

【原著論文】

非アルコール性脂肪肝炎モデル動物の肝炎と 肝線維化に対するSodium nitriteとCaptoprilの 併用投与による影響

河野 有華ⁱ⁾ 藪田 邦博ⁱ⁾ 大竹 一男ⁱⁱ⁾
柴 祥子ⁱⁱ⁾ 北森 一哉ⁱ⁾ 小林 順ⁱⁱⁱ⁾

ⁱ⁾ 金城学院大学 生活環境学部 食環境栄養学科

ⁱⁱ⁾ 城西大学 薬学部 薬学科

ⁱⁱⁱ⁾ 城西大学 薬学部 医療栄養学科

Interaction effect of sodium nitrite and captopril on liver inflammation
and fibrosis in an animal model with nonalcoholic steatohepatitis

Yuka KONOⁱ⁾, Kunihiro SONODAⁱ⁾, Kazuo OHTAKEⁱⁱ⁾
Sachiko SHIBAⁱⁱ⁾, Kazuya KITAMORIⁱ⁾, Jun KOBAYASHIⁱⁱⁱ⁾

ⁱ⁾ Department of Food and Nutritional Environment, College of Human Life and Environment, Kinjo Gakuin University, Nagoya, Japan.

ⁱⁱ⁾ Division of Physiology, School of Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Science, Josai University, Saitama, Japan.

ⁱⁱⁱ⁾ Department of Clinical Dietetics and Human Nutrition, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Science, Josai University, Saitama, Japan.

要約

【目的】 現在、非アルコール性脂肪肝炎（Non-alcoholic steatohepatitis：NASH）は明確な治療法が確立されていないことから、治療法の確立が課題となっている。本研究では、重度な線維化が起こるNASHモデル動物を用いて野菜や果物に含まれている亜硝酸塩（Nitrite）と、臨床的に使用されているACE阻害薬のCaptoprilとの併用摂取によるNASHの炎症と線維化への影響を明らかにすることを目的に研究を行った。【方法】 10週齢の雄性SHRSP5/Dmcrを① Control群（通常食）、② HFC群（高脂肪・高コレステロール食）、③ Nitrite 群（HFC + Sodium nitrite）、④ Captopril 群（HFC + Captopril）、⑤ Combination群（HFC + Sodium nitrite + Captopril）に分け、8週間飼育した。血圧は動脈血圧を測定し、肝臓の病理標本を作製して炎症と線維化の評価、および血漿中の硝酸塩（Nitrate）濃度を測定した。【結果】 Combination群は、NASHモデル動物の体重、肝臓重量、血圧に有意な差を示さなかったが、抑制傾向にあった。また、血漿中のNitrate濃度は、HFC群と比べてCombination群で有意に増

加したが、Nitrite群とCaptopril群で有意な差はなかった。Combination群は、肝臓の炎症範囲と線維化面積をHFC群よりも有意に減少させたが、Sodium nitriteとCaptoprilの単独投与では、線維化面積を抑制しなかった。【結語】 Sodium nitriteとCaptoprilの併用摂取は、NASHの炎症と線維化を相乗的に抑制する可能性が示唆されたことから、NASHの新たな治療戦略として応用できる可能性がある。

はじめに

非アルコール性脂肪性肝疾患（Non-alcoholic fatty liver disease：NAFLD）は、アルコールの多飲が原因ではないにも関わらず、肝臓に脂肪が蓄積した病態で、非アルコール性脂肪肝（Non-alcoholic fatty liver：NAFL）と非アルコール性脂肪肝炎（Non-alcoholic steatohepatitis：NASH）の2つに分類される。NAFLは予後が良好であるとされているが、NASHは進行性であり脂肪肝から肝硬変、肝がんへと進行しやすい。しかし、現在もNASHに対する明確な治療法が確立されていないことから、治療法の確立が喫緊の課題になっている。

NAFLD / NASHは、食事・運動などの生活習慣に起因する肥満、糖尿病、脂質異常症、高血圧症を同時に有することが多いことから、メタボリックシンドロームの肝臓での表現型とも呼ばれる¹⁾。脂質を過剰に摂取すると、肝臓への遊離脂肪酸の流入が増加する²⁾。過剰に流入した脂肪酸は中性脂肪に合成され、肝臓に蓄積することで脂肪肝となる³⁾。また、血清中に増加した遊離脂肪酸はミトコンドリアやペルオキシゾームで β 酸化を受けるが、過剰な遊離脂肪酸酸化の負荷により活性酸素種を生じる⁴⁾。活性酸素種は炎症性サイトカインを誘導して肝臓の炎症を惹起し、肝星細胞を活性化することでコラーゲンの産生を増加させ線維化を促進する⁴⁾。

NAFLD / NASHでは血管内皮障害や活性酸素種の増加により血管拡張作用、抗炎症作用、抗酸化作用を示す一酸化窒素（Nitric oxide：NO）の産生を低下させることによって病態が進行することが知られている。通常、ヒトにおける内因性のNO産生経路は血管内皮細胞や神経細胞内でL-アルギニンを基質としてNO合成酵素（NO synthase：NOS）によって行われている。一方で、最近では野菜や果物に含まれている硝酸塩（Nitrate）から酵素・化学的にNOを産生する外因性のNO産生経路が注目されている。野菜や果物から摂取したNitrateは、75%は尿中に排泄されるが、25%は唾液中に分泌されて口腔内の微生物により亜硝酸塩（Nitrite）に還元される⁵⁾。還元されたNitriteは、生体内で酵素的・化学的にNOに変換され、血管拡張作用、抗炎症作用、抗酸化作用、線維化抑制作用を有することが知られている。Nitrateから産生されるNOは、腸-唾液循環によって恒常的に体内を循環できることから、内因性NOが不足した際のバックアップシステムやオンデマンドのNO供与体としての役割も期待されている。

高血圧の第一選択薬の1つであるアンジオテンシン変換酵素阻害薬（Angiotensin converting enzyme inhibitor：ACE inhibitor）は、アンジオテンシン I からアンジオテンシン II（Angiotensin II：AT II）への変換を抑制することで血圧の上昇を抑制する。2014年と2016年に公表された大規模な横断研究では、ACE阻害薬がNASH患者の肝線維化を抑制したことか

ら^{6, 7)}、NASHに対して一部有効性が認められている。レニン-アンジオテンシン系 (Renin-angiotensin system : RAS) の活性化は昇圧だけでなく、炎症や線維化を誘導することが知られている。NASHでは、肝星細胞に発現するAT II受容体にAT IIが結合することで肝星細胞が活性化され、炎症や肝線維化を促進する。そのため、ACE阻害薬はRASの抑制をすることで肝臓の炎症や線維化を抑制していると考えられている²⁾。さらに、ACE阻害薬のCaptoprilは、スルフヒドリル基 (SH基) を有しており、活性酸素種を減少させることで内因性NOの安定性を高めることが報告されている⁸⁾。その他、SH基を有するACE阻害薬のゾフェノプリルが、外因性のNO供与体である硝酸薬やSodium nitrite由来NOの作用を増強する可能性があることも報告されている⁹⁾。最近の報告では、NASHモデル動物にCaptoprilとNitriteの単独投与が炎症や線維化などの病態進行を抑制することが報告されている¹¹⁾。以上のことから、我々はNASHに対して作用機序の異なるNitriteとCaptoprilを併用することによる相互作用がNASHの病態進行を抑制できると仮説を立てた。

そこで本研究では、重度な線維化が起こるNASHモデル動物のSHRSP5/Dmcrを用いてSodium nitriteとCaptoprilの併用によるNASHの炎症と線維化への影響を明らかにすることを目的に研究を行った。なお、ヒトは唾液中にNitrateを濃縮することで口腔内におけるNitrateからNitriteの変換を効率的に行っているが、げっ歯類は唾液中にNitrateを濃縮しない。そのため、本研究ではヒトにおけるNitrateの腸-唾液循環系に近づけるためSodium nitriteを用いた。

方法

1. 試薬・試料

Captopril、Sodium nitriteを和光純薬工業株式会社 (大阪)、ヘパリンNaを持田製薬株式会社 (東京)、Inactin[®]をSigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より購入した。

2. 実験動物

10週齢の雄性SHRSP5/Dmcrは、日本エスエルシー株式会社より購入した。ラットを5匹ずつの5群に分け、通常食を与えたControl群、高脂肪・高コレステロール (High-fat and high-cholesterol : HFC) 食を与えたHFC群、HFC食とSodium nitriteを100 mg/L与えたNitrite群、HFC食とCaptoprilを100 mg/L与えたCaptopril群、HFC食とSodium nitrite (100 mg/L) にCaptopril (100 mg/L) を加えて与えたCombination群とした。飼育室の環境条件は、室温 24 ± 2 °C、湿度 60 ± 5 %、明暗12時間 (明期8 : 00~20 : 00/暗期20 : 00~8 : 00) サイクルである。Sodium nitriteとCaptoprilは飲料水に混ぜて自由摂取とし、8週間飼育した。本実験は金城学院大学の動物実験委員会によって承認 (承認番号 : 165) されており、「金城学院大学動物実験指針」を遵守して行った。

3. 血圧測定

Inactin 麻酔 (80 mg/kg i.p.) を処置した後、血圧を測定するため後肢大腿動脈にヘパリン生理食塩液で満たしたPE50のチューブを留置した。PowerLab 4/30 system (ADInstruments, Dunedin, New Zealand) に接続して連続的に測定し、解析ソフトLabChartv5.2 (ADInstruments, Dunedin, New Zealand) を用いて10分間の血圧の平均値を算出した¹⁰⁾。

4. 肝臓の病理標本作製

解剖時に摘出した肝臓は10%ホルマリン溶液で保存し、その後パラフィン包埋した。包埋した組織は5 μ mの厚さに薄切し、細胞質が黄色に染まり、線維が赤く染まるシリウスレッド染色を行った。その後、肝臓全体の組織画像を実体顕微鏡 (OLYMPUS SZ61, 東京) で撮影した。撮影した画像を基に肝臓組織全体に占める線維化領域の割合 (%) を算出した¹⁰⁾。画像の解析は、Image Jソフトウェア (Ver.1.48, National Institutes of Health, U.S.A.) を用いた。

5. 免疫学的組織評価

包埋した肝組織を5 μ mの厚さに薄切し、キシレンで脱パラフィン後、Histo/zyme (コスモ・バイオ株式会社、東京) で抗原の賦活化を行った。内因性ペルオキシダーゼ活性を過酸化水素でブロックした後、CD68マウスモノクローナル抗体 (希釈率1:400) (ab955; Abcam plc, Cambridge, UK) を添加して一晩インキュベートした。次に、二次抗体マウスMAX-PO (Rat) (414311; Nichirei Biosciences Inc.、東京、日本) と共にインキュベートした。発色は、ペルオキシダーゼ基質ジアミノベンジジン (ImmPACT™ DAB; Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, U.S.A.) を用いて行った。免疫染色の定量化は、高解像度ビデオカメラを装備した光学顕微鏡 (OLYMPUS CX41, 東京) を用いて、肝臓組織を10視野撮影した。撮影した肝臓の全領域に占めるCD68陽性領域の割合 (%) を算出した。画像の解析は、Image Jソフトウェア (Ver.1.48, National Institutes of Health, U.S.A.) を用いた。

6. 血漿中のNitrate濃度の測定

血漿をメタノールで2倍希釈し、15,000 \times gで5分間遠心分離することによって除タンパクと不純物の除去を行った後、上清を測定試料として用いた。血漿中のNitrate濃度は、グリース法をもとにしたHPLCシステム (ENO-20, Eicom, 京都) を用いて測定した¹¹⁾。

7. 統計解析

値は、すべて平均値 \pm 標準誤差で示した。3群以上の検定を一元配置分散分析した後、有意差があったものに対しTukey testを行い、 $p < 0.05$ をもって有意差有とした。これらの統計解析はStat Mate V (株式会社アトムス, 東京) を用いた。

結果

1) Sodium nitriteとCaptoprilの併用摂取による体重・肝重量に対する影響

表1に各群の体重、肝重量、体重に占める肝臓の割合を示した。体重は、Control群と比べて全ての群で有意に減少した。HFC群に比べCaptopril群は有意に体重が減少していたが、Nitrite群とCombination群は有意な差を示さなかった。体重に占める肝臓の割合はControl群と比べてすべての群で有意に増加した。一方で、Captopril群やCombination群は有意な差は無かったがHFC群に比べ体重に占める肝臓の割合が減少傾向にあった。

表1. Sodium nitriteとCaptoprilの併用摂取による体重、肝重量に対する影響

| Parameters | Control | HFC | Nitrite | Captopril | Combination |
|--------------------------------|------------|--------------|--------------|------------------|--------------------|
| Body weight (g) | 301 ± 3.7 | 280 ± 2.8 * | 285 ± 4.3 * | 246 ± 1.6 * † # | 272 ± 4.0 * ※ |
| Liver weight (g) | 11.1 ± 0.3 | 26.3 ± 0.6 * | 27.9 ± 0.7 * | 21.9 ± 0.3 * † # | 24.1 ± 0.4 * † # ※ |
| Liver weight / Body weight (%) | 3.7 ± 0.1 | 9.4 ± 0.2 * | 9.8 ± 0.2 * | 8.9 ± 0.1 * # | 8.9 ± 0.1 * # |

平均値 ± 標準誤差 (n = 5)

* $p < 0.05$ v.s. Control, † $p < 0.05$ v.s. HFC, # $p < 0.05$ v.s. Nitrite, ※ $p < 0.05$ v.s. Captopril

2) Sodium nitriteとCaptoprilの併用摂取による血圧に対する影響

図1に各群の平均血圧を示した。Control群、HFC群、Nitrite群の各群間で有意な差は認められなかったが、Captopril群はControl群、HFC群、Nitrite群と比較して血圧が有意に低下した。Combination群は、Control群、Nitrite群と比較して血圧が有意に低下した。

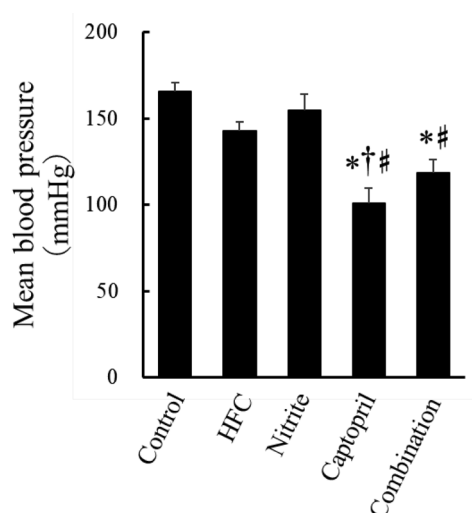


図1. Sodium nitriteとCaptoprilの併用摂取による血圧に対する影響

平均値 ± 標準誤差 (n = 5)

* $p < 0.05$ v.s. Control, † $p < 0.05$ v.s. HFC, # $p < 0.05$ v.s. Nitrite

3) Sodium nitriteとCaptoprilの併用摂取による血漿中のNitrate濃度に対する影響

図2に血漿中のNitrate濃度を示した。血漿中のNitrate濃度は、Control群と比較して全ての群で有意に高かった。さらに、Combination群の血漿中のNitrate濃度はHFC群よりも有意に高かった。

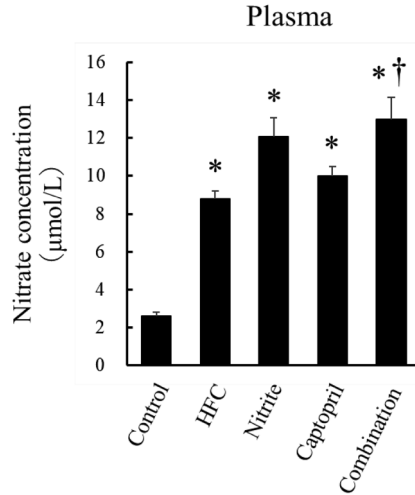


図2. Sodium nitriteとCaptoprilの併用摂取による血漿中のNitrateに対する影響
 平均値±標準誤差 (n = 5)
 * $p < 0.05$ v.s. Control, † $p < 0.05$ v.s. HFC

4) Sodium nitriteとCaptoprilの併用摂取による肝臓の炎症に対する影響

図3に炎症を促進するマクロファージに発現する糖タンパク質のCD68を免疫染色した組織画像とCD68の陽性面積の定量結果を示した。免疫染色の結果、炎症範囲はControl群と比べて全ての群で有意に増加したが、Captopril群とCombination群はHFC群よりも炎症範囲を有意に減少した。

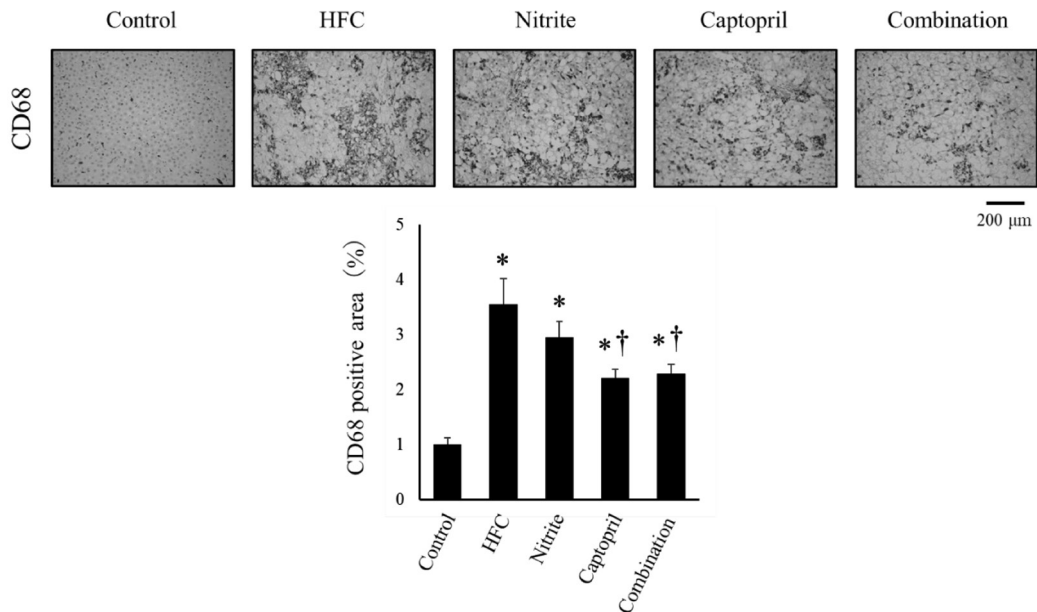


図3. Sodium nitriteとCaptoprilの併用摂取による肝臓の炎症に対する影響
 平均値±標準誤差 (n = 5)
 * $p < 0.05$ v.s. Control, † $p < 0.05$ v.s. HFC

5) Sodium nitriteとCaptoprilの併用摂取による肝臓の線維化に対する影響

図4にシリウスレッド染色の組織画像と線維化面積の定量結果を示した。Control群に比べHFC群とCaptopril群で線維化面積が有意に増加した。一方、Nitrite群はControl群とHFC群の両方と有意な差がなかった。また、Combination群はHFC群に比べ線維化面積を有意に減少した。

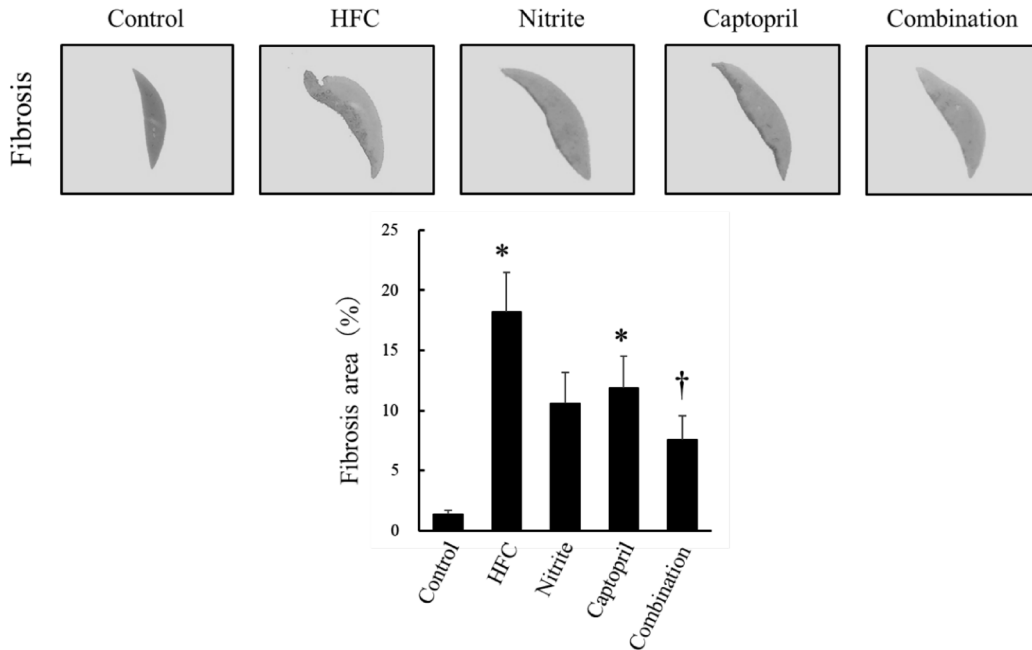


図4. Sodium nitriteとCaptoprilの併用摂取による肝臓の線維化に対する影響
平均値±標準誤差 (n = 5)
* $p < 0.05$ v.s. Control, † $p < 0.05$ v.s. HFC

考察

NASHは炎症や活性酸素の増大が病態の特徴であり、肝硬変、肝がんへと進展するため病態の進展抑制が重要であるが、その治療法は確立できていない。我々が日常的に野菜や果物から摂取しているNitrateから産生されるNitriteは、内因性NOの産生とは異なる機序で外因性NOを産生し、様々な生理作用を示すことが知られている。また、ACE阻害薬（Captopril）はヒトのNASHに対して部分的に病態進展を抑制する作用を示すことが報告されていることから、NitriteとCaptoprilを併用摂取することでNASHの病態進展に対して相乗的な効果を発揮すると仮説を立てた。そこで本研究では、NASHモデル動物を用いてSodium nitriteとCaptoprilの併用摂取によるNASH病態進展抑制効果を明らかにすることを目的に研究を行った。

本研究に用いたSHRSP5/Dmcrラットは、HFC食を与えると肝臓に脂肪沈着、炎症を引き起こし、8週間以上HFC食を与え続けると重度の肝線維化を引き起こすNASHモデル動物である¹²⁾。本モデル動物にHFC食を8週間与えた結果、体重はControl群に比べHFC群で有意に減少した(表1)。SHRSP5/Dmcrは、HFC食を与えているにもかかわらず体重が増加しないことから非肥満型のNASHモデルである¹²⁾とされており、本結果と一致していた。体重に占める肝臓

の割合は、Control群に比べHFC群で有意に増加した（表1）。しかし、Nitrite群、Captopril群、Combination群の3群ともHFC群とは有意な差はなかった。

血圧は、Control群、HFC群、Nitrite群に有意な差はなかったが、Captopril群はそれぞれの群に比べ有意な血圧低下作用を示した（図1）。一方で、Combination群はControl群とNitrite群に比べ有意に血圧を低下させたが、HFC群とは有意な差はなかった（図1）。RASの活性化を抑制するCaptoprilを投与することによって血圧低下作用を示したことから、本モデル動物の血圧上昇にはRASの活性化が関与すると考えられた。一方、本研究においてNitrite群は血圧低下作用を示さなかった。NASHでは、活性酸素種が増加するためNitrite由来のNOが活性酸素種により消去されたことでNOの活性（血圧低下作用）を示さなかった可能性がある。先行研究においても本モデル動物にSodium nitriteを与えると炎症や線維化は抑制するものの血圧には影響を与えなかったことが報告¹⁰⁾されており、本結果と一致していた。

血漿中のNitrateは、HFC群とNitrite群で比べると有意な差はなかったものの増加傾向にあった（図2）。Nitrateが増加した理由として、Nitriteは生体内で酸化されるとNitrateとなるため、摂取したNitriteが反映されたと考えられた。また、Combination群はHFC群と比べNitrateが有意に増加していた。Captoprilは、ブラジキニンの分解を阻害することで、血管内皮細胞に存在するNO合成酵素を介したNOの産生を増加させることが報告されている¹³⁾。このことから、本研究におけるCombination群のNitrateの増加は、Captoprilによる血管内皮細胞由来NOの増加に伴うNitrateと、摂取したNitrite由来のNitrateが合わさった結果であると考えられた。これは、SHRSP5/Dmcrに高脂肪食を与えたNASHモデルに対してSodium nitriteまたはCaptoprilを投与すると血漿中のNitrateが増加するという報告¹⁰⁾と一致していた。また、Control群に比べHFC群はNitrateが有意に増加していた。NASHでは、炎症により誘導型NOS（Inducible NOS：iNOS）が過剰発現していることが報告¹⁴⁾されており、本研究においてもHFC群で炎症範囲が増加していた（図3）。このことから、HFC群におけるNitrateの増加は炎症に伴うiNOS由来のNOを反映しているものと考えられた。炎症範囲は、Control群に比べ全ての群で有意に増加したが、HFC群と比較してCaptopril群とCombination群は炎症範囲を有意に減少させた（図3）。線維化面積は、Control群と比べHFC群やCaptopril群では有意に増加しており、Nitrite群においてはHFC群と有意な差は無かった。一方、Combination群はHFC群に比べ線維化面積を有意に抑制した（図4）。

以上のことから、Sodium nitriteとCaptoprilは単独で投与することに比べて両者を併用することでNASHの病態進展に関わる炎症と線維化への進行を抑制する効果が増強されることが示唆された。本研究では詳細なメカニズムについては明らかに出来ていないが、NASHでは、肝星細胞の活性化により炎症や肝線維化を促進することが知られている。肝星細胞にはAT II受容体が発現しており、RASの活性化により肝臓の炎症や肝線維化を促進する²⁾。本NASHモデル動物にCaptoprilを投与することにより血圧低下作用を示したことから、CaptoprilがRASの活性化を抑制することで血圧上昇だけでなく肝星細胞の活性化も抑制することでNASHの病

態進行を抑えた可能性がある。さらに、Marceloら¹⁵⁾はSodium nitriteの摂取が炎症や線維化を誘導する活性酸素種を産生する酵素の1種であるNADPH oxidaseの発現を抑制すること、Bartoszaら¹⁶⁾はCaptoprilの構造中のSH基が抗酸化作用を示すことを報告している。Nitrite由来のNOは、抗炎症作用、抗酸化作用、血小板凝集抑制作用などの生理作用を発揮する。しかし、NOやNitriteは酸化されやすく、酸化されるとNO活性を失うため、抗酸化物質と併用することによりNO安定性が高まる。したがって、Sodium nitriteとCaptoprilの併用は、CaptoprilによるRAS活性化の抑制に加えて抗酸化作用によりNitriteやNOを安定化した結果、相乗的な作用を示したと推察する。しかし、本研究では脂肪肝や活性酸素種の増減などを評価していないことから、今後の研究課題としたい。

【結語】

本研究結果は、野菜に多く含まれるNitrateとCaptoprilを併用摂取することにより線維化の増加を抑制し、NASHの病態を改善する可能性を示した。このことから、NASHの新たな治療戦略として応用できる可能性がある。

【助成費】

本研究は、JSPS科研費 JP20K19725の助成を受けたものです。また、金城学院大学消費生活科学研究所の活動補助費を一部使用して実施しました。

【参考論文】

- 1) 米田政志「NAFLDの治療と予後のupdate」『日本消化器病学会雑誌』2014; 111: 35-41.
- 2) 一般社団法人 日本消化器病学会, 一般社団法人 日本肝臓学会編「NAFLD/NASH 診療ガイドライン2020 (改訂第2版)」株式会社 南江堂 2020年12月20日発行
- 3) 伊藤大輔, 島田朗「脂肪肝に対する作用の可能性 - 脂肪肝に対するSGLT2阻害薬のpossible effectsとその機序」『医学のあゆみ』2018; 266: 277-283
- 4) 渡辺哲, 岡崎勲「肝線維化に対する薬物療法」西原利治編『別冊・医学のあゆみ NAFLDのすべて』医歯薬出版株式会社. 2006年3月5日発行. 163-167
- 5) T.H. Florin, G. Neale, J.H. Cummings. The effect of dietary nitrate on nitrate and nitrite excretion in man. *Br J Nutr.* 1990; 64: 387-397.
- 6) Goh GB, Pagadala MR, Dasarathy J, Unalp-Arida A, Sargent R, Hawkins C, Sourianarayanan A, Khiyami A, Yerian L, Pai R, McCullough AJ, Dasarathy S. Renin-angiotensin system and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int.* 2015; 35(3): 979-85.
- 7) Pelusi S, Petta S, Rosso C, Borroni V, Fracanzani AL, Dongiovanni P, Craxi A, Bugianesi E, Fargion S, Valenti L. Renin-Angiotensin System Inhibitors, Type 2 Diabetes and Fibrosis

- Progression: An Observational Study in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *PLoS One*. 2016; 11(9): e0163069.
- 8) Liu YH, Liu LY, Wu JX, Chen SX, Sun YX. Comparison of captopril and enalapril to study the role of the sulfhydryl-group in improvement of endothelial dysfunction with ACE inhibitors in high dieted methionine mice. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2006; 47(1): 82-88.
 - 9) H Buikema, S H Monnick, R A Tio, H J Crijns, D de Zeeuw, W H van Gilst. Comparison of zofenopril and lisinopril to study the role of the sulfhydryl-group in improvement of endothelial dysfunction with ACE-inhibitors in experimental heart failure. *Br J Pharmacol*. 2000; 130(8): 1999-2007.
 - 10) Sonoda K, Kono Y, Kitamori K, Ohtake K, Shiba S, Kasono K, Kobayashi J. Beneficial Effects of Dietary Nitrite on a Model of Nonalcoholic Steatohepatitis Induced by High-Fat/High-Cholesterol Diets in SHRSP 5 /Dmcr Rats: A Preliminary Study. *Int J Mol Sci*. 2022; 23(6): 2931.
 - 11) Ohtake K, Koga M, Uchida H, Sonoda K, Ito J, Uchida M, Natsume H, Kobayashi J. Oral nitrite ameliorates dextran sulfate sodium-induced acute experimental colitis in mice. *Nitric Oxide*. 2010; 23, 65-73.
 - 12) Kitamori K, Naito H, Tamada H, Kobayashi M, Miyazawa D, Yasui Y, Sonoda K, Tsuchikura S, Yasui N, Ikeda K, Moriya T, Yamori Y, Nakajima T. Development of novel rat model for high-fat and high-cholesterol diet-induced steatohepatitis and severe fibrosis progression in SHRSP 5 /Dmcr. *Environ Health Prev Med*. 2012; 17: 173-182.
 - 13) Regoli D, Gobeil F. Kallikrein-kinin system as the dominant mechanism to counteract hyperactive renin-angiotensin system. *Can J Physiol Pharmacol*. 2017; 95(10): 1117-1124.
 - 14) Wei CL, Hon WM, Lee KH, Khoo HE. Temporal expression of hepatic inducible nitric oxide synthase in liver cirrhosis. *World J Gastroenterol*. 2005; 11(3): 362-367.
 - 15) Montenegro MF, Amaral JH, Pinheiro LC, Sakamoto EK, Ferreira GC, Reis RI, Marçal DM, Pereira RP, Tanus-Santos JE. Sodium nitrite downregulates vascular NADPH oxidase and exerts antihypertensive effects in hypertension. *Free Radic Biol Med*. 2011; 51(1): 144-52.
 - 16) M Bartosz, J Kedziora, G Bartosz. Antioxidant and prooxidant properties of captopril and enalapril. *Free Radic Biol Med*. 1997; 23(5): 729-35.