

제2형 당뇨병 동물 모델인 OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) 쥐에서 α -lipoic acid에 의한 혈관 기능장애의 회복

정윤이 · 김현식¹ · 고정민 · 한정희 · 박중열 · 배성원² · 조인호² · 흥성관 · 이인규³
박성욱 · 박승정 · 이기업

울산대학교 의과대학 내과학교실, 아산생명과학연구소¹, 국립보건원 심장질환과²,
계명대학교 의과대학 내과학교실³

Improvement of Vascular Dysfunction by α -Lipoic Acid in OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) Rats

Yun-Ey Chung · Hyoun Sik Kim¹ · Jung-Min Koh · Jeong Hee Han · Joong Yeol Park
Sung Won Bae² · In Ho Jo² · Sung Kwan Hong · In-Kyu Lee³ · Seong Wook Park
Seung Jung Park · Ki-Up Lee

Department of Internal Medicine, Asan Medical Center, College of Medicine, University of Ulsan, Asan Institute for Life Sciences and Technology¹, Division of Cardiovascular Research, National Institute of Health²,

Department of Internal Medicine, Keimyung University, Dongsan Medical Center³, Korea

Abstract

Objective: It has been suggested that increased oxidative stress contributes to atherogenesis and endothelial dysfunction. As superoxide anion is known to inactivate nitric oxide (NO), we hypothesized that antioxidant treatment would increase NO bioavailability and improve vascular dysfunction. This study was performed to evaluate the effect of an antioxidant, α -lipoic acid, on vascular dysfunction in OLETF rats, the animal model of type 2 diabetes.

책임저자: 이기업

서울특별시 송파구 풍납동 388-1번지 서울중앙병원 내분비내과, Tel: (02) 3010-3243, FAX: (02) 3010-6962,
E-mail: kulee@amc.seoul.kr)

Methods: OLETF rats at 12 weeks of age were divided into two groups, and were given diet with ($n = 6$) or without ($n = 11$) 5% α -lipoic acid. LETO rats were used as controls. At 26 and 40 weeks, assessment of tension in aortic ring segments was performed. Endothelium dependent relaxation was measured by exposure to stepwise increases in acetylcholine concentration (10^{-9} ~ 10^{-5} M) and endothelium-independent relaxation by sodium nitroprusside (10^{-11} ~ 10^{-7} M) in phenylephrine-preconstricted rings. The amount of urinary NO excretion was measured at 40 weeks.

Results: Endothelium-dependent and independent vasorelaxation was impaired in OLETF rats. At 40 weeks, endothelium-dependent vasorelaxation of OLETF rats ($61.1 \pm 2.1\%$) was significantly lower than that in LETO rats ($91.8 \pm 2.1\%$ at 10^{-5} M acetylcholine, $P < 0.01$). Administration of α -lipoic acid significantly improved endothelium-dependent ($76.8 \pm 2.7\%$, $P < 0.01$ vs. untreated OLETF rats), but not endothelium-independent vasorelaxation. Urinary NO excretion was lower in OLETF group than in LETO group (1.48 ± 0.20 vs. 0.63 ± 0.04 pmol/100g weight/day). It was significantly increased in α -lipoic acid group to 1.50 ± 0.18 pmol/100g weight/day ($P < 0.001$).

Conclusion: OLETF rats showed impaired responsiveness in endothelium-dependent and endothelium-independent vasorelaxation and decreased urinary NO excretion. Administration of α -lipoic acid partly reversed endothelium-dependent vasorelaxation and urinary NO excretion in OLETF rats.

Key Words: OLETF rat, Atherosclerosis, Endothelium-dependent vasorelaxation, α -Lipoic acid, Diabetes

서 론

동맥경화증의 잘 알려진 위험 인자로 당뇨병이나 고혈압, 고지혈증, 흡연 등이 있으나 이러한 위험 인자들이 어떤 기전에 의해 동맥경화증을 일으키는지는 아직까지 확실히 규명되어 있지 않다. 최근에 이들 위험 인자들이 공통적으로 혈관 세포 내에서 반응성 산소기의 생성을 증가시키고 생성된 반응성 산소기는 혈관 염증 유전자의 발현을 증가시킴으로써 동맥경화증 발생에 기여한다는 가설이 제시되었다^{1,2}.

한편, 동맥경화증 발생에 있어 항산화제의 효과에 대한 연구가 보고되고 있지만 그 결과는 일치하지 않고 있다. 비타민 C나 비타민 E, probucol, N-acetylcysteine 등이 당뇨병에서 관찰되는 혈관 기능이상을 호전시켰다는 일부 보고³⁻⁶ 들이 있는 반면 효과를 관찰하지 못했다는 연구⁷⁻⁹ 도 있다. α -Lipoic acid는 강력한 항산화제로 체내에서는 dihydrolipoic acid로 전환되어 비타민 C나 비타민 E 같은 다른 항산화제를 재생시키며 세포내 glutathione 농도를 증가시키는 것으로 알려져 있다¹⁰. 특히 반응성 산소기를 제거하거나 전이 금속을 칼레이트화시

킬 뿐 아니라 신경에서의 혈류 증가나 운동, 감각 신경의 전도 속도를 호전시킨다고 알려져 최근 당뇨병성 신경병증에 사용이 증가되고 있는 약제인데^{11,12}, 아직 혈관 기능에 미치는 효과에 대한 연구는 보고되어 있지 않다.

Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) 쥐는 Long-Evans 쥐의 교잡종에서 유래된 당뇨 쥐로부터 선택적인 교배를 통해 얻어진 쥐로 비만이 동반되며 자연발생적인 고혈당을 보이는 당뇨병의 동물 모델이다. 특히 고혈당의 초기에는 인슐린 치료를 하지 않아도 생존이 가능하나 당뇨병이 진행되면서 결국 저인슐린혈증을 보이고 인슐린 치료가 필요한 상태로 전환되는 경과를 보이는 점에서 사람의 제2형 당뇨병과 병의 경과가 유사하다¹³. 또한 25주령과 30주령의 OLETF 쥐에서 혈관 기능의 이상이 동반됨이 보고된 바 있다^{14,15}.

본 연구는 산화 스트레스가 OLETF 쥐에서 나타나는 혈관 기능장애 및 혈관 이완 인자인 NO (nitric oxide; endothelium-derived relaxing factor)¹⁶ 생산에 어떤 영향을 미치는지, 그리고 항산화제인 α -lipoic acid의 투여로 혈관 기능 장애를 호전시킬 수 있는지를 알아보기 위해 시행되었다.

대상, 재료 및 연구 방법

대상 및 재료: 12주령의 수컷 OLETF 쥐와 비당뇨 대조군인 Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) 쥐를 사용하였다. 모든 쥐는 적정 온도 ($22 \pm 2^\circ\text{C}$)에서 12시간 명암 주기 하에서 사육되었고 물과 먹이를 자유롭게 먹을 수 있게 하였다. OLETF 쥐는 양군으로 나누어 한 군 (OLETF군, 11마리)은 표준 식이를 투여하였고 다른 한 군은 표준 식이에 α -lipoic acid

(Thiocticacid, ASTA Medica AG, Germany)를 0.5%로 섞어 12주부터 투여하였다 (α -lipoic acid 처리군, 6마리). LETO 쥐 (LETO군, 11마리)는 표준식이만 투여하였다. 26주에 LETO 쥐 (5 마리)와 OLETF 쥐 (5 마리)에서 대동맥 절편을 이용하여 혈관 기능에 대한 physiography를 1차로 시행하였고 40주에 남은 LETO 쥐 (6 마리)와 OLETF 쥐 (6 마리), 그리고 α -lipoic acid를 처리한 OLETF 쥐 (6 마리)에서 혈관 기능에 대한 physiography를 시행하였다¹⁷.

방법: Pentobarbital sodium 100 mg/kg 을 복막 내로 투여하여 쥐를 마취한 뒤 흉강을 열어 흉부대동맥의 일부를 1분 내에 적출하였다. 적출한 흉부대동맥을 차가운 Krebs physiological salt solution (KPSS)이 든 페트리 접시에 넣어 혈관내 혈액을 제거하고, 혈관에 장력이 걸리지 않도록 지방과 주변조직을 조심스럽게 박리 제거하였다. 이를 2 mm 넓이의 절편 두개로 나눈 뒤 두개의 스테인레스 스틸 와이어에 걸어 KPSS가 가득찬 이중벽의 organ bath에 담갔다. Organ bath에는 5%의 CO_2 와 95% O_2 를 공급하였고 37°C 로 유지하였다. 대동맥 절편은 우선 0.6 g의 장력을 걸어 60분 간 평형이 되도록 하였으며, 이후 한번 세척 후 3회 긴장시켜 총 2 g의 장력이 걸리게 한 뒤 본 실험에 들어갔다. 장력은 isometric force displacement transducer (Hugo Sachs ELEKTRONIK KG D-7806, F.R. Germany)로 측정하였고 다원기록법 (polygraph: Graphtec Linerrecorder mark8 WR3500)을 이용하여 기록하였다.

평형이 끝난 뒤 대동맥 절편을 $3 \times 10^{-7} \text{ M}$ 의 phenylephrine (Research Biochemicals International, MA, USA) 농도에서 전수축을 시키고 약 30분간 평형 상태 (plateau)가 되도록 기다린 후 20분 간격으로 acetylcholine (Sigma, MO, USA)을 10^{-9} M 에서 10^{-5} M 까지 점진적으로 농도를 증

가시켜 혈관의 내피 의존성 확장 (endothelium-dependent vasorelaxation) 정도를 측정하였다. 이후 phenylephrine과 acetylcholine을 깨끗이 씻어낸 뒤 대동맥 절편을 다시 KPSS 용액에서 재평형 상태를 유지시켰고 다시 phenylephrine으로 전수축시킨 후 sodium nitroprusside (Sigma, MO, USA)를 10^{-11} M에서 10^{-7} M까지 증가시키면서 같은 방법으로 내피 비의존성 혈관확장 (endothelium-independent vasorelaxation)을 측정하였다.

40주령에 각 군의 쥐에서 소변내 NO의 양을 측정하기 위해 항생제 (penicillin G, 1 mg/ml; streptomycin 1 mg/ml; amphotericin B, 0.25 mg/ml)가 포함된 수집통을 이용하여 오후 6시부터 다음날 오전 9시까지 15시간 동안 소변을 받아 모았다. NO의 농도는 Antek nitrite / nitrate reduction assembly와 NO 분석기 (model 745, model 7020; Antek Instruments, Inc., Houston, TX)를 이용하여 NO-specific chemiluminescence로 측정하였다. 1M NaOH나 0.1M VOSO₄로 NO 대사물을 환원시킨 뒤 자유 NO를 chemiluminescence spectrophotometer로 오존반응을 이용하여 측정하였는데 이 방법에 의하면 소변내 질산염과 아질산염을 함께 측정함으로써 체내 NO 대사산물의 총생산량을 추산할 수 있다. 소변 내 NO의 값은 각각 체중으로 보정하였다.

통계학적 분석: 모든 자료는 평균 표준오차로 표시하였고 acetylcholine과 nitroprusside에 의한 혈관의 이완 반응은 3×10^{-7} M phenylephrine으로 일어진 수축 반응에서 감소된 정도를 백분율로 표시하였다. 각 군 간의 체중과 소변내 NO 양의 차이 및 혈관 기능 검사에 대한 분석은 SPSS (SPSS Inc, Chicago, IL, USA)의 one-way analysis of variance (ANOVA) 및 Tukeys multiple comparison test를 이용하였다. P-value 가 0.05 미만인 경우에 통계적인 의의가 있는

것으로 간주하였다.

결 과

대동맥 절편을 이용한 혈관 기능 검사는 모두 같은 쥐에서 두개씩의 절편을 얻어 시행하였고 phenylephrine에 의한 전 수축 이후 acetylcholine을 이용하여 내피 의존성 혈관확장과 sodium nitroprusside에 의한 내피 비의존성 혈관 확장을 검사하였다. 26주에 시행한 혈관 기능 검사에서 우선 내피 의존성 혈관 확장은 10^{-7} M 부터 두 군 사이에 의미있는 차이를 보여 최

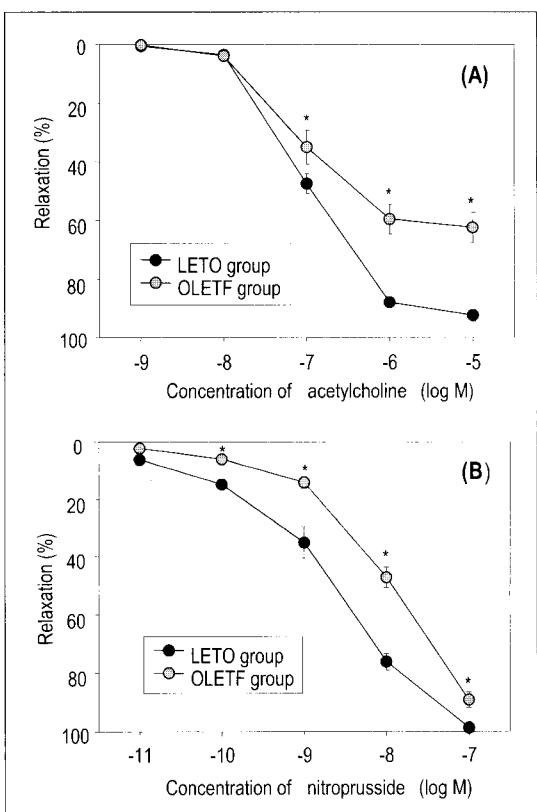


Fig. 1. Concentration-response curve for relaxation to (A) acetylcholine and (B) sodium nitroprusside after phenylephrine preconstriction at 26 weeks.
* p < 0.01

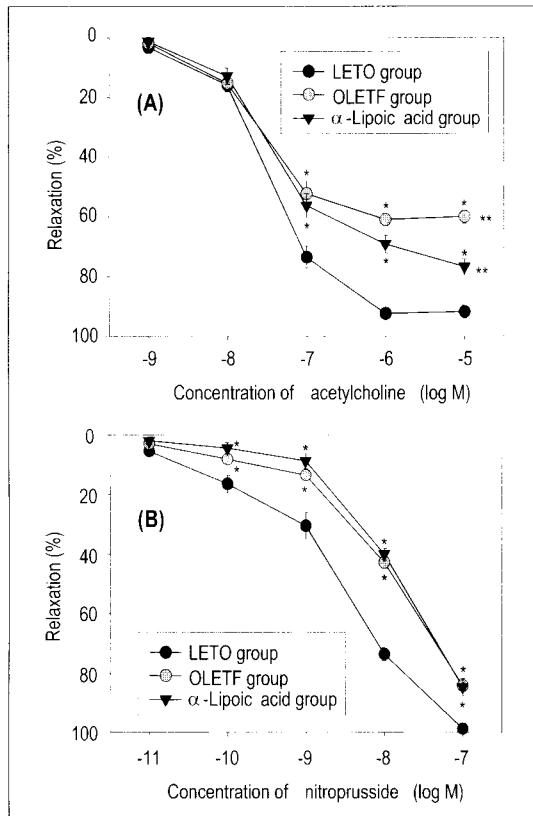


Fig. 2. Concentration-response curve for relaxation to (A) acetylcholine and (B) sodium nitroprusside after phenylephrine preconstriction at 40 weeks
* $p < 0.01$ vs. LETO group

종 10^{-5} M의 acetylcholine에서는 LETO 쥐 92.4 1.9%, OLETF 쥐 62.5 5.2%로 OLETF 쥐에서 의미있는 내피 비의존성 혈관 확장의 장애를 보였다 (Fig. 1A). 내피 비의존성 혈관 확장에 대한 검사에서도 10^{-10} M에서부터 두 군 사이에 의미 있는 혈관 확장의 차이를 보이기 시작하여 최종 10^{-7} M sodium nitroprusside에서는 OLETF 쥐에서 $89.2 \pm 2.6\%$ 로 LETO 쥐에서의 $98.7 \pm 0.5\%$ 에 비해 유의한 혈관 확장의 장애를 보였다 (Fig. 1B).

40주령의 경우 LETO 군은 10^{-7} M에서부터 급격한 혈관 이완이 생기면서 최종 10^{-5} M의 acetylcholine에서는 $91.8 \pm 2.1\%$ 의 이완을 보였

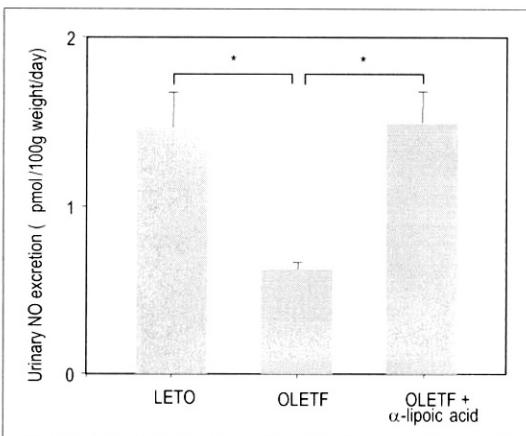


Fig. 3. Urinary NO excretion at 40 week.

$$* p < 0.001$$

다 (Fig. 2A). 반면 OLETF 군의 경우 10^{-7} M부터 LETO 군에 비해 의미있게 낮은 혈관이완을 보였고 최종 농도에서도 $60.1 \pm 2.1\%$ 의 낮은 값을 보여 비당뇨 대조군인 LETO 군과 의미있는 차이가 있었다 ($P < 0.001$). OLETF 쥐에 α -lipoic acid를 투여한 경우 역시 LETO 군에 비해 혈관 확장이 적었으나 acetylcholine 농도가 증가됨에 따라 호전을 보였고 최종 10^{-5} M에서는 OLETF 군에 비해 의미있는 호전을 보였다 ($76.8 \pm 2.7\%$, $P < 0.01$). 26주령 쥐의 경우와 마찬가지로 내피 비의존성 혈관확장도 LETO군의 경우 sodium nitroprusside 10^{-7} M에서 $98.8 \pm 0.6\%$ 의 이완을 보였으나 OLETF 군에서는 $84.3 \pm 1.7\%$ 로 혈관확장의 장애를 보였다. 그러나 α -lipoic acid 투여군 ($84.8 \pm 3.0\%$)과 투여하지 않은 OLETF 군 사이에 내피 비의존성 혈관확장의 차이를 보이지는 않았다 (Fig. 2B).

소변내 NO의 양은 LETO군에 비해 OLETF 군에서 0.63 ± 0.04 pmol/100 g weight/day로 유의하게 낮은 값을 보였으나 α -lipoic acid를 투여한 군에서는 1.50 ± 0.18 pmol/100 g weight/day로 LETO 군 (1.48 ± 0.20 pmol/100 g weight/day)과 차이를 보이지 않았다 (Fig. 3).

고 칠

본 연구에서 OLETF 쥐의 대동맥 절편을 이용하여 혈관 기능 검사를 시행하였을 때 26주와 40주에 모두 내피 의존성 혈관 확장 및 내피 비의존성 혈관 확장에 장애가 있음을 확인할 수 있었고, 항산화제인 α -lipoic acid의 투여로 내피 의존성 혈관확장 장애가 부분적으로 회복됨을 알 수 있었다. 또 소변 내 NO의 대사물이 OLETF 쥐에서 LETO 쥐에 비해 감소되어 있었고 α -lipoic acid 투여에 의해 증가하여 α -lipoic acid의 투여가 체내 NO의 양을 증가시켜 혈관 기능 회복에 기여할 가능성을 시사하였다.

본 연구의 결과 OLETF 쥐의 혈관 기능의 장애는 당뇨병 발병 이전인 26주에서부터 관찰되는데, 비만 상태에서 혈관 기능의 장애가 나타남은 여러 보고에서 지적된 바 있다. Steinberg 등¹⁸은 당뇨병이 동반되지 않은 비만한 환자에서 metacholine에 의한 다리의 혈류량의 증가가 비만하지 않은 대조군에 비해 약 반으로 감소되었다고 보고하였고 특히 인슐린저항성 정도나 비만의 지표에 따라 내피 의존성 혈관 확장의 장애가 연관되어 있다고 보고하여 비만, 인슐린 저항성이 독립적인 내피 기능 장애의 위험인자라는 것을 시사한 바 있다. 또 비만한 Zucker 쥐에서는 산화 스트레스 표지자인 혈액 내 F₂-isoprostane이 증가되어 있고 산화촉진물(pro-oxidant)을 투여하면 내피기능의 장애가 유발되어 확인된 바 있어^{19,20} 비만에 동반된 산화 스트레스의 증가가 당뇨병 발생 이전의 혈관 내피의 기능 장애를 유발하였을 것으로 해석되었다. 최근 비만 상태에서 세포 내 산화 스트레스가 증가하는 기전을 설명하기 위한 가설의 하나로 비만에 동반된 세포내 long-chain acyl-

CoA ester의 증가가 미토콘드리아의 adenine nucleotide translocator를 억제함으로써 미토콘드리아 내의 ADP를 감소시키고 이에 따라 전자 전달계에서 산소 자유기가 축적됨으로써 산화 스트레스를 증가시킬 수 있다는 주장이 있어 관심을 끌고 있다²¹. 이 가설에 따르면 ADP의 부족 상태에서는 ATP synthase에 의한 ATP 생산이 잘 되지 않기 때문에 ATP 생성에 동반되는 proton gradient의 감소가 일어나지 않고 따라서 미토콘드리아 막의 proton gradient가 증가되어 있는 상황이 유발된다고 한다. Proton gradient의 증가는 전자전달계에 의한 전자의 흐름을 방해하고 semiquinone 같은 중간 산물에서 superoxide의 생성을 증가시키는 것으로 알려져 있다²². 이런 일련의 반응성 산소기의 증가는 혈관 염증 유전자의 발현을 증가시고 동맥경화증의 발생을 촉진한다고 알려져 있다^{1,2}.

한편, 증가된 반응성 산소기는 NO의 불활성화를 통하여 혈관 기능이상을 유발할 수 있다는 연구 결과들도 보고되고 있다. Gryglowsky 등²³은 superoxide에 의하여 NO가 불활성화될 수 있음을 보고한 바 있고, 이후의 연구들에서도 혈관 내피에서 분비되는 혈관 확장 인자인 NO가 superoxide의 증가에 의해 불활성화되어 NO의 기능이 감소됨이 확인되었다^{24,25}. 한편 당뇨 쥐의 대동맥에 superoxide dismutase를 처리하면 일시적이었던 확장 반응이 지속되는 것을 관찰하여 당뇨병에서 관찰되는 내피 의존성 혈관확장 장애가 superoxide anion의 증가로 인한 NO의 파괴에 기인함이 보고되기도 하였다²⁶. NO는 superoxide 라디칼과 결합하여 peroxinitrite를 형성하게 되는데, 이 peroxinitrite는 NO와 같이 혈관에서 cGMP를 활성화시키기는 하지만 그 효과가 훨씬 낮아 결국 NO의 기능을 감소시키는 결과가 초래된다고 알려져 있다^{27,28}.

현재까지 α -lipoic acid에 의한 혈관 기능 호전에 대한 보고는 거의 없는 실정인데 Keegan 등²⁹은 streptozotocin 유발 당뇨 쥐에게 α -lipoic acid를 투여하였을 때 corpus cavernosum에서 acetylcholine에 의한 내피 의존성 혈관확장 장애가 호전됨을 보고한 바 있다. 이들에 의하면 당뇨 발생 이전부터 8주간 α -lipoic acid를 투여한 경우 최대 이완은 대조군과 같은 정도로 호전되었으나 당뇨 발생 4주 후부터 4주간만 α -lipoic acid를 투여한 경우 대조군과 비교하여 65% 정도의 호전을 가져왔다고 한다. 또 본 연구에서의 결과와 마찬가지로 내피 비의존성 혈관확장에서 α -lipoic acid 투여는 효과를 나타내지 못했다고 하였다. 본 실험에서는 12주령부터 α -lipoic acid를 투여하였는데 위의 실험 결과와는 달리 내피 의존성 혈관확장 장애의 부분적인 호전만을 보였다.

본 연구의 결과, OLETF 쥐에서 내피 의존성 혈관확장 장애와 함께 소변내 NO 배설량이 감소되어 있었고 α -lipoic acid의 투여로 혈관 기능이상이 일부 호전됨과 동시에 소변내 NO는 유의하게 증가되어 OLETF 쥐에서의 산화 스트레스의 증가가 NO 생성을 감소시킴으로써 혈관 기능장애를 유발하고 α -lipoic acid가 산화 스트레스를 감소시키고 NO를 증가시켜 혈관 기능장애를 호전시킬 가능성을 시사하고 있다. 본 연구에서 OLETF 쥐에 α -lipoic acid를 투여하였을 때에 NO 생산이 거의 완전히 호전되었으나 혈관 이완의 호전 정도는 부분적이었데 이는 OLETF 쥐에서 발생한 내피 의존성 혈관 이완의 이상 발생에는 산소 유리기에 의한 NO의 불활성화 이외에도 prostacyclin이나 EDHF (endothelium-derived hyperpolarizing factor)와 같은 다른 내피의존성 혈관확장 기전^{30~34}의 장애가 함께 있을 가능성이 있다. 혈관 확장이나 수축을 유발하는 여러 인자에는 NO 이외에도

prostacyclin이나 EDHF, endoperoxide, endothelin, angiotensin II 등이 관여할 수 있는데, 본 실험에서는 체내 NO의 대사물만을 측정하였기 때문에 혈관확장 반응의 호전에 다른 인자에 의한 변화가 함께 연관되었을 가능성은 배제할 수 없다. 한편 소변내 NO의 양이 체내 NO 생산을 잘 반영한다고 알려져 있으나 실제 증가된 NO가 혈관 내피에서 생산된 것인지에 관하여는 본 실험의 결과로는 확인할 수 없었다. NO는 L-arginine을 기질로 NO synthase와의 반응으로 형성되는데 본 실험을 결과를 좀더 뒷받침하기 위해 혈관 내피세포에서 NO synthase (eNOS)의 mRNA나 단백질을 측정해 보는 것도 도움이 되리라 생각된다.

본 연구의 또 다른 한계점으로는 α -lipoic acid 투여에 의한 혈관확장 반응이나 체내 NO 양의 변화를 비당뇨 대조군인 LETO 쥐에서 시행하지 못해 대조군에서 α -lipoic acid의 효과를 확인하지 못한 단점이다. 만일 LETO 쥐에게 α -lipoic acid를 투여하였을 때 혈관 확장 반응에 유의한 차이가 나타나지 않는다면 본 연구의 가설을 더욱 강화시키는 결과가 될 것으로 생각된다.

참고문헌

- Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. N Engl J Med 1989;320:915-929
- Alexander RW. Theodore Cooper Memorial Lecture. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis: oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new

- perspective. *Hypertension* 1995;25:155-161
3. Tesfamariam B, Cohen RA. Free radical mediate endothelial cell dysfunction caused by elevated glucose. *Am J Physiol* 1992; 263:H321-H326
 4. Pieper GM, Siebeneich W. Oral administration of antioxidant, N-acetyl cysteine, abrogates diabetes-induced endothelial dysfunction. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;32:101-105
 5. Keegan A, Walbank H, Cotter MA, Cameron NE. Chronic vitamin E treatment prevents defective endothelium-dependent relaxation in diabetic rat aorta. *Diabetologia* 1995;38: 1475-1478
 6. Ting HH, Timimi FK, Boles KS, Creager SJ, Ganz P, Creager MA. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1996;97:22-28
 7. Simons LA, von Konigsmark M, Simons J, Stocker R, Celermajer DS. Vitamin E ingestion dose not improve arterial endothelial dysfunction in older adults. *Atherosclerosis* 1999;143:193-199
 8. McDowell IF, Brennan GM, McEneny J, Young IS, Nicholls DP, McVeigh GE, Bruce I, Trimble ER, Johnston GD. The effect of probucol and vitamin E treatment on the oxidation of low-density lipoprotein and forearm vascular responses in humans. *Eur J Clin Invest* 1994;24:759-765
 9. Creager MA, Roddy MA, Boles K, Stamler JS. N-acetylcysteine dose not influence the activity of endothelium-derived relaxing factor in vivo. *Hypertension* 1997;29:668-672
 10. Han D, Tritschler HJ, Packer L. α -Lipoic acid increases intracellular glutathione in a human T-lymphocyte Jurkat cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;207:258-264
 11. Packer L, Witt EH, Tritschler HJ. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Rad Biol Med* 1995;19:227-250
 12. Nagamatsu M, Nickander KK, Schmelzer JD. Lipoic acid improves nerve blood flow, reduces oxidative stress and improves distal nerve conduction in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes Care* 1995;18:1160-1167
 13. Kawano K, Hirashima T, Mori S, Kurosumi M, Natori T. Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complication, Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty strain. *Diabetes* 1992;41:1422-1428
 14. Sakamoto S, Minami K, Niwa Y, Ohnaka M, Nakaya Y, Mizuno A, Kuwajima M, Shima K. Effect of exercise training and food restriction on endothelium-dependent relaxation in the Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rat, a model of spontaneous NIDDM. *Diabetes* 1998;47:82-86
 15. Saito S, Nakamura T, Ohyama Y, Suzuki T, Iida A, Shiraki-Iida T, Kuro-o M, Nabeshima Y-I, Kurabayashi M, Nagai R. In vivo klotho gene delivery protects against endothelial dysfunction in multiple risk factor syndrome. *Biochem Biophys Res Comm* 2000;276: 762-767
 16. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biologic activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987;327:524-526
 17. Gros R, Borkowski KR, Feldman RD. Human insulin-mediated enhancement of vascular

- adrenergic responsiveness. *Hypertension* 1994; 23:551-555
18. Steinberg HO, Chaker H, leaming R, johnson A, Brechtel G, Baron AD. Obesity/Insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. *J Clin Invest* 1996;97:2601-2610
 19. Laight DW, Desai KM, Gopaul NK, Anggard EE, Carrier MJ. F2-isoprestane evidence of oxiant stress in the insulin resistant, obese Zucker rat: effects of vitamin E. *Eur J Pharmacol* 1999;377:89-92
 20. Laight DW, Desai KM, Anggard EE, Carrier MJ. Endothelial dysfunction accompanies a pro-oxidant, pro-diabetic challenge in the insulin resistant, obese Zucker rat *in vivo*. *Eur J Pharmacol* 2000;402:95-99
 21. Bakker SJL, IJzerman RG, Teerlink T, Westerhoff HV, Gans ROB, Heine RJ. Cytosolic triglycerides and oxidative stress in central obesity: the missing link between excessive atherosclerosis, endothelial dysfunction, and -cell failure? *Atherosclerosis* 2000; 148:17-21
 22. Boss O, Hagen T, Lowell BB. Uncoupling protein 2 and 3 potential regulators of mitochondrial energy metabolism. *Diabetes* 2000; 49:143-156
 23. Gryglewsky RJ, Palmer RM, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1986;320:454-458
 24. Laight DW, Kaw AV, Anggard EE, Carrier MJ. Interaction between superoxide anion and nitric oxide in the regulation of vascular endothelial function. *Br J Pharmacol* 1998; 124:238-244
 25. Darley-Usmar V, White R. Disruption of vascular signalling by the reaction of nitric oxide with superoxide: implications for cardiovascular disease. *Exp Physiol* 1997;82: 305-316
 26. Hattori Y, Kawasaki H, Abe K, Kanno M. Superoxide dismutase recovers altered endothelium-dependent relaxation in diabetic rat aorta. *Am J Physiol* 1991;261:H1086-094
 27. Mayer B, Schrammel A, Klatt P, Koesling D, Schmidt K. Peroxinitrite-induced accumulation of cGMP in endothelial cells and stimulation of purified soluble guanylyl cyclase. *J Biol Chem* 1995;270:17355-17360
 28. Tarpey MM, Beckman JS, Ischiropoulos H, Gore JZ, Brock TA. Peroxinitrite stimulates vascular smooth muscle cell cyclic GMP synthesis. *FEBS Lett* 1995;364:314-318
 29. Keegan A, Cotter MA, Cameron NE. Effects of diabetes and treatment with the antioxidant -lipoic acid on endothelial and neurogenic responses of corpus cavernosum in rats. *Diabetologia* 1999;42:343-350
 30. Chen G, Suzuki H, Weston AH. Acetylcholine releases endothelium derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. *Br J Pharmacol* 1988;95:1165-1174
 31. Furchtgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-376
 32. Garland CJ, Plane F, Kemp BK, Cocks TM. Endothelium-dependent hyperpolarization: a role in the control of vascular tone. *Trends Pharmacol Sci* 1995;16:23-30
 33. Komori K, Vanhoutte PM. Endothelium

- dependent hyperpolarizing factor. Blood Vessels 1990;27:238-245
34. Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR. An enzyme isolated from arteries trans-
- forms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. Nature 1976;263:663-665