

과당식이 고혈압 흰쥐에서 혈관 Endothelin-1과 산화질소합성효소의 발현

광주보건대학 물리치료과

백윤웅 · 김명훈

Expression of Vascular Endothelin-1 and Nitric Oxide Synthase in Fructose-fed Hypertensive Rats

Paek, Yun-Woong Ph.D., Kim, Myung-Hoon, Ph.D., P.T.

Department of Physical Therapy, Kwangju Health College

- ABSTRACT -

Rats that are fed a fructose-rich diet develop hypertension, insulin resistance, and hypertriglyceridemia. To elucidate whether altered expression levels of endothelin-1 and nitric oxide synthase are related to the development of insulin-resistant hypertension, we examined the present study. Male Sprague-Dawley rats were fed a fructose-rich diet for 5 weeks. Systolic blood pressure significantly increased in fructose-fed rats. While serum free fatty acid and plasma nitrite/nitrate levels did not significantly differ between the fructose-fed and control groups, plasma insulin and serum triglyceride concentrations significantly increased in the former. Endothelin-1 mRNA expression in the aorta increased in fructose-fed rats. Neither the protein expression of constitutive nitric oxide synthase nor that of inducible nitric oxide synthase were significantly affected by fructose feeding.

However, nitrite/nitrate levels in the aorta were significantly increased. These results suggest that an increase in vascular endothelin-1 is an important contributing factor to the development of hypertension in fructose-fed rats. However, the vascular nitric oxide pathway may not be causally related to the development of fructose-induced hypertension.

Key words : Hypertension, Endothelin-1, Nitric Oxide Synthase, Fructose

I. 서 론

흰쥐가 과당식이를 하면 인슐린 저항성, 고혈압, hypertriglyceridemia 등이 발생한다(Zavaroni et al, 1982). 인슐린 저항성은 자발적 고혈압 흰쥐(SHR)와 Dahl salt-sensitive rat(DSR)과 같은 유전적 고혈압 쥐에서도 발생한다(Hulman et al, 1933; Reaven et al, 1991). 이에 반하여 과당식이를 하면서 동시에 somatostatin의 주입은 hyperinsulinemia의 개선을 가져오고 과당식이에 의해 유도된 고혈압을 현저하게 완화시킨다(Reaven et al, 1989). 또한, 인슐린 저항성을 낮추는 약물은 항고혈압 효과가 있다(Lee et al, 1994). 이런 결과들을 볼때 인슐린 저항성과 hyperinsulinemia은 고혈압의 병인에 중요한 요소임을 알 수 있다. 또 다른 요소들 중 혈관내피세포의 기능부전은 인슐린 저항성 증후의 필수 구성 요소이다(Raj, 1999). Steinberg 등(1994)은 인슐린이 산화질소(nitric oxide, NO)의 분비를 촉진시킨다고 하였고 Baron 등(1995)은 인슐린 저항성은 내피세포 의존성 혈관확장의 손상과 관련이 있다고 하였다. 내피세포 의존성 혈관이완의 손상은 과당식이 고혈압 흰쥐에서 보고되었다(Katakam et al, 1998). 하지만 인슐린 저항성 고혈압의 기작은 아직까지 확립되어 있지 않다. 내피세포의 산화질소계 교란은 고혈압의 발달과 연관되어 있다. 내피세포 기능부전의 기작은 고혈압의 모델에 따라 차이가 있다. 자발적 고혈압 흰쥐에서 아세틸콜린에 대한 혈관이완 반응의 감소는 cyclooxygenase 의존성 수축인자의 생산 때문이고 혈관의 constitutive nitric oxide synthase(cNOS) 활성은 증가되지만(Luscher et al, 1990; Hayakawa and Raj, 1997) 다른 고혈압 모델에서는 산화질소 생산의 감소가 일반적이다(Rebeiro et al, 1992). Hayakawa와 Raj(1997)의 연구에서는 DSR에서 항고혈압 치료가 혈압과 대동맥 cNOS활성을 정상화시킴을 보여줬다. 그러나 아직까지 고혈압의 인슐린 저항성 모델인 과당식이에서 혈관 NO합성에 대한 어떠한 연구도 없었다. 지난 십여년간 혈관수축 대한

endothelin-1 (ET-1)의 효과는 잘 밝혀졌다(Yanagisawa et al, 1988). 인슐린은 내피세포에서 endothelin-1의 분비와 유전자의 발현을 증가시키고(Oliver et al, 1991; Hattori et al, 1991) 혈관의 평활근 세포에서 endothelin-1 수용체의 발현을 증가시킨다(Frank et al, 1993). 과당식이 흰쥐에 장기간 endothelin-1 길항제를 처리하면 혈압의 증가는 완화된다(Verma et al, 1995). 이와같이 endothelin-1도 hyperinsulinemic state에서 고혈압의 발달에 관련이 있을 보여준다.

고혈압, 당뇨병과 같은 성인병의 치료방법은 식사, 운동, 약물치료가 있지만 거의 약물치료에 의존해온게 사실이다. 운동치료의 중요성을 알면서도 생리, 생화학적 기작이 복잡하여 이해하기 힘들기 때문에 물리치료에서 운동치료에 대한 연구는 충분히 이해되지 않고 기초, 임상양면에서 연구가 부족한 실정이다. 앞으로 노령화 시대로 접어들면서 더욱더 이러한 성인병 환자는 늘어나게 되고 결국 성인병 치료에도 물리치료가 관심을 가져야 될것이며 이러한 기초적인 고혈압의 발병기전을 이해하는 것은 운동치료의 효과를 극대화 시키리라 생각한다.

그래서 본 연구에서는 후천성 인슐린 저항성 고혈압의 발달에 NO합성과 endothelin-1이 관련이 있는지 알아보기 위해, 흰쥐에게 과당식이를 하게 하여 고혈압을 유발시켰으며 혈관에서 산화질소합성효소 단백질과 endothelin-1 mRNA을 분석하고 혈관 NO합량도 측정하였다.

II. 연구 방법

1. 실험동물 및 일반적 절차

본 연구는 전남대 의과학 연구소에서 2000년 3월부터 2001년 2월까지 실험하였고, 실험동물은 고혈압 모델에 일반적으로 많이 사용되는 건강한 정상 흰쥐들 중 체중이 약 130g인 수컷 흰쥐(Sprague-Dawley)를 사용하였다. 대조군은 일반사료를, 실험군은 과당

식이(fructose diet) (Harlan Teklad, Madison, WI)를 5주 동안 먹였다. 수축기 혈압은 의식이 있는 상태에서 tail-cuff 방법으로 매주 측정하였다. 혈액은 단두(decapitation)하여 1 mg/mL ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA)가 포함된 튜브에 수집하였고 대동맥 혈관 조직은 절제하여 액체질소에 재빨리 얼려 -80 에 보관하여 실험에 사용하였다. 혈액은 원심 분리하여 혈청이나 혈장으로 분리하였다. 혈장의 포도당 농도는 Beckman Glucose Analyzer II(Beckman-Coulter, Fullerton, CA), 혈청 triglyceride (TG)는 효소분석법(Boehringer, Mannheim, Germany), 인슐린은 radioimmunoassay kit(Linco, St. Charles, MO), 지방산은 비색법(Wako, Osaka, Japan)으로 분석되었다.

2. RT-PCR(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)에 의한 endothelin-1 mRNA 발현 비교

RNA는 Ultraspec™ RNA 분리계(Biotech Laboratories, Inc., Houston, Tx, USA)를 이용하여 Chomczynski와 Sacchi(1987)의 방법으로 대동맥 조직으로부터 분리해냈다. 역전사(reverse transcription)를 위하여 Gibco사(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)의 방법에 따라서 total RNA 1 µg을 사용하여 최종 volume이 20 µl가 되게 하였다. PCR은 바이오니아 kit(Bioneer, Korea)를 사용하였다. Endothelin-1의 PCR 조건은 94°C에서 2분간 denaturation, 56°C에서 45초간 annealing, 72°C에서 1.5분 extension 과정을 밟았다. β-actin은 94°C에서 45초간 denaturation시킨 후, 56°C에서 45초간 annealing, 72°C에서 1분 30초간 extension시켰다. Endothelin-1 그리고 β-actin의 oligonucleotide 서열은 다음과 같다. Endothelin-1 primers는 (sense primer, 5' - ATGGATTATTTTCCCGTGAT-3', antisense primer 5' -GGGAGTGTGACCCAGATGA-3')이

며, 최종산물은 231bp이고 β-actin primers는 (sense primer: 5' -GACTACCTCATGAAGATCCTGACC-3' : antisense primer: 5' -TGATCTTCATGGCTAGGAGCC-3')이며, 최종산물은 423bp이다. PCR 산물은 ethidium bromide가 함유된 1.5% agarose gel에 전기영동하여 UV transilluminator로 비추어 사진을 찍은 후 endothelin-1 mRNA의 발현정도를 IMAGER™ & 1D MAIN(Bioneer, Korea)을 이용하여 정량화하였다.

3. 산화질소합성효소의 western blot analysis

대동맥 조직을 250 mmol/L sucrose, 1 mmol/L EDTA, 0.1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, 50 mmol/L potassium phosphate(pH 7.7)가 들어있는 용액 내에서 조직분쇄기(Kinematica, Littau, Switzerland)로 3,000 rpm에서 균질화하였다. 그리고 온도 4 조건에서 3,000×g로 5분, 그리고 10,000×g로 10분 동안 두 번 원심분리 하였다. 조직 균질액을 다시 100,000×g에서 60분 동안 한번 더 원심분리 하였다. 원심분리하여 생성된 pellet은 용해하여 cNOS 단백질 분석에 사용하였고 상등액은 inducible nitric oxide synthase(iNOS)분석을 위하여 사용하였다. 조직 균질액의 단백질 농도는 BCA protein assay kit(Pierce, Rockford, IL)을 사용하여 측정하였다. 단백질 blotting을 위하여 단백질 시료(30 ug per lane)를 7.5% polyacrylamide resolving gel과 5% polyacrylamide stacking gel로 이루어진 비연속성계를 이용하여 전기영동하였다. 그런 다음 단백질을 전기영동하여 Nitroplus membrane(Boehringer Mannheim)에 옮겼다. 이 membrane을 Tris로 완충한 식염수(TBS)에 씻고 TBS에 용해시킨 5% 무지방 건조 우유 용액(NFM/TBS)에서 blocking하고, 2% NFM/TBS로 monoclonal anti-cNOS와 iNOS(Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA)를 1대 2,000의 비율로 희석한 용액에서 실온에서 1시간

동안 incubation하였다.

그런 다음 membrane을 2% NFM/TBS에서 1시간 동안 1:1,000으로 희석된 2차 항체(horseradish peroxidase conjugated anti-mouse immunoglobulin) 함께 반응시킨다. 결합된 항체를 hyperfilm (Amersham, Buckinghamshire, England)에 나타나는 chemiluminescence (Amersham)로 측정하였다. 단백질 밴드는 IMAGERTM & ID MAIN(Bioneer, Korea)을 이용하여 분석하였다.

4. 혈장과 대동맥 혈관의 nitrite /nitrate(NOx) 측정

혈장 및 대동맥 조직의 산화질소 생성량의 측정은 NO₂⁻ 농도를 비색법에 의한 산화질소 분석 kit(Oxford Biomedical Research, MI, USA)를 이용하여 측정하였다. 혈장이나 조직에서 단백질을 제거하기 위해 100°C에서 5분간 끓인 뒤 10,000×g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 산화질소 정량에 이용하였다. Griess 시약을 이용한 NO₂⁻의 분광학적 분석은 65 μL MOPS(50 mM MOPS/1 mM EDTA) 완충용액, pH 7.0에 20 μL의 조직이나 혈장의 상층액을 첨가하였다. NO₃⁻를 NO₂⁻로 환원시키기 위하여 Nitrate 환원효소(0.01 U)와 10 μL의 2 mM NADH를 차례로 첨가하여 37°C에서 20분간 반응시켰다. 발색 시약인 sulfanilamide와 N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride를 첨가하여 microtiter plate reader(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 검량선은 0.5 M~25 M의 NO₂⁻ 용액을 이용하여 측정하였고 이 검량선을 이용하여 시료의 NO₂⁻ 농도를 측정하였다.

5. 자료처리

모든 실험결과는 mean SEM으로 표시하였다. 각 군과의 차이는 Student's t-test를 이용하였으며 통계

적 유의수준은 .05로 하였다.

III. 결 과

실험기간 동안 대조군에 비하여 과당식이 그룹에서 수축기 혈압은 그림 1과 같이 현저히 높았다. 체중, 혈장 포도당 농도, 인슐린, triglyceride와 지방산의 수준은 표 1에 보여주고 있다. 체중, 혈장 포도당 농도는 실험기간 동안 실험군과 대조군 사이에 차이가 없었다. 혈청의 triglyceride와 혈장 인슐린은 과당식이 그룹에서 유의성 있게 증가되었다. 혈청의 지방산은 두 그룹 사이에 차이가 없었다. Endothelin-1 mRNA의 PCR결과는 그림 2에 보여주는 바와 같이 과당식이 그룹에서 증가하였다(p<.001). 대동맥 혈관 조직의 western blot분석은 그림 3에 보여주고 있고, 산화질소합성효소인 cNOS 단백질과 iNOS 단백질 발현 수준은 두 그룹간에 차이가 없었다. 그러나 NO_x함량은 대동맥 조직에서 과당식이 그룹에서 증가되었고 혈장의 NO_x농도는 차이가 없었다.

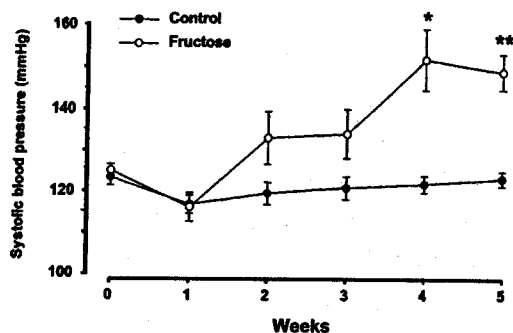


Fig. 1. Systolic blood pressure in control and fructose-fed rats (n = per group).

*P<.005, **P<.001 v control.

Table 1. Metabolic characteristics in control and fructose-fed experimental rats after 5 weeks of dietary treatment

Characteristic	Control	Fructose-fed	P
Body weight(g)	296.6 ± 8.9	303.8 ± 7.6	NS
Plasma glucose(mg/dL)	66.0 ± 4.2	72.6 ± 2.3	NS
Plasma insulin(U/mL)	18.2 ± 0.5	33.6 ± 0.8	.001
Serum TG(mg/dL)	123.3 ± 23.8	381.3 ± 37.5	.008
Serum FFA(mmol/L)	0.36 ± 0.03	0.40 ± 0.09	NS

NOTE. Data are the mean SEM (n = 9 per group)

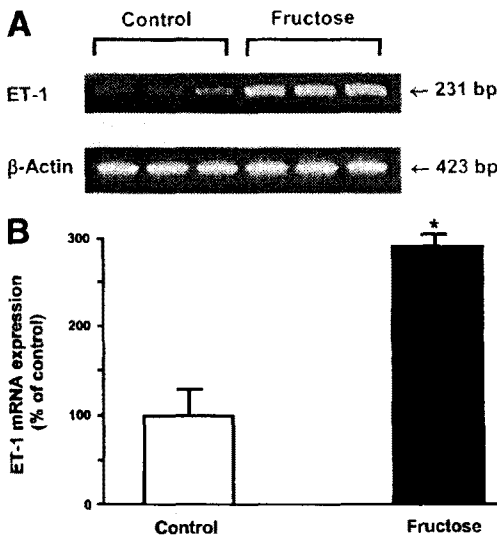


Fig. 2. Representative RT-PCR products and quantification of ET-1 mRNA expression in aortic tissues (n = 6 rats each). The mean volume of amplification products in control rats was taken as 100%. *P<.001 v control.

IV. 고찰

인슐린 저항성과 hyperinsulinemia은 서로 상반적이지만 고혈압 발생에 관련이 있고(Hulman et al,

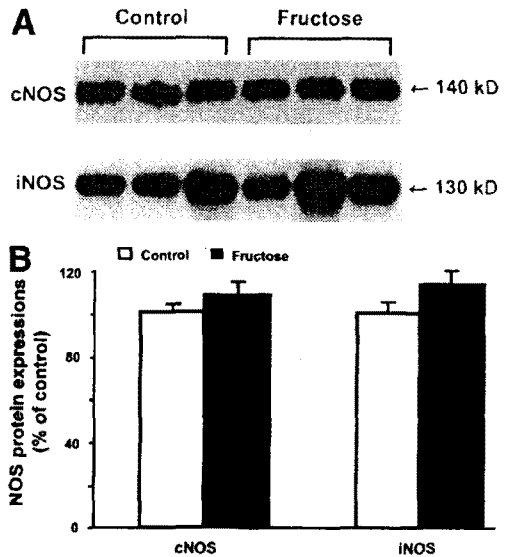


Fig. 3. Representative western blots and densitometric quantification of cNOS and iNOS protein expression in aortic tissue (n = 6 experiment each).

1993; Reaven et al, 1991; Haffner et al, 1992) 이러한 기작을 이해하는데 아직 많은 연구가 필요하다.

내피세포에서 유래된 혈관 수축인자와 이완인자들의 합성과 분비 양상의 변화는 고혈압의 발달에 영향을 미친다(Rebeiro et al, 1992; Luscher and Vanhoutte, 1986; Kato et al, 1990). 내피세포 의존성 혈관확장의 손상은 과당식이 후, 18일경 나타나고 약 28일까지 혈압은 크게 상승하지 않는다(Katakam et al, 1988). 이것은 내피세포 기능부전이 고혈압의 발달을 진행시킨다는 것을 시사한다. 본 연구에서도 서서히 수축기 혈압이 상승하여 고혈압이 유발되었으며 대동맥 혈관 조직의 endothelin-1 mRNA 발현이 과당식이 그룹에서 3배 이상 증가하였는데 이러한 결과는 Verma 등(1995), Juan 등(1998)의 결과와 유사하다. 인슐린은 내피세포에서 endothelin-1의 분비와 유전자 발현을 촉진시킨다(Oliver et al, 1991; Hattori et al, 1991). 혈청 triglyceride의 상승에 수반

되는 인슐린의 생리적 증가는 고혈압 환자에서 나타나는 수준까지 동맥 endothelin-1을 증가시킨다(Piatti et al, 1996). 본 실험의 결과에서도 고혈압과 수반되어 인슐린이 약간 증가하였고 혈청 triglyceride는 현저히 상승하였다. 이것은 인슐린 저항성이나 hyperinsulinemia, 모두에서 endothelin-1의 증가가 필요함을 보여준다. 그러나 고혈압에서 혈장 endothelin-1 수준은 증가한다는 결과와 변화지 않는다는 결과가 논쟁이 되고 있다(Kohno et al, 1990; Schiffrin et al, 1991). Verma 등(1995)과 Juan 등(1998)의 결과에서는 혈장 endothelin-1의 수준은 과당식이 고혈압 그룹과 대조군 사이에 차이가 없었다. Endothelin-1은 paracrine방식으로 작용하여 고혈압의 발달에 연관이 될 것이라 추측한다. 그리고 또 하나의 논쟁거리는 endothelin-1발현의 증가가 고혈압의 원인보다는 결과라는 것이다. Endothelin-1은 norepinephrine, angiotensin II, serotonin과 같은 혈관 수축제의 효과를 강화시켜서(Yanagisawa et al, 1988; Dohi et al, 1992), endothelin-1을 정맥주사시에 혈압이 심각하게 높게 유지된다(Kiowski, 1991). Verma 등(1995)은 과당식이 흰쥐에게 장기간 endothelin-1 길항제를 투여하면 혈압상승이 억제됨을 밝혔고 장간막의 endothelin-1의 증가는 길항제의 의해 변하지 않음을 보여주었다. 내피세포에 의한 혈관 이완의 손상은 많은 실험 고혈압 동물에서 NO생산의 감소를 가져왔다(Chou et al, 1998). DSR 고혈압에서 대동맥 NOS활성은 대조군에 비하여 감소되었으나(Hayakawa et al, 1997) SHR에서는 cNOS 발현이 촉진되어 NO생산이 증가하였다(Hayakawa et al, 1997; Nava et al, 1998; Sakurai et al, 1992). 내피세포에 의한 이완은 SHR과 DSR에서 대동맥 혈관에서 손상되며, 그것은 indomethacin에 의해 SHR에서는 정상화되지만 DSR에서는 그렇지 못하다(Luscher and Vanhoutte, 1986). 이러한 결과는 SHR 고혈압의 발달에 cyclooxygenase유래 혈관 수축 인자가 관여하기 때문임을 보여준다. 반대로 DSR 고혈압에서는 항고혈압제에 의해 혈압이 감소될 때 대동

맥에서 내피세포 유래 혈관 이완뿐만 아니라 cNOS활성도 정상화된다. 결론적으로 유전적으로 고혈압이 되기 쉬운 SHR과 DSR에서 cNOS활성의 변화는 고혈압의 원인보다는 결과임을 보여준다. 그렇지만 과당식이 고혈압 동물에서 혈관 NO경로에 관한 연구는 아직까지 없어서 본 연구에서 조사한 바에 의하면 NOS단백질 발현이 과당식이 흰쥐에서 변화가 없었으나 대동맥 NOx수준은 크게 증가하였다. 그래서 과당식이 고혈압은 혈관 NO경로의 활성도의 감소 때문일 것 같지는 않다. NOS 단백질 발현의 변화없이 NOx함량의 증가는 NOS활성도의 증가를 의미한다. Endothelin-1이 내피 ETB 수용체의 활성을 통한 NO생산을 촉진시킨 후(Juan et al, 1998; Sakurai et al, 1992), NOx함량의 증가는 endothelin-1의 증진된 활성에 의하여 설명된다.

본 연구의 결과에서 혈관 endothelin-1의 증가는 과당식이 흰쥐 고혈압의 발달에 중요한 요소임을 제시하고 혈관 NO경로는 과당식이 고혈압의 발달에 연관되지는 않음을 보여준다.

V. 결 론

수컷 흰쥐를 5주 동안 대조군은 일반사료를 실험군은 과당식을 먹여 고혈압을 유발시켰다. 실험 4주부터 대조군에 비교하여 과당식이 그룹에서 수축기 혈압은 현저히 높았다.

혈청 지방산과 혈장 NOx 수준은 실험군과 대조군 사이에 차이가 없었다. 혈장 인슐린과 혈청 triglyceride 농도가 과당식이 그룹에서 유의성 있게 증가되었다. 대동맥 endothelin-1 mRNA의 발현은 과당식이 그룹에서 증가하였다. 대동맥 혈관 조직의 산화질소합성효소 단백질 발현 수준은 두 그룹간에 차이가 없었다. 그러나 대동맥 NOx수준은 과당식이 그룹에서 증가되었다. 이러한 결과는 혈관 endothelin-1의 증가가 과당식이 고혈압의 발달에 영향을 미치지만 혈관 산화질소는 고혈압 유도 초기경로에 관여하지 않음을 시사한다.

참 고 문 헌

- Baron AD, Steinberg HO, Chaker H, et al. Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation contributes to both insulin sensitivity and responsiveness in lean humans. *J Clin Invest*, 96:786-792, 1995.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162:156-159, 1987.
- Chou TC, Yen MH, Li CY, et al. Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats. *Hypertension*, 31:643-648, 1998.
- Dohi Y, Hahn AW, Boulanger CM, et al. Endothelin stimulated by angiotensin II augments contractility of spontaneously hypertensive rat resistance arteries. *Hypertension*, 19:131-137, 1992.
- Frank HJ, Levin ER, Hu RM, et al. Insulin stimulates endothelin binding and action on cultured vascular smooth muscle cells. *Endocrinology*, 133:1092-1097, 1993.
- Haffner SM, Valdez RA, Hazuda HP, et al. Prospective analysis of the insulin-resistance syndrome (syndrome X). *Diabetes*, 41:715-722, 1992.
- Hattori Y, Kasai K, Nakamura T, et al. Effect of glucose and insulin on immunoreactive endothelin-1 release from cultured porcine aortic endothelial cells. *Metabolism*, 40:165-169, 1991.
- Hayakawa H, Raji L. The link among nitric oxide synthase activity, endothelial function, and aortic and ventricular hypertrophy in hypertension. *Hypertension*, 29:235-241, 1997.
- Hulman S, Falkner B, Freyvogel N. Insulin resistance in the conscious spontaneously hypertensive rat: Euglycemic hyperinsulinemic clamp study. *Metabolism*, 42:14-18, 1993.
- Juan CC, Fang VS, Hsu YP, et al. Overexpression of vascularendothelin-1 and endothelin-A receptors in a fructose-induced hypertensive rat model. *J Hypertens*, 16:1775-1782, 1998.
- Katakam PV, Ujhelyi MR, Hoenig ME, et al. Endothelial dysfunction precedes hypertension in diet-induced insulin resistance. *Am J Physiol*, 275:R788-R792, 1998.
- Kato T, Iwama Y, Okumura K, et al. Prostaglandin H2 may be the endothelium-derived contracting factor released by acetylcholine in the aorta of the rat. *Hypertension*, 15:475-481, 1990.
- Kiowski W. Endothelial function in humans. Studies of forearm resistance vessels. *Hypertension*, 18:II84-89, 1991.
- Kohno M, Yasunari K, Murakawa K, et al. Plasma immunoreactive endothelin in essential hypertension. *Am J Med*, 88:614-618, 1990.
- Lee MK, Miles PD, Khourshed M, et al. Metabolic effects of troglitazone on fructose-induced insulin resistance in the rat. *Diabetes*, 43:1435-1439, 1994.
- Luscher TF, Aarhus LL, Vanhoutte PM. Indomethacin improves the impaired endothelium-dependent relaxations in small mesenteric arteries of the spontaneously hypertensive rat. *Am J Hypertens*, 3:55-58, 1990.
- Luscher TF, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*, 8:344-348, 1986.
- Nava E, Farre AL, Moreno C, et al. Alterations to the nitric oxide pathway in the spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens*, 16:609-615, 1998.
- Oliver FJ, de la Rubia G, Feener EP, et al.

- Stimulation of endothelin-1 gene expression by insulin in endothelial cells. *J BiolChem*, 266:23251-23256, 1991.
- Piatti PM, Monti LD, Conti M, et al. Hypertriglyceridemia and hyperinsulinemia are potent inducers of endothelin-1 release in humans. *Diabetes*, 45:316-321, 1996.
- Raj L. Nitric oxide, salt sensitivity, and cardiorenal injury in hypertension. *Semin Nephrol*, 19:296-303, 1999.
- Reaven GM, Ho H, Hoffmann BB. Somatostatin inhibition of fructose-induced hypertension. *Hypertension*, 14:117-120, 1989.
- Reaven GM, Twersky J, Chang H. Abnormalities of carbohydrate and lipid metabolism in Dahl rats. *Hypertension*, 18:630-635, 1991.
- Rebeiro MO, Antunes E, DeNucci G, et al. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis: A new model of arterial hypertension. *Hypertension*, 20:298-303, 1992.
- Sakurai T, Yanagisawa M, Masaki T. Molecular characterization of endothelin receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 13:103-108, 1992.
- Schiffrin EL, Thibault G. Plasma endothelin in human essential hypertension. *Am J Hypertens*, 4:303-308, 1991.
- Steinberg HO, Brechtel G, Johnson A, et al. Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent. A novel action of insulin to increase nitric oxide release. *J Clin Invest*, 94:1172-1179, 1994.
- Verma S, Bhanot S, McNeill JH. Effect of chronic endothelin blockade in hyperinsulinemic hypertensive rats. *Am J Physiol*, 269:H2017-H2021, 1995.
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 332:411-415, 1988.
- Zavaroni I, Chen YD, Reaven GM. Studies of the mechanism of fructose-induced hypertriglyceridemia in the rat. *Metabolism*, 31:1077-1083, 1982.