellular location of endothelin-1 mRNA in rat liver following endotoxemia. *Chin Med J* 1997;110:932-5.
- 13) Lundblad R, Giercksky KE. Endothelin concentrations in experimental sepsis: profiles of big endothelin and endothelin 1-21 in lethal peritonitis in rats. *Eur J Surg* 1995;161:9-16.
- 14) Wahl JR, Goetsch NJ, Young HJ, Van Maanen RJ, Johnson JD, Pea AS, Brittingham A. Murine macrophages produce endothelin-1 after microbial stimulation. *Exp Biol Med* 2005; 230:652-8.
- 15) Thomson AW, Lotze MT. *The Cytokine Handbook*. Academic Press. 4th ed. San Diego: Elsevier Science; 2003. p.10-1, p.1056-7.
- 16) Boekholdt SM, Peters RJ, Hack CE, Day NE, Luben R, Bingham SA, Wareham NJ, Reitsma PH, Khaw KT. IL-8 plasma concentrations and the risk of future coronary artery disease in apparently healthy men and women: the EPIC-Norfolk prospective population study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1503-8.
- 17) Kim HY, Kang YJ, Song IH, Choi HC, Kim HS. Upregulation of interleukin-8/CXCL8 in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 2008;31:515-23.
- 18) Ehrenreich H, Anderson RW, Fox CH, Rieckmann P, Hoffman GS, Travis WD, Coligan JE, Kehrl JH, Fauci AS. Endothelins,

- peptides with potent vasoactive properties, are produced by human macrophages. *J Exp Med* 1990;172:1741-8.
- 19) Ehrenreich H, Burd PR, Rottem M, Hultner L, Hylton JB, Garfield M, Coligan JE, Metcalfe DD, Fauci AS. Endothelins belong to the assortment of mast cell-derived and mast cell-bound cytokines. *New Biol* 1992;4:147-56.
  - 20) Ehrenreich H, Rieckmann P, Sinowatz F, Weih KA, Arthur LO, Goebel FD, Burd PR, Coligan JE, Clouse KA. Potent stimulation of monocytic endothelin-1 production by HIV-1 glycoprotein 120. *J Immunol* 1993;150:4601-9.
  - 21) Xu J, Zhong NS. The interaction of tumour necrosis factor alpha and endothelin-1 in pathogenetic models of asthma. *Clin Exp Allergy* 1997;27: 568-73.
  - 22) Salh B, Hoefflick K, Kwan W, Pelech S. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 potentiate interferon-gamma-mediated endothelin production by human monocytes: role of protein kinase C. *Immunology* 1998;95:473-9.
  - 23) Kim HY, Kim HK, Kim JR, Kim HS. Upregulation of LPS-induced chemokine KC expression by 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 in mouse peritoneal macrophages. *Immunol Cell Biol* 2005;83:286-93.
  - 24) Griendling KK, Taubman MB, Akers M, Mendlowitz M, Alexander RW. Characterization of phosphatidylinositol-specific phospholipase C from cultured vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1991;266:15498-504.
  - 25) Anggrahini DW, Emoto N, Nakayama K, Widyanoro B, Adiarto S, Iwasa N, Nonaka H, Rikitake Y, Kisanuki YY, Yanagisawa M, Hirata K. Vascular endothelial cell-derived endothelin-1 mediates vascular inflammation and neointima formation following blood flow cessation. *Cardiovasc Res* 2009;82:143-51.
  - 26) Tsai CS, Loh SH, Liu JC, Lin JW, Chen YL, Chen CH, Cheng TH. Urotensin II-induced endothelin-1 expression and cell proliferation via epidermal growth factor receptor transactivation in rat aortic smooth muscle cells. *Proceedings of Atherosclerosis* 2009.
  - 27) Badr KF, Murray JJ, Breyer MD, Takahashi K, Inagami T, Harris RC. Mesangial cell, glomerular and renal vascular responses to endothelin in the rat kidney: elucidation of signal transduction pathways. *J Clin Invest* 1989;83:336-42.
  - 28) Ito H, Hirata Y, Hiroe M, Tsujino M, Adachi S, Takamoto T, Nitta M, Taniguchi K, Marumo F. Endothelin-1 induces hypertrophy with enhanced expression of muscle-specific genes in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ Res* 1991; 69:209-15.
  - 29) Cunningham ME, Huribal M, Bala RJ, McMillen MA. Endothelin-1 and endothelin-4 stimulate monocyte production of cytokines. *Crit Care Med* 1997;25:958-64.
  - 30) Liu G, Wang H, Ou D, Huang H, Liao D. Endothelin-1, an important mitogen of smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats. *Chin Med J* 2002;115:750-2.
  - 31) Hong HJ, Chan P, Liu JC, Juan SH, Huang MT, Lin JG, Cheng TH. Angiotensin II induces endothelin-1 gene expression via extracellular signal-regulated kinase pathway in rat aortic smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 2004;61:159-68.
  - 32) Chao HH, Liu JC, Lin JW, Chen CH, Wu CH, Cheng TH. Uric acid stimulates endothelin-1 gene expression associated with NADPH oxidase in human aortic smooth muscle cells. *Acta Pharmacol Sin* 2008;29:1301-12.
  - 33) Molet S, Furukawa K, Maghazechi A, Hamid Q, Giaid A. Chemokine- and cytokine-induced expression of endothelin 1 and endothelin-converting enzyme 1 in endothelial cells. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:333-8.
  - 34) Cheng M, Li Y, Wu J, Nie Y, Li L, Liu X, Charoude, HN, Chen H. IL-8 induces imbalances between nitric oxide and endothelin-1 and also between plasminogen activator inhibitor-1 and tissue-type plasminogen activator in cultured endothelial cells. *Cytokine* 2008;41:9-15.
  - 35) Ros J, Leivas A, Jimenez W, Morales M, Bosch-Marce M, Arroyo V, Rivera F, Rodes J. Effect of bacterial lipopolysaccharide on endothelin-1 production in human vascular endothelial cells. *J Hepatol* 1997;26:81-7.
  - 36) Deshpande R, Khalili H, Pergolizzi RG, Michael SD, Chang MD. Estradiol down-regulates LPS-induced cytokine production and NF- $\kappa$ B activation in murine macrophages. *Am J Reprod Immunol* 1997;38:46-54.
  - 37) Kim HY, Kim JR, Kim HS. Upregulation of lipopolysaccharide-induced interleukin-10 by prostaglandin A<sub>1</sub> in mouse peritoneal macrophages. *J Microbiol Biotechnol* 2008;18:1170-8.
  - 38) Kim HY, Kim HS. Upregulation of MIP-2 (CXCL2) expression by 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) in mouse peritoneal macrophages. *Immunol Cell Biol* 2007;85:60-7.
  - 39) Fu Y, Luo N, Lopes-Virella MF. Upregulation of interleukin-8 expression by prostaglandin D<sub>2</sub> metabolite 15-deoxy-delta 12, 14 prostaglandin J2 (15d-PGJ2) in human THP-1 macrophages. *Atherosclerosis* 2002;160:11-20.
  - 40) Tanabe S, Bodet C, Grenier D. *Peptostreptococcus micros* cell

- wall elicits a pro-inflammatory response in human macrophages. *J Endotoxin Res* 2007;13:219-26.
- 41) Chung J, Lee HS, Chung HY, Yoon TR, Kim HK. Salicylideneamino-2-thiophenol inhibits inflammatory mediator genes (RANTES, MCP-1, IL-8 and HIF-1 $\alpha$ ) expression induced by tert-butyl hydroperoxide via MAPK pathways in rat peritoneal macrophages. *Biotechnol Lett* 2008;30:1553-8.
- 42) Sen U, Tyagi N, Patibandla PK, Dean WL, Tyagi SC, Roberts AM, Lominadze D. Fibrinogen-induced endothelin-1 production from endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009;296:C840-7.
- 43) Natarajan R, Rosdahl J, Gonzales N, Bai W. Regulation of 12-lipoxygenase by cytokines in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1997;30:873-9.
- 44) Preston IR, Hill NS, Warburton RR, Fanburg BL. Role of 12-lipoxygenase in hypoxia-induced rat pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;290:L367-74.
- 45) Sasaki M, Hori MT, Hino T, Golub MS, Tuck ML. Elevated 12-lipoxygenase activity in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Hypertens* 1997;10:371-8.
- 46) Oyekan A, Balazy M, McGiff JC. Renal oxygenases: differential contribution to vasoconstriction induced by ET-1 and ANG II. *Am J Physiol* 1997;273:R293-300.
- 47) Newaz MA, Oyekan AO. Contribution of renal oxygenases to glycerol-induced acute renal failure in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002;39:834-41.
-