

# 糸球体内皮細胞における MCP-1 mRNA 発現に及ぼす lysophosphatidylcholine の影響

溝端 理恵

Effects of lysophosphatidylcholine on expression of monocyte chemoattractant protein-1 in glomerular endothelial cells

Rie MIZOBATA

Third Department of Internal Medicine, Wakayama Medical University, Wakayama, Japan

Glomerular endothelial cells (GEC) produce monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), which is considered to be an important factor for the recruitment of macrophages into the glomeruli. Recent reports have suggested an association between oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) and progression of glomerular disease. In this study, the effects of lysophosphatidylcholine (LysoPC), a modified phospholipid produced during LDL oxidation, on MCP-1 mRNA expression in cultured bovine GEC were examined. GEC from the 8th through 10th passages were used. LysoPC substantially increased expression of MCP-1 mRNA when compared to the control. These findings led us to examine the mechanism of LysoPC-induced MCP-1 expression in GEC.

LysoPC-induced MCP-1 mRNA expression in GEC was suppressed by genistein and staurosporine. It was suggested that both the tyrosine kinase (TK) and protein kinase C (PKC) pathways were involved in LysoPC-induced MCP-1 expression in GEC. MCP-1 mRNA induction by LysoPC was also attenuated by Vitamin E. This effect may be related to the beneficial effects of Vitamin E on experimental glomerular disease models. In conclusion, LysoPC increased MCP-1 expression in GEC. This phenomenon is believed to be mediated by both the TK and PKC signaling pathways, in contrast with other vascular endothelial cells. Vitamin E also attenuated LysoPC-induced MCP-1 expression in GEC.

Jpn J Nephrol 2003 ; 45 : 76-83.

**Key words** : glomerular endothelial cells, lysophosphatidylcholine, monocyte chemoattractant protein-1, Vitamin E, signaling pathway

## 緒 言

従来、ネフローゼ症候群に高脂血症を伴うことはよく知られていたが、近年、脂質代謝異常が糸球体疾患の増悪因子になりうるということが明らかになってきている。特に酸化修飾された低比重リポ蛋白(酸化 LDL)が動脈硬化疾患と同様に糸球体硬化を促進する可能性<sup>1-3)</sup>が考えられている。また、多くの動物実験においても脂質代謝異常と糸球体障害との関連が報告されている<sup>4,5)</sup>。高脂血症の進展とともにマクロファージ由来の泡沫細胞の糸球体への集

積、糸球体硬化の発現が認められ、このマクロファージの集積には糸球体での monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) の発現亢進が関与し、また、このような変化は酸化 LDL の作用によるものと推定されている。

そこで今回、腎糸球体硬化の初期病変として、動脈硬化の初期病変と同様にマクロファージの遊走因子である MCP-1 の由来細胞として血管内腔に面している糸球体内皮細胞に注目し、MCP-1 mRNA 発現に対する動脈硬化発症の主要な因子とされる酸化 LDL が与える影響と、その刺激の細胞内シグナル伝達経路について検討した。さら

に、脂質代謝異常による糸球体障害の改善には高脂血症治療薬<sup>6)</sup>あるいは抗酸化剤の臨床応用が期待されていること<sup>7-10)</sup>を踏まえ、動物実験において効果が報告されている抗酸化剤である Vitamin E の酸化 LDL による MCP-1 発現に及ぼす効果についても併せて検討した。

一般的に、LDL の脂質成分が酸化変性を起こす際にリン脂質である phosphatidylcholine (PC) が lysophosphatidylcholine (LysoPC) に変化する<sup>11)</sup>。すなわち、PC が phospholipase A2 (PLA2) により加水分解されて脂肪酸が 1 つとされ LysoPC が生成される。この LysoPC は強い溶血活性や細胞融合能を持ち、動脈硬化の初期病変における酸化 LDL の作用の中心的役割を担っていることが証明されており<sup>12)</sup>、今回、酸化 LDL の影響の検討には LysoPC を用いた。

## 方 法

### 1. 糸球体内皮細胞培養法

糸球体内皮細胞培養法については Ballermann ら<sup>13)</sup>の方法を一部改変して行った。すなわち、摘出された生後 3 カ月のウシの腎から、180  $\mu$ m、100  $\mu$ m 径のメッシュを用いて糸球体を単離し、Hanks 平衡塩溶液 (HBSS) (Nissui Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan) 中に浮遊させた。HBSS にて 3 回洗浄後、0.1% collagenase (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) にて消化し、糸球体細胞浮遊液を得た。その糸球体細胞を 17% Fetal Calf Serum (FCS) (Nishirei, Tokyo, Japan) を含む RPMI 1640 (Invitrogen Co., CA, USA) 培地に浮遊させ 80 G $\times$ 2 分で遠心し、得られた上清を 180 G $\times$ 10 分遠心し、ペレットを RPMI 1640 培地で再浮遊させた。それを gelatin および fibronectin でコートした 24 穴プレート上に散布し、4 時間後に非付着細胞を洗浄除去し、2.5% Nu-serum (Becton Dickinson, Bedford, MA, USA)、17% FCS、0.3 mg/ml endothelial cell growth supplement (ECGS) (Sigma)、0.05 mg/ml heparin を含む RPMI 1640 培地中で培養した。約 10 日後に各 well 内に細胞数が 300~500 個となったコロニーをクローニングシリンドラーで 24 穴プレート上に移した。以下、near confluent に達した細胞を 0.01% trypsin/0.02% EDTA (Sigma) 処理にて継代し、15% FCS を含む RPMI 1640 培地中にて維持培養した。実験には 8~10 代の細胞を使用した。

糸球体内皮細胞の同定には抗第 VIII 因子関連抗原陽性、DiI-acetylated LDL (Paesel Lorei, Frankfurt, Germany) の取り込み陽性、位相差顕微鏡による形態的観察で行った<sup>13)</sup>

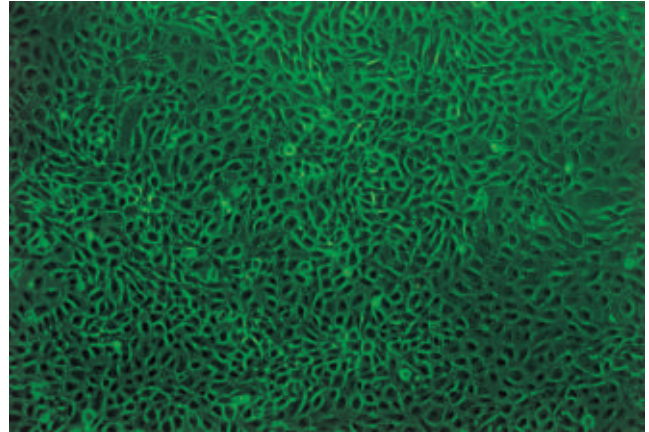


Fig. 1. Morphological appearance of GEC

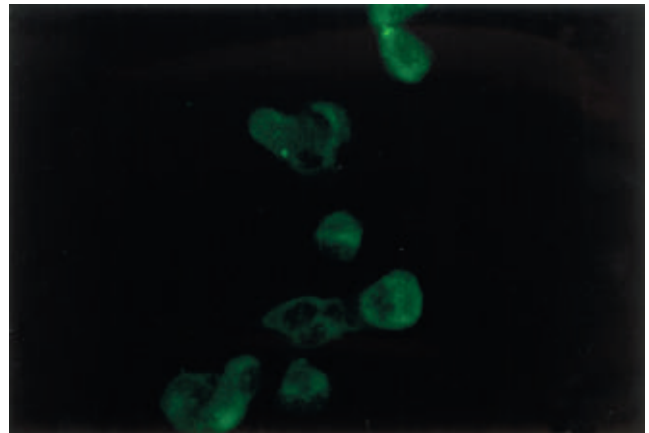


Fig. 2. Indirect immunofluorescence micrograph of GEC with anti-factor VIII antiserum

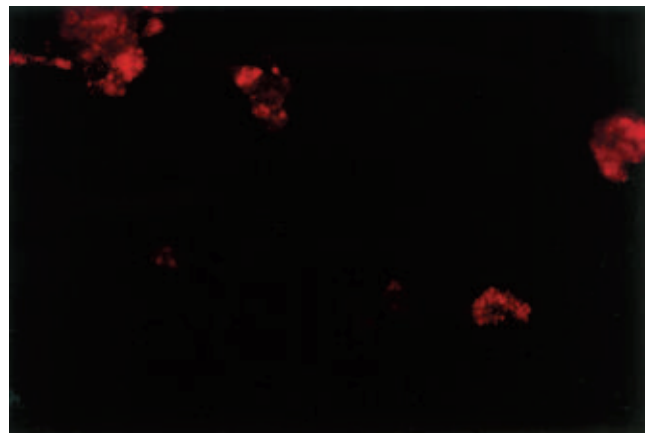


Fig. 3. Fluorescence micrograph of GEC with DiI-acetylated LDL

(Fig. 1~3)。

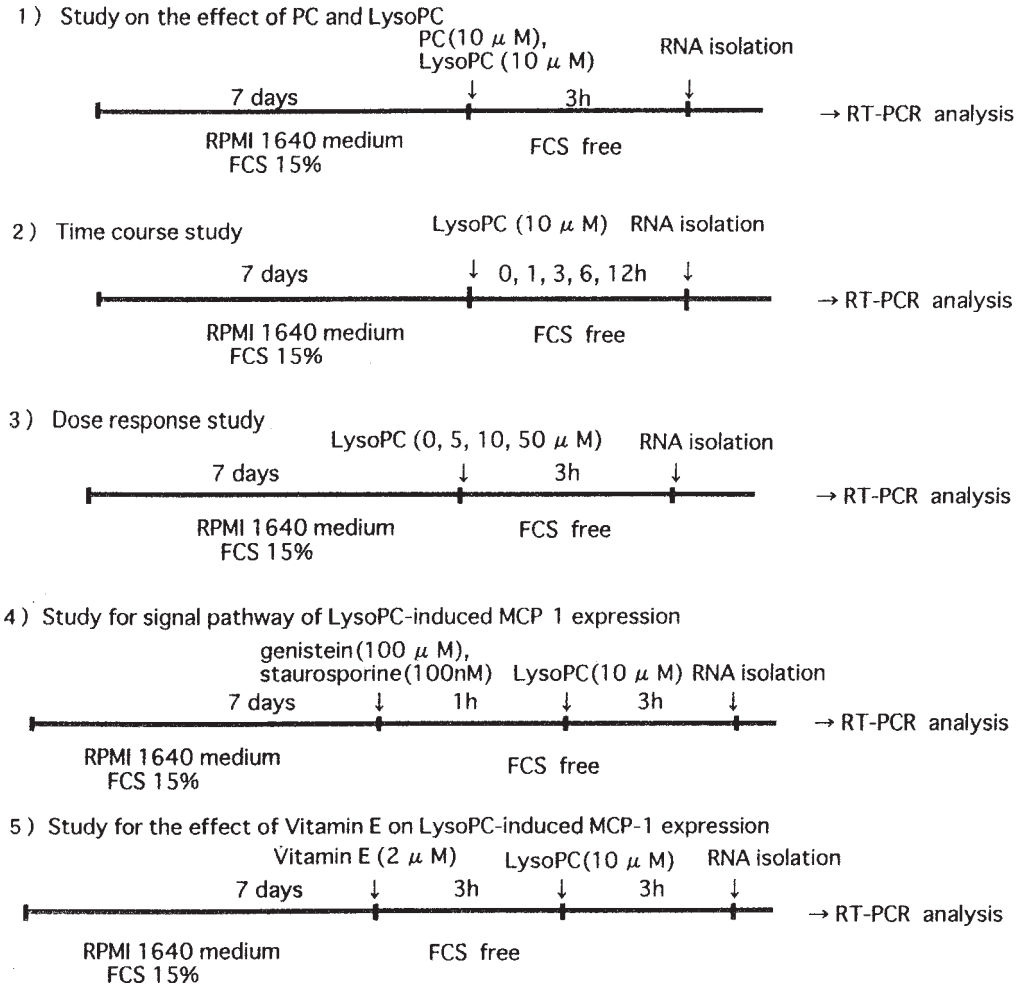


Fig. 4. Experimental protocol

## 2. RNA抽出およびRT-PCR法によるMCP-1 mRNA発現の解析

RNAはAGPC法<sup>14)</sup>で調整し逆転写後、MCP-1および $\beta$ -actinのプライマーを用いてRT-PCR法を行った<sup>5,15)</sup>。PCRの条件はdenature 95°C, annealing 45°C, extension 72°C, 26 cycleとした。

得られたPCR産物は1.5%アガロースゲルで電気泳動し、ethidium bromideで染色した後、ゲルをポラロイド撮影した。さらにその写真をimage scannerで取り込み、画像解析ソフトNIH imageを用いて各バンドのdensityを測定し、MCP-1に対応する $\beta$ -actinのdensityをコントロールとして評価した。

## 3. 実験プロトコル(Fig. 4)

### 1) MCP-1 mRNA発現に及ぼすPCとLysoPCの影響の比較検討

糸球体内皮細胞を7日間RPMI 1640培地で培養し、near confluentになった状態でPC, LysoPCを各10  $\mu$ M

添加し、3時間後にRNAを抽出し、RT-PCR法によりMCP-1 mRNAの発現を解析した。

### 2) LysoPC投与によるMCP-1 mRNA発現の経時的変化の検討

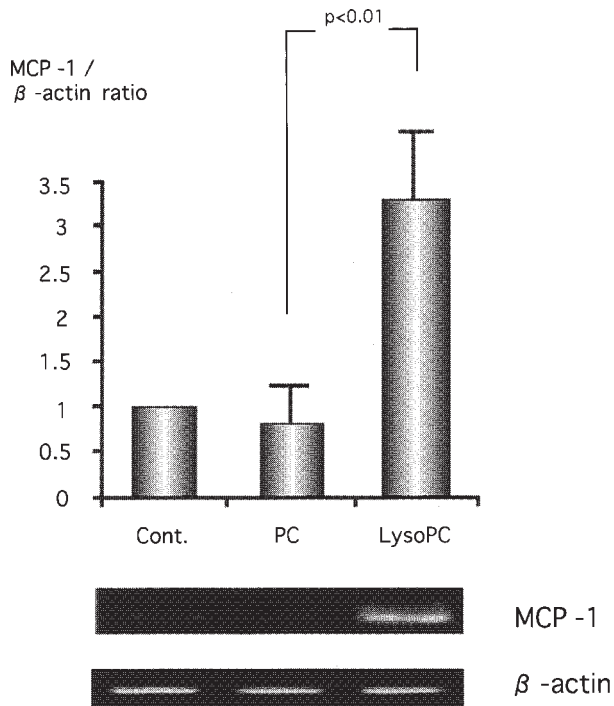
1)と同様に7日間培養した後、LysoPCを10  $\mu$ M添加し、0, 1, 3, 6, 12時間後にRNAを抽出し、MCP-1 mRNAの発現を観察した。

### 3) LysoPC投与量によるMCP-1 mRNA発現の変化の検討

1)と同様に7日間培養した後、LysoPCを0, 5, 10, 50  $\mu$ Mずつ添加し、3時間後にRNAを抽出し、MCP-1 mRNAの発現をみた。

### 4) LysoPCによるMCP-1 mRNA発現の細胞内シグナル伝達経路の検討

LysoPC刺激によるMCP-1の発現の経路として細胞内シグナル伝達経路の代表的な2つであるtyrosine kinase (TK)とprotein kinase C(PKC)の経路について検討した。



**Fig. 5. Effects of PC and LysoPC on MCP-1 expression in GEC**

MCP-1 mRNA expression was increased by LysoPC treatment, but not by PC.

糸球体内皮細胞を7日間培養した後、TK および PKC を十分に抑制するとされている TK inhibitor である genistein  $100 \mu\text{M}^{16)}$  と PKC inhibitor である staurosporine  $100 \text{nM}^{17)}$  でそれぞれ前処置し、1時間後に LysoPC を添加した。添加後3時間で RNA を抽出し、RT-PCR 法により MCP-1 mRNA の発現を解析した。

#### 5) Vitamin E の効果

同様に7日間糸球体内皮細胞を培養した後、十分量の Vitamin E (Sigma)  $2 \mu\text{M}$  で3時間前処置し、細胞内に取り込ませた後 LysoPC を添加した<sup>18)</sup>。LysoPC 添加前には残存する Vitamin E を含む培養液を洗浄し取り除いた。LysoPC 添加後3時間で RNA を抽出し、RT-PCR 法により MCP-1 mRNA の発現を検討した。

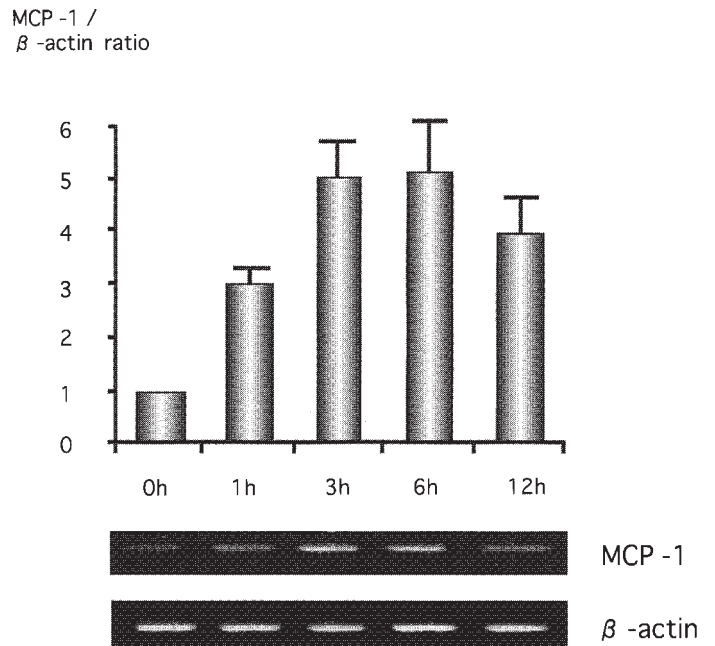
#### 4. 統計解析

有意差検定には paired t-test を用い、 $p < 0.05$  を有意とした。

## 結 果

#### 1) LysoPC による MCP-1 mRNA の発現

LysoPC の添加により MCP-1 mRNA の発現の有意な



**Fig. 6. Time course study**

MCP-1 mRNA expression was increased progressively, peaking at 3 and 6 hr.

( $p < 0.01$ ) 増強を認めた。一方、PC の添加によってもコントロールと変わらず MCP-1 mRNA の発現の増強は、ほとんど認めなかった (Fig. 5)。

#### 2) 経時的変化

LysoPC による MCP-1 mRNA の経時的変化の検討では、LysoPC 添加後1時間ですでに増強が認められるが、3時間、6時間で発現の増強がピークとなり、12時間では増強の程度が抑えられた (Fig. 6)。

#### 3) LysoPC 量による MCP-1 mRNA 変動

LysoPC を  $5 \mu\text{M}$ 、 $10 \mu\text{M}$ 、添加したものでは MCP-1 mRNA の発現の増強を認めたが、 $50 \mu\text{M}$  添加したものは  $5 \mu\text{M}$ 、 $10 \mu\text{M}$  と比べて発現の程度は減弱していた (Fig. 7)。

以上の結果より、この後の実験には LysoPC を  $10 \mu\text{M}$  使用し、3時間後に RNA を抽出し RT-PCR を行った。

#### 4) LysoPC による MCP-1 mRNA 発現の細胞シグナル伝達経路について

Genistein と staurosporine でそれぞれ前処置した場合には、LysoPC 単独の場合に比べ MCP-1 mRNA の発現の増強の程度がともに有意に ( $p < 0.05$  versus LysoPC+genistein,  $p < 0.05$  versus LysoPC+staurosporine) 抑制された (Fig. 8)。

#### 5) Vitamin E の LysoPC による MCP-1 mRNA 発現に



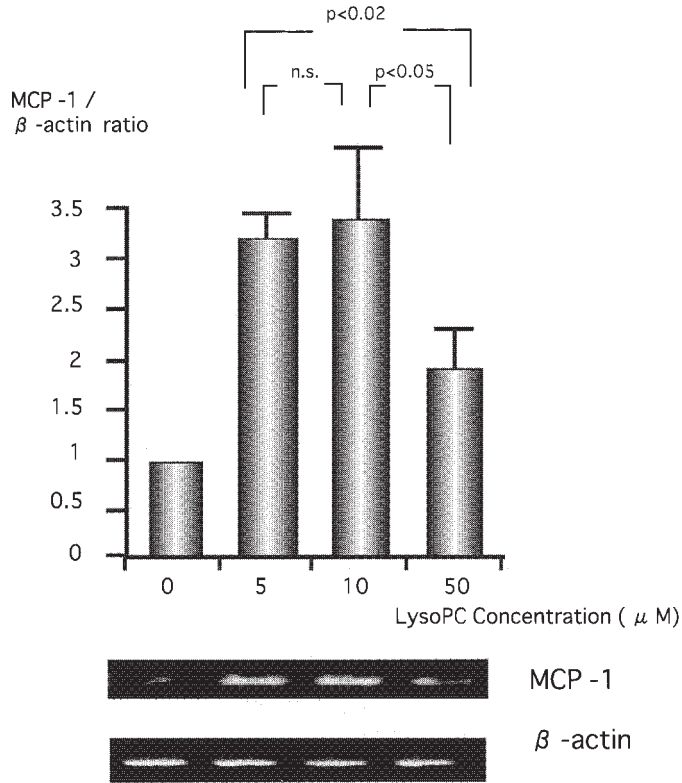


Fig. 7. Dose response study

MCP-1 mRNA expression in GEC was increased by 5 and 10 μM LysoPC, but attenuated by 50 μM LysoPC.

対する作用

LysoPC 単独に比べて Vitamin E で前処置したものは、MCP-1 mRNA の発現増強が有意に (p<0.01) 抑制された (Fig. 9)。

考 察

最近の種々の臨床研究や実験成績から、脂質代謝異常が糸球体疾患を増悪させるのではないかと報告されている<sup>1-3)</sup>。脂質代謝異常と腎障害との関連について、いくつかの臨床成績が報告されている。大谷ら<sup>19)</sup>は apo B の糸球体への沈着と糸球体障害の程度について検討し、高度の蛋白尿を示す例や腎機能低下例では apo B の染色が強度であったと報告している。また、血清 TC, PL, LDL-C, apo B が高値を示す例では apo B の沈着が高度であったことより、高脂血症によるリポ蛋白の糸球体への負荷が apo B の糸球体沈着の一因となり、さらには糸球体疾患の進展増悪に関与する可能性が示唆されている。また、Attman ら<sup>20)</sup>は非糖尿病性糸球体疾患において、血中 apo B 含有リポ蛋白の程度と予後が関連することを報告し

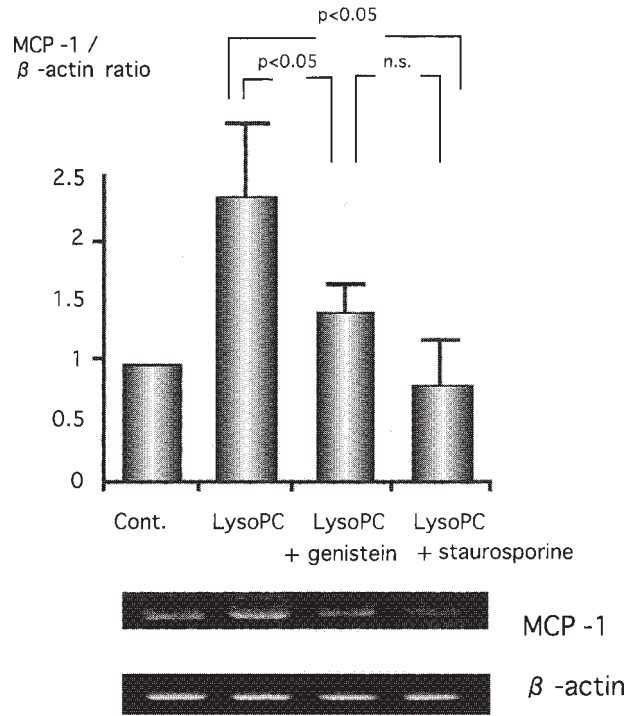


Fig. 8. Inhibition of LysoPC-induced MCP-1 expression induced by LysoPC with genistein and staurosporine

LysoPC-induced MCP-1 mRNA expression in GEC was suppressed by both genistein and staurosporine.

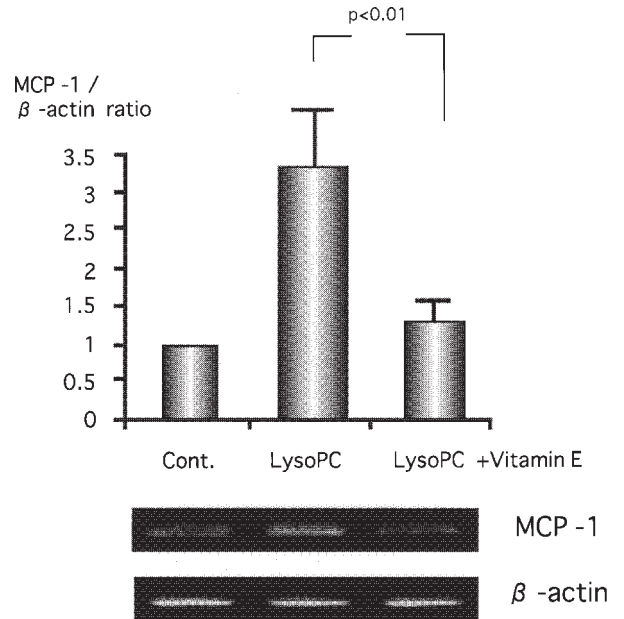


Fig. 9. Effects of Vitamin E on MCP-1 expression in GEC

MCP-1 mRNA expression in GEC was significantly suppressed by the addition of Vitamin E.

ている。一方、治療面では、Tojo らの報告<sup>21)</sup>以降、Mune ら<sup>22)</sup>あるいはMuso ら<sup>23)</sup>により難治性ネフローゼ症候群に LDL アフェレーシスが有効であることが示され、酒井ら<sup>6)</sup>は各種腎炎において抗酸化作用を持つ高脂血症治療薬である probucol が尿蛋白を減少させることを報告している。また、多くの動物実験においても脂質代謝異常と糸球体障害との関連が報告されている。Kodama ら<sup>5)</sup>の報告によると、巣状糸球体硬化症のモデルである高脂血症ラット (ExHC)において、高脂血症の進展とともにマクロファージ由来の泡沫細胞の糸球体への集積、糸球体硬化の発現が認められ、このマクロファージの集積には糸球体での MCP-1 の発現亢進が関与していることが示された。また、この一連の変化は高脂血症を改善させなくても、抗酸化剤である probucol を投与することにより抑制されたことから、酸化 LDL の作用であろうと推定している。

脂質、特に酸化 LDL が動脈硬化疾患の場合と同様に糸球体硬化を促進すると考えられる機序の一つとして、以下のような仮説が考えられる。すなわち、高脂血症の状態では血中に増加した LDL が糸球体内皮細胞の小孔を通りメサンギウム領域への透過性が亢進し、メサンギウムマトリックスへの結合、あるいはメサンギウム細胞への取り込みが亢進する。また障害された糸球体においては、メサンギウム領域からの排除機構が低下することが考えられ、そこに停滞する間に何らかの機序で LDL 中の脂質の不飽和脂肪酸部位が酸化され、酸化 LDL が形成される。この酸化 LDL がマクロファージの糸球体内への誘導を引き起こし、マクロファージから様々な増殖因子やサイトカイン、例えば PDGF、TGF- $\beta$ 、IL-1、TNF- $\alpha$  が放出され、糸球体硬化が促進されるのではないかと考えられる。このマクロファージの糸球体内への遊走には MCP-1 の関与が推測される。

今回の検討では、酸化 LDL の主要成分である LysoPC が糸球体内皮細胞を刺激して MCP-1 mRNA 発現を増強させた。すなわち、LysoPC が主な作用を担うと考えられている酸化 LDL により糸球体内皮細胞 MCP-1 mRNA が誘導され、糸球体初期病変を形成する可能性が示唆された。

また、今回の LysoPC が糸球体内皮細胞における MCP-1 mRNA 発現を増強させたメカニズムについて、その細胞内における発現経路として、細胞内シグナル伝達経路の代表的な 2 つである TK、PKC の 2 つについて検討した。これまでヒト血管内皮細胞において、LysoPC 刺激による MCP-1 mRNA 誘導のシグナル伝達経路として

PKC 経路が関与するという報告<sup>24)</sup>や、LPS 刺激による MCP-1 mRNA 誘導のシグナル伝達経路に TK と PKC の両経路が関与するという報告<sup>25)</sup>がなされている。今回の実験結果より、MCP-1 発現が TK inhibitor である genistein と PKC inhibitor の staurosporine の両方で抑制されたことにより、糸球体内皮細胞における LysoPC 刺激による MCP-1 mRNA 誘導のシグナル伝達経路に TK と PKC の両経路が関与することが示唆された。このことは、他の血管内皮細胞におけるシグナル伝達経路とは異なる可能性を示唆する。最近、組織による内皮細胞の形態的および機能的な違いについてはいくつか報告されており、Lang ら<sup>26)</sup>によると臍帯内皮細胞と毛細血管内皮細胞において vascular endothelial growth factors (VEGFs) や placental growth factors (PIGFs) のみならず、fibroblast growth factor (FGF-2) に対する細胞増殖反応にも差が認められ、また Yashima ら<sup>27)</sup>は毛細内皮細胞は臍帯内皮細胞や大血管内皮細胞とは VEGF による MAPK の活性化に違いが認められたこと、すなわち、異なる組織の内皮細胞は細胞内シグナル伝達経路にも違いが認められる可能性を報告している。今回の結果についても糸球体内皮細胞の特異性とも考えられる。

一方、抗酸化剤である Vitamin E による糸球体障害の軽減効果についてはいくつかの腎炎モデルで報告されている。Trachtman ら<sup>8)</sup>は FGS モデルである PAN 腎症ラットに Vitamin E を投与し、腎組織内 MDA 濃度の低下とともに尿蛋白の減少、イヌリンクリアランスの改善、糸球体硬化病変と尿管病変の改善を認め報告している。Otani ら<sup>9)</sup>は酸化的ストレスの関与が指摘されているレムナント腎モデルに対する Vitamin E の有効性ととともに、抗 Thy-1 腎炎モデルにおいても Vitamin E がメサンギウム細胞増殖を抑制することを報告した。また、Kuemmerle ら<sup>10)</sup>は IgA 腎炎モデルに対して Vitamin E の有効性を報告している。最近では Vitamin E は抗酸化作用以外にも細胞内での作用、特に PKC 経路を阻害するという報告もされている<sup>28)</sup>。今回、LysoPC 刺激による MCP-1 mRNA 発現増強を Vitamin E が抑制した機序としても、Vitamin E による PKC 経路も含めた細胞内シグナル伝達経路の阻害作用による可能性も考えられるが、更なる検討が必要であろう。

## 結 語

酸化 LDL の主要成分である LysoPC はウシ糸球体内皮

細胞における MCP-1 mRNA の発現を増強した。その機序として、糸球体内皮細胞は大血管内皮細胞の報告と異なり、TK および PKC の両経路の関与が示唆された。また、抗酸化剤である Vitamin E は LysoPC による MCP-1 mRNA 発現の増強を抑制した。

#### 謝 辞

この稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜りました和歌山県立医科大学第3内科湯川進教授、宗正敏助教授、大谷晴久講師、腎グループ諸兄ならびに関西鍼灸短期大学の栗林恒一教授に深甚なる謝意を表します。また、終始研究にご協力いただいた坂井知子、藪内敏子両研究助手に感謝いたします。

本研究の要旨は第40回日本腎臓学会総会(1997, 新潟), 第XIV回国際腎臓学会(1997, Australia)において発表した。

#### 文 献

- Moorhead JF, El-Nahas M, Chan MK, Varghese Z. Lipid nephrotoxicity in chronic progressive glomerular and tubulo-interstitial disease. *Lancet* 1982; ii: 1309-10.
- Keane WF, Kasiske BL, O'Donnell MP. Lipids and progressive glomerulosclerosis. A model analogous to atherosclerosis. *Am J Nephrol* 1988; 8: 261-71.
- Diamond JR, Karnovsky MJ. Focal and segmental glomerulosclerosis: analogies to atherosclerosis. *Kidney Int* 1988; 33: 917-24.
- Magil AB, Grohlich JJ, Innis SM, Steinbrecher UP. Oxidized low density lipoprotein in experimental focal glomerulosclerosis. *Kidney Int* 1993; 43: 1243-50.
- Kodama N, Otani H, Yamada Y, Mune M, Yukawa S. Involvement of MCP-1 and M-CSF in glomerular foam cell formation in ExHC rats. *Kidney Int* 1999; 56(Suppl 71): 174-7.
- 酒井 紀, 川村哲也, 酒井聡一, 北島武之, 杉崎徹三, 飯野靖彦. 高コレステロール血症を伴うプロブコールの臨床効果の検討. *腎と透析* 1993; 35: 419-27.
- Boscoboinik D, Szewczyk A, Azzi C. Inhibition of cell proliferation by  $\alpha$ -tocopherol. *J Biol Chem* 1991; 266: 6188-94.
- Trachtman H, Schwob N, Maesaka J, Valderrama E. Dietary vitamin E supplementation ameliorates renal injury in chronic puromycin aminonucleoside nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 1995; 5: 1811-9.
- Otani H, Mune M, Yukawa S, Smith D, Meydani M, Blumberg J. Vitamin E treatment of experimental glomerular disease in rats. *Kidney Int* 1999; 56(Suppl 71): S66-9.
- Kuemmerle NB, Krieg RJ, Chan W, Trachman H, Norkus EP, Chan JC. Influence of alpha-tocopherol over the time course of experimental IgA nephropathy. *Pediatr Nephrol* 1999; 13(2): 108-12.
- Yokoyama M, Hirata K, Miyake R, Akita H, Ishikawa Y, Fukuzaki H. Lysophosphatidylcholine: essential role in the inhibition of endothelium-dependent vasorelaxation by oxidized low density lipoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 168(1): 301-8.
- Steinbrecher UP, Parthasarathy S, Leake DS, Witztum JL, Steinberg D. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 3883-7.
- Ballermann BJ. Regulation of bovine glomerular endothelial cell growth *in vitro*. *Am J Physiol* 1989; 256: C182-9.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-PhOH-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-9.
- Wempe F, Kuhlmann JK, Scheit KH. Characterization of the Bovine Monocyte Chemoattractant Protein-1 Gene. *Biochem Biophys Res* 1994; 202(3): 1272-9.
- Nishida E, Hoshi M, Miyata Y, Sakai H, Kadowaki T, Kasuga M, Saijo S, Ogawara H, Akiyama T. Tyrosine phosphorylation by the epidermal growth factor receptor kinase induces functional alterations in microtubule-associated protein 2. *J Biol Chem* 1987; 262: 5592-5602.
- Tamaoki T, Nomoto H, Takahashi I, Kato Y, Morimoto M, Tomita F. Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/ $Ca^{++}$  dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 135: 397.
- Kunisaki M, Umeda F, Yamauchi T, Masakado M, Nawata H. High Glucose Reduces Specific Binding for D- $\alpha$ -Tocopherol in Cultured Aortic Endothelial Cells. *Diabetes* 1993; 42: 1138-46.
- 大谷晴久, 的場克巳, 雑賀保至, 田中利平, 山田陽一, 坂東憲生, 高橋敏夫, 宗正敏, 湯川進, 野本拓. 糸球体疾患における APO LIPOPROTEIN B の糸球体沈着についての検討. *日腎会誌* 32(11): 1145-52, 1990.
- Attman PO, Alaupovic P, Samuelsson O. Lipoprotein abnormalities as a risk factor for progressive nondiabetic renal disease. *Kidney Int* 1999; 56(Suppl 71): S14-7.
- Tojo K, Sakai S, Miyahara T. Possible therapeutic application of low density lipoprotein apheresis (LDL-A) in conjunction with double filtration plasma pheresis (DFPP) in drug-resistant nephrotic syndrome due to focal glomerular sclerosis (FGS). *Jpn J Nephrol* 1988; 30: 1153-60.
- Mune M, Kodama N, Yukawa S. Low Density Lipoprotein-Apheresis Therapy in Patients with Focal Glomerular Sclerosis. *JJ Apheresis* 1994; 13(2): 59-60.
- Muso E, Mune M, Fujii Y, Imai E, Ueda N, Hatta K, Imada A, Miki S, Kuwahara T, Takamitsu Y, Takemura T, Tsubakihara Y. Lowdensity Lipoprotein Apheresis Treatment (K-FLAT) Study Group. *Kidney Int* 1999; 56(Suppl 71): S122-5.

24. Takahara N, Kashiwagi A, Maegawa H, Shigeta Y. Lyso-phosphatidylcholine Stimulates the Expression and Production of MCP-1 by Human Vascular Endothelial Cells. *Metabolism* 1996 ; 45(5) : 559-64.
25. Kakizaki Y, Waga S, Sugimoto K, Tanaka H, Nukii K, Takeya M, Yoshimura T, Yokoyama M. Production of monocyte chemoattractant protein-1 by bovine glomerular endothelial cells. *Kidney Int* 1995 ; 48 : 1866-74.
26. Lang I, Hoffmann C, Olip H, Pabst MA, Hahn T, Dohr G, Desoye G. Differential mitogenic responses of human macrovascular and microvascular endothelial cells to cytokines underline their phenotypic heterogeneity. *Cell Prolif* 2001 ; 34(3) : 143-55.
27. Yashima R, Abe M, Tanaka K, Ueno H, Shitara K, Takenoshita S, Sato Y. Heterogeneity of the signal transduction pathways for VEGF-induced MAPKs activation in human vascular endothelial cells. *J Cell Physiol* 2001 ; 188(2) : 201-10.
28. Azzi A, Aratori E, Boscoboinik D, Clement S, Ozer NK, Ricciarelli R, Spycher S. Molecular basis of  $\alpha$ -tocopherol control of smooth muscle cell proliferation. *Bio Factors* 1998 ; 7 : 3-14.