

일차 배양 혈관 평활근 세포에서 포도당 농도에 의한 엔도톡신 유도 프로스타글란딘 합성 변화

이수환* · 우현구 · 김지영 · 백은주 · 문창현

아주대학교 의과대학 생리학교실

(Received November 10, 1997)

Enhancement of Endotoxin-induced Prostaglandin Synthesis by Elevation of Glucose Concentration in Primary Cultured Rat Vascular Smooth Muscle Cells

Soo Hwan Lee*, Hyun Goo Woo, Ji Young Kim,
Eun Joo Baik and Chang-Hyun Moon

Department of Physiology, School of Medicine, Ajou University, Suwon 442-749, Korea

Abstract—This study was designed to characterize glucose-enhancing effects on endotoxin-induced prostaglandin production in primary cultured rat vascular smooth muscle cells (VSMC). High glucose treatment significantly augmented prostaglandin (PG) synthesis in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated VSMC and this effect was maximal at the concentration of 4 mg/ml. It has been reported that increases in glucose metabolism through sorbitol pathway could alter the cytosolic NADH/NAD⁺ ratio and this change favors de novo synthesis of diacylglycerol (DAG) and, in turn, results in the activation of protein kinase C (PKC) in vascular tissues. Protein kinase C (PKC) inhibitors, staurosporin and H7, blocked the glucose enhancing effect, and DAG, a PKC activator, significantly increased the PG production stimulated by LPS. Sodium pyruvate, which can reverse the alteration in cytosolic NADH/NAD⁺ ratio, reduced the high glucose effect on PG production. And also, zopolrestat, a strong aldose reductase inhibitor, almost completely blocked the augmentation effect of glucose on PG synthesis. Arachidonic acid release was significantly increased in high glucose treated group, which implied the increase in PLA₂ activity was associated with glucose enhancing effect. Metabolic labeling study clearly showed that de novo synthesis of prostaglandin H synthase-2 (PGHS-2) is greatly increased in high glucose treated group and this was mitigated by the treatment of zopolrestat. Taken together, the activation of PKC through sorbitol pathway increased the activities of PLA₂ and PGHS which resulted in the augmentation in LPS-induced PG production in high glucose treated VSMC.

Keywords □ High glucose, Vascular smooth muscle cells, Endotoxin, Prostaglandin.

Eicosanoid란 prostaglandin, thromboxane, 15-hydroxyeicosatetraenoic acid(HETEs)등과 같은 arachidonic acid 대사산물을 통칭하는 말로써, 이들 eicosanoid 류들은 염증 반응, 면역조절 반응 및 세포 분화, 증식등과 같은 다양한 생체 반응에 관여하고 있는 것으로 알려져 있다.¹⁻⁴⁾ Eicosanoid의 생성은 phos-

pholipase에 의해 세포막 인지질로부터 arachidonic acid가 유리됨으로써 시작되는데, 이 단계가 eicosanoid, 특히 prostaglandin의 생성에 있어 가장 중요한 조절 단계인 것으로 인식되어져 왔다.^{5,6)} 유리된 arachidonic acid는 prostaglandin G/H synthase (PGHS)에 의해 PGH₂로 변환되며 이 대사체는 thromboxane을 비롯한 모든 prostanoid의 전구물질로 작용하게 된다. 이 PGHS에는 두가지 isoform이 존재하는 것으로 알려져 있으며, 이 중 최근 Simmons등

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

(전화) 0331-219-5043 (팩스) 0331-219-5049

에 의해 발견된 inducible PGHS (PGHS-2)는 기존의 isoform (PGHS-1)과는 다른 조절기전을 통해 발현되고 있으며,^{7,8)} 각종 질병의 발현에 있어서 중요한 역할을 할 것으로 추정되고 있다.^{3,4)} 이 isozyme은 여러 세포내,외의 자극에 의해 발현이 증가되는 것으로 알려져 있는데,⁹⁻¹³⁾ 특히 다양한 세포들에서 mitogenic stimulation의 결과로 나타나는 prostaglandin 합성 증가와 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되는 등,¹⁴⁻²¹⁾ 지금까지의 연구 결과에 의하면 PGHS가 관여하는 단계는 이전에 추론되었던 것과는 달리 prostaglandin 합성에 있어 가장 중요한 조절 단계일 것으로 추정되고 있다. 따라서 최근에는 PGHS-1 및 PGHS-2의 생리학적 기능 및 발현 조절 기전에 대한 연구가 매우 활발히 진행되고 있다.¹⁻⁴⁾

연구자들은 PGHS isozyme들의 생체내 역할에 대한 일련의 연구를 수행하여 오고 있으며, 이러한 연구의 일환으로 일차 배양 혈관 평활근 세포에 bacterial lipopolysaccharide(LPS)를 처리한 후 prostaglandin 합성능 변화를 측정된 결과, 시간 경과에 따라 prostacyclin의 합성이 현저히 증가되며, 이는 PGHS-2의 선택적 발현 증가에 기인함을 확인한 바 있다.²²⁻²⁴⁾ 또한 동일한 실험 조건하에서 행한 예비 실험 결과, 세포 배양액의 포도당 농도를 증가 시키면, endotoxin에 의한 prostaglandin 합성이 현저히 증가됨을 관찰할 수 있었다. 이와같은 사실은 prostacyclin의 강력한 혈관 확장 작용을 감안할 때 매우 중요한 의미를 내포하고 있는 것으로, 당뇨병 상태에서의 endotoxin에 의한 septic shock 발현증가는 prostacyclin의 생성 증가와 밀접한 관련성이 있을 것으로 추정된다.²⁵⁻²⁷⁾ 이와 관련하여, 배양액중의 포도당 농도를 증가시키는 경우 신장 내피세포나 사구체 세포등에서 PKC가 활성화되며 이는 당뇨병의 혈관 합병증의 한 원인이 될 수 있다는 보고는,^{28,29)} PGHS isozyme의 발현이 PKC stimulator인 phorbol ester에 의하여 증가된다는 연구 결과와^{16,17)} 더불어, 앞서의 추정에 시사하는 바 크다 할 수 있다. 본 연구에서는 이러한 추론을 확인하기 위한 연구의 일환으로, 포도당 농도를 달리한 배양조건하에서 일차 배양 혈관 평활근 세포에서 prostaglandin 합성에 미치는 endotoxin의 영향을 검토하고, 그 작용 기전의 일단을 검토 하였으며, prostaglandin 합성 경로에 관여하는 효소계에 미치는 영향들을 살펴 보고자 하였다.

실험방법

시약 - Bacterial lipopolysaccharide(*E. coli* 0111:B4), aspirin, arachidonic acid, 6-keto-PGF_{1 α} 등은 Sigma Chemical Co.에서, Dulbecco's Modified MEM, fetal calf serum등은 GIBCO사에서, [³H]-6-keto-PGF_{1 α} , [³H]-arachidonic acid는 New England Nuclear(NEN)에서, TRAN³⁵S-LABELTM은 ICN사에서 구입하였고, zopolrestat은 Pfizer 사에서 공급 받았으며, 기타의 시약은 1급 이상의 것을 사용하였다.

혈관 평활근 세포의 분리 및 배양 - Sprague-Dawley계(180~100 g) 웅성 랫드를 실험 치사 시킨후 흉강을 열어 thoracic aorta를 무균적으로 적출하여 Ham's F12 배지(GIBCO, Grand Island, NY, USA)에 넣어 이후의 분리 배양에 이용하였다. 혈관 평활근 세포의 분리 및 배양은 Thyberg등의 방법에³⁰⁾ 준하여 행하였다. 무균적 조건 하에서 connective tissue와 세동맥들을 제거한 후, aorta를 길이 방향으로 자른 다음, 0.1% collagenase가 함유된 Ham's 12배지에서 1시간 동안 전배양 하였다. Aorta의 inner lining을 rubber policeman으로 긁어 제거한 뒤, medial layer를 1 mm²의 크기로 잘게 세절하고 다시 0.1% collagenase를 overnight 처리하였다. 분리된 세포를 3,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 10% fetal calf serum이 함유된 Dulbecco's modified essential medium(DMEM, GIBCO)에 resuspend하여 5% CO₂/95% air, 37°C 조건에서 배양하였다. 배지는 일주일에 2번씩 교체하였으며 본 실험에서는 2회 -3회 계대한 세포를 이용하였다. 실험 개시전 48시간 동안의 serum deprivation을 통해 growth arrest시킨 조건하에서 세포 배양액에 2, 4, 6, 8 mg/ml의 glucose가 포함되도록한 후, 10 µg/ml의 LPS를 가하여 prostacyclin(PGI₂)의 생성에 미치는 영향을 검토하였다.

6-keto-PGF_{1 α} 생성능과 PGHS 활성의 측정 - 배양세포에 10% fetal calf serum(FCS, GIBCO BRL, USA)이 포함된 DMEM 배지를 가하고 bacterial lipopolysaccharide(LPS, *E. coli*, 0111:B4, 10 µg/ml, Sigma, USA)와 함께 37°C에서 배양하였다. 일정 시간 동안 배양한 후 배지를 전량 취하여 -20°C에 보관하였다가, 생성된 6-keto-PGF_{1 α} 의 양을 radioimmunoassay(RIA)로 측정하였다. PGHS의 활성은 Fu등⁹⁾

에 의한 실험 방법에 준하여 측정하였다. 즉, 6-keto-PGF_{1α} 생성능을 측정하기 위해 배지를 제거한 세포에, 과량의 arachidonic acid(10 μg/ml, Sigma, USA)가 함유된 PBS를 가하여 10분간 배양한 후, 배지를 취하여 생성된 6-keto-PGF_{1α}의 양을 정량함으로써 PGHS 활성의 지표로 하였다.

6-keto-PGF_{1α}의 정량 - 6-keto-PGF_{1α}의 정량은 전보²⁴⁾에 기술한 radioimmunoassay방법에 따라 실시하였으며 6-keto-PGF_{1α} 항체는 루이지애나 주립대학의 황 동호 박사로부터 공급 받아 사용하였다.

Arachidonic acid release - 24 well tissue culture plate(Nunc, USA)에 배양한 혈관 평활근 세포에 [³H]-arachidonic acid(0.25 μCi/well)를 가지고 20시간 동안 배양한 다음, 수회 세척하였다. 포도당 농도를 달리한 조건하에서 일정시간 동안 배양한 후, 배지를 취하여 radioactivity를 측정하였다.

Metabolic labeling - 혈관 평활근 세포를 6 well tissue culture plate(Falcon, USA)에 confluent하도록 배양한 다음 48시간 동안 serum starvation을 행한 후, 포도당 농도를 달리한 DMEM 배지에서 일정시간 동안 배양하였다. Methionine-free DMEM(GIBCO BRL, USA)으로 배지를 교환하고 여기에 [³⁵S]-methionine(50 μCi/ml, ICN, USA)를 가한 후 37°C에서 2시간 더 배양하였다. Solubilization buffer(50 mM Tris, pH 7.4, 1% Tween 20)를 가지고 초음파 분쇄기로 세포를 solubilize한 다음 10,000 rpm, 4°C에서 5분간 원심분리 한 후 얻은 상층액에 PGHS-2 항체를 가해 immunoprecipitation을 행하였다. Radio-label된 PGHS-2의 양을 SDS polyacrylamide gel electrophoresis를 거쳐 fluorography에 의해 비교하였다.

통계 - 모든 data는 mean±SE로 나타내었으며, student's-t-test에 의해 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서는 포도당 농도를 달리한 배양조건하에서 세균 감염시 병리학적 제 증상을 발현하는 원인 물질인 bacterial lipopolysaccharide(LPS)이 prostaglandin 합성에 미치는 영향을 일차 배양 혈관 평활근 세포에서 검토함으로써, 당뇨병에서의 septic shock 증상 발현 증가 현상과의 상관성을 살펴 보고자 하였으며, 그

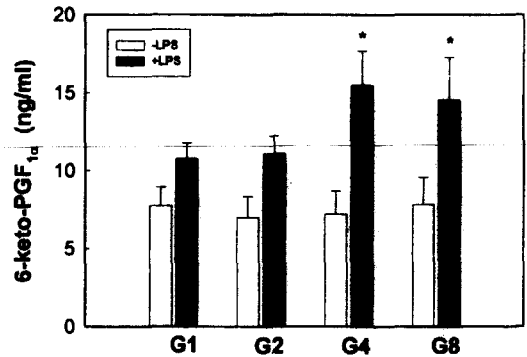


Fig. 1— Effects of glucose on endotoxin-induced prostaglandin production in primary cultured rat vascular smooth muscle cells.

Cells were preincubated in the absence of serum for 48 hours and further incubated with or without lipopolysaccharide (LPS, 10 μg/ml) in 10% fetal bovine serum contained fresh media for 16 hours. Supernatants were collected and the contents of 6-keto-PGF₁ were quantified with radioimmunoassay. G1: 1 mg/ml glucose; G2: 2 mg/ml glucose; G4: 4 mg/ml glucose; G8: 8 mg/ml glucose. p<0.05 vs G1+LPS

작용 특성등에 관한 기초 연구를 수행하였다. 일차 배양 혈관 평활근 세포에 LPS를 처리한 경우 이전의 보고에서와 마찬가지로 prostaglandin 합성이 현저히 증가되었으며,^{22, 24)} 이러한 증가는 배양액내의 포도당 농도가 증가될수록 더욱 현저하여 포도당 농도 4 mg/ml의 경우 1 mg/ml인 경우에 비해 2배 이상의 prostaglandin이 합성됨을 관찰할 수 있었다. 포도당 농도를 4 mg/ml 이상 증가시킨 경우, 더 이상의 prostaglandin 합성 증가는 관찰되지 않았다(Fig. 1). 따라서 이후의 실험에서는 포도당을 1 mg/ml(G1) 및 4 mg/ml(G4)의 농도로 처리하여 수행하였다. Williams 등의 보고³¹⁾에 의하면, 고포도당 배지에서 배양한 혈관세포에서는 세포질내의 NADH/NAD⁺ 비율이 현저히 증가하며, 이는 세포내에서의 diacylglycerol의 생합성을 증가시키는 환경을 제공하게 되고, 이에 따라 protein kinase C(PKC)의 활성화가 초래된다고 알려져 있다. 따라서 다음 실험에서는 포도당 농도의 증가에 의한 LPS 유도 prostaglandin 합성 증폭 현상이 PKC의 활성화에 매개되는지의 여부를 확인하기 위하여 동일한 실험조건하에서 PKC 저해제인 staurosporin 및 H7을 처리하여 보았다(Fig. 2). PKC 저해제는 고농도 포도당 처리군에서의 prostaglandin 증

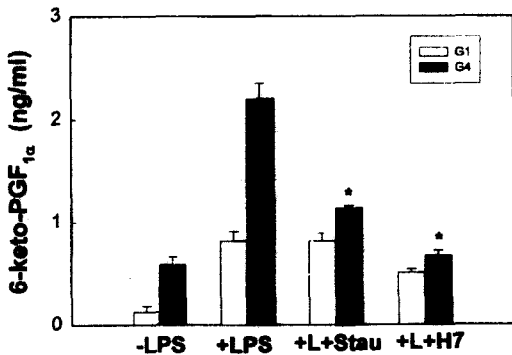


Fig. 2—Effects of PKC inhibitors on endotoxin-induced prostaglandin production in primary cultured rat vascular smooth muscle cells

Cells were preincubated in the absence of serum for 48 hours and further incubated with or without lipopolysaccharide (LPS, 10 μ g/ml) in 10% fetal bovine serum contained fresh media for 16 hours. PKC inhibitors, staurosporine (Stau : 100 ng/ml) and H7 (50 μ M) were added with LPS. Supernatants were collected and the contents of 6-keto-PGF_{1 α} were quantified with radioimmunoassay. $p < 0.01$ vs G4+LPS

폭 현상을 현저히 억제함을 관찰할 수 있었다. 그러나, 저농도 포도당 처리군에서의 LPS 작용에는 별다른 영향이 없거나(staurosporin 처리군), 상대적으로 작은 정도의 억제현상만이(H7 처리군) 관찰 되었다. 이러한 PKC의 영향이 전술한 바와 같은 경로를 통한 것인지의 여부를 확인하기 위해, 동일한 실험 조건하에서 diacylglycerol을 처리한 결과, 저농도 포도당 처리군에서의 prostaglandin 합성은 유의적인 증가를 보였으나, 고농도 포도당 처리군에서는 통계적으로 유의한 변화를 보이지 않았다(Fig. 3). 이는 Fig. 1에서 보인 바와 같이 G4이상의 포도당 농도에서는 더 이상의 6-keto-PGF_{1 α} 생성 증가가 관찰되지 않는 현상과 일치하고 있다. 세포질내에 증가된 NADH/NAD⁺ 비율은 세포질내 pyruvate의 농도와 역상관계가 있는 것으로 보고된 바 있으며,³²⁾ 이는 pyruvate의 lactate로의 대사과정에서 NADH가 NAD⁺로 산화됨에 기인하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 이번에는 배양액중의 pyruvate 농도를 변화 시켰을 경우의 prostaglandin 합성에 미치는 영향을 검토하였다. Fig. 3에 요약한 바와 같이, sodium pyruvate 처리에 의해 고농도 포도당에 의한 prostaglandin 합성 증폭 현상이 유의적으로 억제됨을 관찰할 수 있었다. 전술한 바와 같은 세포질내에

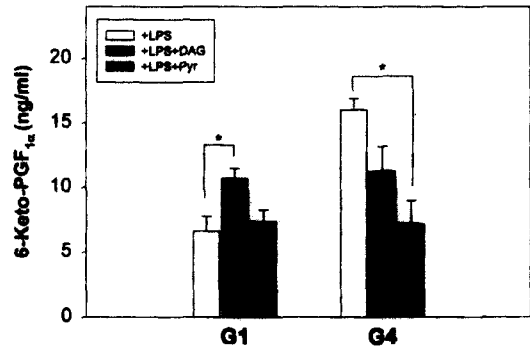


Fig. 3—Effects of diacylglycerol (DAG) and pyruvate on endotoxin-induced prostaglandin production in primary cultured rat vascular smooth muscle cells

Cells were preincubated in the absence of serum for 48 hours and further incubated with or without lipopolysaccharide (LPS, 10 μ g/ml) in 10% fetal bovine serum contained fresh media for 16 hours. Diacylglycerol (DAG, 10 μ M) and sodium pyruvate (Pyr, 11 mM) were added with LPS. Supernatants were collected and the contents of 6-keto-PGF_{1 α} were quantified with radioimmunoassay. $p < 0.05$

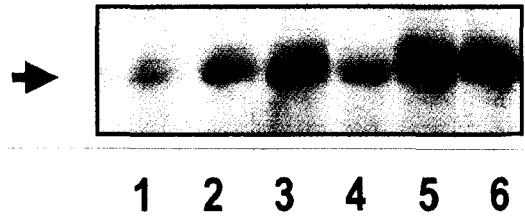
서의 NADH/NAD⁺ 비율 변화는 과잉의 포도당이 sorbitol pathway를 통해 대사됨에 기인하는 것으로 알려져 있다. Aldose reductase 저해제는 실험적 당뇨 모델에서 변형된 혈관 반응성을 개선시키는 것으로 보고된 바 있으며, 이는 sorbitol pathway 저해를 통한 PKC 활성화 억제 작용에 기인한 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 aldose reductase 저해제인 zopolrestat을 처리함으로써 sorbitol pathway를 차단한 후 prostaglandin 합성에 미치는 영향을 검토하였으며 그 결과, 고포도당 처리군에서의 증폭작용이 현저히 억제됨을 관찰할 수 있었다(G1+LPS : 0.45 ± 0.10 ng/ml; G4+LPS : 1.45 ± 0.047 ng/ml; G4+LPS+zopolrestat : 0.54 ± 0.074 ng/ml). 이상의 실험 결과들로 부터 고포도당에 의한 prostaglandin 합성 증폭 현상은 sorbitol pathway를 통한 PKC의 활성화에 기인함을 확인할 수 있었다.

Prostaglandin은 다단계의 효소작용을 거쳐 생합성되며, 이중, 세포막 인지질로부터의 arachidonic acid 유리에 관여하는 phospholipase A₂ 단계와 유리된 arachidonic acid를 PGH₂로 대사시키는 prostaglandin H synthase의 단계가 전체 반응 속도를 규율하고 있는 것으로 알려져 있다.^{1,2)} 따라서, 다음 실험에서는

Table I—Effects of glucose on arachidonic acid release from rat vascular smooth muscle cells

Treatment		Radioactivity released (%)
G1 control	-IM	2.58±0.16
	+IM	2.85±0.08
G4 control	-IM	3.41±0.30
	+IM	3.81±0.42
G1+LPS	-IM	12.11±0.84
	+IM	12.87±0.16
G4+LPS	-IM	14.39±0.33 ^a
	+IM	16.07±0.72 ^a

고포도당 처리에 의한 prostaglandin 합성 증폭 현상이 이 두가지 주요 조절 단계에 미치는 영향을 검토하여 보았다. Cornwell등³³⁾에 의하면 일차 배양 혈관 평활근 세포에 LPS를 처리한 경우 arachidonic acid release가 현저히 증가되는 것으로 알려져 있으며, 이는 본 실험 결과에서도 재확인 되고 있었다(Table I). LPS 자극에 의한 arachidonic acid release는 고포도당 처리에 의해 유의적인 증가를 보였으며, 또한 이러한 현상은 유의적이지는 않았지만, LPS를 처리하지 않은 군에서도 비슷한 양상을 보였다. 그러나 이전의 보고와는 달리, indomethacin 처리에 의한 arachidonic acid release 차단 작용은 본 실험에서는 관찰되지 않았다. LPS에 의한 arachidonic acid release 증가는 혈관 평활근 세포에서의 secretory PLA₂ 활성 증가에 기인하는 것으로 보고 되고 있으나, 본 실험 결과만으로는 고포도당에 의한 arachidonic acid release 증가현상이 sec 즉, Secretory retory PLA₂ 활성 증가와 관계 있을 것으로 추정할 수는 없었다. 즉, 전술한 바와 같이, 고포도당에 의한 prostaglandin 생성 증폭 현상이 sorbitol pathway를 통한 PKC의 활성화에 기인한다면, 이로 인한 cytosolic PLA₂의 활성화 역시 관여될 가능성을 배제할 수 없기 때문에,³⁴⁾ 이러한 문제점들에 대해서는 추후 진전된 연구를 통해 확인되어야 할 것이다. LPS에 의하여 유도되는 PGHS-2의 생합성에 미치는 포도당의 영향을 검토한 결과는 Fig. 4에 나타난 바와 같으며 band의 상대적 강도는 G1+LPS : 100, G4+LPS : 178 및 G4+LPS+Zopolrestat : 136 이었다. 일반적으로 PGHS-2는 mitogenic stimuli에 의해 발현이 증가되는 것으로 알려져 있으며,^{4, 35)} 본 실험 결과에서도 이를 재확인 할 수 있었다. 즉, fetal calf serum에 의해 유도되는 PGHS-2의 생합성은 LPS 처리에 의해 현저히 증폭되고 있으며, 이는 고포도당 처리군에서 더욱 현저하

**Fig. 4**—Effects of glucose and zopolrestat on endotoxin-induced de novo synthesis of prostaglandin H₂ synthase 2 in primary cultured rat vascular smooth muscle cells.

Cells were preincubated in the absence of serum for 48 hours and further incubated with or without lipopolysaccharide (LPS, 10 µg/ml) in 10% fetal bovine serum contained fresh media for 12 hours. Medium was changed with methionine free DMEM and further incubated in the presence of [³⁵S]-methionine for 4 hours. Zopolrestat (50 µM) was added at the beginning of second incubation. Cell lysates were immunoprecipitated with specific PGHS-2 antibody and committed to electrophoresis. Fluorographic images were developed on Kodak X-O-Mat film. Lane 1 : G1 control, Lane 2 : G1 LPS treated, Lane 3 : G1 LPS and zopolrestat treated, Lane 4 : G4 control, Lane 5 : G4 LPS treated, Lane 6 : G4 LPS and zopolrestat treated.

였다. 이 때, aldose reductase inhibitor인 zopolrestat을 처리한 경우 고포도당 처리군에서 더욱 증폭되었던 PGHS-2의 생합성은 감소됨을 관찰할 수 있었으며, 이러한 결과는 PGHS 활성을 측정된 결과와도 일치하였다(G1+LPS : 98±54; G4+LPS : 390±140; G4+LPS+zopolrestat : 170±74; 단위 : pg/ml/10 min). 그러나 저포도당 처리군에서는 aldose reductase 저해제 처리에 의해 오히려 PGHS-2 생합성이 증가되는 양상을 보였으며, 이는 PGHS 활성 측정 결과와는 일치하지 않았다(34±18 pg/ml/10 min). 이러한 불일치에 대해서는 time course study등을 비롯한 보다 정밀한 실험을 통하여 그 이유를 추적할 예정이다. 이상의 결과로 부터 고포도당에 의한 prostaglandin 합성 증폭작용은 PKC 활성화에 따른 PLA₂의 활성 증가 및 PGHS-2의 생합성 증가에 기인하는 것으로 추정할 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 1996년도 한국학술진흥재단의 공모과제

연구비(04-F-0079)에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

문헌

- 1) Shimizu, T. and Wolfe, L. S. : Arachidonic acid cascade and signal transduction. *J. Neurochemistry*, **55**, 1 (1990).
- 2) Smith, W. L. : Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. *Am. J. Physiol.* **263**, F181 (1992).
- 3) Williams, C. S. and DuBois, R. N. : Prostaglandin endoperoxide synthase: Why two isoforms? *Am. J. Physiology*, **270**, G393 (1996).
- 4) Herschman, H. R. : Prostaglandin synthase 2. *Biochim. Biophys. Acta*, **1299**, 125 (1996).
- 5) Smith, W. L. : Prostaglandin biosynthesis and its compartmentation in vascular smooth muscle and endothelial cells *Ann. Rev. Physiol.* **48**, 251 (1986).
- 6) Needleman, P., Turk, J., Jakschi, B. A., Morrison, A. R. and Lefkowitz, J. B. : Arachidonic acid metabolism. *Ann. Rev. Biochem.* **55**, 69 (1986).
- 7) Simmons, D. L., Levy, D. B., Yannoni, Y. and Erikson, R. L. : Identification of a phorbol ester-responsive v-src-inducible gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 1178 (1989).
- 8) Xie, W., Chipman, J. G., Robertson, D. L., Erikson, R. L. and Simmons, D. L. : Expression of a mitogen responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 2692 (1991).
- 9) Fu, J. Y., Masferrer, J.F., Seibert, K., Raz, A. and Needleman, P., The induction and suppression of prostaglandin H₂ synthase (cyclooxygenase) in human monocytes *J. Biol. Chem.* **265**, 16737 (1990).
- 10) Riese, J., Hoff, T., Nordhoff, A., DeWitt, D. L., Resch, K. and Kaever V. : Transient expression of prostaglandin endoperoxide synthase-2 during mouse macrophage activation. *J. Leukocyte Biol.* **55**, 476 (1994).
- 11) Sirois, J. : Induction of prostaglandin endoperoxide synthase-2 by human chorionic gonadotropin in bovine preovulatory follicles *in vivo*. *Endocrinology* **135**, 841 (1994).
- 12) Rester, M., Coroneos, E., Thomas P. J. and Dunn, M. J. : Endothelin stimulates prostaglandin endoperoxide synthase-2 mRNA expression and protein synthesis through a tyrosine kinase signaling pathway in rat mesangial cell. *J. Biol. Chem.* **269**, 22574 (1994).
- 13) Bazan, N. G., Fletcher, B. S., Herschman, H. R. and Mukherjee, P. K. Platelet activating factor and retinoic acid synergistically activate the inducible prostaglandin synthase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 5252 (1994).
- 14) Lee, S. H., Soyoola, E., Channugam, P., Hart, S., Sun, W., Zhong, H., Liou, S., Simmons, D. and Hwang, D., Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide *J. Biol. Chem.* **267**, 25934 (1992).
- 15) Jones, D. A., Carlton, D. P., McIntyre, T. M., Zimmerman, G. A. and Prescott, S. M. : Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines. *J. Biol. Chem.* **268**, 9049 (1993).
- 16) Kujubu, D. A. and Herschman, H. R., Dexamethasone inhibits mitogen induction of the TIS10 prostaglandin synthase/cyclooxygenase gene. *J. Biol. Chem.* **267**, 7991 (1992).
- 17) Hamasaki, Y., Kitzler, J., Hardman, R., Nettesheim, P. and Eling, T. E. : Phorbol ester and epidermal growth factor enhance the expression of two inducible prostaglandin H synthase genes in rat tracheal epithelial cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **304**, 226 (1993).
- 18) O'Sullivan, M. G., Chilton, F. H., Huggins, E. M. and McCall, C. E. : Lipopolysaccharide priming of alveolar macrophages for enhanced synthesis of prostanoids involves induction of a novel prostaglandin H synthase. *J. Biol. Chem.* **267**, 14547 (1992).
- 19) DuBois, R. N., Awad, J., Morrow, J., Roberts, L. J. and Bishop, P. R. : Regulation of eicosanoid production and mitogenesis in rat intestinal epithelial cells by transforming growth factor- α and

- phorbol ester. *J. Clin. Invest.* **93**, 493 (1994).
- 20) DeWitt, D. L. and Meade, E. A. : Serum and glucocorticoid regulation of gene transcription and expression of prostaglandin H synthase-1 and prostaglandin H synthase-2 isozymes. *Arch. Biochem. Biophys.* **306**, 94 (1993).
 - 21) Coyne, D. W., Nickols, M., Bertrand, W. and Morrison, A. R. : Regulation of mesangial cell cyclooxygenase synthesis by cytokines and glucocorticoids. *Am. J. Physiol.* **263**, F97 (1992).
 - 22) Lee, S. H., Hart, S., Qiao D., Chanmugam P., Soyoola E., Liou S., Kanemaru, Y. : and Hwang, D. Expression of cyclooxygenase (COX) in smooth muscle cells (SMCs). *FASEB J.* **7** suppl 1, A661 (1993).
 - 23) Feng, L., Sun, W., Xia, Y., Tang, W. W., Chanmugam, P., Soyoola, E., Wilson E. B. and Hwang, D. Cloning of two isoforms of rat cyclooxygenase: differential regulation of their expression. *Arch. Biochem. Biophys.* **307**, 361 (1993).
 - 24) Lee, S. H. Effects of bacterial lipopolysaccharide on prostaglandin production in primary cultured rat vascular smooth muscle cells. *Kor. J. Food Hyg. Safety* **11**, 227 (1996).
 - 25) Lang, C. H., Dobrescu, C., Bagy G. J. and Spitzer J. J. : Altered glucose kinetics in diabetic rats during gram negative infection. *Am. J. Physiol.* **253**, E123 (1987).
 - 26) Raetz, C. R. H. Biochemistry of endotoxins. *Ann. Rev. Biochem.* **59**, 129 (1990).
 - 27) Morrison, D. C. and Ryan, J. L. : Endotoxins and disease mechanisms. *Ann. Rev. Med.* **38**, 417 (1987).
 - 28) Lee, T. A., Saltsman K. A., Ohashi H. and King G. L. : Activation of protein kinase C by elevation of glucose concentration : proposal for a mechanism in the development of diabetic vascular complications *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 5141 (1989).
 - 29) Craven, P. A. and DeRubertis, F. R. : Protein kinase C is activated in glomeruli from streptozotocin diabetic rats-possible mediation by glucose. *J. Clin. Invest.* **83**, 1667 (1989).
 - 30) Thyberg, J., Hedin, U., Sjolund, M., Palmberg, L. and Bottger, B. A. : Regulation of differential properties and proliferation of arterial smooth muscle cells. *Arteriosclerosis* **9**, 413 (1990).
 - 31) Williams, B. and Schrier, R. W. Characterization of glucose-induced insitu protein kinase C activity in cultured vascular smooth muscle cells *Diabetes* **41**, 1464 (1992).
 - 32) Williamson, J. R., Chang, K., Frangos, M., Hasan, K., Ido, Y., Kawamura, T., Nyengaard, J. R., Enden, M. V. D., Kilo, C. and Tilton, R. G. : Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications *Diabetes* **42**, 801 (1993).
 - 33) Okuda, Y., Kawashima, K., Suzuki, S., Asakura, Y., Asano, M., Tsurumaru, K., Dai, H., Tachi, Y., Bannai, C., Saitoh, M. and Yamashita K. : Restoration of nitric oxide production by aldose reductase inhibitor in human endothelial cells cultured in high glucose medium *Life Sci.* **60**, 53 (1997).
 - 34) Zahng, H., Kaseki, H., Davis, W. B., Whisler, R. L. and Cornwell, D. G. : Mechanisms for the stimulation of prostanoid synthesis by cyclosporine and bacterial lipopolysaccharide *Transplantation* **47**, 864 (1989).
 - 35) Nakano, T., Ohara, O., Teraoka, H. and Arita, H. Group II phospholipase A2 mRNA synthesis is stimulated by two distinct mechanisms in rat vascular smooth muscle cells *FEBS-Lett.* **261**, 171 (1990).
 - 36) Flynn, J. T. and Hoff, H. Lipopolysaccharide induces time-dependent increases in prostaglandin H synthase-2 and cytosolic phospholipase A₂ mRNA in cultured human microvessel-derived endothelial cells *Shock* **4**, 433 (1995).
 - 37) Pritchard, K., O'Banion M. K., Miano, J. M., Vlastic, N., Bhatia, U. G., Young, D. and Stemberman, M. B. Induction of cyclooxygenase-2 in rat vascular smooth muscle cells *in vitro* and *in vivo* *J. Biol. Chem.* **269**, 8504 (1994).