

흰쥐 대뇌피질 신경세포에 미치는 호모시스틴의 신경독성에 대한 S-nitrosation의 역할

이화여자대학교 의과대학 약리학교실; 의과학연구소 신경과학부

김 원 기

=Abstract=

S-nitrosation Ameliorates Homocysteine-mediated Neurotoxicity in Primary Culture of Rat Cortical Neurons

Won-Ki Kim

*Division of Neuroscience, Medical Research Center;
Department of Pharmacology, College of Medicine, Ewha Womans University*

The reactivity of the sulfhydryl (thiol) group of homocysteine has been associated with an increased risk of atherosclerosis, thrombosis and stroke. Thiols also react with nitric oxide (NO, an endothelium-derived relaxing factor (EDRF)), forming S-nitrosothiols that have been reported to have potent vasodilatory and antiplatelet effects and been expected to decrease adverse vascular effects of homocysteine. The present study was aimed to investigate whether the S-nitrosation of homocysteine modulates the neurotoxic effects of homocysteine. An 18 hour-exposure of cultured rat cortical neurons to homocysteine (>1 mM) resulted in a significant neuronal cell death. At comparable concentrations (<10 mM), however, S-nitrosohomocysteine did not induce neuronal cell death. Furthermore, S-nitrosohomocysteine partially blocked NMDA-mediated neurotoxicity. S-nitrosohomocysteine also decreased NMDA-mediated increases in intracellular calcium concentration.

The present data indicate that in brain nitric oxide produced from neuronal and nonneuronal cells can modulate the potential, adverse properties of homocysteine.

Key Words: Homocysteine, S-nitrosohomocysteine, Neurotoxicity, Cortical neuron, Primary culture, Calcium

서 론

정상인의 혈중 호모시스틴 농도는 약 5 μ M이다. 그러나 혈중 호모시스틴 농도가 수십배 이상 증가할 수 있으며 이를 고호모시스틴혈증(hyperhomocysteinemia)이라 한다. 고호모시스틴혈증은

유전적 소인에 기인하며 cystathionine β -synthase, methylene tetrahydrofolate reductase 등이 결핍된 환자에게 주로 발견된다(McCully, 1969; Olszewski 및 McCully, 1993). 식이요법 또한 매우 중요하여 비타민 B₆, 비타민 B₁₂ 및 folate의 결핍도 고호모시스틴혈증을 유발할 수 있으며 때로는 200 μ M 이상의 혈중농도를 보이기도 한다

(Joosten 등, 1993; Selhub 등, 1993; Stabler 등, 1988).

혈중 호모시스틴 농도가 증가하게 되면 말초 및 관상혈관의 경화증을 유발하게 된다(Gibson 등, 1964; McCully, 1969; Selhub 등, 1995). 고호모시스틴혈증의 경우 뇌졸중의 발병률이 증가하게 되며 소아의 경우 지능발달을 저해할 수 있다(Malinow, 1990). 호모시스틴을 쥐의 복강등으로 직접 투여시 간질 증세를 보이는 것이 여러 연구자들에 의하여 보고된 바 있다(Allen 등, 1986; Blennow, 1979; Kubova 등, 1995). 이러한 임상 및 실험결과 보고는 호모시스틴이 신경세포에 독성을 유발할 수 있으며 특히 흥분성 신경자극을 경유하여 독성을 유발한다는 것을 의미한다.

호모시스틴은 혈관 내피세포에 대하여 강한 독성작용을 나타내는 것으로 알려져 있다. 호모시스틴의 세포독성은 주로 활성 thiol기(sulfhydryl group)에 의하여 생성되는 것으로 알려져 있는 과산화수소(H_2O_2) 때문인 것으로 보인다(Starkebaum 및 Harlan, 1986). 그러나 최근 내피세포가 endothelium-derived relaxing factor (EDRF)로 알려져 있는 nitric oxide (Palmer 등, 1987; Ignarro 등, 1987)를 생성분비함으로써 호모시스틴의 세포독성을 어느정도 억제한다는 보고가 있었다. 이는 호모시스틴과 nitric oxide의 반응생성물인 S-nitrosohomocysteine이 H_2O_2 를 생성하지 않으며 내피세포에 강한독성을 가지는 것으로 알려져 있는 homocysteine thiolactone을 생성하지 않기 때문인 것으로 생각된다(Stamler 등, 1993).

최근 본인 등은 호모시스틴이 NMDA 수용체를 통하여 신경세포에 독성을 유발한다는 것을 보고한 바 있다(Kim 등, 1995). 그러나 허혈 등의 경우 다량으로 생성될 것으로 예상되는 nitric oxide와 호모시스틴의 반응으로 생길 수 있는 S-nitrosohomocysteine이 신경세포에 미치는 영향에 대해서는 연구된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 고호모시스틴혈증 환자의 경우 생성이 예상되는 S-nitrosohomocysteine의 대뇌피질 신경세포에 미치는 신경독성과, NMDA 혹은 호모시스틴에 의

하여 유발되는 신경독성에 대하여 비교 연구하였다.

재료 및 방법

1) 재료

Homocysteine, N-methyl-D-aspartate(NMDA), tetrodotoxin (TTX), glycine, poly-D-lysine, Eagle's minimum essential medium (EMEM)은 Sigma Chemical Company (St. Louis, MO)에서 구입하였다. D-2-amino-5-phosphovalerate (APV) 및 7-chlorokynurenate (7-Cl-KYN)는 Research Biochemicals International (RBI; Natick, MA)에서 구입하였다. Trypsin, fetal bovine serum, 페니실린, 스트렙토마이신 등은 Gibco (BRL Life Technologies, Inc., NY)에서 구입하였다. Fura-2/AM 및 Fura-2 pentaphosphate는 Molecular Probes (Eugene, OR)에서 구입하였다.

2) 방법

(1) **대뇌피질 세포배양:** 대뇌피질세포의 일차배양은 16~17일 된 흰쥐 태아(Sprague-Dawley)의 대뇌피질을 적출하여 배양하였다. 뇌간, 소뇌, 해마 등을 제거하여 얻은 대뇌피질에서 뇌막을 제거하고 0.03% trypsin을 첨가한 Eagle's minimum essential medium(EMEM; 11 mM 포도당, 1 mM 글루타민 및 60 U/ml 페니실린 및 스트렙토마이신 포함, 그러나 혈청은 첨가하지 않음)에 넣고 잘게 섀후 35°C에서 두시간 가량 배양하였다. 세포를 성장배지(5% fetal bovine serum을 첨가한 EMEM)로 세 번 씻어 주고 같은 배지에서 20분간 방치하였다. 세포를 135 및 35 μ m 나이론 천으로 여과하여 크기가 큰 비신경세포를 일부 제거하고 여과된 세포를 poly-D-lysine으로 미리 처리한 배양접시에 나누어 5% 이산화탄소 세포배양기에서 배양하였다. 비신경세포의 성장을 줄이기 위하여 배양 14일후 5 μ g/ml cytosine arabinoside로 48시간 처리하였다. 세포내 칼슘농도측정을 위하여 12 mm coverslip이 들어 있는 배양접시에서,

lactate dehydrogenase 측정을 위해서는 24-well 배양접시에서 세포를 배양하였다.

(2) 세포독성: 약물에 의하여 유발되는 세포독성은 세포파괴시 세포밖으로 유출되는 lactate dehydrogenase (LDH)의 양을 측정하여 연구하였다. 24-well plate의 각 well에서 배양액을 일정량씩 취하여 시험관에 넣고 pyruvate와 NADH를 섞은 혼합액을 가한 뒤 37°C에서 30분간 방치하였다. 이 후 발색제를 첨가하고 실온에서 20분간 방치한 후 0.4 N NaOH를 넣고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(3) 세포내 칼슘농도: 세포내 칼슘농도($[Ca^{2+}]_i$)는 칼슘과 결합하여 형광스펙트럼이 변화하는 성격을 가진 fura-2를 사용하여 측정하였다(Kim등, 1994). 간략히 설명하면, 12 mm 유리 coverslip에 배양한 세포들을 철청을 함유하고 있지 않은 EMEM으로 두 번 씻어 주고 10 μ M fura-2/AM과 함께 37°C에서 30분간 배양하였다. 세포를 Mg^{2+} -free Krebs-Ringer-Hanselite buffer (KRH buffer; 125 mM NaCl, 1.2 mM KH_2PO_4 , 6 mM glucose, and 1 mM $CaCl_2$, 25 mM HEPES, pH 7.4)로 세 번 씻어 내고 실온에서 20분간 방치하였다. 세포내 칼슘의 농도는 10초마다 측정하였으며 칼슘농도 측정시 NMDA 수용체의 활성을 높이기 위하여 글리신(1 μ M)과 tetrodotoxin(1 μ M)을 항상 측정액에 포함시켰다. Fura-2의 형광강도의 변화를 단일세포영상화기기(Quantex QX 7-210, Sunnyvale, CA)를 사용하여 340 및 380 nm에서 측정하여 세포내 칼슘의 양을 측정하였다. 세포내 칼슘농도는 Grynkiewicz 등의 방법(Grynkiewicz 등, 1985)에 따라 계산하였다.

(4) 호모시스틴의 S-nitrosation: 호모시스틴의 thiol기에 nitrosation은 통상적인 방법에 따라 시행하였다(Stamler등, 1992; Byler등, 1983). 간략히 설명하면, 호모시스틴을 $NaNO_2$ 및 HCl 혼합액(1:1)에 녹이고 일정한 반응시간이 지난 후 S-nitrosothiol의 특징이 되는 흡광도를 측정 비교함으로써 S-nitrosohomocysteine의 생성을 관찰하였다. 549 nm에서 흡광의 정도는 $16.9 M^{-1}cm^{-1}$

으로서 이전에 Stamler 등이 발표한 수치와 유사하였다(Stamler등, 1993).

결 과

1) S-nitrosohomocysteine의 신경독성 효과

여러 가지 농도의 호모시스틴을 20시간 처리한 후 lactate dehydrogenase 유리량을 측정하여 세포독성의 정도를 보았다. 호모시스틴에 의한 세포독성은 농도 1 mM 이상의 호모시스틴에서 뚜렷이 관찰되었으며 10 mM 호모시스틴은 300 μ M NMDA에 의한 세포독성의 유발 정도와 비교해 볼 때 약 41%의 효과를 보였다(Fig. 1). 본 연구에서 10 mM 이상의 호모시스틴 농도는 사용되지

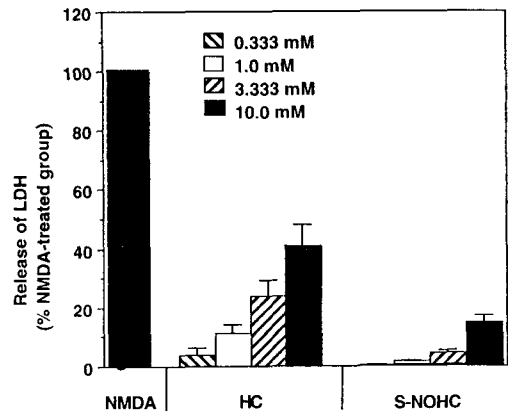


Fig. 1. S-nitrosohomocysteine(S-NOHC) mediates neuronal cell death.

Cortical cultures were incubated in nominally Mg^{2+} -free EMEM containing N-methyl-D-aspartate (NMDA), D,L-homocysteine (HC) and S-nitrosohomocysteine (S-NOHC) at various concentrations in a 95% air/5% CO_2 humidified environment at 37°C for 20 h. Neuronal injury in these cultures was assessed by the leakage of lactate dehydrogenase (LDH), as described in Methods. The amount of LDH leaked out of NMDA-treated cells was assigned to 100%. Data were mean \pm standard error from 4 separate experiments.

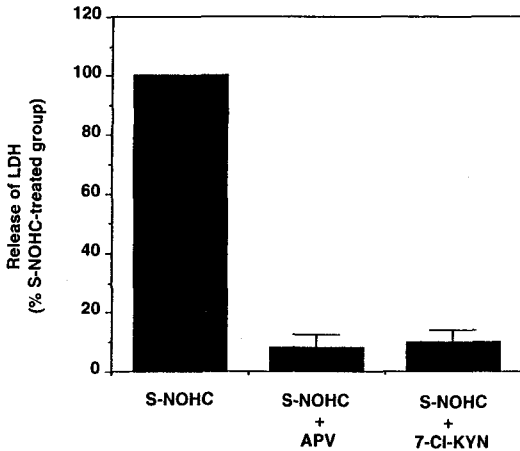


Fig. 2. NMDA receptor antagonists decrease S-NOHC-mediated neuronal cell death. Cortical cultures were treated with S-NOHC in the presence and absence of the NMDA receptor antagonists APV (300 μ M) and 7-Cl-KYN (20 μ M). The amount of LDH leaked out of S-NOHC-treated cells was assigned to 100%. Data were mean \pm standard error from 6 separate experiments.

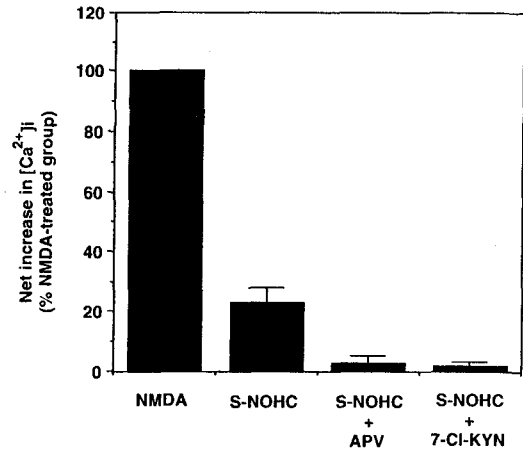


Fig. 4. NMDA receptor antagonists decreases S-NOHC-mediated increases in [Ca²⁺]_i. Cortical cultures were treated with NMDA and S-NOHC in the presence and absence of the NMDA receptor antagonists APV (300 μ M) or 7-Cl-KYN (20 μ M). Intracellular calcium concentrations were measured using the calcium-sensitive dye fura-2, as described in the Methods. The net increase in [Ca²⁺]_i in NMDA-treated cells was assigned to 100%. Data were mean \pm standard error from 4 separate experiments.

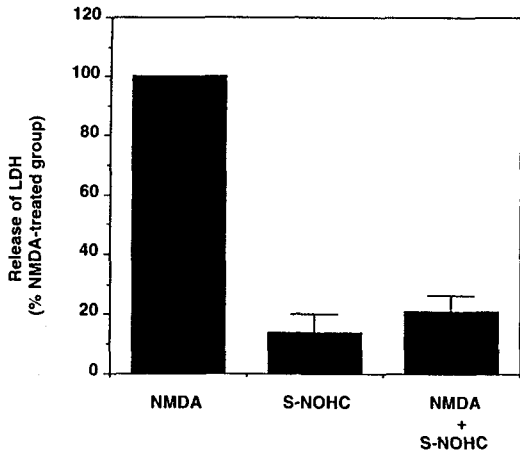


Fig. 3. S-nitrosohomocysteine blocks NMDA-mediated neuronal cell death. Cortical cultures were treated with NMDA and S-NOHC, respectively or together. The amount of LDH leaked out of NMDA-treated cells was assigned to 100%. Data were mean \pm standard error from 6 separate experiments.

않았다. 호모시스틴과 비교해 볼 때 호모시스틴의 thiol기에 nitrosation시켜 생성된 S-nitrosohomocysteine은 3.3 mM 이하의 농도에서는 유의성 있는 신경독성을 유발하지 않았다. S-nitrosohomocysteine은 농도 10 mM에서 NMDA (300 μ M) 효과와 비교할 때 15.3%의 신경독성을 유발하였으며 호모시스틴(10 mM)과 비교해 볼 때 37% 수준의 신경독성을 유발하였다(Fig. 1). 한편, S-nitrosohomocysteine에 의하여 유발되는 신경독성은 NMDA 수용체 길항제인 APV (300 μ M) 및 7-Cl-KYN (20 μ M)에 의하여 완전히 억제되었다(Fig. 2). 흥미롭게도, S-nitrosohomocysteine은 NMDA에 의해 유발되는 신경독성을 억제하는 현상을 보였다: 10 mM S-nitrosohomocysteine은 NMDA (300 μ M)에 의하여 유발된 신경독성을 82% 억제하였다(Fig. 3, $P < 0.05$, $N = 5$).

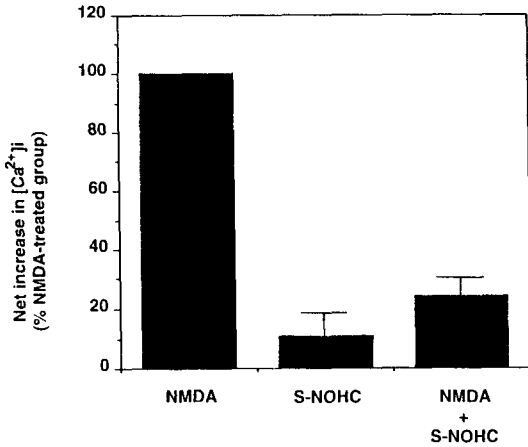


Fig. 5. S-nitrosohomocysteine blocks NMDA-mediated increases in $[Ca^{2+}]_i$. Cortical cultures were treated with NMDA and S-NOHC, respectively or together. The net increase in $[Ca^{2+}]_i$ out of NMDA-treated cells was assigned to 100%. Data were mean \pm standard error from 5 separate experiments.

2) S-nitrosohomocysteine의 세포내 칼슘농도에 미치는 효과

단일세포영상화기법을 이용한 실험에서도 S-nitrosohomocysteine은 3.3 mM에서 유의성있게 세포내 칼슘농도의 증가를 유발하지 않았으며 10 mM의 농도에서는 NMDA (300 μ M)에 의하여 유발되는 세포내 칼슘농도 증가의 23% 정도만 세포내 칼슘농도를 증가하였다(Fig. 4). S-nitrosohomocysteine에 의한 세포내 칼슘농도의 증가는 NMDA 수용체 길항제인 APV(300 μ M) 및 7-Cl-KYN(20 μ M)에 의하여 완전히 억제되었다(Fig. 4). S-nitrosohomocysteine은 NMDA와 동시투여시 NMDA에 의한 세포내 칼슘농도의 증가를 억제하는 현상을 보였다: 10 mM S-nitrosohomocysteine은 NMDA (300 μ M)에 의하여 유발되는 세포내 칼슘이온의 상승을 80% 억제하였다(Fig. 5, $P < 0.05$, $N = 6$).

고찰

뇌졸중이나 두부손상 등으로 인하여 혈뇌장벽(blood-brain-barrier)의 손상이 일어나게 되면 두뇌 국소부위의 호모시스틴 농도가 증가하게 된다. 고호모시스틴혈증 환자의 경우 두부손상등은 국소뇌부위에서 호모시스틴의 농도를 수십 내지 수백 μ M까지 올리게 될 것으로 예상된다(Selhub등, 1995; Stabler등, 1988). 고호모시스틴혈증 환자에서 뇌졸중(Malinow, 1990), 간질 등의 발생율이 증가하는 것은 두뇌에서의 호모시스틴의 농도증가와 관련있을 것으로 생각된다(Allen등, 1986; Blennow, 1979; Kubova등, 1995).

최근 본 연구자 등은 호모시스틴이 일차배양한 흰쥐의 대뇌피질 신경세포의 NMDA 수용체를 직접 자극하여 세포독성을 나타낸다고 보고한 바 있다(Kim등, 1995). 또한 호모시스틴의 세포독성이 superoxide dismutase와 catalase 복합투여에 의하여 억제되는 것을 관찰함으로써 호모시스틴에 의한 신경세포독성이 산소라디칼의 생성과 일부 관련되어 있다는 것을 보였다(Kim등, 1995). 호모시스틴은 혈관 내피세포에 대해서도 강한 독성 작용을 나타내며 이러한 세포독성은 주로 활성 thiol기에 의하여 생성되는 것으로 알려져 있는 과산화수소(H_2O_2)에 기인하는 것으로 보인다(Starkebaum 및 Harlan, 1986). 호모시스틴과 유사한 화학적 구조를 가지는 다른 황함유아미노산의 경우(예를 들면, 시스틴)도 이와 유사한 작용이 있는 것으로 보고 되어 있어(Nishiuch등, 1976; Heinecke등, 1987) thiol기에 의한 세포독성이 중요한 의미를 가진다는 것을 보여 주고 있다.

본 연구결과와 최근 발표된 Stabler 등의 연구결과 보고(1993)는 호모시스틴등의 황함유아미노산의 세포독성이 nitric oxide에 의하여 저하될 수 있다는 것을 보여 주고 있다. S-nitrosohomocysteine은 NMDA 수용체를 자극하여 세포내 칼슘의 농도를 증가시키며 신경독성을 유발하나 유의성있는 신경독성 및 세포내 칼슘농도의 증가는 높은

농도 (≥ 10 mM)에서만 관찰되며, 호모시스틴과 비교시 약 20배 이상 약한 것으로 보인다. 따라서 호모시스틴의 S-nitrosation은 궁극적으로 호모시스틴의 중추신경계에서의 신경독성을 제거하는 작용을 할 것으로 생각된다. 호모시스틴은 혈관 내피세포에 대해 강한 독성을 나타내며 혈소판응집 작용이 있는 것으로 보고되어 있다. 그러나 S-nitrosohomocysteine은 혈소판응집작용이 없고 호모시스틴에 의한 세포독성의 원인으로 생각되는 H_2O_2 를 생성하지 않는 것으로 알려져 있다 (Stamler 등, 1993).

S-nitrosohomocysteine은 또한 NMDA에 의한 독성을 억제하기도 하여 허혈 등의 조건에서 다량 유리되는 것으로 알려져 있는 글루타민산의 신경독성을 제거할 수도 있는 것으로 보인다. S-nitrosohomocysteine에 의한 NMDA 작용 억제기전은 본 연구에서는 밝혀지지 않았으나, 호모시스틴에 의한 NMDA 작용 억제기전과 유사할 것으로 생각된다: 호모시스틴은 NMDA 수용체의 글리신결합부위에서 글리신의 결합을 경쟁적으로 억제함으로써 NMDA 수용체의 활성을 억제한다 (Kim 등, 1995).

호모시스틴은 S-nitrosohomocysteine을 제조하는 과정의 산성조건에서 일부 homocysteine thiolactone으로 될 수 있다 (Riegel, DuVigneaud, 1935). Homocysteine thiolactone은 혈관 내피세포에 직접적인 독성작용을 가지는 것으로 보고되어 있다 (McCully, Ragsdal, 1970; McCully, Wilson, 1975). 그러나 고농도 (> 10 mM)의 homocysteine thiolactone은 일차배양한 흰쥐 대뇌피질 세포에서 세포내 칼슘농도를 증가시키지 않았으며 신경독성의 지표가 되는 lactate dehydrogenase의 유리도 유발하지 않는 것으로 보아(테이타 생략) 본 실험에서 보여지는 호모시스틴과 nitric oxide에 의한 반응물의 독성은 homocysteine thiolactone의 생성에 의한 것이 아닌 것으로 생각된다.

S-nitrosation에 의한 세포보호작용은 호모시스틴뿐만 아니라 다른 황함유아미노산(Sulfur-containing amino acid)에서도 관찰된다. 예를 들면

시스틴의 경우 매우 강한 세포독성을 보이거나 (Nishiuch 등, 1976) nitric oxide가 시스틴에 S-nitrosation 되어 시스틴의 세포독성을 제거하는 것으로 보고되어 있다. 따라서 nitric oxide는 직접 혈관평활근의 이완뿐만 아니라 세포독성이 되는 호모시스틴, 시스틴 등의 황함유아미노산과 화학적으로 반응하여 세포 독성을 제거하는 능력을 가지고 있음을 보여 주고 있다.

고호모시스틴혈증 환자에서 예상되는 호모시스틴에 의한 혈관질환이나 신경독성을 치료하기 위하여 혈중 호모시스틴농도를 저하시키거나, 혈관 내피세포의 부활을 도모하여 nitric oxide 등의 EDRF의 생성을 원활히 함으로써 S-nitrosation을 통해 혈관질환 관련물질(예, 황함유아미노산)의 세포독성을 제거하는 것이 중요한 의미를 가질 것으로 생각된다. 또한 고호모시스틴환자에서 예상되는 호모시스틴에 의한 신경독성은 NMDA수용체를 통하여 일어나므로 NMDA 수용체 길항제의 사용도 추천할 만하다.

참 고 문 헌

- Allen IC, Grieve A and Griffiths R: *Differential changes in the content of amino acid neurotransmitters in discrete regions of the rat brain prior to the onset and during the course of homocysteine-induced seizures.* J Neurochem 46: 1582-1592, 1986
- Blennow G, Folbergrova J, Nilsson B and Siesjo BK: *Cerebral metabolic and circulatory changes in the rat during sustained seizures induced by DL-homocysteine.* Brain Res 179: 129-146, 1979
- Byler DM, Grosser DK and Susi H: *Spectroscopic estimation of the extent of nitrosothiol formation by nitrite action on sulfhydryl groups.* J Agric Food Chem 31: 523-527, 1983
- Gibson JB, Carson NAJ and Neill DW: *Pathological findings in homocysteinuria.* J Clin Pathol 17: 427-437, 1964
- Grykiewicz G, Poenie M and Tsien RY: *A new*

- generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260: 3440-3450, 1985
- Heinecke JW, Rosen H, Suzuki LA and Chait A: *The role of sulfur-containing amino acids in superoxide production and modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cells. J Biol Chem* 262: 10098-10103, 1987
- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE and Chaudhuri G: *Endothelium derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. Proc Natl Acad Sci USA* 84: 9265-9269, 1987
- Joosten E, vander Berg A, Riezler R, Naurath HJ, Lindenbaum J, Stabler SP and Allen RH: *Metabolic evidence that deficiencies of vitamin B-12 (cobalamin), folate, and vitamin B-6 occur commonly in elderly people. Am J Clin Nutr* 58: 468-476, 1993
- Kim WK, Rayudu PV, Choi YB, Kumar S, Stamler JS and Lipton SA: *Homocysteine: An NMDA agonist and glycine site partial antagonist that induces cortical neurotoxicity. Soc Neurosci Abst* 21: 521, 1995
- Kubova H, Folbergrova J and Mares P: *Seizures induced by homocysteine in rats during ontogenesis. Epilepsia* 36:750-756, 1995
- Malinow MR: *Hyperhomocysteinemia: A common and easily reversible risk factor for occlusive atherosclerosis. Circulation* 81: 2004-2006, 1990
- McCully KS: *Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. Am J Pathol* 56: 111-128, 1969
- McCully KS and Ragsdale BD: *Production of arteriosclerosis by homocysteinemia. Am J Pathol* 61: 1-8, 1970
- McCully KS and Wilson RB: *Homocysteine theory of arteriosclerosis. Artherosclerosis* 22: 215-227, 1975
- Nishiuchi Y, Sasaki M, Nakayasu M and Oikawa A: *Cytotoxicity of cysteine in culture media. In Vitro* 12: 635-638, 1976
- Olszewski AJ and McCully KS: *Homocysteine metabolism and the oxidative modification of proteins and lipids. Free Radical Biol Med* 14: 683-693, 1993
- Palmer RMJ, Ferrige AG and Moncada S: *Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature(Lond)* 327: 524-526, 1987
- Riegel B and DuVigneaud V: *The isolation of homocysteine and its conversion to a thiolactone. J Biol Chem* 112: 149-154, 1935
- Selhub J, Jacques PF, Wilson PWF, Rush D and Rosenberg IH: *Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population. JAMA* 270: 2693-2698, 1993
- Selhub J, Jacques PF, Bostom AG, D'Agostino RB, Wilson PW, Belanger AJ, O'Leary DH, Wolf PA, Schaefer EJ and Rosenberg IH: *Association between plasma homocysteine concentrations and extracranial carotid-artery stenosis. N Engl J Med* 332: 286-291, 1995
- Stabler SP, Marcell PD, Podell ER, Allen RH, Savage DG and Lindenbaum J: *Elevation of total homocysteine in the serum of patients with cobalamin or folate deficiency detected by capillary gas chromatography-mass spectrometry. J Clin Invest* 81: 466-474, 1988
- Stamler JS, Osborne JA, Jaraki O, Rabbani LE, Mullins M, Siegel DJ and Loscalzo J: *Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and released oxides of nitrogen. J Clin Invest* 91: 308-318, 1993
- Stamler JS, Simon DI, Osborne JA, Mullins ME, Jaraki O, Michel T, Siegel DJ and Loscalzo J: *S-nitrosylation of proteins with nitric oxide synthase and characterization of biologically active compounds. Proc Natl Acad Sci USA* 89: 444-448, 1992
- Starkebaum G and Harlan JM: *Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. J Clin Invest* 77: 1370-1376, 1986