

摘出ラット大動脈における human urotensin II による 血管収縮のメカニズム

田崎 勝成・若林 一郎*

Mechanism of human urotensin II-induced contraction in the isolated rat aorta

Katsunari Tasaki and Ichiro Wakabayashi*

Summary

We investigated the mechanism of contractile response to human urotensin II, a new receptor-mediated vasoconstrictive peptide, in thoracic aortas isolated from rats. Isolated aortic rings were incubated in Tyrode solution aerated by mixed gas of 95% O₂ + 5% CO₂ and stimulated with human urotensin II. Ca²⁺ antagonists, verapamil (10 μM) and La³⁺ (30 μM) strongly inhibited human urotensin II-induced vasoconstriction. On the other hand, a P₂ receptor antagonist, cibacron blue 3GA (10 μM), did not inhibit the contraction. In addition, neither an ET_A receptor antagonist, BQ123 (10 μM), nor a neuropeptide Y₁ receptor antagonist, BIBP3226 (10 μM), affected the contractile action of human urotensin II. These results suggest that 1) Ca²⁺ influx via Ca²⁺ channels plays an important role in the urotensin II-induced contraction in rat aorta, 2) neither P₂ receptor, ET_A receptor nor neuropeptide Y₁ receptor is involved in human urotensin II-induced vasoconstriction.

Received Oct. 30. 2004

Key word: human urotensin II, rat, aorta, Ca²⁺ channel, P₂ receptor, ET_A receptor, Y₁ receptor

緒言

Urotensin II (U-II) は、最初、魚類の神経分泌系で産生され、尾部下垂体に貯留放出されることが報告されたペプチドである¹⁻³⁾。その後、魚類のU-IIは強力な血管収縮作用を有する

*山形大学医学部環境病態統御学講座環境病態医学分野

*Department of Hygiene and Preventive Medicine, Yamagata University, School of Medicine, Yamagata, 990-9585, Japan

ことが報告された⁴⁻⁶⁾。そして1998年には、Human Urotensin II (hU-II) の cDNA が同定され⁷⁾、1999年に hU-II の受容体 (GPR14受容体) が同定された⁸⁾。さらに hU-II は、7 回膜貫通型受容体である GPR14受容体を介して血管収縮を惹起することが報告された⁸⁾。そして、hU-II は血管収縮ペプチドとして知られているエンドセリン-1 と同様に強力な血管収縮作用を惹起するということが近年注目されている⁸⁾。また高血圧症⁹⁾や糖尿病の患者¹⁰⁾では、健常人と比較して、hU-II の血漿濃度が上昇することが報告されている。したがって、循環器疾患の発症や進展に関連している可能性も考えられる。そのため最近では、循環器疾患治療薬として hU-II の受容体拮抗薬の開発が進んでいる¹¹⁻¹³⁾。

ところで、血管平滑筋収縮の細胞内メカニズムについて、一般に次のような機序が考えられている。1) 受容体作動薬は、受容体、さらに続くGタンパクを介してフォスホリパーゼC (PLC) を活性化させ、細胞膜からイノシトール三リン酸 (IP₃) とジアシルグリセロール (DG) を生成する。その生成された IP₃ が細胞内の筋小胞体 (SR) にある IP₃ 受容体に結合することにより、SR からのカルシウム (Ca²⁺) 遊離を生じる。一方、受容体作動薬の刺激により電位依存性あるいは非電位依存性 Ca²⁺ チャネルを介する細胞外からの Ca²⁺ 流入が生じる。SR あるいは細胞外から流入した Ca²⁺ は、Ca²⁺ 結合タンパク質のカルモジュリン (CM) と結合し、カルシウム-カルモジュリン複合体 (CaCM) を形成する。その CaCM は、ミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) を活性化させる。その活性化された MLCK により、ミオシン軽鎖 (MLC) のリン酸化が進み、ミオシンとアクチンがクロスブリッチを形成し、筋が収縮する。2) 一方、細胞膜から生成された DG はプロテインキナーゼC (PKC) を活性化し、収縮蛋白系のCa²⁺ 感受性を亢進させて収縮を惹起することが知られている。

なお、hU-II による血管収縮について、ウサギ大動脈において、hU-II は PLC の活性化を介して血管収縮を惹起させることが報告されている¹⁴⁾。また、田崎らは、ラット大動脈において、MLCK、PKC の活性化と細胞外からの Ca²⁺ 流入および SR からのカルシウム (Ca²⁺) 遊離が hU-II による血管収縮に関与していることを明らかにした¹⁵⁾。同様に、Rossowski らは、ラット大動脈において、MLCK、PKC の活性化と細胞外からの Ca²⁺ 流入が hU-II による血管収縮に関与していることを報告した¹⁶⁾。

このように、hU-II による血管収縮機序として、細胞内の情報伝達経路に関する既報は多数存在するが、hU-II と細胞膜にある GPR14受容体以外の受容体との関連性に関する報告は皆無に等しい。

そこで、本研究では、hU-II の受容体と報告されている GPR14受容体以外の他の受容体を介してhU-II による刺激が細胞内に情報伝達され、血管収縮を惹起するか否かを検討した。

材料と方法

8 - 9 週齢の Wistar ラット (♂) を実験に供した。ラットを放血致死させた後、速やかに

開胸し、胸部大動脈を摘出した。摘出した大動脈を冷却した Tyrode 液に浸し、血液を十分に洗い流した後、血管に付着した雑組織等を除去し、内皮細胞をピンセットを用いて取り除いた。長さ約 2 mm のリング標本を作製し、混合ガス (95% O₂+5% CO₂) を通気した Tyrode 液 (37 ± 0.1°C) を満たした 2 ml の organ bath に懸垂し、その収縮張力を等尺性張力トランスデューサーを用いて測定した。灌流液の組成 (mM) は、NaCl 136.9、KCl 5.4、NaHCO₃ 23.8、MgCl₂ 1.0、Glucose 5.5、CaCl₂ 1.5、EDTA 0.1、pH 7.4 であった。標本を organ bath に懸垂した後、約 9.8 mN の静止張力を負荷し、この状態で標本を約 1 時間保ち安定化させた。この間 15 分間隔で灌流液を新鮮なものと交換した。標本が安定した後、72.7 mM KCl (高濃度 K⁺) に対する収縮の大きさが一定となることを確認した後本実験を開始した。KCl による血管収縮反応の濃度反応曲線を求めたところ、72.7 mM (高濃度 K⁺) はほぼ最大収縮反応が得られる濃度であった。なお、高濃度 K⁺ の投与は次のように行った。あらかじめ NaCl を KCl と置換した 37°C の灌流液、即ち NaCl 69.6 mM、KCl 72.7 mM を含む Tyrode 液に混合ガスを通気しておき、通常の灌流液とすみやかに交換した。本実験では、全て血管内面をピンセットで軽く擦過し内皮細胞を除去した標本を用いた。

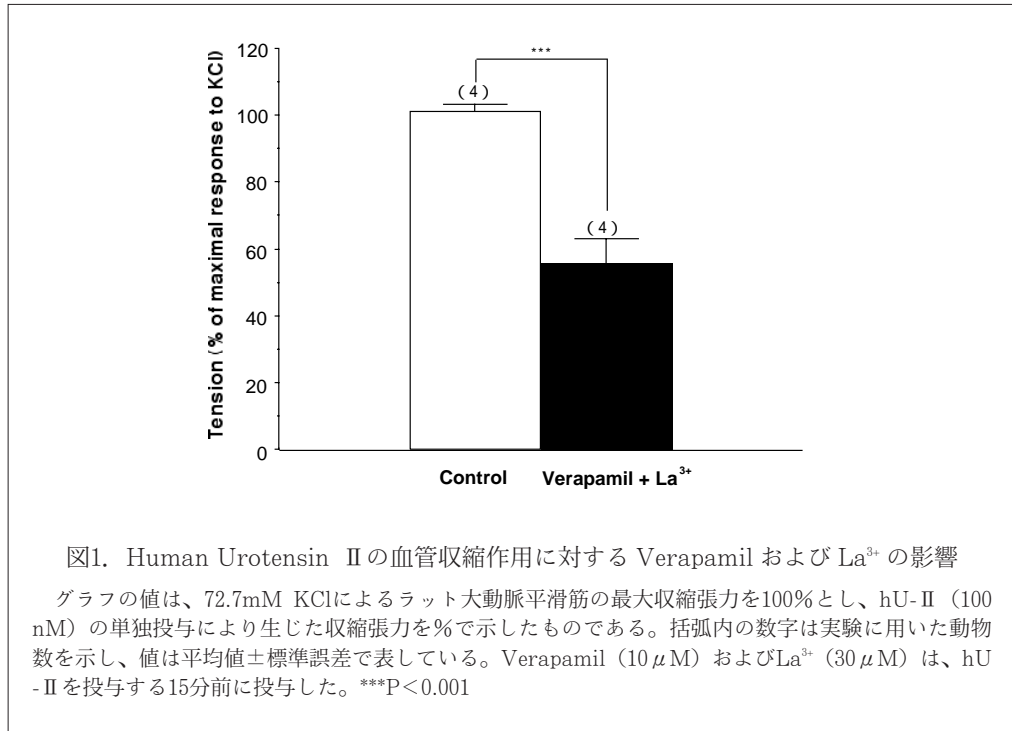
前述の通り、一般に受容体作動薬の刺激により、細胞外 Ca²⁺ が細胞内に流入し、血管収縮が惹起される。一方、ATP¹⁷⁾、エンドセリン-1^{18),19)}、ニューロペプチド Y²⁰⁾ といった物質と血管収縮との関連性が、各々の受容体拮抗薬を用いることにより明らかにされている。そこで本研究では、hU-II の血管収縮への細胞外 Ca²⁺ の関与および各々の収縮物質の受容体と hU-II による血管収縮との関連性を検討するために、電位依存性 Ca²⁺ チャネルの拮抗薬である verapamil、電位依存性および非電位依存性 Ca²⁺ チャネルの拮抗薬であるランタン (La³⁺)、ATP の受容体として知られている P₂ 受容体の拮抗薬である cibacron blue 3GA、エンドセリン-1 の受容体として知られる ET_A 受容体の拮抗薬である BQ123、ニューロペプチド Y の受容体の拮抗薬として知られる BIBP3226 を用いて検討した。それぞれの拮抗薬を 15 分間前処置した上で、hU-II (100 nM) の一回投与あるいは hU-II (0.01 nM-100 nM) の累積投与により血管収縮反応を計測した。高濃度 K⁺ による血管収縮反応を 100% (KCl_{max}) とし、それぞれの血管標本における hU-II による血管収縮反応の大きさを標準化した。

使用薬物

hU-II (Peptide Institute, Osaka, Japan)、verapamil hydrochloride (Sigma Chemical, St. Louis, MO, U.S.A)、lanthanum chloride (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) は蒸留水で溶解した後、生理食塩水を用いて希釈した。cibacron blue 3GA (Sigma Chemical, St. Louis, MO, U.S.A) は蒸留水で溶解した。BQ123 (Sigma Chemical, St. Louis, MO, U.S.A) は、DMSO を用いて溶解した。BIBP3226 (Peninsula Lab, Calif, U.S.A) はメタノールを用いて溶解した。

統計処理法

得られたデータは、対応のない Student's t-test を用いて検定を行った。それぞれの値はすべて平均値±標準誤差で表示した。危険率 $P < 0.05$ をもって有意とした。



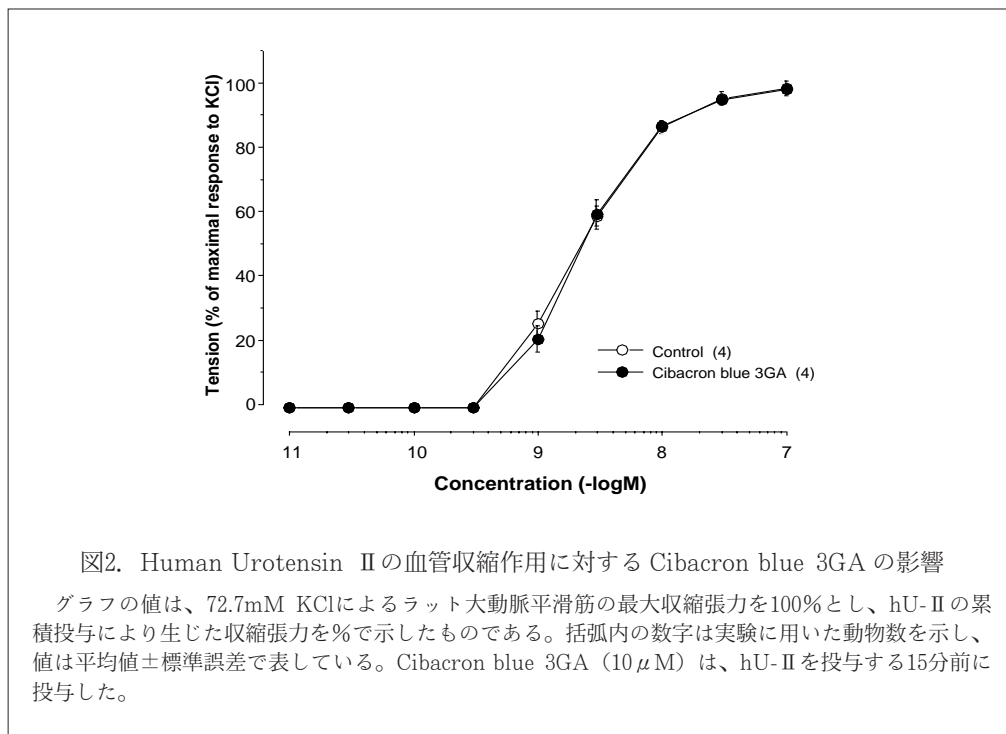
結 果

1. hU-II による血管収縮作用に対する verapamil および La³⁺ の影響 (図1)

hU-II による血管収縮作用に細胞外からの Ca²⁺ 流入が関与しているか否かを Ca²⁺ チャネルの拮抗薬である verapamil および La³⁺ を用いて検討した (図1)。hU-II による血管収縮は、コントロール群 (溶媒のみを前処置したもの) ではhU-II (100 nM) 投与時に KCl_{max} の101.6 ± 2.1% (n=4) であり、一方 verapamil (10 μM)、La³⁺ (30 μM) 処置群では、hU-II (100 nM) 投与時に、KCl_{max} の56.0 ± 7.4% (n=4、P<0.001) となり、コントロール群と比較して有意に抑制された。

2. hU-II による血管収縮作用に対する cibacron blue 3GA の影響 (図2)

大動脈平滑筋に対して、hU-II の累積投与 (0.01 nM-100 nM) を行った。1 nM の hU-II 投与から収縮が惹起され、100 nM で収縮反応は最大に達し、その反応の大きさは KCl_{max} の



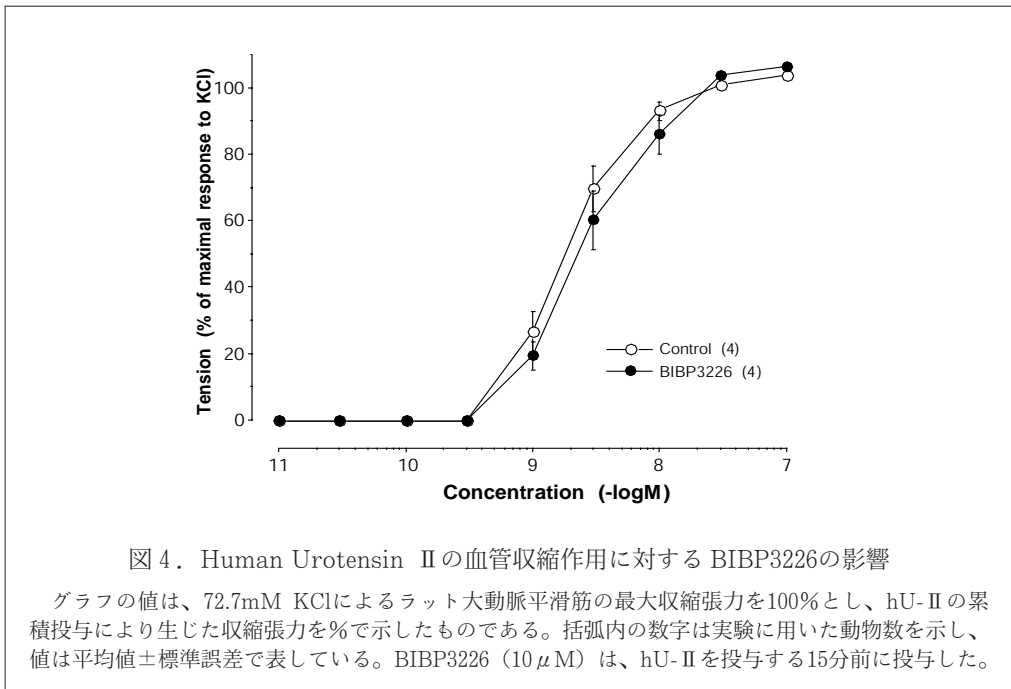
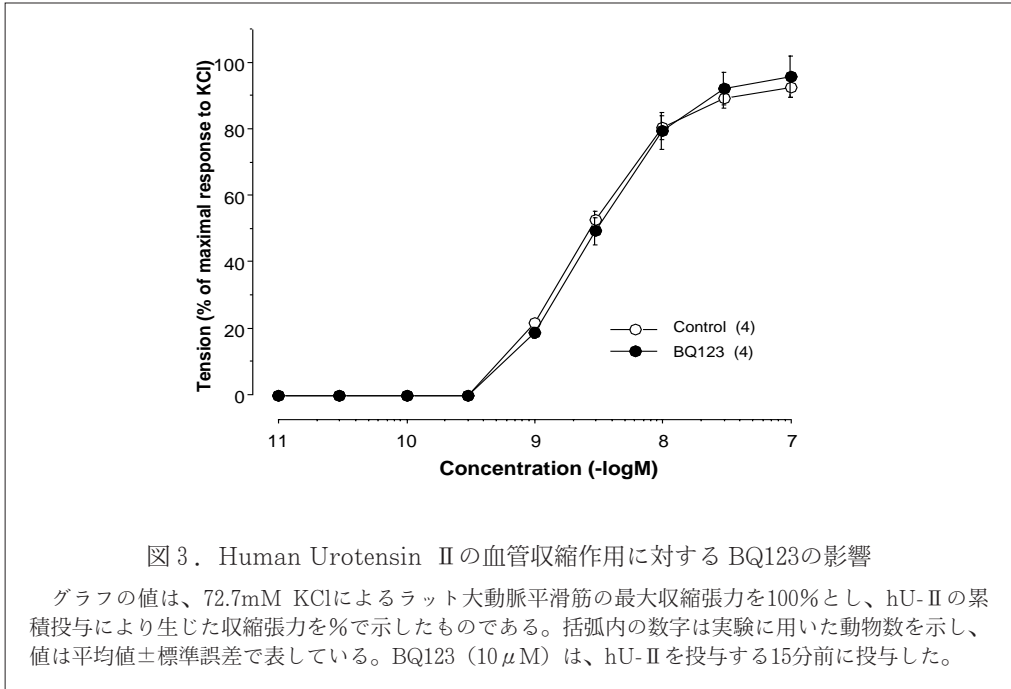
103.9±4.1% (n=4)であった。次にhU-IIの血管収縮がP_{2Y}受容体を介して反応しているか否かを、P_{2Y}受容体の拮抗薬である cibacron blue 3GA を用いて検討した(図2)。hU-IIによる血管収縮は、コントロール群(溶媒のみを前処置したもの)ではhU-II(100 nM)投与時にKCl_{max}の99.2±2.7% (n=4)、cibacron blue 3GA (10 μM) 処置群では、hU-II(100 nM)投与時に、KCl_{max}の99.0±0.9% (n=4)となり、コントロール群と比較して有意差は認められなかった。

3. hU-IIによる血管収縮作用に対するBQ123の影響(図3)

hU-IIの血管収縮がET_A受容体を介して反応しているか否かを、ET_A受容体の拮抗薬であるBQ123を用いて検討した(図3)。hU-IIによる血管収縮は、コントロール群(溶媒のみを前処置したもの)ではhU-II(100 nM)投与時にKCl_{max}の92.8±3.0% (n=4)、BQ123(10 μM)処置群では、hU-II(100 nM)投与時に、KCl_{max}の95.9±6.2% (n=4)となり、コントロール群と比較して有意差は認められなかった。

4. hU-IIによる血管収縮作用に対するBIBP3226の影響(図4)

hU-IIの血管収縮がY₁受容体を介して反応しているか否かを、Y₁受容体の拮抗薬である



BIBP3226を用いて検討した(図4)。hU-IIによる血管収縮は、コントロール群(溶媒のみを前処置したもの)ではhU-II(100 nM)投与時に KCl_{max} の $103.8 \pm 1.3\%$ ($n=4$)、BIBP3226(10 μ M)処置群では、hU-II(100 nM)投与時に、 KCl_{max} の $106.3 \pm 0.9\%$ ($n=4$)となり、コントロール群と比較して有意差は認められなかった。

考 察

GPR14受容体は、ソマトスタチン受容体およびオピオイド受容体ファミリーに類似しており¹⁶⁾、Rossowskiらにより、ソマトスタチン受容体拮抗薬がラット大動脈におけるhU-IIによる血管収縮を抑制することが明らかにされた¹⁶⁾。しかしながら、GPR14受容体以外の受容体とhU-IIによる血管収縮に関する報告は、いまだ、皆無に等しい状況である。本研究では、ラット摘出胸部大動脈を用いて、hU-IIの血管収縮反応とhU-IIの受容体として報告されているGPR14受容体以外の受容体との関連性を検討した。

ところで、一般的に受容体作動物質による血管収縮には、細胞外からの Ca^{2+} 流入が重要な役割を果たしていると考えられている。そこで、本研究では Ca^{2+} チャネルの拮抗薬であるverapamilおよび La^{3+} を用いて検討した。その結果、 Ca^{2+} 拮抗薬によりhU-IIの血管収縮作用は、強力に抑制された。したがって、hU-IIの血管収縮には主として Ca^{2+} の細胞外から細胞内への流入が重要であると考えられる。また種々の動物の種々の血管において、ATP²¹⁾、エンドセリン-1²²⁾、ニューロペプチドY²³⁾などの血管収縮性物質の場合にも、hU-IIの血管収縮作用と同様に細胞外から細胞内への Ca^{2+} 流入が認められ、血管収縮において重要な役割を果たしていると報告されている。したがって、本研究では、主として細胞外から細胞内への Ca^{2+} 流入により血管収縮を惹起する点でhU-IIと共通点をもつATP、エンドセリン-1、ニューロペプチドYという血管作動物質を用いて、hU-IIの血管収縮と各々の血管作動物質の受容体レベルでの交差性の有無を検討した。そこでまず初めに、hU-IIの血管収縮作用における P_2 受容体の関与を検討した。 P_2 受容体はATP刺激により活性化され、血管平滑筋にある P_2 受容体が活性化することにより、血管収縮が惹起されることが報告されている^{21), 24), 25)}。そこで、 P_2 受容体拮抗薬として使用されているcibacron blue 3GAを用いて検討した。その結果、cibacron blue 3GAによりhU-IIの血管収縮作用は影響を受けないということが明らかとなった(図1)。次に、hU-IIの血管収縮作用における ET_A 受容体の関与を検討した。 ET_A 受容体は、血管平滑筋に多数存在し、エンドセリン-1の刺激により、 ET_A 受容体を介する血管収縮が惹起されることが知られている^{18), 19)}。そこで、 ET_A 受容体拮抗薬として使用されているBQ123を用い、hU-IIの血管収縮作用における ET_A 受容体の関与を検討した。その結果、BQ123によりhU-IIの血管収縮作用は影響を受けないということが明らかとなった(図2)。ニューロペプチドY受容体は7回膜貫通Gタンパク質共役型受容体で、6種類のサブタイプ(Y_1 、 Y_2 、 Y_3 、 Y_4 、 Y_5 、 Y_6)が存在する²⁶⁾。血管収縮に関与する受容体のサブタイプは動物種、血管部

位により異なることが推測され、その詳細は未だ明らかではないが、 Y_1 が血管収縮に関与していることが、示唆されている^{24),27)}。そこで、 Y_1 受容体拮抗薬である BIBP3226を用い、hU-IIの血管収縮作用における Y_1 受容体の関与の有無を検討した。その結果、BIBP3226により hU-IIの血管収縮作用は影響を受けないということが明らかとなった(図3)。

本研究では、hU-IIの血管収縮について、cibacron blue 3GA、BQ123、BIBP3226という3種類の異なった受容体拮抗薬を使用して検討を行い、それぞれの受容体拮抗薬は、hU-IIの血管収縮に有意な影響を与えなかった。したがって、hU-IIが P_2 受容体、 ET_A 受容体、 Y_1 受容体を介して収縮している可能性は低いと考えられる。

ところで、自然発症高血圧ラット (SHR) において、トロンボキサン A_2 のアナログである U46619による血小板凝集や血管収縮が、強力な血管作動性ペプチドであるアンジオテンシン IIの受容体である AT_1 受容体の拮抗薬である losartan によって抑制されることが報告された²⁸⁾。さらに、SHRの大動脈標本において、エンドセリン-1および U46619による血管収縮が losartan により抑制されることが報告された²⁹⁾。また、犬の冠動脈においてトロンボキサン A_2 のアナログである U46619による血管収縮が AT_1 受容体の拮抗薬である Irbesartan で抑制されたという報告がある³⁰⁾。それ以外にもウサギの大動脈において、アンジオテンシン IIによる血管収縮が BQ123処置により抑制されたという報告もある³¹⁾。したがって、血管作動性物質が他の受容体を介して血管収縮を惹起している可能性が考えられる。しかしながら、動物種や使用する血管の部位の差により、異なる結果が得られる可能性がある。今回は、hU-IIの血管収縮と P_2 受容体、 ET_A 受容体、 Y_1 受容体について検討したが、 AT_1 受容体やトロンボキサン A_2 受容体等、その他の血管収縮物質受容体について検討しておらず、使用する動物種および血管部位を含めて、今後の研究課題である。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、研究環境を提供して下さった東京大学大学院農学生命科学研究科獣薬理学教室の唐木英明名誉教授、尾崎博教授、堀正敏助教授に深謝する。

文 献

1. Bern HA, Lederis. A reference preparation for the study of active substances in the caudal neurosecretory system of teleosts. *J Endocrinol* 1969; 45:xi-xii.
2. Berlind A. Teleost caudal neurosecretory system: release of urotensin II from isolated urophyses. *Gen Comp Endocrinol.* 1972; 18:557-560.
3. Pearson D, Shively JE, Clark BR, Geschwind II, Barkley M, Nishioka RS, Bern HA. Urotensin II: a somatostatin-like peptide in the caudal neurosecretory system of fishes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980; 77:5021-5024.

4. Itoh H, Itoh Y, Rivier J, Lederis K. Contraction of major artery segments of rat by fish neuropeptide urotensin II. *Am J Physiol.* 1987; 252:R361-366.
5. Gibson A. Complex effects of Gillichthys urotensin II on rat aortic strips. *Br J Pharmacol.* 1987; 91:205-212.
6. Itoh H, McMaster D, Lederis K. Functional receptors for fish neuropeptide urotensin II in major rat arteries. *Eur J Pharmacol.* 1988; 149:61-66.
7. Coulouarn Y, Lihrmann I, Jegou S, Anouar Y, Tostivint H, Beauvillain JC, Conlon JM, Bern HA, Vaudry H. Cloning of the cDNA encoding the urotensin II precursor in frog and human reveals intense expression of the urotensin II gene in motoneurons of the spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95:15803-15808.
8. Ames RS, Sarau HM, Chambers JK, Willette RN, Aiyar NV, Romanic AM, Loudon CS, Foley JJ, Sauermelch CF, Coatney RW, Ao Z, Disa J, Holmes SD, Stadel JM, Martin JD, Liu WS, Glover GI, Wilson S, McNulty DE, Ellis CE, Elshourbagy NA, Shabon U, Trill JJ, Hay DWP, Ohistein EH, Beregsma DJ, Douglas SA. Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature.* 1999; 401:282-286.
9. Cheung BM, Leung R, Man YB, Wong LY. Plasma concentration of urotensin II is raised in hypertension. *J Hypertens.* 2004; 22:1341-1344.
10. Totsune K, Takahashi K, Arihara Z, Sone M, Ito S, Murakami O. Increased plasma urotensin II levels in patients with diabetes mellitus. *Clin Sci (Lond).* 2003; 104:1-5.
11. Flohr S, Kurz M, Kostenis E, Brkovich A, Fournier A, Klabunde T. Identification of nonpeptidic urotensin II receptor antagonists by virtual screening based on a pharmacophore model derived from structure-activity relationships and nuclear magnetic resonance studies on urotensin II. *J Med Chem.* 2002; 45:1799-1805.
12. Behm DJ, Herold CL, Ohlstein EH, Knight SD, Dhanak D, Douglas SA. Pharmacological characterization of SB-710411 (Cpa-c[D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Cpa-amide), a novel peptidic urotensin-II receptor antagonist. *Br J Pharmacol.* 2002;137:449-458. Herold CL, Behm DJ, Buckley PT, Foley JJ, Wixted WE, Sarau HM, Douglas SA. The neuromedin B receptor antagonist, BIM-23127, is a potent antagonist at human and rat urotensin-II receptors. *Br J Pharmacol.* 2003; 139:203-207.
13. Patacchini R, Santicioli P, Giuliani S, Grieco P, Novellino E, Rovero P, Maggi CA. Urantide:an ultrapotent urotensin II antagonist peptide in the rat aorta. *Br J Pharmacol.* 2003; 140:1155-1158.
14. Saetrum Opgaard O, Nothacker H, Ehlert FJ, Krause DN. Human urotensin II

- mediates vasoconstriction via an increase in inositol phosphates. *Eur J Pharmacol.* 2000; 406: 265-271.
15. Tasaki K, Hori M, Ozaki H, Karaki H, Wakabayashi I. Mechanism of human urotensin II-induced contraction in rat aorta. *J Pharmacol Sci.* 2004; 94:376-383.
 16. Rossowski WJ, Cheng BL, Taylor JE, Datta R, Coy DH: Human urotensin II-induced aorta ring contractions are mediated by protein kinase C, tyrosine kinases and Rho-kinase: inhibition by somatostatin receptor antagonists. *Eur J Pharmacol.* 2002; 438: 159-170.
 17. Shen JZ, Zheng XF, Kwan CY. Evidence for P2-purinoceptors contribution in H₂O₂-induced contraction of rat aorta in the absence of endothelium. *Cardiovasc Res.* 2000; 47:574-585.
 18. Ihara M, Ishikawa K, Fukuroda T, Saeki T, Funabashi K, Fukami T, Suda H, Yano M. In vitro biological profile of a highly potent novel endothelin (ET) antagonist BQ-123 selective for the ETA receptor. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1992; 20 Suppl 12:S11-14.
 19. Sumner MJ, Cannon TR, Mundin JW, White DG, Watts IS. Endothelin ETA and ETB receptors mediate vascular smooth muscle contraction. *Br J Pharmacol.* 1992; 107:858-860.
 20. Prieto D, Garcia-Sacristan A, Simonsen U. Characterization of NPY receptors mediating contraction in rat intramyocardial coronary arteries. *Regul Pept.* 1998; 75-76:155-160.
 21. Kitajima S, Ozaki H, Karaki H. The effects of ATP and alpha,beta-methylene-ATP on cytosolic Ca²⁺ level and force in rat isolated aorta. *Br J Pharmacol.* 1993; 110:263-26.
 22. Sakata K, Ozaki H, Kwon SC, Karaki H. Effects of endothelin on the mechanical activity and cytosolic calcium level of various types of smooth muscle. *Br J Pharmacol.* 1989; 98:483-92.
 23. Rioux F, Bachelard H, Martel JC, St-Pierre S. The vasoconstrictor effect of neuropeptide Y and related peptides in the guinea pig isolated heart. *Peptides.* 1986; 7:27-31.
 24. O'Connor SE. Recent developments in the classification and functional significance of receptors for ATP and UTP, evidence for nucleotide receptors. *Life Sci.* 1992; 50:1657-1664.
 25. Kitajima S, Harada K, Hori M, Ozaki H, Karaki H. Dissociation of P2 purinoceptor-mediated increase in intracellular Ca²⁺ level from myosin light chain phosphorylation

- and contraction in rat aorta. *Br J Pharmacol.* 1996; 118:543-548.
26. Mullins DE, Guzzi M, Xia L, Parker EM. Pharmacological characterization of the cloned neuropeptide Y y6 receptor. *Eur J Pharmacol.* 2000; 395:87-93.
 27. Prieto D, Buus CL, Mulvany MJ, Nilsson H. Neuropeptide Y regulates intracellular calcium through different signalling pathways linked to a Y₁-receptor in rat mesenteric small arteries. *Br J Pharmacol.* 2000; 129:1689-1699.
 28. Maeso R, Rodrigo E, Munoz-Garcia R, Navarro-Cid J, Ruilope LM, Lahera V, Cachofeiro V. Losartan reduces constrictor responses to endothelin-1 and the thromboxane A₂ analogue in aortic rings from spontaneously hypertensive rats: role of nitric oxide. *J Hypertens.* 1997; 15:1677-1684.
 29. Li P, Ferrario CM, Brosnihan KB. Losartan inhibits thromboxane A₂-induced platelet aggregation and vascular constriction in spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998; 32:198-205.
 30. Li P, Fukuhara M, Diz DI, Ferrario CM, Brosnihan KB. Novel angiotensin II AT₁ receptor antagonist irbesartan prevents thromboxane A₂-induced vasoconstriction in canine coronary arteries and human platelet aggregation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000; 292:238-246.
 31. Webb ML, Dickinson KE, Delaney CL, Liu EC, Serafino R, Cohen RB, Monshizadegan H, Moreland S. The endothelin receptor antagonist, BQ-123, inhibits angiotensin II-induced contractions in rabbit aorta. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992; 185:887-892.