

고혈압 쥐와 정상혈압 쥐의 혈관 평활근 세포에서 케모카인 발현 비교

김정혜 · 박소영* · 김희선

영남대학교 의과대학 미생물학교실, 생리학교실*

Differential Expression of Chemokines in Vascular Smooth Muscle Cells from Spontaneously Hypertensive Rat and Normotensive Rat

Jung Hae Kim, So Young Park*, Hee Sun Kim

*Department of Microbiology and *Department of Physiology
College of Medicine, Yeungnam University, Daegu, Korea*

—Abstract—

Background : The action of chemokines to the vascular inflammation plays a pathogenic role in the development and maintenance of hypertension.

Materials and methods : In the present study, the expression of chemokine IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2 and RANTES/CCL5 was investigated in cultured vascular smooth muscle cells (VSMC) obtained from the thoracic aorta of normotensive Wistar-Kyoto rat (WKY) and spontaneously hypertensive rat (SHR). We used real-time PCR and western blotting.

Result : The expressions of IL-8/CXCL8, and MCP-1/CCL2 mRNA were stronger in VSMC from SHR than in WKY. However, the expression of RANTES/CCL5 was stronger in VSMC from WKY than in SHR. Expressions of CXCR1, CCR2, CD14 and PPAR γ mRNA were stronger in VSMC from WKY than in SHR. Expressions of LPS-induced IL-8/CXCL8 and MCP-1/CCL2 mRNA were stronger in VSMC from SHR, but expression of LPS-induced RANTES/CCL5 was stronger in VSMC from WKY. A PPAR- γ ligand, 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂) which possesses anti-inflammatory activity suppressed the expressions of LPS-induced IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2 and RANTES/CCL5 in VSMC from WKY and the expressions of LPS-induced MCP-1/CCL2 and RANTES/CCL5 expressions in

SHR. But, the expression of LPS-induced IL-8/CXCL8 mRNA in SHR was increased by 15d-PGJ₂. Angiotensin II (AngII) also induced IL-8/CXCL8 and MCP-1/CCL2 mRNA expressions in VSMC from SHR, but inhibited the expression of RANTES/CCL5 mRNA. Activities of LPS, or AngII-induced MAP kinases were stronger in VSMC from SHR than in WKY. Expression of AngII-induced IL-8/CXCL8 mRNA was associated with ERK pathway, and the expression of AngII-induced MCP-1/CCL2 mRNA was associated with p38 pathway, and the inhibition of RANTES/CCL5 mRNA by AngII was not associated with MAP Kinases pathways.

Conclusion : Chemokine IL-8/CXCL8 and MCP-1/CCL2, not RANTES/CCL5, has a possibility to play a critical role in the pathogenesis of hypertension in the SHR.

Key Words : Chemokine, MAP kinase, Gene expression

서 론

고혈압의 발생 및 유지는 혈관 내 지속적 염증 작용들과 관련이 있으며, 동맥 경화 발생의 주요 위험 인자이다. 명확한 세포 분자생물학적 발생 기전은 아직 밝혀지지 않았으나, 일부는 케모카인들이 작용할 것으로 추측하고 있다.¹⁻⁴⁾ 혈관 평활근세포와 혈관내피세포의 증식이나 단핵세포, 큰 포식세포의 침윤은 케모카인에 의해 매개되며 과도한 케모카인의 생산은 염증 환경을 지속적으로 유발하게 된다. 또한 실험동물의 경우 염증 세포의 침윤이 고혈압의 병리기전과 관계가 있음을 보고하고 있다.⁵⁻⁸⁾ 고혈압환자나 실험동물의 동맥 혈관 내에는 만성적인 단핵세포 매개 염증이 관찰된다. 그리고 실험동물의 경우 염증 세포들의 침윤 억제 시 고혈압이 호전되는 것이 관찰 된다.⁹⁾ 따라서 케모카인의 생산 조절은 고혈압 혈관 벽의 염증 작용 조절에 중요하다 할 수 있다. 고혈압 실험동물에서 케모카인에 관한 연구는 주로 MCP-1/CCL2 관련 연구이다.^{4, 5, 10, 11)} 고혈압

혈관 손상 시 MCP-1/CCL2이 증가되어 있으며 염증 작용에 관여 한다는 것이다. 따라서 본 연구는 고혈압 쥐 (spontaneously hypertensive rat, SHR)와 정상혈압 쥐 (Wistar Kyoto rat, WKY) 혈관평활근세포 (vascular smooth muscle cells, VSMC)에서 케모카인 IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2 및 RANTES/CCL5의 발현도를 비교하고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료

Total RNA의 분리는 Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하였다. Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), penicillin-streptomycin and fetal bovine serum (FBS)은 Gibco/BRL (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA)사에서 구입하였다. 15d-PGJ₂는 Biomol (Plymouth Meeting, PA, USA)사에서 구입하였다. *Escherichia coli* LPS

(O111:B4)는 Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA)사에서 구입하였다. Angiotensin II는 Calbiochem (San Diego, CA, USA)사로부터 구입하였다. MAPK inhibitors, 2'-amino-3'-methoxyflavone (PD98059), Anthral[1,9-cd]pyrazol-6(2H)-one (SP600125), 4-(4-fluorophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-5-(4-pyridyl)-1H-imidazole (PD169316)은 Calbiochem (San Diego, CA, USA)사로부터 구입하였다. Nitrocellulose transfer membrane은 Schleicher & Schuell Bioscience (Dassel, Germany)사에서 구입하였다. 중합효소연쇄반응을 위한 IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5, CXCR1, CCR2, CCR1, CD14, PPAR- γ , β -actin oligonucleotide primer는 Bionics (Seoul, Korea)사로부터 합성하여 구입하였다. The LightCycler FastStart DNA SYBR Green I Mix는 Roche (Mannheim, Germany)사에서 구입하였다. Phospho-ERK, phospho-p38, phospho-JNK 항체는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)사에서 구입하였다. γ -tubulin 항체는 Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA)사에서 구입하였다.

실험동물

생후 20~30주령의 specific pathogen free (SPF)의 수컷 고혈압 쥐 (Spontaneously hypertensive rat, SHR)와 정상혈압 쥐 (Wistar Kyoto rat, WKY)를 Japan SLC Int. (Japan)에서 구입하여 실험에 사용하였다. Rat에 실험동물 사료 (삼양유지사료, 강원도 원주)와 멸균 음용수를 공급하고 가능한 스트레스와 환경적으로 큰 변화를 받지 않도록 사육하였다.

세포배양

20~30주의 수컷 고혈압 쥐와 정상 쥐의 thoracic aorta로부터 혈관평활근세포를 분리하였다. 혈관 평활근세포는 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin을 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)을 사용하여 세포를 배양하였다. 0.25% Trypsin/EDTA를 이용하여 세포를 plate로부터 떼어낸 후 75-cm² tissue culture flasks에 10⁵ cells/ml 정도의 농도로 계대배양 하였다. 본 연구에서는 3~5계대의 세포를 사용하였다. 실험 전, 95% 정도 배양된 혈관평활근세포의 배지를 FBS가 첨가되지 않은 DMEM에서 16~18시간 동안 배양하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 실험 반응시간에 따라 정치 배양하였다.

Real-time PCR

특정유전자 발현의 관찰을 위하여 Roche사의 LightCycler를 이용하여 Real-time PCR를 수행하였다. 분리된 total RNA 농도를 각각 1 μ g으로 조정하고 역전사를 실시하여 cDNA를 합성시킨 후 real-time PCR 시료로 사용하였다. PCR 과정은 Roche사에서 제시한 실험의 방법에 준하여 실행하였다. PCR master mixture의 구성은 MgCl₂ 1.2 μ l, LightCycler FastStart DNA master SYBR Green I 1 μ l, 10 pmole의 sense primer와 anti-sense primer를 각각 0.4 μ l, cDNA 2 μ l와 멸균 증류수 5 μ l를 혼합하여 전체 양이 10 μ l가 되도록 하여 PCR를 실시하였다. Pre-incubation 단계는 95°C에서 10분 반응 뒤, 본격적인 증폭을 하였다. 변성과정은 95°C에서 10초, 연결과정은 primer에 따른 적정온도에서 5초, 신장과정은 72°C에서 10초간 총 45회를 실시한 뒤 매 회마

다 fluorescense detection을 수행하였다. 이 후 65~95°C의 범위에서 계속적인 fluorescense detection을 동반한 Melting point 분석을 실시하였다. 이 때 발현 정도를 비교하기 위한 normalization gene으로 β -actin을 사용하였다. Primer의 염기서열은 다음과 같다. IL-8/CXCL8 (365 bp): sense, 5'-gaagatagattgcaccga-3' antisense, 5'-catagcctctcacatttc-3' ; MCP-1/CCL2 (396 bp): sense, 5'-cctgtgttcacagttgctgcc-3' antisense, 5'-tctacagaagtcttgagggttg-3'; RANTES/CCL5 (110 bp): sense, 5'-ctggaaggagtattttacaccagc-3' antisense, 5'cttg aacctctctctctggg-3'; CXCR1 (518 bp): sense, 5'-aatttgaaatcaccggaa-3' antisense, 5'-gacgtgtccagaacggtatgg-3'; CCR2 (233 bp): sense, 5'-cgcagagttgacaagttgtg-3' antisense, 5'-gccatggatgaactgaggta-3'; CCR1 (447 bp): sense, 5'-ggccttagccatcttagctt-3' antisense, 5'-cgctcaccacaaagacata-3'; CD14 (500 bp): sense, 5'-acatctgaaacctcgcaac-3' antisense, 5'-agcgttctatccagcctgt-3'; PPAR- ν (359 bp): sense, 5'-tgaggagaagtcacactctg-3' antisense, 5'-tggtcagctctgtgaatg-3'; β -actin (101 bp): sense, 5'-tactgcctggctcctagca-3' antisense, 5'-tgga cagtgaggccaggatag-3'이다.

Western blotting

세포를 수거하여 PRO-PREP buffer (iNtRON, Korea)를 이용하여 세포를 lysis 한 후 13000 rpm으로 10분 동안 원심하여 상층액을 수거하였다. Bradford (Bio-Rad, Rochmond, CA)법으로 단백질을 정량한 후 반응세포의 상층액을 분광광도계를 이용하여 595 nm에서 단백질 농도를 측정한다. 다음 -70°C에서 보관하여 western

blot을 위한 재료로 사용하였다. 30 μ g의 단백질을 10% SDS-PAGE gel에서 전기영동 한 후, nitrocellulose membrane에 전이하였다. 5% 탈지유에 적정 항체를 희석하여 4°C에서 16~18시간 동안 반응시키고 0.05% tween 20이 함유된 인산완충용액으로 3회 세척한 후 2차 항체를 5% 탈지유에 희석하여 실온에서 1시간 반응시켰다. 반응이 끝난 흡착지를 인산완충용액으로 3회 세척 후 chemiluminescence detection system (LAS-3000, Fujifilm, Japan)으로 관찰하였다.

결 과

혈관평활근세포에서의 케모카인의 발현

혈관평활근세포에서의 케모카인 IL-8/CXCL8과 MCP-1/CCL2 mRNA의 발현은 SHR이 WKY에 비해 월등히 높았다. 그러나 RANTES/CCL5의 경우 WKY 혈관평활근세포에서의 발현이 훨씬 높았다. 케모카인 IL-8/CXCL8의 수용체 CXCR1과 MCP-1/CCL2의 수용체 CCR2, 지다당질 (lipopolysaccharide, LPS)의 수용체 CD14 및 PPAR ν ligand 수용체 PPAR ν mRNA는 모두 WKY 혈관평활근세포에서 SHR에 비해 월등히 높게 발현되었다 (Fig. 1). LPS 유도에 의한 케모카인 유전자발현은 IL-8/CXCL8과 MCP-1/CCL2의 경우 SHR에서 발현이 더 강하였으나 RANTES/CCL5의 경우 WKY 혈관평활근세포에서 더 강하였다. LPS에 의해 유도된 케모카인 발현에 항 염증작용을 한다고 알려진 PPAR ν ligand인 15d-PGJ₂의 효과를 관찰한 결과, SHR 평활근 세포에서의 MCP-1/CCL2과 RANTES/CCL5의 발현과 WKY 평활근세포 모두에서 15d-PGJ₂에 의해 LPS 유

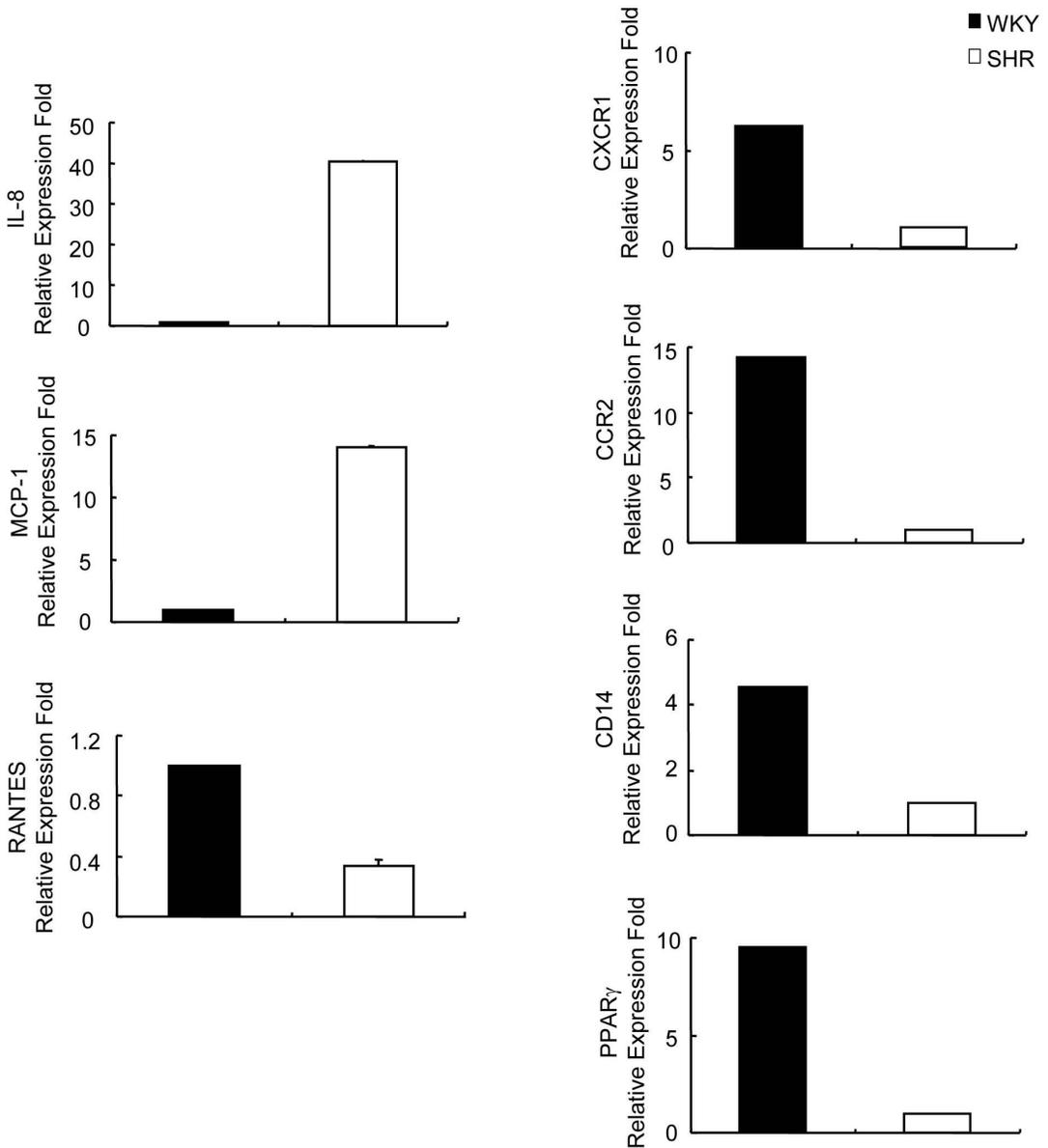


Fig. 1. Expression of IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2, RANTES/CCR5, CXCR1, CCR2, CD14 and PPAR γ mRNA in vascular smooth muscle cells (VSMC) from WKY and SHR. Real-time PCR for mRNAs expression in VSMC from WKY and SHR. Bars represent mean \pm SEM from three independent experiments.

도 케모카인들은 유전자 발현이 억제되었으나, SHR 평활근세포에서의 IL-8/CXCL8의 발현은 오히려 증가 되어 나타났다 (Fig. 2). SHR의 혈관

평활근세포에서 고혈압 유발인자인 Angiotensin II (AngII)에 의한 케모카인의 발현 또한 관찰한 결과 IL-8/CXCL8과 MCP-1/CCL2의 경우

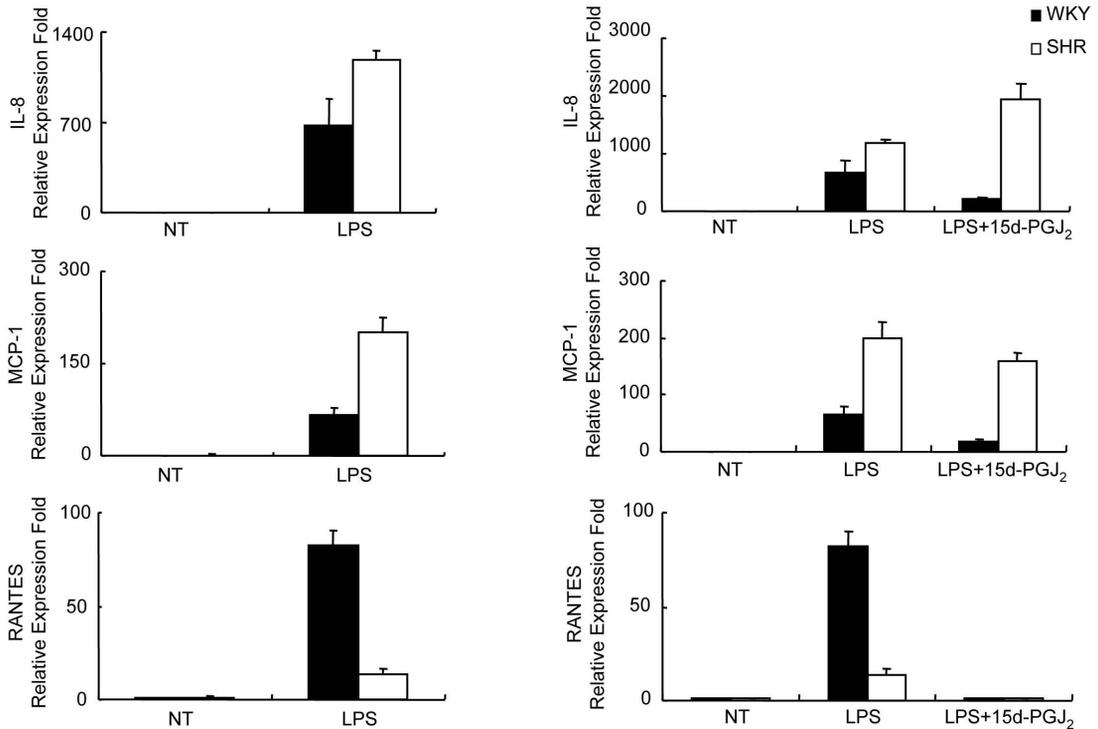


Fig. 2. Expression of LPS or LPS/15d-PGJ₂-induced chemokines in VSMC from WKY and SHR. VSMC were untreated or treated with LPS (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or LPS plus 15d-PGJ₂ (10 $\mu\text{mol}/\ell$) for 2 h, and the total RNA was analyzed by real-time PCR. Bars represent mean \pm SEM from three independent experiments.

유전자 발현이 유도 되었으나 RANTES/CCL5의 경우 오히려 유전자 발현이 감소하였다. IL-8/CXCL8 수용체 CXCR1과 MCP-1/CCL2 수용체 CCR2 또한 AngII에 의해 유전자 발현이 관찰되었다. 비록 Angiotensin II에 의해 RANTES/CCL5의 발현이 억제되었으나, Angiotensin에 의한 RANTES/CCL5 수용체 CCR1의 경우에는 유전자 발현이 유도되었다 (Fig. 3).

혈관평활근세포의 케모카인 발현에 대한 MAPK 신호전달 경로의 확인

혈관평활근세포에서의 케모카인 유전자 발현에 MAPK 신호 전달 경로가 관여하는지 확

인하기 위하여 WKY와 SHR 혈관평활근세포의 LPS 및 AngII에 의한 MAP kinases 활성도를 비교, 관찰하였다. MAP kinase ERK, p38 및 JNK 모두 WKY에 비해 SHR 혈관평활근세포에서 활성도가 더 높았으며 phospho-ERK의 경우 LPS에 의한 것 보다 AngII에 의한 활성도가 좀 더 높게 나타났다 (Fig. 4). 이에 SHR 혈관평활근세포에서의 AngII에 의한 케모카인 유전자 발현에 있어 MAP kinase들의 활성을 관찰한 결과 IL-8/CXCL8의 경우 AngII에 의해 유도된 IL-8/CXCL8의 발현은 ERK 억제제인 PD98059에 의해 억제됨이 관찰되었고 (Fig. 5A), MCP-1/CCL2의 경우 p38 억제제

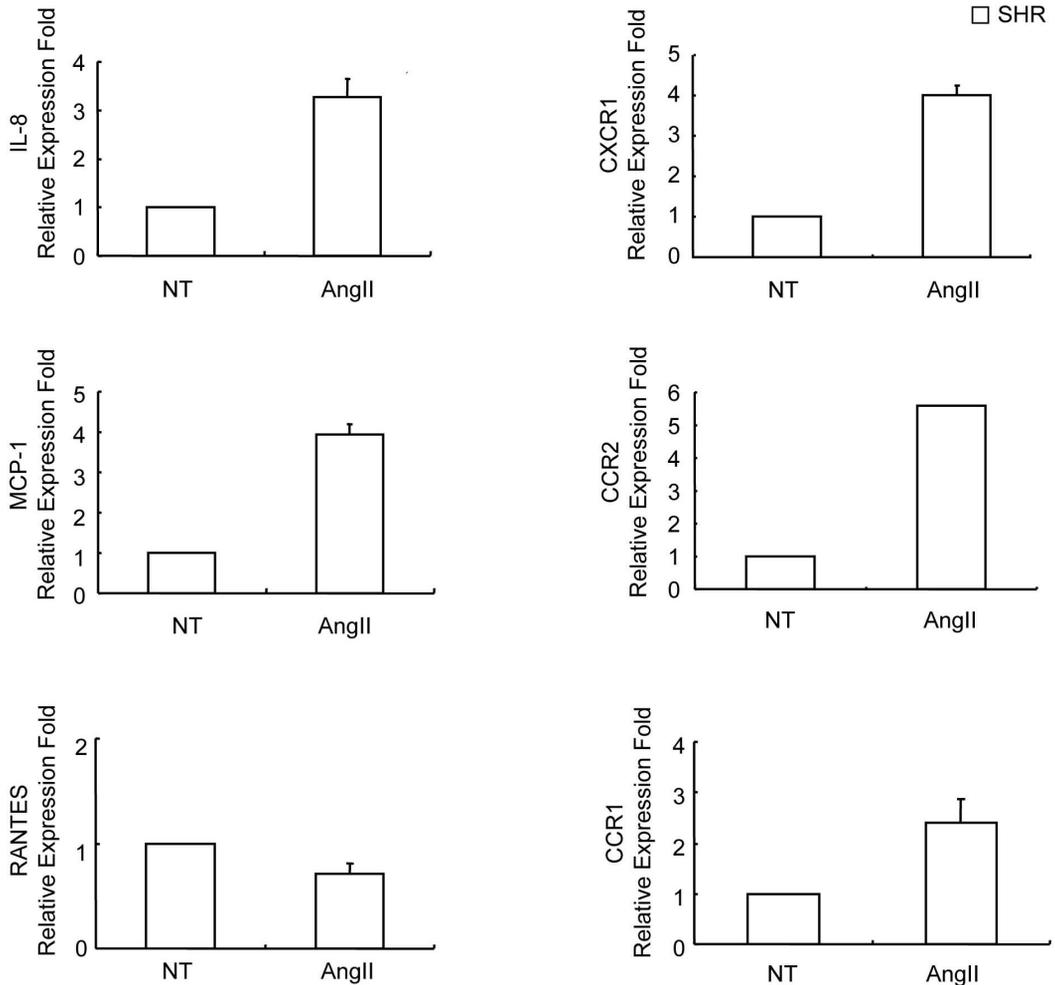


Fig. 3. Angiotensin II (AngII) directly induces IL-8/CXCL8, CXCR1, MCP-1/CCL2, and CCR2 mRNA expression in VSMC from SHR. VSMC were untreated or treated with AngII (0.1 μmol/l) for 2 h, and the total RNA was analyzed by real-time PCR. Bars represent mean ± SEM from three independent experiments.

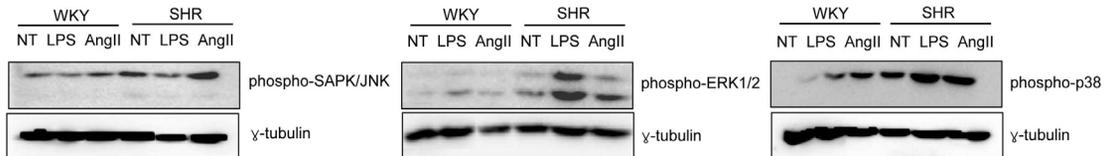


Fig. 4. Activation of LPS or angiotensin II-induced MAP Kinases in vascular smooth muscle cells from WKY and SHR. VSMC were untreated (NT) or treated with LPS (0.1 μg/ml) or AngII (0.1 μM) for 2 h. After then, cell lysates were separated on 10% SDS-polyacrylamide gels and then immunoblotted with phospho-ERK, phospho-p38 or phospho-SAPK/JNK antibody. These data are representative of three independent experiments.

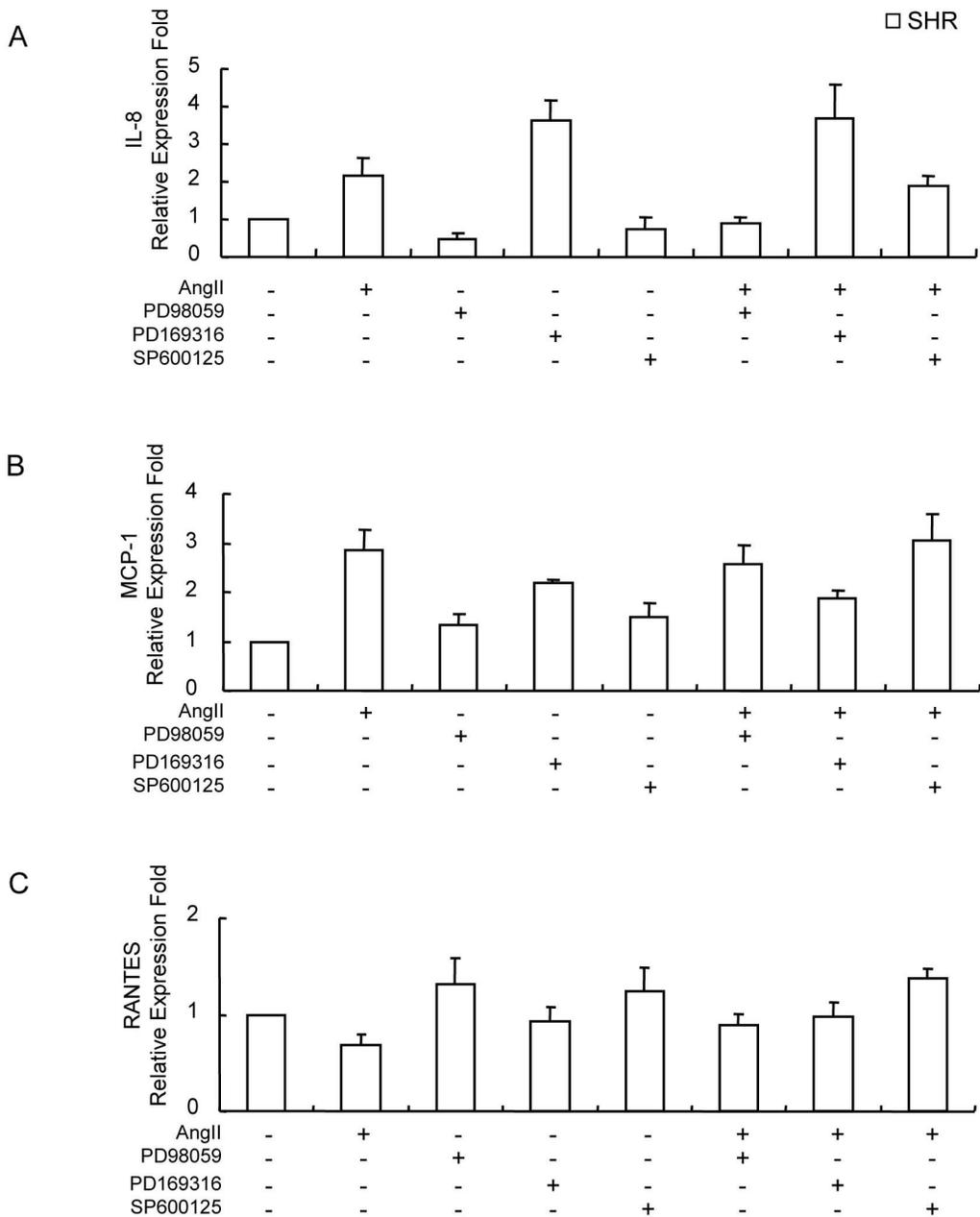


Fig. 5. MAP kinases are involved in the expression of AngII-induced IL-8/CXCL8 and MCP-1/CCL2 mRNA expression, but not involved in RANTES/CCL5 mRNA expression. VSMCs were untreated (NT) or pretreated with PD98059 (ERK inhibitor, 10 μ M), PD169316 (p38 inhibitor, 10 μ M), or SP600125 (SAPK/JNK inhibitor, 25 μ M) for 30 min. Cells were left untreated or treated with AngII (0.1 μ M) for 2 h. And then the total RNA was analyzed by real-time PCR. Bars represent mean \pm SEM from three separate experiments.

인 PD169316이 AngII에 의해 발현된 MCP-1/CCL2 유전자 발현을 억제시켰다 (Fig. 5B). AngII에 의해 발현이 오히려 억제되었던 RANTES/CCL5의 경우, AngII에 의한 억제 작용에 MAP kinases 의 활성화는 필요하지 않는 것으로 관찰되었다 (Fig. 5C).

고 찰

고혈압환자의 혈장에서 케모카인은 높은 농도로 측정되나, 고혈압의 병리기전이나 유지에 있어 케모카인의 역할은 아직 명확하게 이해되지 않고 있다. 게다가 이와 관련된 케모카인 연구는 대개 MCP-1/CCL2에 국한되어 있다.^{4, 5, 10, 11)}

IL-8/CXCL8는 호중구를 불러들이는 호염증성 케모카인으로 내피세포, 단핵세포, 큰포식세포 등 다양한 면역 세포들에서 생산되며, 체내 IL-8/CXCL8이 높게 측정되면 관상동맥 질환의 위험인자로서 연관이 있다는 보고가 있다.¹²⁾ 본 연구의 경우 SHR의 혈관평활근세포에서 MCP-1/CCL2과 IL-8/CXCL8의 경우 WKY에 비해 강하게 발현됨을 증명하였으나, RANTES/CCL5의 경우 오히려 WKY 혈관평활근세포에서 높게 나타나고, SHR의 혈관평활근세포의 경우, AngII에 의해 RANTES/CCL5 유전자 발현이 오히려 억제됨에 따라, 이들 케모카인 모두 호염증성 케모카인으로 알려져 있으나 RANTES/CCL5의 경우 고혈압의 발생이나 유지에 있어 IL-8/CXCL8이나 MCP-1/CCL2에 비해 관계가 없을 것으로 추측되었다.

PPAR γ 리간드들은 NO의 생산을 증가시킴으로써 혈관을 확장하여 혈압을 낮추는 효과가 있으며 항염증 제제로 잘 알려져 있다.¹³⁻¹⁶⁾ 그

러나 본 연구에서 SHR 혈관평활근세포의 경우 LPS유도에 의한 IL-8/CXCL8의 발현이 15d-PGJ2에 의해 오히려 항진되어 나타남에 따라 이에 대한 연구는 앞으로 하여야 할 것으로 생각된다. AngII의 혈관수축작용은 잘 알려져 있다.^{17, 18)} 따라서 본 연구는 고혈압 혈관의 평활근세포에서의 AngII에 의한 MAP kinases의 활성도를 관찰하였다. Rhian 등¹⁹⁾은 SHR의 혈관평활근세포에서 AngII에 의한 ERK 및 p38의 활성화를 확인하였으나 JNK는 관여하지 않는다 하였다. 이와 반대로, 본 연구의 경우 AngII에 의한 JNK의 활성화가 나타나 이는 AngII의 작용시간에 따라 결과가 달리 나타난 것으로 추측된다. Rhian 등의 경우 단시간 (5, 10분)의 반응을 관찰하였고 본 연구의 경우 반응시간이 2시간의 결과였다.

본 연구는 SHR에서의 IL-8/CXCL8의 강한 발현을 확인하였으며, 이는 기존에 알려진 고혈압 혈관평활근세포에서의 MCP-1/CCL2의 강한 발현과 비교할 때, IL-8/CXCL8 또한 고혈압 발생 및 유지에 MCP-1/CCL2과 더불어 중요한 역할을 할 것으로 추측된다. 케모카인 RANTES/CCL5의 경우 고혈압의 발생이나 유지에는 큰 영향을 끼치지 않을 것으로 생각되나, AngII에 의해 RANTES/CCL5의 발현이 억제되고, WKY에 비해 SHR 혈관평활근세포에서 RANTES/CCL5의 발현 또한 낮게 나타남에 따라, RANTES/CCL5가 오히려 고혈압의 환경을 완화시키는 쪽으로 작용할 가능성이 있을 것으로 추측되며 이에 대한 연구가 필요할 것으로 생각한다.

요 약

고혈압의 발생 및 유지는 혈관 내 지속적인 염증 작용들과 관련이 있으며, 동맥 경화 발생의 주요 위험 인자이다. 명확한 세포 분자생물학적 발생 기전은 아직 밝혀지지 않았으나, 일부는 케모카인들이 작용할 것으로 추측하고 있다. 따라서 본 연구는 고혈압 쥐(spontaneously hypertensive rat, SHR)와 정상 혈압 쥐(Wistar Kyoto rat, WKY)의 혈관평활근세포(vascular smooth muscle cells, VSMC)에서 케모카인 IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2 및 RANTES/CCL5의 발현도를 비교하고자 하였다. 혈관평활근세포에서의 케모카인 IL-8/CXCL8과 MCP-1/CCL2 mRNA의 발현은 SHR이 WKY에 비해 월등히 높았으나 RANTES/CCL5의 경우 WKY 혈관평활근세포에서의 발현이 훨씬 높았다. LPS 유도에 의한 IL-8/CXCL8과 MCP-1/CCL2 RNA 발현의 경우 SHR에서 더 강하였으나, RANTES/CCL5의 경우 WKY 혈관평활근세포에서 더 강하였다. LPS에 의해 유도된 케모카인 발현에 항 염증작용을 한다고 알려진 PPAR γ ligand인 15d-PGJ $_2$ 의 효과를 관찰한 결과, SHR 평활근세포에서의 IL-8/CXCL8의 발현은 오히려 증가 되어 나타났다. SHR의 혈관평활근세포에서 Angiotensin II(AngII)에 의한 케모카인의 발현은 RANTES/CCL5의 경우 오히려 유전자 발현이 감소하였다. SHR 혈관평활근세포에서의 AngII에 의한 케모카인 유전자 발현에 있어 MAP kinase들의 활성은 MCP-1/CCL2의 경우 p38 의존적이었고 IL-8/CXCL8의 발현은 ERK 의존적이었으나 RANTES/CCL5의 경우 AngII에 의한 억제 작용은 MAP kinases의 활성과는 무관하였다.

기존에 알려진 고혈압 혈관평활근세포에서의 MCP-1/CCL2의 강한 발현과 비교할 때, 본

연구를 통하여, IL-8/CXCL8 또한 고혈압 발생 및 유지에 MCP-1/CCL2과 더불어 중요한 역할을 할 것으로 추측된다. 케모카인 RANTES/CCL5의 경우 고혈압의 발생이나 유지에는 큰 영향을 끼치지 않을 것으로 생각되나, AngII에 의해 RANTES/CCL5의 발현이 억제되고, WKY에 비해 SHR 혈관평활근세포에서 RANTES/CCL5의 발현 또한 낮게 나타남에 따라, RANTES/CCL5가 오히려 고혈압의 환경을 완화시키는 쪽으로 작용할 가능성이 있을 것으로 추측되며 이에 대한 연구가 필요할 것으로 생각한다.

참 고 문 헌

1. Alexander RW. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis. *Hypertension* 1995; 25:155-61.
2. Gerszten RE. Pleiotropic effects of chemokines in vascular lesion development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:528-9.
3. Luster AD. Chemokines - chemotactic cytokines that mediate inflammation. *The New England J Med* 1998;338:436-45.
4. Spinetti G, Wang M, Monticone R, Zhang J, Zhao D, Lakatta EG. Rat aortic MCP-1 and its receptor CCR2 increase with age and alter vascular smooth muscle cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1397-402.
5. Ishibashi M, Hiasa KI, Zhao Q, et al. Critical role of monocyte chemoattractant protein-1 receptor CCR2 on monocyte in hypertension-induced vascular inflammation and remodeling. *Circ Res* 2004;94:1203-10.
6. Capers QI, Alexander RW, Lou P, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic tissues of hypertensive rats. *Hypertension* 1997;30:1397-402.

7. Parissis JT, Korovesis S, Giazitzoglou E, Kalivas P, Katritsis D. Plasma profile of peripheral monocyte-related inflammatory markers in patients with arterial hypertension. Correlations with plasma endothelin-1. *Int J Cardiol* 2002; 83:13-21.
8. Zhang Y, Griendling KK, Dikalova A, Owens GK, Talyor WR. Vascular hypertrophy in angiotensin II-induced hypertension is mediated by vascular smooth muscle cell-derived H₂O₂. *Hypertension* 2005;46:732-7.
9. Rodríguez-Iturbe B, Vaziri ND, Herrera-Acosta J, Johnson RJ. Oxidative stress, renal infiltration of immune cells and salt-sensitive hypertension: all for one and one for all. *Am J Physiol* 2004;286:F606-F16.
10. Chen XL, Tummala PE, Olbrych MT, Alexander RW, Medford RM. Angiotensin II induces monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1998;83:952-9.
11. Xie QY, Sun M, Yang TL, Sun ZL. Losartan reduces monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic tissues of 2K1C hypertensive rats. *Int J Cardiol* 2006;110:60-6.
12. Boekholdt S, Peters R, Hack CE, et al. IL-8 plasma concentrations and the risk of future coronary artery disease in apparently healthy men and women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1503-08.
13. Barbier O, Torra IP, Duguay Y, Fruchart JC, Glineur C, Staels B. Pleiotropic actions of peroxisome proliferator-activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:717-26.
14. Calnek DS, Mazzella L, Roser S, Roman J, Hart CM. Peroxisome proliferators-activated receptor gamma ligands increase release of nitric oxide from endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:52-7.
15. Dobrian AD, Schriver SD, Khraibi AA, Prewitt RL. Pioglitazone prevents hypertension and reduces oxidative stress in diet-induced obesity. *Hypertension* 2004;43:48-56.
16. Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR-vagonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 1998;391:82-6.
17. Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, et al. Angiotensin II mediated hypertension in the rat increase vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation: contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 1996;97:1916-23.
18. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994;74:1141-8.
19. Touyz RM, He G, El Mabrouk M, Diep Q, Mardigyan V, Schiffrin EL. Differential activation of extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 and p38 mitogen activated-protein kinase by AT1 receptors in vascular smooth muscle cells from Wistar-Kyoto rats and spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2001;19:553-9.