
マイクロセンサーを用いた気道上皮細胞からの
一酸化窒素産生とその制御機構

(課題番号 07670680)

平成8年度科学研究費補助金 (基盤研究 C)
研究結果報告書



平成9年3月

研究代表者 近藤光子
(東京女子医科大学医学部 助手)

マイクロセンサーを用いた気道上皮細胞からの一酸化窒素産生とその制御機構

(課題番号 07670680)

平成8年度科学研究費補助金（基盤研究 C）研究結果報告書

平成9年3月

研究代表者 近藤光子
(東京女子医科大学医学部 助手)

はしがき

一酸化窒素 (NO) はL-arginineを基質としてNO合成酵素 (NOS) により産生され、気道系においては血管平滑筋や気道平滑筋のトーンズの調節、宿主防御機構、神経伝達などに重要な役割を果たしている。最近、isoproterenolやbradykininによる気道上皮線毛周波数の亢進がNOを介していることが報告され、気道上皮細胞機能にNOが深く関わっていることが示唆された。さらにNADPH diaphorase活性による組織化学や免疫組織学により気道上皮細胞において高度にNOSが存在していることが報告された。このことは気道上皮細胞がNOを産生し得ることを示しているが、これまではNOS阻害剤などを用いた薬理的な実験結果によるものであり、直接的に気道上皮細胞からのNOの遊離を測定した報告はなされていない。NO濃度の測定は従来、化学発光や電子スピン共鳴などにより行われていたが、最近、ポーラログラフィー法が考案され、高感度でかつリアルタイムの測定が可能となった(Malinski et al, Nature358:676-678, 1992)。

そこで本研究ではポーラログラフィー法を原理とするマイクロセンサーから検出される気道上皮細胞からのNOの産生とその制御機構を明らかにする。また我々が開発した高分化誘導培養法であるAir interface培養気道上皮細胞を用いて、気道の水分分泌に重要な役割を果たしているClイオントランスポートにおけるNOの役割や、気道上皮細胞内カルシウム動態に対するNOの影響についても報告する。

研究組織

研究代表者：近藤光子（東京女子医科大学医学部助手）

研究費

平成7年度	1200千円
平成8年度	600千円
計	1800千円

研究発表

(1) 学会誌

1. M.Kondo, J. Tamaoki, A. Sakai, et al. Increased oxidative metabolism in cow tracheal epithelial cells cultured at air-liquid interface. *Am J. Respir. Cell Mol. Biol.* 16: 62-68, 1997
2. J. Tamaoki, M. Kondo, H. Takemura, et al. Cyclic AMP-mediated release of nitric oxide from canine cultured tracheal epithelium. *Am J. Crit Care Med.* 152:1325-1330, 1995
3. A. Sakai, M. Kondo, J. Tamaoki et al. Nitric oxide modulation of calcium response in cow tracheal epithelium. *Eur. J. Pharm.* 291:375-379, 1995.
4. 近藤光子、玉置淳、磯野一雄 他 気道上皮細胞におけるIP3依存性カルシウム上昇に対するヘパリンの影響 日本胸部疾患学会雑誌35：発表予定, 1997.
5. Tamaoki J., Sakai A., Kondo M. et al. Role of nitric oxide in tacykinin-induced increase in potential difference of rabbit tracheal mucosa. *J. Physiol* 488: 115-122, 1995.

(2) 口頭発表

1. M. Kondo, J. Tamaoki, A. Chiyotani et al.. Regulatory role of nitric oxide in bradykinin- and isoproterenol- induced Cl secretion in cow tracheal epithelium. *Am J. Respir. Crit. Care Med.* 153:A507, 1996. ATS, 1996, May, New Orleans, U.S.A.
2. 近藤光子、玉置淳、気道上皮Cl輸送における一酸化窒素による制御
日本胸部疾患学会、1996年、4月、宇都宮
3. 近藤光子、玉置淳、竹村尚志、磯野一雄、金野公郎
気道上皮細胞Cl分泌におけるNOの調節機構
第16回気道分泌研究会、1996年、6月7日、函館
4. 近藤光子 ATPによる気道上皮細胞Clイオン輸送に対するNOの影響
第46回日本アレルギー学会総会、1996年10月31日、宇都宮
5. 近藤光子、玉置淳、千代谷厚、竹村尚志、金野公郎
The regulation of chloride secretion by nitric oxide in airway epithelium
第4回 Asthma Club in Sendai 1995年9月8-9日、仙台
6. 近藤光子、玉置淳、酒井篤、金野公郎

シンポジウム：気道上皮 エリスロマイシンが気道上皮細胞内カルシウム動態に与える影響 第2回マクロライド新作用研究会 1995年7月7日、東京

7. 近藤光子、玉置淳、金野公郎 Air interface培養気道上皮細胞における好気性代謝の検討 第35回日本胸部疾患学会総会、1995年5月1日、名古屋

8. 近藤光子、玉置淳、金野公郎 気道上皮の透過性 第35回日本胸部疾患学会総会イブニングシンポジウム、1995年5月1日、名古屋

9. M.Kondo, J. Tamaoki, K.Konno. Increased oxidative metabolism in airway epithelial cells cultured at air-liquid interface. American Thoracic Society, International Conference, 1995, May, Seattle, U. S. A.

10. 近藤光子、玉置淳、酒井篤、竹村尚志、千代谷厚、金野公郎、叶宗一郎 Bradykininの気道上皮細胞Clイオン輸送における一酸化窒素(NO)の役割とその作用機序 気道過敏性研究会、1996年3月、東京

11. 近藤光子 咳嗽の病態生理とニューロペプチド (招待講演)

気道粘液の過分泌と咳嗽 第4回ニューロペプチド研究会

日本小児アレルギー学会総会、平成8年11月28日、福岡

12. 近藤光子、叶宗一郎、玉置淳 気道上皮細胞内Ca²⁺動態に対するマクロライド剤の効果 第9回気道病態シンポジウム 平成9年1月17日、東京

気道上皮細胞 イオントランスポートとCa²⁺動態に対する
一酸化窒素の影響

東京女子医科大学第1内科
近藤光子

1、はじめに

一酸化窒素 (NO) はL-arginineを基質としてNO合成酵素 (NOS) により産生され、気道系においては宿主防御機構、血管平滑筋や気道平滑筋のトーンスの調節、神経伝達などに重要な役割を果たしている¹⁾。近年、呼気中にNOが検出され²⁾、気道上皮細胞に高度にNOSが発現されている^{3) 4)}ことから、気道上皮細胞はNOの主要な産生部位である⁵⁾と推測されている。気道上皮細胞は線毛運動、イオントランスポート、粘液分泌機能を介して粘液線毛輸送系に中心的な役割を果たしている。最近、bradykininやisoproterenolによる気道上皮線毛周波数の亢進がNOを介していること⁶⁾、さらにisoproterenolによるClイオントランスポートの調節にNOが関わっていること⁷⁾が報告された。bradykininおよびATPは気道上皮細胞に対して強力なClイオントランスポートを引き起こすメディエーターとして知られているが、isoproterenolがcyclic AMPをセカンドメッセンジャーとして作用するのに対し、bradykininおよびATPは細胞内Ca²⁺を介して作用する^{8) 9)}。本研究ではbradykininおよびATPに対する上皮細胞Clイオントランスポートの反応性とCa²⁺動態に与えるNOの役割をin vitro の系を用いて明らかにした。

2、方法

1) 気道上皮細胞の培養

牛気管粘膜を剥離し5mM dithiothreitolを含むphosphate-buffered saline (PBS)で4回洗浄し、さらにPBSで洗浄し0.05%プロテアーゼ (Sigma社、type XIV)で一晩消化した。翌日、FCSを添加して十分に振と

うさせ反応を停止し残存組織を除去後、遠心し上皮細胞のペレットを得た。これを5%牛胎児血清、ペニシリン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシンを添加したDulbecco's modified Eagle medium とHam's F12 mediumの1対1混合培地に浮遊させ、ヒト胎盤由来コラーゲン(20 μ g/cm²)をコーティングしたCostar Transwellのフィルター上にて培養した。その翌日に粘膜側の培地を除去し、漿膜側のみより栄養し培養を継続した (air interface法)¹⁰⁾。

細胞内Ca²⁺濃度の実験は、細胞数を5X10⁵ cells/cm²に調整し、ヒト胎盤由来コラーゲンをコーティングした円形カバーガラス上に撒き上記培地にて培養した。

2) 気道上皮イオントランスポートの測定

気道上皮細胞における能動イオン輸送を評価するためUssing chamber法によりその電気的特性の変化を測定した。すなわち、コンフルエンスになった気道上皮細胞をUssing chamberにマウントし、上皮細胞の管腔側と漿膜側を95% O₂-5% CO₂で吹送平衡させたKrebs-Henseleit溶液に浸漬させ、膜電位固定法を用いてbaselineの短絡電流(Isc)を測定した。すべて実験はNaイオンの吸収を除去するためNaチャンネルブロッカーであるamiloride(10⁻⁴ M)を前処置した。実験のプロトコールは以下のとおりとした。

1) 対照群ではbradykinin (10⁻⁶M)またはATP(10⁻⁴M)を粘膜側および漿膜側に同時に添加しIscの変化を調べた。2) 次に内因性NOのIscに与える影響を調べるために、NO合成阻害剤であるNG-nitro-L-arginine methylester (L-NAME)またはその異性体であるD-NAMEを粘膜側および漿膜側の両方に10分間前処置し、bradykininまたは

ATPを投与しIscの変化を調べた。3) L-NAMEとともにL-arginineまたは D-arginineを10分間前処置し、bradykinin または ATPを投与しIscの変化を調べ、L-arginineまたは D-arginineのL-NAMEに対するreverse 効果を検討した。

3) 細胞内Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i)の測定

培養細胞がコンフルエンスになった円形カバーグラスを取り出し、holderにカバーグラスを装着後、10mM HEPES緩衝Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, pH 7.4)で洗浄後、2μM fura-2 AM (acetoxymethyl ester)を含むHBSSの中で37° C、20分間、負荷した。再度HBSSで洗浄し、37° C、3ml HBSS入りの石英キュベットの中に入れ、蛍光分光光度計 (CAF110、日本分光、東京)で蛍光強度を連続測定した。340nm と380nmを交互に50Hzの頻度で励起し、500nmのフィルターを通して340nmと380nmの蛍光強度 (F340, F380)とその蛍光強度比 (R)をペンレコーダー上に連続記録した。またキュベットの中にはマグネットスターラーをいれ800rpmで回転させ瞬時に薬液が行き渡るようにした。蛍光強度比の最大値 (Rmax)と最小値 (Rmin)を10μM ionomycinおよび5mM EGTAの投与により求めGrynkiewicz¹¹⁾の計算式により[Ca²⁺]_iを算定した。実験のプロトコールはUssing chamberの実験と同様に1) 対照群ではbradykinin (10⁻⁶M)または ATP(10⁻⁴M)を添加し[Ca²⁺]_iの変化を調べた。2) 次にL-NAMEまたはD-NAMEを10分間前処置後、bradykininまたは ATPを添加し[Ca²⁺]_iの変化を調べた。3) L-NAMEと同時にL-arginineまたは D-arginineを10分間前処置し、bradykinin または ATPを添加し

[Ca²⁺]_iの変化を調べた。

4) 統計

実験成績の有意差検定はStudent's t-testを用い p<0.05を有意差ありとした。

3、結果

1) 気道上皮細胞イオントランスポートに対するNOの影響

bradykinin(10⁻⁶M)によるIscの増加反応は15秒をピークとするスパイク反応と2-3分で最大反応に達する反応の2相性を示した(ΔIsc: 26.5±5.3, 17.4±1.7μA/cm²)。前者の反応は細胞内Ca²⁺のキレート剤であるBAPTA-AM(10⁻⁶M)で抑制され、後者の反応はインドメサシン(10⁻⁶M)の前処置により抑制された(Fig.1)。次にこの2相性反応のいずれもNO合成阻害剤であるL-NAME(10⁻³M)の前処理により有意に抑制されたが(ΔIsc: 4.7±0.9μA/cm², 5.6±3.6μA/cm²; P<0.05)、D-NAMEでは抑制されなかった(29±4.1μA/cm², 16.6±1.6μA/cm²)。またL-arginine(3X10⁻³M)の同時投与でL-NAMEの抑制効果は減少したが(11.2±4.2μA/cm², 18.1±6.1μA/cm²)、D-arginineでは変化しなかった(6.3±2.5μA/cm², 8.9±2.4μA/cm²) (Fig.2, Fig.3)。ATP(10⁻⁴M)によるIscの増加反応はスパイク反応を示し(12.5±1.0μA/cm²)、bradykininと同様にL-NAMEの前処置により有意に抑制され(4.8±1.1μA/cm², P<0.005)、L-arginineの同時投与により反応が回復した(12.0±1.5μA/cm²)(Fig.4)。

2) 気道上皮細胞細胞内Ca²⁺濃度に対するNOの影響

fura-2法を用いた細胞内Ca²⁺濃度はbradykininおよびATPにより有意に増加した (ΔCa²⁺ : bradykinin 128±15nM, ATP 556±24nM)。L-NAME単独では細胞内Ca²⁺の有意な変化はもたらさなかったが、L-NAMEの10分間の前処置後、bradykininおよびATPの反応は有意に抑制された (bradykinin 19±55nM, P<0.01, ATP 28±4nM, P<0.01)(Fig.5)。さらにこの反応はL-arginine (3X10⁻⁴M)の同時投与によりL-NAMEによる抑制効果は消失したがD-NAMEは無効であった(Fig.6)。Sodium nitroprusside(10⁻⁴M)の前処置によりbradykinin(10⁻⁷M)またはATP(10⁻⁵M)の細胞内Ca²⁺の反応はさらに増強した (ΔCa²⁺ : bradykinin 107.5±22.7nM → 229.5±30.9nM, P<0.05, ATP 92.2±7.9nM → 152.0±31.6nM, P<0.05)。同様に dibutyryl cyclic GMP (3X10⁻⁴M)の前処置によりbradykinin(10⁻⁷M)またはATP(10⁻⁵M)の反応もさらに増強した (ΔCa²⁺ : bradykinin 107.5±22.7nM → 404±98.1nM, P<0.05, ATP 92.2±7.9nM → 263.0±50.4nM, P<0.05)(Fig.7)。

4. 考察

bradykininによるクロロイオン輸送はこれまでの研究から細胞内Ca²⁺に依存した反応とprostaglandinに依存した反応の2つの経路が知られている¹²⁾。私共の検討でもBAPTA-AMによりspike反応が抑制されたことから細胞内Ca²⁺に依存性であり、後半の反応はindomethacinの前処置で抑制されたことからprostaglandin依存性であることがわかった。Iscのspike反応は細胞内Ca²⁺濃度のspike反

応とtime-courseが一致しており、このこともIscのspike反応は細胞内Ca²⁺依存性であることを示唆するものである。Ca²⁺によるClイオントランスポートの亢進の機序はCa²⁺依存性のK channelの活性化が上皮細胞の過分極をもたらし、これがCl分泌の亢進を招くと考えられている⁸⁾。

次にbradykininによるIscの2相性反応はいずれもL-NAMEの前処置により抑制され、L-arginineの同時投与により回復したが、D-NAMEによる影響を受けなかった。このことはbradykininによるIscの2相性反応はいずれも内因性NOの制御を受けていることを示唆する。またATPもIscのspike反応を示し、L-NAMEの前処置により抑制された。よってATPもbradykininと同様にNOの制御を受けていると考えられる。

そこでさらにNOの作用機序を解明するため細胞内Ca²⁺を測定したところ、L-NAME単独では細胞内Ca²⁺に影響を与えなかったが、L-NAMEの前処置によりbradykininおよびATPの細胞内Ca²⁺の上昇は著明に抑制された。このことはbradykinin、ATPによってもたらされる細胞内Ca²⁺の上昇は内因性NOに依存していることを示す。したがってbradykininおよびATPによるIscのspike反応がL-NAME前処置により抑制されたのはセカンドメッセンジャーである細胞内Ca²⁺レベルがNOにより制御を受けていたためと解釈される。さらに外因性NOによる影響をsodium nitroprussideの存在下で検討したところ、L-NAME存在下とは逆にbradykininおよびATPの細胞内Ca²⁺上昇反応はさらに増強した。またNOによる制御がcyclic GMPを介しているかどうかを検討するためdibutyryl cyclic GMPの存在下でこれらの反応は検討したところ、同様に細胞内

Ca²⁺の反応は増強された。すなわちこのことはNOはcyclic GMPを介して細胞内Ca²⁺の反応を制御していることを示唆するものである。

気道上皮細胞にNO synthase (NOS)が存在することが免疫組織化学や遺伝子発現により証明されている^{3) 4)}。一般にNOSはconstitutive NOSとinducible NOSの2つのtypeに分類される¹⁾。以前の検討から今回の実験で用いた培養細胞はNADPH diaphorase染色で濃染されることが証明されている⁵⁾が、いずれのtypeのNOSが関与しているか不明である。NOと細胞内Ca²⁺との関係について、従来constitutive NOSはcalcium/ calmodulin依存性でその活性化にはcalciumの存在が必要であることはよく知られている¹⁾。しかし今回の私共の研究はNO自体が細胞内Ca²⁺の反応を制御していることを示している。NOが細胞内Ca²⁺に与える影響はまだよく検討されていないが、最近NOが心筋細胞¹³⁾や犬大腸のinterstitial cellsのCa²⁺電流を増強する¹⁴⁾といった報告やNOがラット交感神経のnoradrenalinにより誘発されたCa²⁺電流を調節¹⁵⁾しているといった報告が見受けられる。LeeはNOがcyclic GMPを介してcyclic ADPの上昇をもたらす細胞内Ca²⁺の上昇を招くという仮説¹⁶⁾を提唱している。またSchmidtらはNO、Ca²⁺、cyclic AMP、cyclic GMP、IP3、cyclic ADP riboseなどの細胞内セカンドメッセンジャーは相互に作用しpositiveまたはnegative feedbackを介して複雑に制御されているという仮説¹⁷⁾を提唱している。今回の私共の結果はNOの存在がagonistによる細胞内Ca²⁺の上昇を調節し、また上昇したCa²⁺はNOSの活性を高めさらにNOの産生亢進に導くpositive feedback機構の存在を示

唆するものかもしれない。

今回の研究から気道の水分調節に中心的役割を果たすイオントランスポートがNOによって制御されていることがあきらかとなった。最近、線毛運動⁶⁾や粘液分泌¹⁸⁾においてもNOによる制御が報告されており、気道の粘液線毛輸送系においてNOは重要な調節因子であると示唆される。また粘液線毛輸送系の低下を認めるKartagener症候群において呼気中のNO濃度が著明に低下していること¹⁹⁾が最近報告されたが、このこともNOと粘液線毛輸送系との関わりを推測させるものかもしれない。

References

- 1) Gaston, B., J.M. Drazen, J. Loscalzo and J.S. Stamler, 1994, The biology of nitrogen oxides in the airways, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 149: 538.
- 2) Kharitonov, S.A., Yates, D., Logan-Sinclair, R., Shinebourne, E. A., and P. .J. Barnes, 1994, Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients, *Lancet.* 343: 133.
- 3) Kobzik, L., D.S. Bredt, C.J. Lowenstein, J. Drazen, B. Gaston, D. Sugarmaker and J.S. Stamler, 1993, Nitric oxide synthase in human and rat lung: Immunocytochemical and histochemical localization, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 9: 371.
- 4) Asano, K., C.B.E. Chee, B. Gaston, C.M. Lilly, C. Gerard, J. M. Drazen, and J.S. Stamler, 1994. Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation, and activity in human lung epithelial cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 10089.
- 5) Tamaoki, J., Kondo, M., Takemura, H., Chiyotani, A., Yamawaki, I., and K. Konno, 1995, Cyclic adenosine monophosphate-mediated release of nitric oxide from canine cultured tracheal epithelium, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 152: 1325.
- 6) Jain, B., I. Rubinstein, A.R. Robbins, K.L. Leise and J.H. Sisson, 1993, Modulation of airway epithelial cell ciliary beat frequency by nitric oxide, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 191: 83.
- 7) Takemura, H., Tamaoki, J. Chiyotani, A., Kondo, M.

- and K. Konno, 1995, Insoproterenol increases Cl diffusion potential difference of rabbit trachea through nitric oxide generation, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 274: 584.
- 8) Clancy, J.P., J.D. McCann, M. Li and M.J. Welsh, 1990, Calcium-dependent regulation of airway epithelial chloride channels, *Am. J. Physiol.* 258: L25.
- 9) Mason, S.J., A.M. Paradiso, and R.C. Boucher, 1991, Regulation of transepithelial ion transport and intracellular calcium by extracellular adenosine triphosphate in normal and cyclic fibrosis airway epithelium. *Br. J. Pharmacol.* 103: 1649.
- 10) Kondo, M., Finkbeiner, W. E., and J. H. Widdicombe, 1993. Cultures of bovine tracheal epithelium with differentiated ultrastructure and ion transport, *In Vitro Cell Dev. Biol.* 29A: 19-24.
- 11) Grynkiewicz, G., M. Poenie and R.Y. Tsien, 1985, A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties, *J. Biol. Chem.* 260: 3440.
- 12) Smith, J., MacCann, J. D., and M. Welsh, 1990. Bradykinin stimulates airway epithelial Cl^- secretion via two second messenger pathways. *Am. J. Physiol.* 258: L369.
- 13) Mery, P., C. Parvoine, L. Belhassen, F. Pecker, and R. Fishmeister, 1993, Nitric Oxide regulates cardiac Ca^{2+} current, *J. Biol. Chem.* 268: 26286.
- 14) Publicover, N.G., E.M. Hammond and K.M. Sanders, 1993, Amplification of nitric oxide signaling by interstitial cells isolated from canine colon, *Proc. Natl. Acad. Sci.*

USA 90: 2087.

15) Chen, C., and G.G. Schofield, 1995, Nitric oxide donors enhanced Ca^{2+} currents and blocked noradrenaline-induced Ca^{2+} current inhibition in rat sympathetic neurons, *J. Physiol.* 482: 521.

16) Lee, H.C. 1994, A signaling pathway involving cyclic ADP-Ribose, cGMP, and nitric oxide, *NIPS* 9: 134.

17) Schmidt, H. H. H. and U. Walter, 1994, NO at work, *Cell* 78: 919.

18) Adler, K.B, Fisher, B. M., Choe, H. L. N. H. and D. T. Wright, 1995, Hypersecretion of mucin in response to inflammatory mediators by guinea pig tracheal epithelial cells in vitro is blocked by inhibition of nitric oxide synthase, 13: 526.

19) Lundberg, J.O.N., Weitzberg, E., Nordvall, S.L., Kuylenstierna, R., Lundberg, J. M. and K. Alving, 1994, Primarily nasal origin of exhaled nitric oxide and absence in Kartagener's syndrome, *Rur. Respir. J.* 7: 1501.

Figure Legends

Fig. 1 Representative recordings of I_{sc} in cow tracheal epithelial cells exposed to bradykinin (BK) (10^{-6} M). (Left) bradykinin alone, (middle) in presence of BAPTA-AM (10^{-6} M), (right) in the presence of indomethacin (3×10^{-6} M).

Fig. 2 Representative recordings of I_{sc} in cow tracheal epithelial cells exposed to bradykinin. (a) control, (b) in the presence of L-NAME (10^{-3} M), (c) in the presence of L-NAME plus L-arginine 3×10^{-3} M, (d) in the presence of L-NAME and D-arginine (3×10^{-3} M), (e) in the presence of D-NAME (10^{-3} M). The cells are pretreated with amiloride (AM, 10^{-4} M).

Fig. 3 The effects of L-NAME on bradykinin-induced increases in I_{sc}.

The simultaneous addition of L-arginine, but not D-arginine reverses the inhibitory effect of L-NAME. * $P < 0.05$ v.s. bradykinin alone, + $P < 0.05$ v.s. in the presence of L-NAME.

Fig. 4 Representative recordings of I_{sc} in cow tracheal epithelial cells exposed to ATP (10^{-4} M) in the absence (left), in the presence of L-NAME (10^{-3} M) (middle), and in the presence of L-NAME and L-arginine (3×10^{-3} M) (right).

Fig. 5 Representative recordings of fura-2 fluorescence ratios in cow tracheal epithelial cells exposed to bradykinin (10^{-6} M) and ATP (10^{-4} M) in the absence (control) and presence of L-NAME (10^{-4} M) or D-NAME (10^{-4} M).

Fig. 6 Representative recordings of fura-2 fluorescence ratios in response to bradykinin (10^{-6} M) and ATP (10^{-4} M) of the cells pretreated with L-NAME (3×10^{-5} M) alone (top panel) and L-NAME plus L-arginine (3×10^{-4} M) (middle panel) or D-arginine (bottom panel).

Fig. 7 Representative recordings of fura-2 fluorescence ratios in response to bradykinin(10^{-7} M) and ATP(10^{-5} M) of the cells in the absence (upper panel) and the presence of sodium nitroprusside (SNP)(10^{-4} M)(middle panel) or dibutyryl cyclic GMP(3×10^{-4} M)(bottom panel).

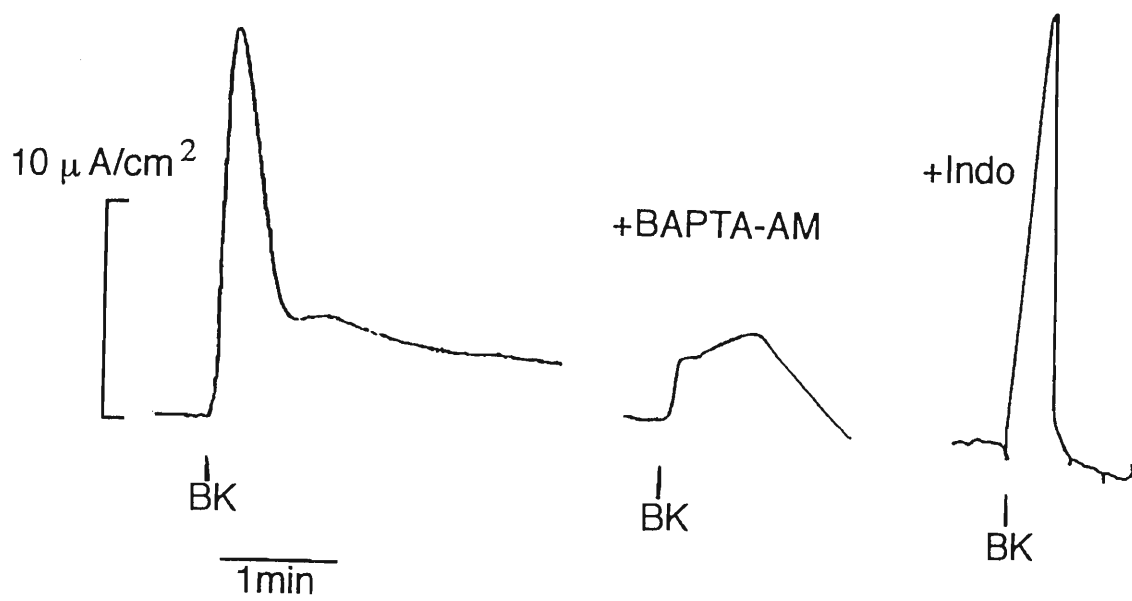


Fig 1

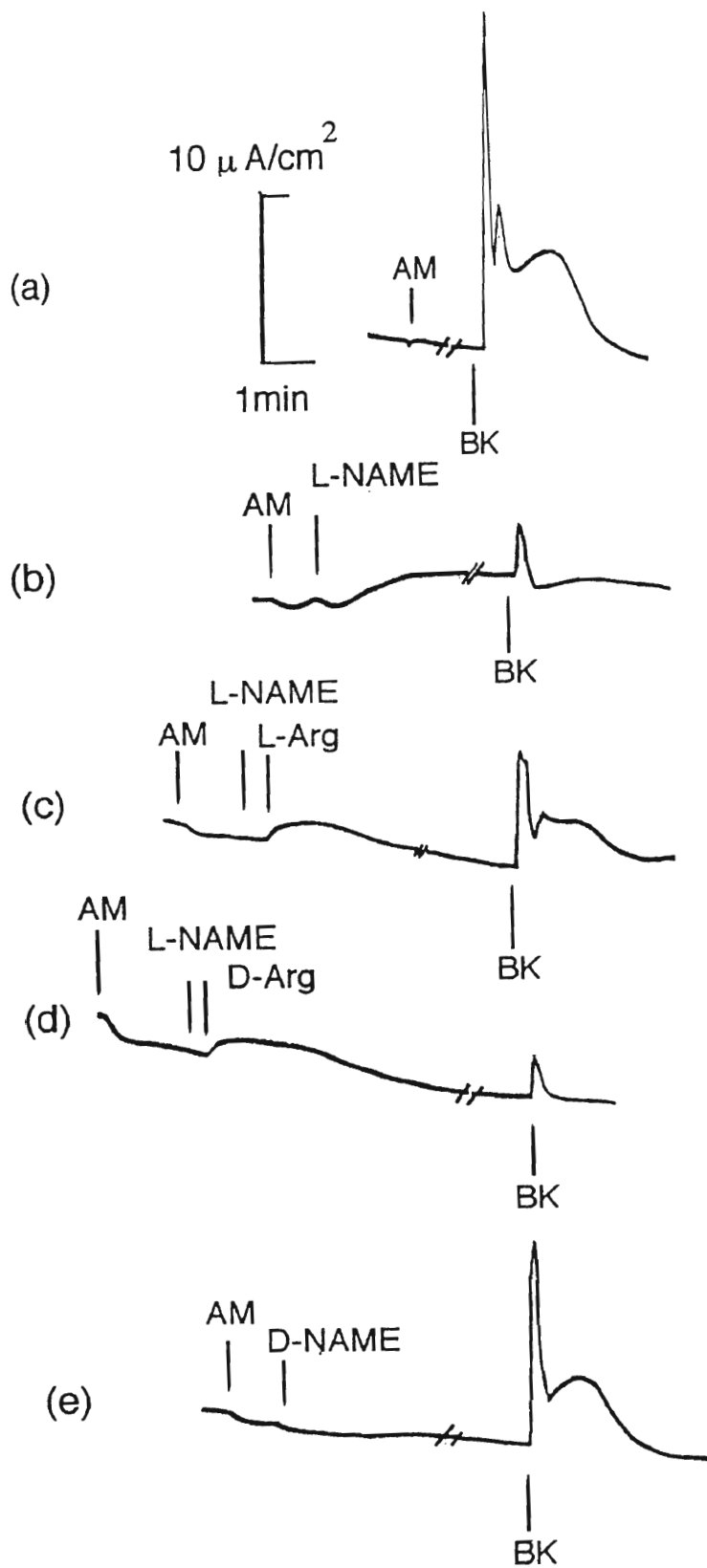


Fig 2

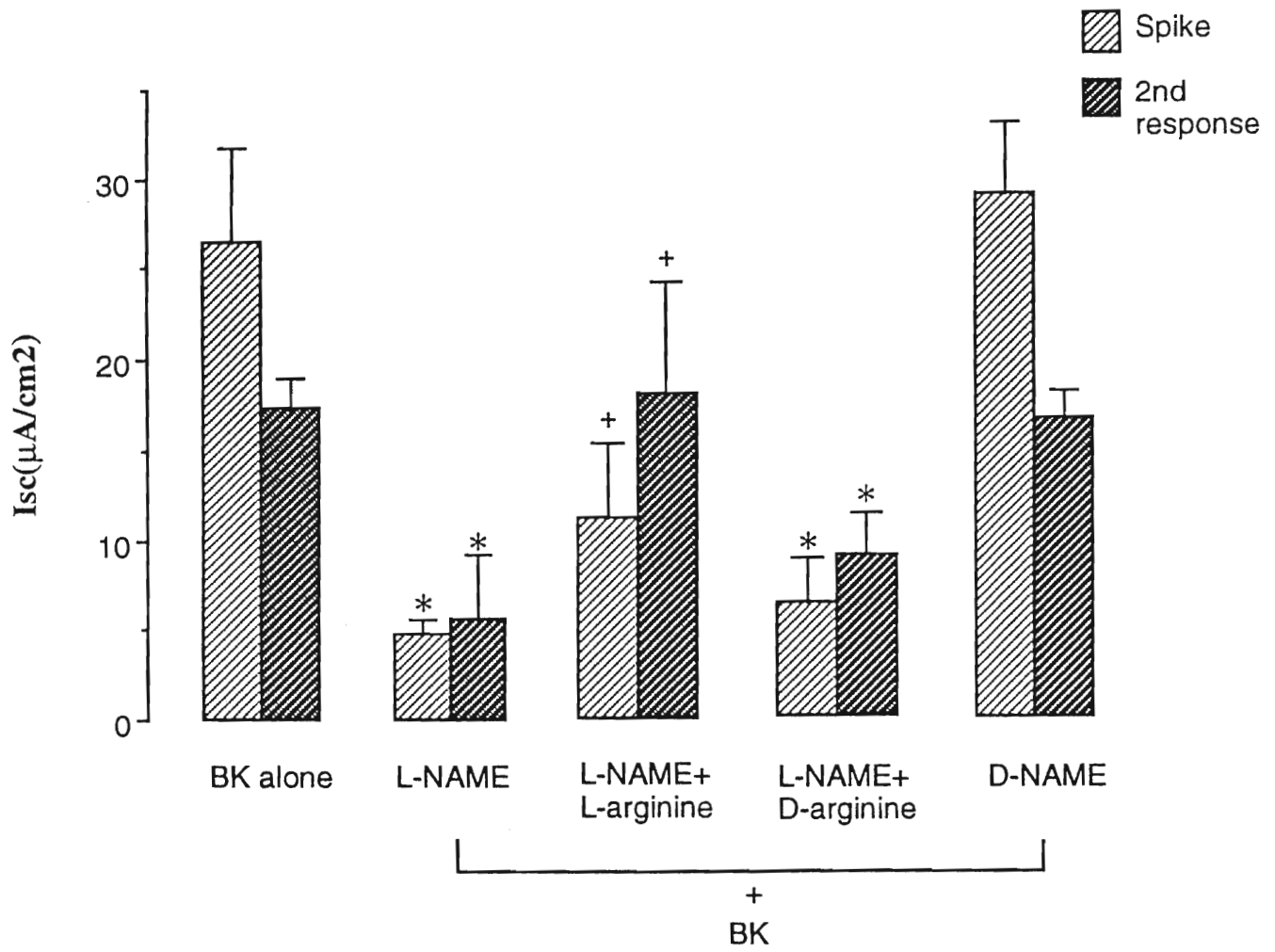


Fig 3

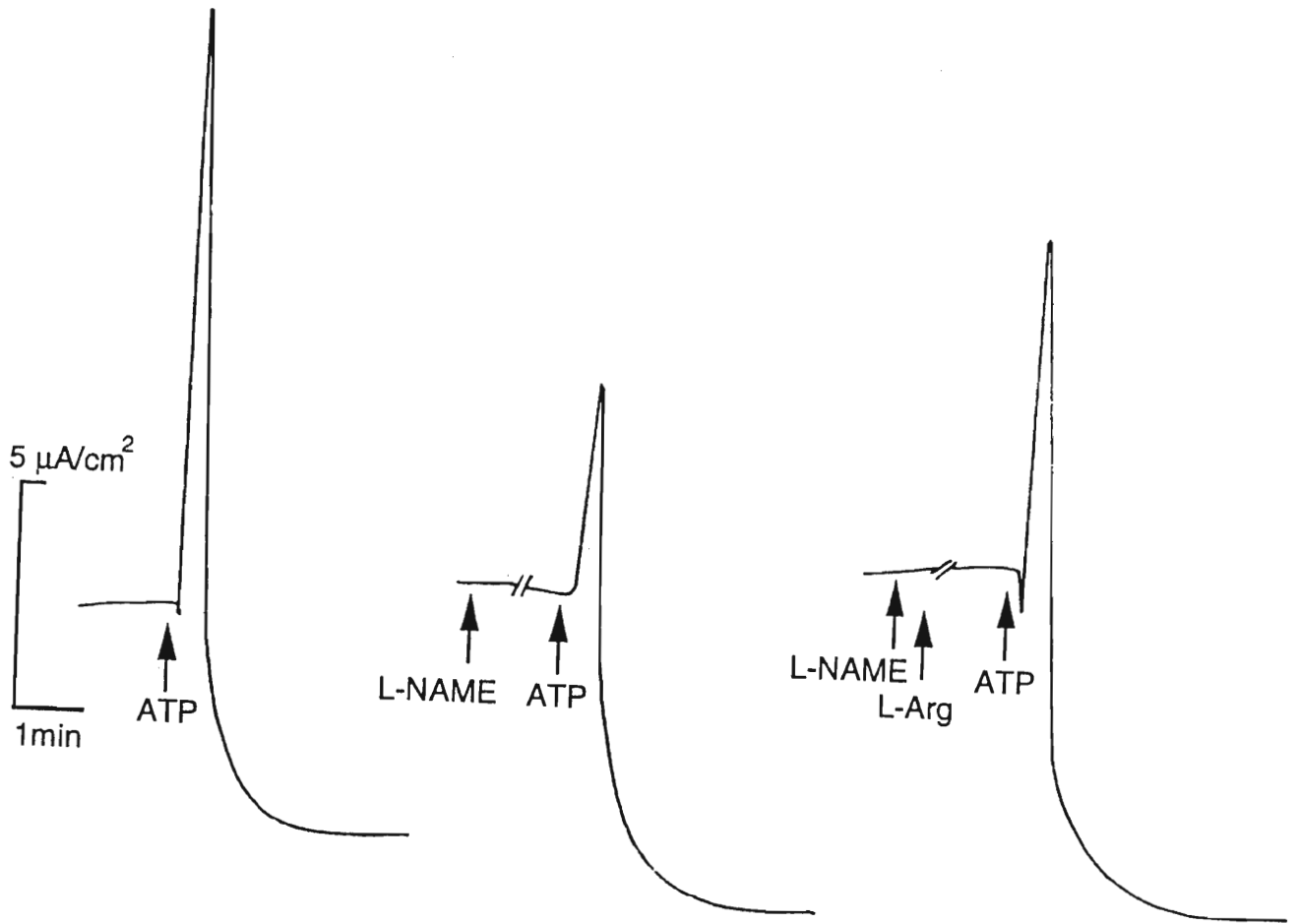


Fig 4

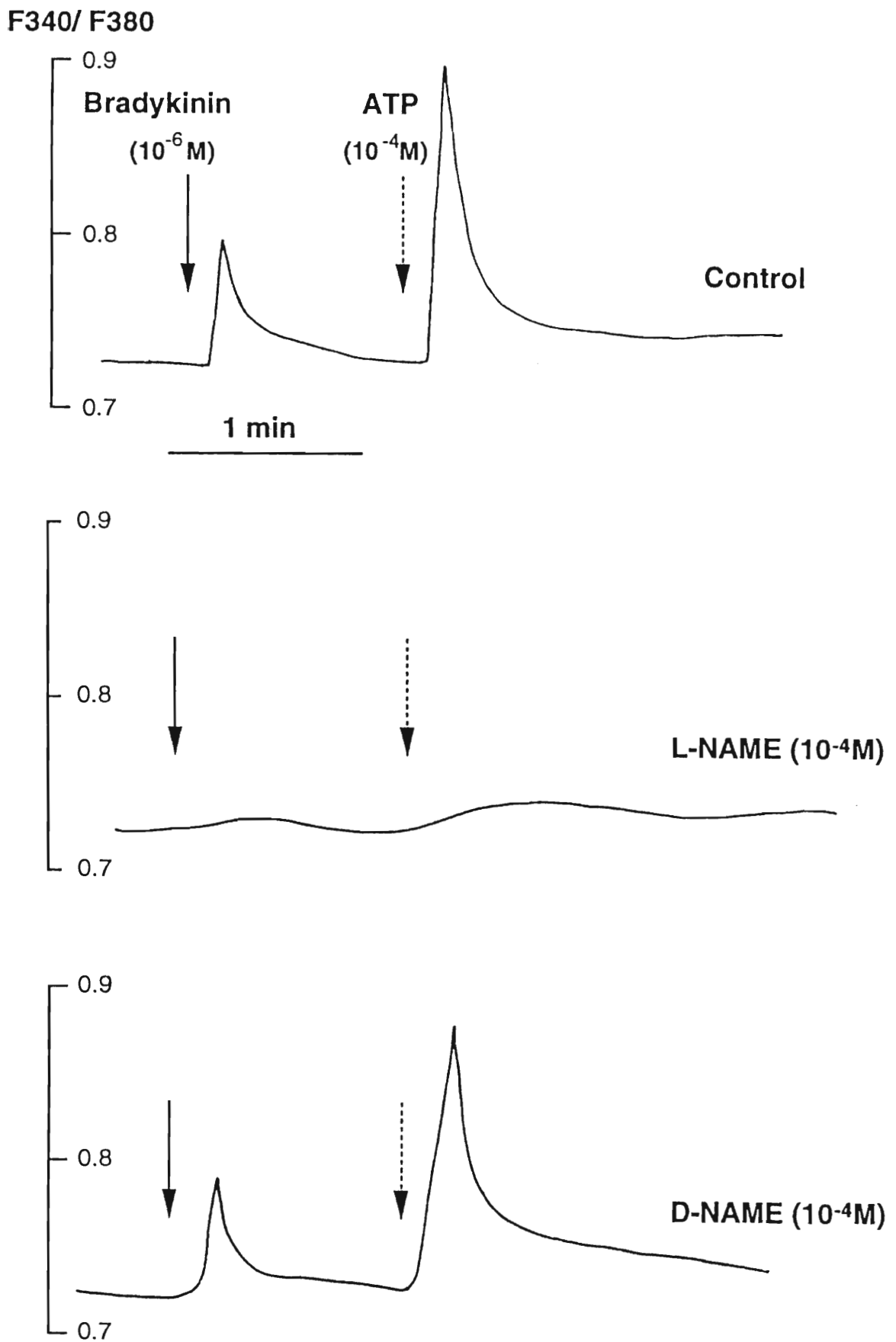


Fig. 5
- 32 -

F340/ F380

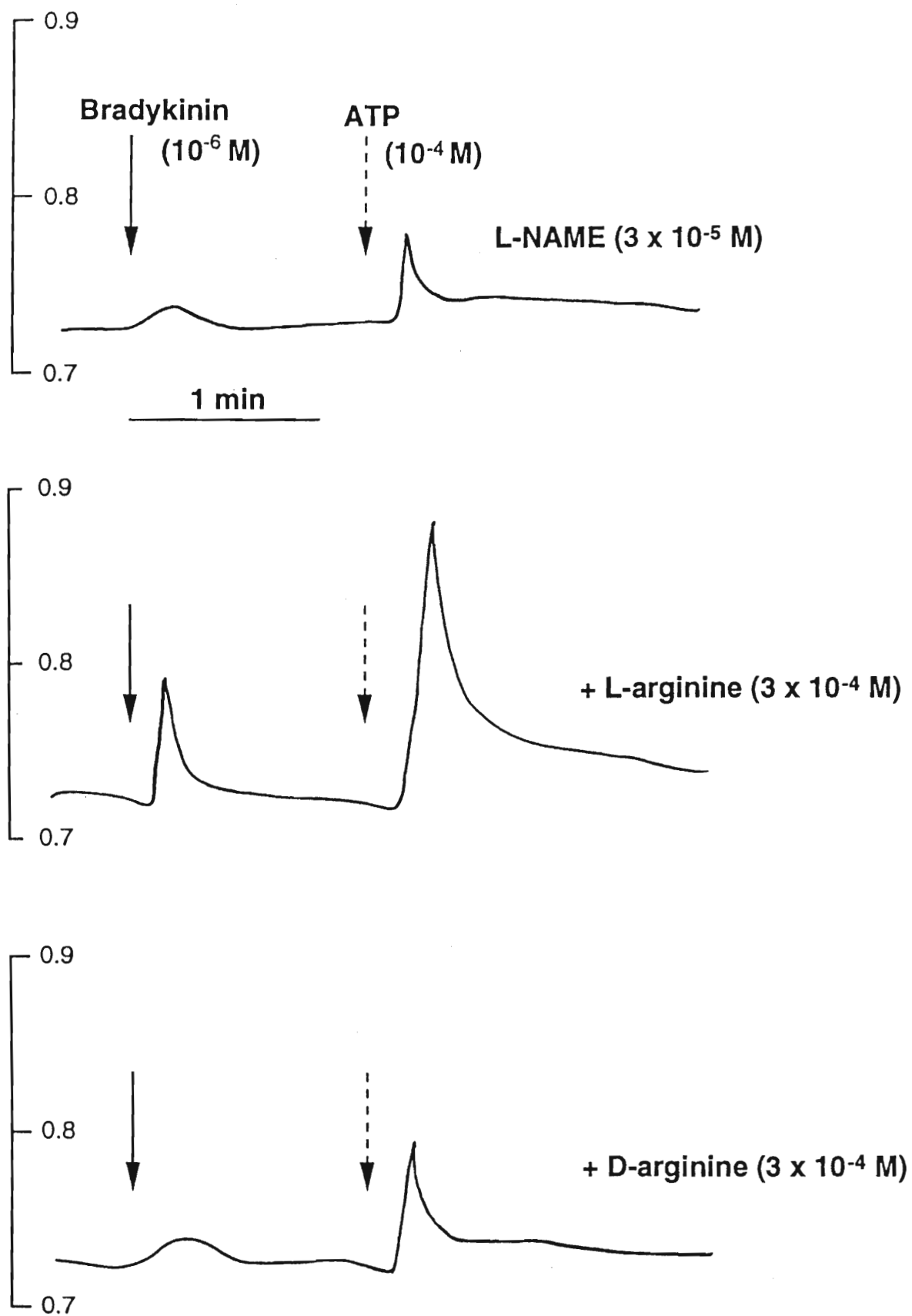


Fig 6

F340/ F380

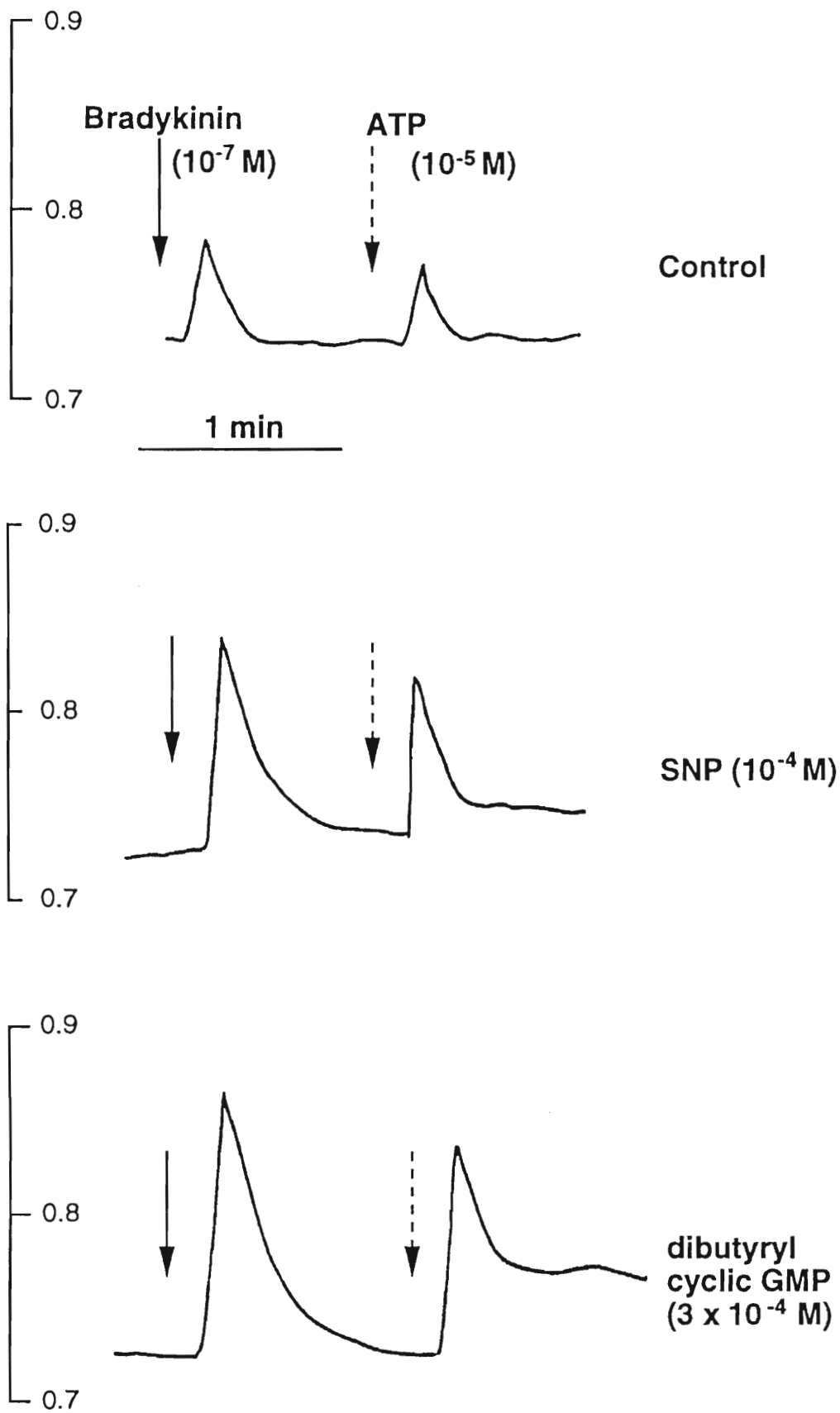


Fig. 7