

血管内皮細胞におけるメチルグリオキサールによるスーパーオキシドの産生

立浪良介, 高橋恭兵, 大場達也, 丹保好子*

Methylglyoxal-induced Superoxide Anion Production in Endothelial Cells

Ryosuke TATSUNAMI, Kyohei TAKAHASHI, Tatsuya OBA, and Yoshiko TAMPO*

*Hokkaido Pharmaceutical University School of Pharmacy, 7-1 Katsuraoka-cho,
Otaru, Hokkaido 047-0264, Japan*

(Received June 2, 2008; Accepted October 9, 2008; Published online October 22, 2008)

Methylglyoxal (MG), a highly reactive dicarbonyl compound, is a metabolic by-product of glycolysis. MG is often detected at high levels in the blood of diabetic patients. We examined whether MG was capable of inducing reactive oxygen species (ROS) production in bovine aortic endothelial cells (BAECs). The viability of BAECs decreased with time on treatment with 5 mM MG, and was almost completely lost at 24 h. In contrast, MG at 1 mM had little influence on BAEC viability up to 24 h, but induced the elevation of intracellular glutathione content at 24 h. Exposure of BAECs to MG caused a dose-dependent increase in oxidized-hydroethidine fluorescence intensity, indicating ROS production. In addition, aconitase inactivation, which is an indicator of intracellular superoxide, was observed in MG-treated cells. Finally, we found that MG at 5 mM increased the fluorescence intensity of BES-So, a specific probe for superoxide. Together, the results suggest that MG induces superoxide production in endothelial cells, and that the accumulation of ROS may be linked to cytotoxic effects.

Key words—methylglyoxal; superoxide; reactive oxygen species; endothelial cell; advanced glycation end product

序 論

高血糖が持続する状態では、血管が傷害を受け易く、脳梗塞や心筋梗塞などの動脈硬化性疾患を引き起こす。糖尿病の三大合併症である神経障害、網膜症、腎症も微小血管の内皮細胞が傷害を受けて発症する。高血糖が血管を傷害する機構は明らかではないが、血管内皮細胞傷害には糖化最終産物 (advanced glycation end products; AGEs) 形成が重要視されている。^{1,2)} AGEs は、グルコースなど還元糖のアルデヒド基とタンパク質アミノ基の非酵素的反応 (糖化反応) が引き金となり、複雑な反応を経て生成する。この反応過程ではグリオキサール、メチルグリオキサール (MG)、3-デオキシグルコソンのようなジカルボニル化合物が生じる。これらのジカルボニル化合物は AGEs より反応性が高く、血管内皮の傷害に深く関係していることが考えられる。血管内皮細胞では特に MG が多く生成することが報告されている。³⁾ しかし、MG をはじめとす

るジカルボニル化合物の血管内皮細胞への影響はいまだ十分には理解されていない。

一方で糖尿病やその合併症の発症機序に酸化ストレスの関与が示唆されている。糖尿病の病態では、活性酸素種 (ROS) の消去酵素であるスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) やカタラーゼの活性低下、抗酸化物質である還元型グルタチオン (GSH) の減少、過酸化脂質の増加などが確認されている。高血糖状態では、SOD は糖化を受けて失活する。⁴⁾ さらに近年、MG が SOD を不活性化することが明らかにされている。SOD のアイソザイムの1つである Cu, Zn-SOD を MG とともにインキュベーションすると、活性中心である Cu^{2+} が遊離し失活する。⁵⁾ *In vivo* では、MG を投与したマウス肝 SOD 活性の低下が報告されている。⁶⁾ 生体内で生じる ROS のほとんどはスーパーオキシド ($\text{O}_2^{\cdot-}$) に起因することから、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ の消去酵素である SOD の不活性化は糖尿病患者の病態に大きな影響をもたらすことが予測される。

Wu らは、MG により ROS 生成が増加することを報告している。^{7,8)} すなわち、血管平滑筋を MG

北海道薬科大学

*e-mail: y-tampo@hokuyakudai.ac.jp

で処理すると、ROSの蛍光プローブである2',7'-ジクロロフルオレセイン-ジアセテート (DCFH-DA) の酸化が増大する。DCFHを用いた実験からシュワン細胞、ヒト心筋細胞、ウシ網膜周皮細胞においてもMGがROS産生を亢進することが報告されている。⁹⁻¹¹⁾ さらに、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVECs) ではMGによりGSHの枯渇とグルタチオンペルオキシダーゼ活性上昇が認められている。¹²⁾ これらの報告から、MGが培養細胞系において酸化ストレスを与えている可能性が考えられる。

本研究では、血管内皮細胞を用い、MGの影響を検討した。まず細胞生存率に対する影響を追跡し、次いでROSの産生について蛍光プローブであるヒドロエチジン (HE) や最近開発されたBES-Soを用いて検討を行った。その結果、MG処理により細胞生存率が低下する過程でROSの産生が認められたので報告する。

実験方法

1. 試薬 MG (40%水溶液) はSigma Chemical Co. (St. Louis, MO) より購入した。HEはInvitrogen (Eugen, OR) より、BES-Soは和光純薬工業(株) (大阪) より購入した。ウシ胎児血清 (FBS) はCambrex Corporation (East Rutherford, NJ) より購入したものを使用した。その他の試薬類は、市販特級品を用いた。

2. 細胞培養とMG処理 細胞はCambrex Corporationより購入した正常ウシ大動脈内皮細胞 (bovine aortic endothelial cells; BAECs) を使用した。培地はDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) に10%FBS、ペニシリン (200 U/ml)、ストレプトマイシン (200 µg/ml)、L-グルタミン (2 mM) を添加したのを用い、CO₂ インキュベーター (37°C, 5%CO₂/95%air) で培養した。本研究では6-13継代のBAECsをコンフルエント状態に培養して実験に使用した。MG処理は、培地を2%FBSを含むDMEMに交換したのち、MGを添加して行った。インキュベーション後、細胞をDPBSで洗浄し、各種測定に用いた。

3. 細胞生存率 細胞生存率は、酸性ホスファターゼ活性を指標として測定した。酸性ホスファターゼ活性は、血管内皮の生細胞数と高い相関性を示すことが知られている。¹³⁾ BAECs (3×10⁴ cells)

をMG処理したのち、10 mM *p*-ニトロフェニルリン酸及び0.1% Triton-X 100含有酢酸ナトリウム溶液 (pH 5.5) を100 µl添加し、20分間インキュベーションした。ついで、1 M NaOH溶液10 µlを加えて反応を停止し、405 nmの吸光度を測定した。

4. GSH及びGSSGの定量 DTNBリサイクリング法を使用した。¹⁴⁾ BAECs (1.5×10⁵ cells) をMG処理し、細胞を洗浄、凍結融解後に遠心分離した。得られた上清の一部を[GSH+GSSG]定量の試料として使用し、2-ビニルピリジン処理でマスキングしたものをGSSG定量用の試料とした。0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.5, 含5 mM EDTA) に試料 (50-100 µl), 0.6 mM DTNB, 0.2 mM NADPHを添加して30°Cでプレインキュベーション後、1.3 U/mlのグルタチオンレダクターゼ添加により反応開始した。生成した2-ニトロ-5-チオ安息香酸の412 nmにおける吸光度変化を測定した。GSHは[GSH+GSSG]とGSSGの差から算出した。なお、タンパク定量にはマイクロBCA法を用いた。

5. ROSの生成 ROSに対する蛍光プローブHE及びBES-Soを用いた。また、アコニターゼ活性の変動を指標とした。

HEの蛍光: MG処理後、MGを含む培地を除去した。10 µM HE含有DMEM溶液を添加し、20分間インキュベーションした。続いてHEを含む溶液を除去してDPBSで洗浄後、蛍光顕微鏡 (オリンパス, 東京) により観察した。

BES-Soの蛍光: MG処理後、MGを含む培地を除去した。10 µM BES-So含有DMEM溶液を添加して20分間インキュベーションした。続いて細胞をトリプシンにより剥離遠心して洗浄し、得られた細胞懸濁液をセルストレーナーチューブ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) でろ過してフローサイトメーター用の試料を調製した。BES-Soの蛍光は、FL-1チャンネル (530 nm) により検出した。

アコニターゼ活性: MG処理細胞を洗浄後、0.2% Triton-X 100, 0.1 mM ジエチレントリアミン5酢酸, 5 mM クエン酸を含むPBSで可溶化した。測定はイソクエン酸を基質として生成するシスアコニチン酸の240 nmの吸光度を測定した。¹⁵⁾

6. 統計処理 データは平均値±標準偏差で表した。Figure 1の検定には、一元配置分散分析後、

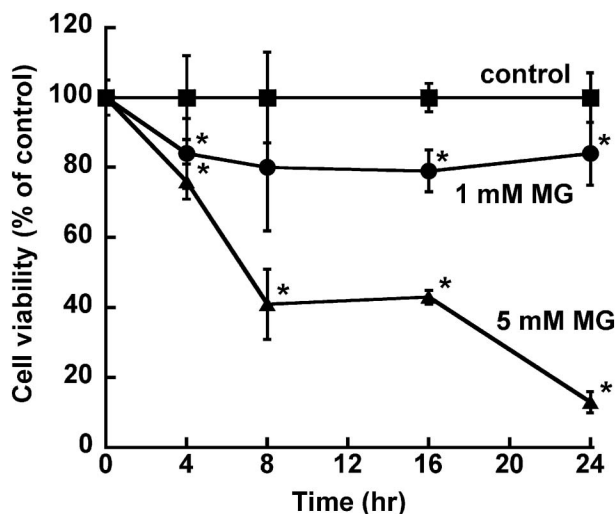


Fig. 1. Effect of MG on Viability of BAECs

BAECs were treated with 1 and 5 mM MG for the indicated times. Cell viability was assessed by measuring acid phosphatase activity. Values are means \pm S.D. of six experiments. * $p < 0.05$ compared with control at each time, Scheffe test after analysis of variance.

Scheffe の検定を用いた。その他のデータは F 検定で分散分析後、Student の t 検定を行った。等分散性の棄却されたデータについては Kruskal-Wallis 検定後、Scheffe の検定を行った。それぞれ $p < 0.05$ を有意とした。

結 果

1. BAECs の生存率に対する MG の影響と GSH 量の変動 BAECs に MG (1 mM, 5 mM) を添加し、経時的に細胞生存率を測定した (Fig. 1)。細胞生存率は、血管内皮の生細胞数と高い相関性を示す酸性ホスファターゼ活性を指標とした。¹³⁾ 1 mM MG 処理では、細胞生存率の低下が認められたものの、約 80% の細胞が生存を示した。これに対し、5 mM MG 処理では、インキュベーション 4 h から減少し、24 h 後の細胞生存率はわずか 13% であった。

次に BAECs に MG (0.5–5 mM) を添加し、4 h 後と 24 h 後における GSH 量を測定した (Fig. 2)。4 h 後の GSH 量は MG を添加しないコントロールに比べて 1 mM, 2 mM 及び 5 mM MG 処理で減少し、特に 2 mM で顕著であった。これらの条件下、酸化型 GSSG の変動は認められなかった (data not shown)。一方、24 h の GSH 量は 0.5 mM 及び 1 mM の低濃度側で増加し、1 mM においてコントロールの 2–5 倍 (平均 4 倍) を示した (Fig. 2)。

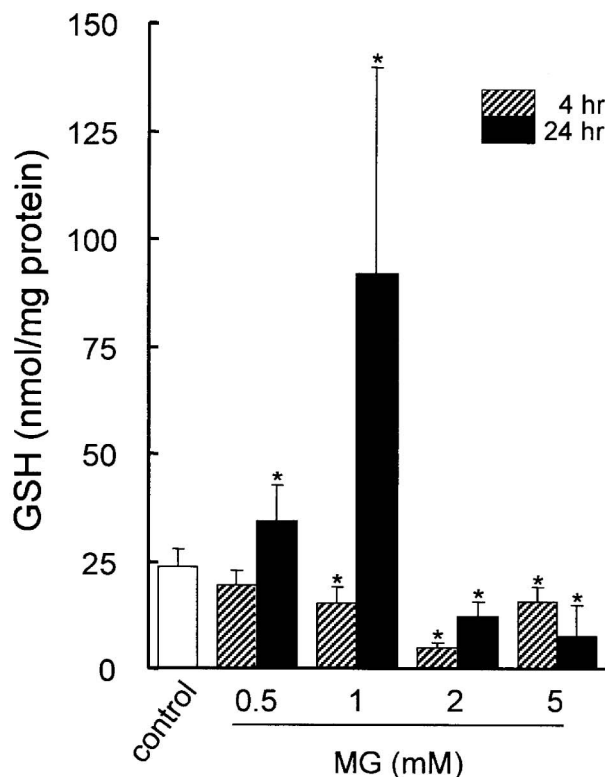


Fig. 2. Effect of MG on Glutathione Levels in BAECs

BAECs were treated with MG (0.5, 1, 2 or 5 mM) for 4 and 24 h. GSH levels in BAECs were measured by using enzymatic cycling method as described in experimental section. Values are means \pm S.D. of 3–8 experiments. * $p < 0.05$ compared with GSH in control cells, Student's t -test after analysis of variance or Scheffe test after Kruskal-Wallis test.

このような GSH の増加は 2 mM 及び 5 mM の高濃度側では認められなかった。24 h の GSSG 量は 1 mM の条件でのみわずかではあるが増加した (コントロール, 0.3 ± 0.3 nmol/mg protein, $n=8$; 1 mM MG, 2.2 ± 1.8 nmol/mg protein, $n=6$)。しかしながら、他の MG 濃度では GSSG の変動は認められなかった (data not shown)。

2. MG 処理 BAECs における ROS の産生 MG 処理 2 h で、ROS 生成について 3 種の測定法を用いて検討した。HE は ROS と反応して赤色蛍光を発する。特に $O_2^{\cdot-}$ との反応性が高く、細胞内 $O_2^{\cdot-}$ プローブとして広く用いられている。¹⁶⁾ 本研究では、HE が MG と直接反応しないことをあらかじめ確認してから実験に供した。MG 未処理のコントロール細胞及び MG 処理 2 h 後の HE 蛍光写真を Fig. 3 に示す。HE の蛍光は、コントロール細胞ではほとんどみられなかった。一方、1 mM の MG 処理細胞では HE の赤色蛍光がわずかに観察された。また、5 mM の MG 処理では赤色蛍光が顕著に増大し、

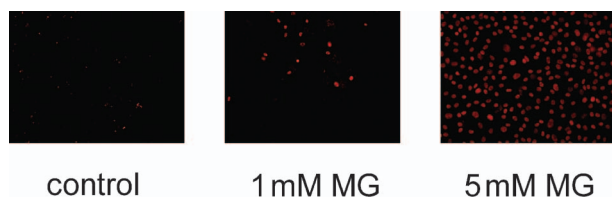


Fig. 3. HE fluorescence in MG-treated BAECs
BAECs were treated with 1 and 5 mM MG for 2 h. Cells were incubated with 10 μ M HE for 20 min. The red fluorescence generated from HE was monitored by fluorescence microscopy.

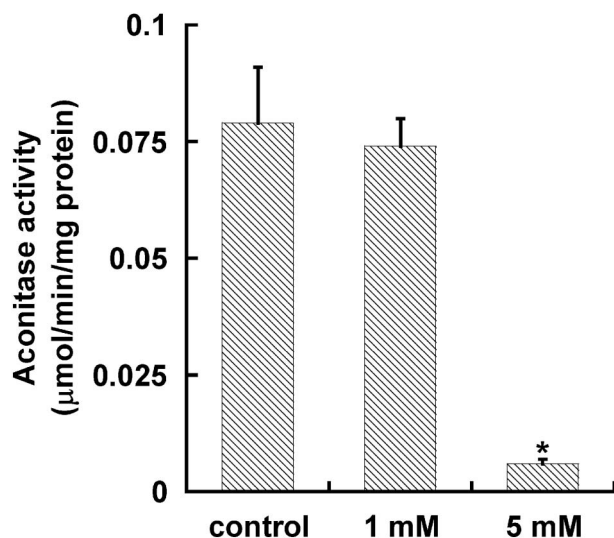
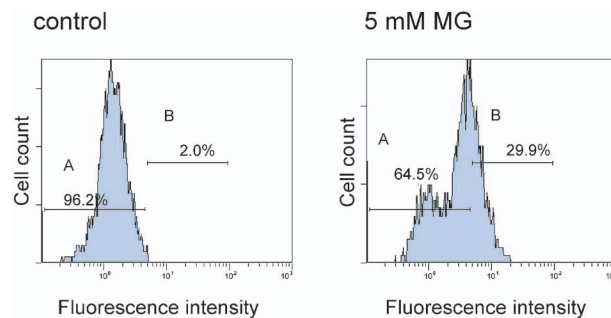


Fig. 4. Aconitase Activities in MG-treated BAECs
After BAECs were treated with 1 and 5 mM MG for 4 h, aconitase activity was measured spectrophotometrically. Values are means \pm S.D. of three experiments. * p < 0.05 compared with control, Student's t -test after analysis of variance.

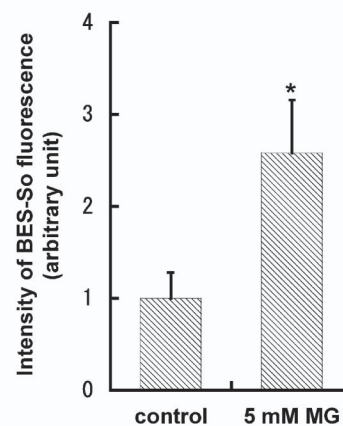
MG 濃度依存的であることが明らかになった。

次に、MG 処理 BAECs のアコニターゼ活性を測定した。アコニターゼは $O_2^{\cdot-}$ の存在下で容易に失活することが報告されている。^{17,18)} Figure 4 に示すように、1 mM の MG 処理ではアコニターゼ活性の変動は認められなかった。これに対して、5 mM の MG 処理では著しく低下し、Fig. 3 で得られた HE 蛍光と同様な結果を示した。

最近、細胞内 $O_2^{\cdot-}$ プローブとして BES-So が開発された。BES-So は $O_2^{\cdot-}$ に高特異的であり、かつ感度も優れている。¹⁹⁾ そこで、BES-So を用い、フローサイトメトリー分析を行った。Figure 5(A) に示すように、コントロールでは BES-So の蛍光は小さく、ほとんどの細胞が領域 A に分布した。一方、MG (5 mM) 処理では、領域 A の分布割合は減少し、 $O_2^{\cdot-}$ の生成を示す領域 B へシフトした。



(A)



(B)

Fig. 5. BES-So Fluorescence in MG-treated BAECs

BAECs were treated with 5 mM MG for 2 h. Cells were incubated with 10 μ M BES-So for 20 min. BES-So fluorescence was detected by flow cytometry (A). Fluorometric analysis of data. Values are means \pm S.D. of three experiments. * p < 0.05 compared with control, Scheffe test after Kruskal-Wallis test (B).

この際、蛍光強度はコントロールの約 2 倍に上昇した [Fig. 5(B)]. なお、BES-So の蛍光は、BAECs が存在しない条件下では MG の有無に係わらず認められなかった (data not shown).

考 察

本研究では、MG により BAECs の生存率が低下し、この過程で ROS 産生が亢進されていることを示した。糖尿病の病態では、血清中の MG 濃度は正常な状態 (0.1 μ M) と比べて高く、0.15–2 μ M 程度に増加する。^{20,21)} しかし、MG が解糖系やポリオール経路から生成することを考慮すると、細胞内 MG 濃度は血清中よりさらに高いと予測される。実際、ラット動脈組織の MG 濃度は血漿中より約 5 倍高く、²²⁾ CHO 細胞内の MG 濃度は 310 μ M であると報告されている。²³⁾ しかしながら、本研究で認められた BAECs 生存率の低下及び ROS 産生の増

大は、mM オーダーという高濃度 MG を要した。DCFH-DA を用いた実験では、ヒト心筋細胞で 200 μM の MG 処理により、ウシ網膜周皮細胞で 200–800 μM の MG 処理により ROS 産生の増大が認められている。^{10,11)} また、ヒト単球性白血病細胞株 U937 では 10–300 μM の MG により ROS 産生が増加するが、HL60 や K562 など他の細胞株では ROS 産生の増加が起こらないことが報告されている。²⁴⁾ これらの知見から、MG に対する感受性は細胞の種類によってかなり異なると考えられる。一方、培養細胞に MG を添加した場合、細胞内に取り込まれる MG はわずかに数%であることが報告されている。²⁵⁾ このことから、本実験において mM オーダーの MG を添加した場合、BAECs 内に取り込まれている MG 濃度は数十 μM オーダーと換算される。臨床的に細胞内、特に血管内皮細胞の MG 濃度が数十 μM オーダーまで増加するかどうかは不明であるが、高血糖が持続し糖尿病が悪化する病態ではその可能性は否定できないものと思われる。

DCFH-DA は細胞内で DCFH へ加水分解され、続いて ROS と反応するため、酸化ストレスの測定に広く用いられている。これまで、HUVECs、シュワン細胞、血管平滑筋細胞、ヒト心筋細胞やウシ網膜周皮細胞を MG 処理すると、DCFH-DA 由来の蛍光が増大することが報告されている。^{7–12)} DCFH は H_2O_2 とは反応しないが、ヒドロキシルラジカルや NO_2 ラジカルと反応し、蛍光物質である DCF へ酸化される。²⁶⁾ しかし、自動酸化を受け易いことや、DCFH が酸化される過程で $\text{O}_2^{\cdot-}$ 及び H_2O_2 を生成することが指摘されている。²⁷⁾ したがって、DCFH-DA を用いた蛍光強度から ROS の定量化や反応種を推定することは困難であると思われる。本研究では、蛍光プローブとして HE を用い、ROS 生成について検討した。HE は従来 $\text{O}_2^{\cdot-}$ によって蛍光性のエチジウムに酸化されると考えられていたが、近年、生成する蛍光物質はエチジウムと異なることが明らかにされている。¹⁶⁾ 蛍光物質の構造等は不明であるが、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ との反応で特異的に生じることが証明されている。BAECs を 1 mM の MG で処理した場合、HE 蛍光に対する影響はみられなかったが、BAECs の生存率が低下する 5 mM の MG で処理した場合は HE 蛍光の増大が認められた (Fig. 3)。このことから、細胞生存率が低下する条

件では、細胞死に先行して $\text{O}_2^{\cdot-}$ のような ROS が増加していることが示唆される。

アコニターゼは一般に鉄硫黄クラスター $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ を有する酵素で、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ によって容易に酸化され $[\text{3Fe-4S}]^{1+}$ となり失活する。¹⁸⁾ BAECs のアコニターゼ活性は 1 mM MG 処理で影響はみられなかったが、5 mM MG 処理では著しく低下し (Fig. 4)、HE 蛍光測定の結果 (Fig. 3) と一致した。しかしながら一方で、MG (5 mM) 処理 BAECs によるアコニターゼ活性低下は、Cu,Zn-SOD、膜透過型のポリエチレングリコール修飾 SOD を添加しても回復しなかった (data not shown)。SOD を MG とともに添加した場合、SOD の活性中心である Cu^{2+} が遊離し、失活していることが考えられる。⁹⁾

BES-So は最近開発された蛍光プローブで、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ に対して極めて高い特異性を有する。BES-So の蛍光は MG (5 mM, 2 h) 処理によって増加することが確認された (Fig. 5)。以上より、MG 処理 BAECs において、その細胞生存率の低下に先行して、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ に起因する酸化ストレスが誘導されていることが示唆される。

HUVECs やシュワン細胞では MG 処理により GSH レベルが減少することが報告されている。^{12,28,29)} BAECs を MG で 24 h 処理した場合、2 mM 及び 5 mM の高濃度側で GSH 量の減少が認められた (Fig. 2)。これに対して 0.5 mM と 1 mM の低濃度側では GSH 量の増加が認められた。この GSH の増減に連動して、細胞生存率は 1 mM MG で保たれ、5 mM MG では著しく減少した (Fig. 1)。したがって、MG による細胞死に対して GSH が防御作用を有していることが示唆される。GSH は γ -グルタミルシステイン合成酵素 (γ GCS) とグルタチオン合成酵素の 2 段階の反応により生合成される。MG は GSH 生合成の律速である γ GCS 活性を増強することが報告されている。³⁰⁾ この γ GCS の活性増強が 0.5 mM 及び 1 mM MG 処理 (24 h) で認められた GSH の増加に関与していることが考えられる。

4 h における GSH 量の変動は 24 h とは異なった挙動を示した (Fig. 2)。すなわち、1–5 mM MG 処理により GSH は減少した。一般に酸化ストレスの過程では、GSH はグルタチオンペルオキシダーゼ

を介して $O_2^{\cdot-}$ から派生する H_2O_2 を還元分解する。この過程で GSH は減少し、GSSG は増加する。しかしながら、GSSG の増加はほとんど認められなかった (data not shown)。グルタチオンペルオキシダーゼ活性は MG 存在下で上昇する、¹²⁾ あるいは不活性化する³¹⁾ という報告がなされている。今回 GSSG が増加を示さなかった要因として、グルタチオンペルオキシダーゼが不活性化されていることが挙げられるが、詳細は不明である。MG は細胞内で GSH を基質としてグリオキサラーゼ系による分解を受ける。まずグリオキサラーゼ I の介在により S-D-lactoylglutathione へ代謝され、ついでグリオキサラーゼ II により D-lactate へ変換される。Amicarelli らは、メラノーマ細胞を 200–400 μ M の MG で処理すると、グリオキサラーゼ I 及び II の活性が増強することを明らかにしている。³²⁾ Figure 2 に示したように 0.5–2 mM MG 処理 (4 h) では濃度依存的に GSH の減少が認められた。グリオキサラーゼの活性増強を介して MG の代謝が促進され、これに伴い GSH の消費も亢進した可能性が考えられる。なお GSH の減少は 5 mM より 2 mM で顕著であり、高濃度 MG 処理条件ではグリオキサラーゼが失活を受けていることが考えられる。

本研究では、 $O_2^{\cdot-}$ プローブとして用いられている HE 及び BES-So を用い、MG 処理 BAECs においてその蛍光が増大することを明らかにした。さらに、 $O_2^{\cdot-}$ のセンサーとされるアコニターゼの活性低下も認められ、MG による BAECs 生存率の低下に GSH レベルの変動が関与することが示唆された。しかし、ROS が増大するメカニズムや GSH レベルの変動、あるいはグリオキサラーゼ系との関連性は不明であり、今後、詳細な検討が必要であると考えられる。

REFERENCES

- 1) Chan W. H., Wu H. J., *J. Cell Biochem.*, **103**, 1144–1157 (2008).
- 2) Price C. L., Knight S. C., *Curr. Pharm. Des.*, **13**, 3681–3687 (2007).
- 3) Schalkwijk C. G., van Bezu J., van der Schors R. C., Uchida K., Stehouwer C. D., van Hinsbergh V. W., *FEBS Lett.*, **580**, 1565–1570 (2006).
- 4) Jabeen R., Mohammad A. A., Elefano E. C., Petersen J. R., Saleemuddin M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1760**, 1167–1174 (2006).
- 5) Kang J. H., *Mol. Cells*, **15**, 194–199 (2003).
- 6) Choudhary D., Chandra D., Kale R. K., *Toxicol. Lett.*, **93**, 141–152 (1997).
- 7) Wu L., *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **83**, 63–68 (2005).
- 8) Chang T., Wang R., Wu L., *Free Radic. Biol. Med.*, **38**, 286–293 (2005).
- 9) Ota K., Nakamura J., Li W., Kozakae M., Watarai A., Nakamura N., Yasuda Y., Nakashima E., Naruse K., Watabe K., Kato K., Oiso Y., Hamada Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **357**, 270–275 (2007).
- 10) Li S. Y., Sigmon V. K., Babcock S. A., Ren J., *Life Sci.*, **80**, 1051–1056 (2007).
- 11) Kim J., Son J. W., Lee J. A., Oh Y. S., Shinn S. H., *J. Korean Med. Sci.*, **19**, 95–100 (2004).
- 12) Cai W., Gao Q. D., Zhu L., Peppas M., He C., Vlassara H., *Mol. Med.*, **8**, 337–346 (2002).
- 13) Connolly D. T., Knight M. B., Harakas N. K., Wittwer A. J., Feder J., *Anal. Biochem.*, **152**, 136–140 (1986).
- 14) Griffith O. W., *Anal. Biochem.*, **106**, 207–212 (1980).
- 15) Hausladen A., Fridovich I., *Methods Enzymol.* **269**, 37–41 (1996).
- 16) Zhao H., Joseph J., Fales H. M., Sokoloski E. A., Levine R. L., Vásquez-Vivar J., Kalyanaraman B., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102**, 5727–5732 (2005).
- 17) Gardner P. R., Fridovich I., *J. Biol. Chem.*, **266**, 19328–19333 (1991).
- 18) Flint D. H., Tuminello J. F., Emptage M. H., *J. Biol. Chem.*, **268**, 22369–22376 (1993).
- 19) Maeda H., Yamamoto K., Kohno I., Hafsi L., Itoh N., Nakagawa S., Kanagawa N., Suzuki K., Uno T., *Chemistry*, **13**, 1946–1954 (2007).
- 20) Beisswenger P. J., Howell S. K., O'Dell R. M., Wood M. E., Touchette A. D., Szwegold B. S., *Diabetes Care*, **24**, 726–732 (2001).
- 21) Odani H., Shinzato T., Matsumoto Y., Usami J., Maeda K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **256**, 89–93 (1999).
- 22) Randell E. W., Vasdev S., Gill V., *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **51**, 153–157 (2005).
- 23) Chaplen F. W., Fahl W. E., Cameron D. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 5533–5538

- (1998).
- 24) Okado A., Kawasaki Y., Hasuike Y., Takahashi M., Teshima T., Fujii J., Taniguchi N., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **225**, 219–224 (1996).
- 25) Che W., Asahi M., Takahashi M., Kaneto H., Okado A., Higashiyama S., Taniguchi N., *J. Biol. Chem.*, **272**, 18453–18459 (1997).
- 26) Tampo Y., Kotamraju S., Chitambar C. R., Kalivendi S. V., Keszler A., Joseph J., Kalyanaraman B., *Circ. Res.*, **92**, 56–63 (2003).
- 27) Rota C., Chignell C. F., Mason R. P., *Free Radic. Biol. Med.*, **27**, 873–881 (1999).
- 28) Fukunaga M., Miyata S., Liu B. F., Miyazaki H., Hirota Y., Higo S., Hamada Y., Ueyama S., Kasuga M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **320**, 689–695 (2004).
- 29) Chang T., Wu L., *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **84**, 1229–1238 (2006).
- 30) Amicarelli F., Colafarina S., Cattani F., Cimini A., Di Ilio C., Ceru M. P., Miranda M., *Free Radic. Biol. Med.*, **35**, 856–871 (2003).
- 31) Park Y. S., Koh Y. H., Takahashi M., Miyamoto Y., Suzuki K., Dohmae N., Takio K., Honke K., Taniguchi N., *Free Radic. Res.*, **37**, 205–211 (2003).
- 32) Amicarelli F., Bucciarelli T., Poma A., Aimola P., Di Ilio C., Ragnelli A. M., Miranda M., *Carcinogenesis*, **19**, 519–523 (1998).