

Udenafil이 혈관 평활근 세포의 증식과 백서 경동맥 손상 모델에서 신생내막 증식에 미치는 영향

한양대학교 의생명공학과,¹ 생물공학과,² 의과대학 내과학교실³

조준호¹ · 임광석² · Ji Yong Jin³ · 김경수^{1,3}

Effect of Udenafil on Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Neointimal Hyperplasia in Rat Carotid Artery Injury Model

Jun Ho Joe¹, Kwang Suk Lim², Ji Yong Jin, MD³ and Kyung Soo Kim, MD^{1,3}

¹Department of Biomedical Sciences, ²Bioengineering and ³Division of Cardiology, Internal Medicine, College of Medicine, Hanyang University, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives: Neointimal hyperplasia, which was caused by smooth muscle cell proliferation, was noted to occur after performing percutaneous coronary intervention. Phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibitor has been shown to inhibit smooth muscle cell proliferation. Udenafil is one of the PDE5 inhibitors, and it is also expected to inhibit smooth muscle cell proliferation and reduce neointimal hyperplasia. We investigated the effect of udenafil on the smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia that occurs after balloon injury in the carotid arteries of rats. **Materials and Methods:** Smooth muscle cells were treated with 1 mM, 100 μ M, 10 μ M, 1 μ M and 100 nM concentrations of udenafil. The viability of the smooth muscle cells was evaluated by MTT assay. The carotid arteries of rats were injured with a balloon catheter. Udenafil (100 μ M, 10 μ M and 1 μ M) was applied on the carotid artery adventitia after balloon injury. At 21 days after treatment, the carotid arteries were harvested and stained with H & E. The neointima and media area were measured with a computerized image analysis program. **Results:** In the *in vitro* experiment, treatment with 1 mM udenafil reduced smooth muscle cell viability by $68.8 \pm 4.42\%$ compared to the control group. In the balloon injured rat carotid artery, treatment with 100 μ M udenafil reduced the neointima area by 71.8% compared to the control group. **Conclusion:** Udenafil administration effectively inhibited smooth muscle cell proliferation and it reduced neointimal hyperplasia in the balloon-injured rat carotid artery. (Korean Circ J 2008;38:320-324)

KEY WORDS: Udenafil; Neointimal hyperplasia; Smooth muscle cell.

서 론

경피적 관동맥 중재술 후 재협착은 주요한 문제가 되고 있다.^{1,2)} 재협착의 주된 원인은 신생내막 (neointima) 증식에 의한 것이며, 이 신생내막 증식은 주로 혈관 손상 후에 활성화

된 혈관 평활근 세포 (vascular smooth muscle cells, VSMCs)의 증식에 의한 것이다.³⁾ 관상동맥 성형술 시술로 인한 혈관 손상으로 인한 여러가지 성장인자와 염증세포의 증식으로 인해 VSMCs의 증식이 촉진되어 혈관 내에 신생내막이 형성된다.⁴⁻⁷⁾

재협착 방지를 위한 여러가지 방법⁸⁻¹⁰⁾ 중에 관상동맥 스텐트 삽입술이 매우 효과적이다. 그러나 금속 스텐트 (bare metal stent, BMS)에서도 재협착은 24~35% 정도로 관찰된다.^{2,11,12)} 스텐트 재협착 (in stent restenosis)은 스텐트 시술 시 혈관 손상으로 인한 신생내막의 과잉 형성으로 발생하게 된다. 스텐트에 세포증식을 억제하는 약물을 코팅한

Received: February 12, 2008

Revision Received: March 27, 2008

Accepted: March 27, 2008

Correspondence: Kyung Soo Kim, MD, Division of Cardiology, Department of Internal Medicine, College of Medicine, Hanyang University, 17 Haengdang-dong, Seongdong-gu, Seoul 133-791, Korea
Tel: 82-2-2290-8312, Fax: 82-2-2298-9183

E-mail: kskim@hanyang.ac.kr

약물 방출형 스텐트 (drug eluting stent, DES)가 도입되어 재협착률은 3.2~5.5%까지 감소되었다.¹¹⁾¹²⁾ 그러나 DES에도 약물에 의한 재내피세포화 (re-endothelialization)의 지연, 과도한 평활근세포증식의 억제로 후기스텐트혈전증 등의 문제점이 발생되고 있다. 항암제로 사용되고 있는 paclitaxel과 면역 억제제인 sirolimus는 흔히 DES에 사용되는 약제로써 VSMCs의 증식 억제뿐만 아니라 내피세포 증식까지 억제하여 re-endothelialization이 억제되어 BMS보다 스텐트 내 혈전 생성의 빈도를 증가시킨다.¹²⁾¹³⁾

본 연구에서 사용된 udenafil은 phosphodiesterase type 5 (PDE 5) 억제제로 최근에 개발된 발기부전 치료제로 사용되는 약물이다. PDE 5 억제제는 nitric oxide (NO)의 국소 분비를 유발하고¹⁴⁾ cGMP를 분해하는 phosphodiesterase type 5의 활성을 억제하는 기능을 가지고 있어 세포내의 cGMP의 농도를 증가시킨다.¹⁵⁾ cGMP의 신호는 VSMCs내에서의 세포 사멸을 일으키고 증식을 억제하고,¹⁶⁻²⁰⁾ NO는 VSMCs의 세포사멸, 증식, 이주를 조절한다.²¹⁾²²⁾ PDE 5 억제제의 일종인 sildenafil이 세포내 cGMP의 증가를 유발시키고, VSMCs의 증식을 억제시키는 연구 결과가 보고되었다.¹⁴⁾ Udenafil과 같은 PDE 5 억제제는 항암제처럼 세포독성을 나타내는 물질이 아니기 때문에 혈관내피세포의 증식에 미치는 영향이 적을 것으로 예상된다. 따라서 VSMCs의 증식을 충분히 억제할 수 있다면 DES의 효과적인 후보약제로 생각된다. 그러나 udenafil이 VSMCs의 증식을 억제시키는 효과에 대하여 아직 조사된 바는 없다.

본 실험의 목적은 세포 실험에서 udenafil이 VSMCs의 증식 억제여부를 관찰하고, 백서 경동맥 손상의 모델에서 udenafil이 신생내막의 형성과 혈관의 협착을 감소시킬 수 있는지 알아보하고자 하였다.

재료 및 방법

세포 배양

세포 실험은 human artery vascular smooth muscle cells (HASMCs; ATCC, Rockville, MD)를 사용하였다. 세포는 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, Germany), 1% penicillin을 포함한 dulbecco's modified eagle's medium-low glucose (DMEM; Gibco, Germany)의 배양액을 사용하여 37°C에 5% CO₂를 포함한 세포배양기에서 배양하였다. 세포 배양에 사용된 배양액은 2일에 한번씩 교체했다. 세포는 20에서 22 passage에서 사용하였다.

Udenafil의 VSMCs 증식억제효과

Udenafil은 zydena (동아제약(주), 한국)를 사용하였으며, ethanol에 1 mM, 100 μ M, 10 μ M, 1 μ M, 100 nM의 농도로 용해하여 사용하였다. 배양된 HASMCs를 phosphate-buffered saline (PBS; Gibco, Germany)로 씻고 0.25% trypsin

(Gibco, Germany)으로 처리하여 petri dish에서 떼어낸 후, cell counter를 이용해 세포 수를 측정하고 1×10^4 개의 세포를 96-well plate에 분주하고 24시간 배양하였다. 우태혈청을 첨가하지 않은 (serum free) 배양액에서 24시간 배양한 후, 대조군은 아무런 물질을 첨가하지 않은 배양액에, 실험군은 1 mM, 100 μ M, 10 μ M, 1 μ M, 100 μ M의 농도별로 udenafil을 배양액에 첨가하여 24시간 관찰하였다. 이후 PBS로 다시 씻고, MTT [50 μ L, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide; Cal-biochem, Germany]를 넣고 3시간 배양한 후, 처리한 시약을 제거하고 dimethyl sulfoxide (150 μ L, DMSO; Sigma, Germany)로 5분간 처리하였다. 이후 Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)를 이용하여 590 nm의 파장으로 흡광도를 측정하였고, 결과는 대조군의 수치를 100%로 하고 실험군은 대조군과의 비율로 표기하였다.

도포용 Udenafil-pluronic gel의 제조

실험 하루 전날 F-127 pluronic gel (Sigma, Germany)을 25%가 되도록 PBS로 녹인 뒤, 4°C에서 12시간 이상 방치하였다. 실험 당일 분말상태의 udenafil을 100 μ M, 10 μ M, 1 μ M의 농도로 ethanol에 용해시킨 후 25% F-127 pluronic gel 180 μ L에 ethanolic udenafil (100 μ M/L, 10 μ M/L, 1 μ M/L의 udenafil) 20 μ L의 비율로 첨가하여, 200 μ L의 udenafil을 포함한 pluronic gel이 되도록 제조하였다.

재 료

실험동물은 체중 300~350 g의 Sprague-Dawley계의 성숙한 수컷 백서를 사용하였다. 총 16마리 백서에서 좌측 총경동맥에 풍선으로 손상을 주었다. 그 중 대조군 3마리는 udenafil을 포함하지 않는 pluronic gel로 처리하고, 실험군 13마리는 udenafil을 포함한 pluronic gel을 처리하였다.

백서 경동맥 손상모델과 Udenafil 처리

백서에 ketamine (50 mg/kg)과 xylazine (6.7 mg/kg)을 복강에 투여하여 마취시킨 후, 좌측 경부를 절개하여 총경동맥, 외경동맥 및 내경동맥을 분리하였다. Microvascular clamp (Acland, S & T, Switzerland)를 총경동맥의 대동맥 기시부와 내경동맥 원위부에 착용시켜 혈류를 일시적으로 중단시킨 상태에서 외경동맥을 절개하였다. 외경동맥으로부터 총경동맥에 풍선도자를 삽입하고, 총경동맥의 직경보다 크게 풍선을 부풀려 3회 왕복시켜 혈관 내막에 손상을 주었다. 이후 microvascular clamp를 제거하여 혈류를 재관류시키고 외경동맥을 묶었다. 대조군은 총경동맥에 손상을 가한 후 udenafil이 포함되지 않는 pluronic gel로 처리하고, 실험군은 각각 udenafil 100 μ M (n=5), 10 μ M (n=5), 1 μ M (n=3)의 농도를 포함한 pluronic gel로 처리하였다. 경동맥의 외부에 분비물 및 혈액을 깨끗이 제거한 후 미리 준비된 pluro-

nic gel을 각 실험동물의 총 경동맥 외벽에 주사기를 이용하여 200 μ L씩 고르게 도포한 후 절개부위를 봉합하였다.

백서 경동맥 병리조직 검사 및 분석

약물처리 21일 후에 다시 마취시키고 경동맥을 적출하여 10% formalin액에 고정시켰다. 고정된 경동맥의 중앙부위 1 cm를 취하여 파라핀에 포매한 후 4 μ m 두께로 연속적인 5장의 절편을 만들어 hematoxylin-eosin 염색을 시행하고 광학 현미경으로 관찰하였다. 혈관 절편의 사진을 찍어 컴퓨터에 옮긴 후 image analysis software (Image-Pro Plus version 6.0)을 이용하여 quantitative morphometry 분석을 시행하였다. 분석에 사용한 인자들은 신생내막의 면적 (neointima area), 중막의 면적 (media area), 신생내막과 중막의 면적비(neointima/media ratio)이다.

통계처리

모든 자료의 값은 평균 \pm 표준편차로 표시하였으며 통계분석은 SPSS (version 13)를 사용하였고, 대조군 및 udenafil 처리군들 간의 측정값의 차이 및 유의성은 ANOVA를 통해 검증하였고, p값이 0.05 미만인 경우에 통계적인 의의를 두었다.

결 과

Udenafil의 VSMCs의 증식억제효과

약물투여 24시간 후에 측정한 MTT assay에서 cell viability는 대조군과 비교해서 각각 udenafil 1 mM 처리군에서 $32.7 \pm 4.42\%$ ($p < 0.05$), 100 μ M 처리군에서 $40.5 \pm 4.24\%$ ($p < 0.05$), 10 μ M 처리군에서 $82.7 \pm 6.41\%$, 1 μ M에서 $90.1 \pm 5.61\%$, 100 nM에서 $103.2 \pm 17.25\%$ 였다 (Fig. 1). Udenafil 1 mM 처리군과 100 μ M 처리군에서 cell viability가 대조군에 비교하여 유의하게 감소하였고 ($p < 0.05$), 10 μ M, 1 μ M, 100 nM은 대조군과 비교해서 유의한 차이가 없었다 ($p > 0.05$). 그러나 1 mM과 100 μ M군에서 cell viability는 유의한 차이가 없었고, 다른 치료군들 사이에서도 유의한 차이가 없었다.

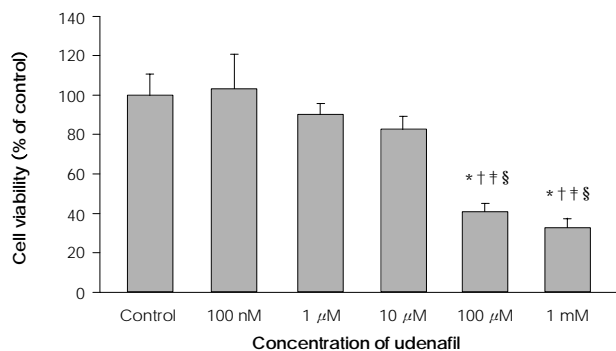


Fig. 1. MTT assay for the cell viability with using different udenafil concentrations. Quantification of HASMC proliferation was performed with MTT assay in presence of different concentrations of udenafil. *Vs control, † Vs 10 μ M, ‡ Vs 1 μ M, § Vs 100 nM, $p < 0.05$. HASMC: human artery vascular smooth muscle cell.

Udenafil 투여의 신생내막 증식 억제효과

조직학 검사에서 H & E 염색으로 신생내막의 형성을 관찰했다 (Fig. 2).

신생 내막의 면적은 대조군, udenafil 100 μ M, 10 μ M, 1 μ M 처리군에서 각각 0.074 ± 0.02 , 0.021 ± 0.06 , 0.043 ± 0.01 , 0.059 ± 0.01 mm²였다.

약물 처리군에서 udenafil 100 μ M 처리군은 대조군과 비교하여 유의하게 신생내막 면적을 감소시켰고 (0.021 ± 0.06 vs 0.074 ± 0.02 mm², $p < 0.05$), 10 μ M 처리군도 대조군에 비교해서 유의한 차이를 보였다 (0.043 ± 0.01 vs 0.074 ± 0.02 mm², $p < 0.05$) (Fig. 2) (Table 1). 그러나 udenafil 100 μ M 처리군과 10 μ M 처리군은 유의한 차이를 보였다 (0.021 ± 0.06 vs 0.043 ± 0.01 mm², $p < 0.05$). 1 μ M 처리군의 신생내막 면적은 대조군에 비하여 유의한 차이가 없었다.

신생내막/중막의 비율은 대조군, udenafil 100 μ M, 10 μ M, 1 μ M 처리군에서 각각 0.96 ± 0.22 , 0.32 ± 0.08 , 0.69 ± 0.31 , 0.75 ± 0.15 였다.

Udenafil 100 μ M 처리군은 각각 대조군, 10 μ M, 1 μ M 처리군에 비교하여 유의한 차이를 보였다 ($p < 0.05$) (Fig. 2) (Table 1). 그리고 10 μ M, 1 μ M 처리군은 대조군과 비교하여 유의한 차이를 보이지 않았고, 각 처리군들에서도 유의한 차이를 보이지 않았다.

고 찰

본 연구는 udenafil이 세포배양실험에서 HASMCs의 증식을 억제하고 백서 경동맥 손상 모델에서 신생내막 형성을 억제함을 알 수 있었다.

본 실험에서 MTT assay를 이용하여 HASMCs의 cell viability를 측정한 결과 대조군에 비해 udenafil 1 mM 처리군에서 32.7%, 100 μ M 처리군에서 40.5%로 유의하게 감소하였다 (Fig. 1). Tantini B 등은 동일한 PDE 5 억제제인 sildenafil을 human pulmonary artery smooth muscle cells (HPAVSMCs)에 처리한 결과 약 50%의 증식을 억제하였다고 보고하였다.¹⁵⁾ 이로서 sildenafil과 동일한 PDE 5 억제제인 udenafil도 HASMCs의 증식 억제 효과가 있음을 알 수 있다.

본 실험에서는 udenafil을 ethanol에 용해하였다. 용매인 ethanol 자체가 VSMCs의 증식을 억제하는 효과가 있음이 보고됐다.²⁴⁾ 본 연구의 보조실험에서, 용매로 사용된 ethanol이 동량 포함된 배지에 배양한 HAVSMCs의 viability는 ethanol이 없는 배양액에 배양한 세포의 viability와 차이가 없었다. 이는 본 실험에서 사용된 농도의 ethanol은 VSMCs에 viability에 영향을 미치지 않음을 시사한다.

본 실험의 백서 경동맥 손상 모델에서 형성된 신생내막의 면적이 대조군에 비해 100 μ M의 농도에서 신생내막의 형성이 78.1% 억제되었다. Cho 등⁹⁾이 paclitaxel을 가지고 경동맥 실험을 한 다른 논문에서는 신생내막 형성이 대조군과 pa-

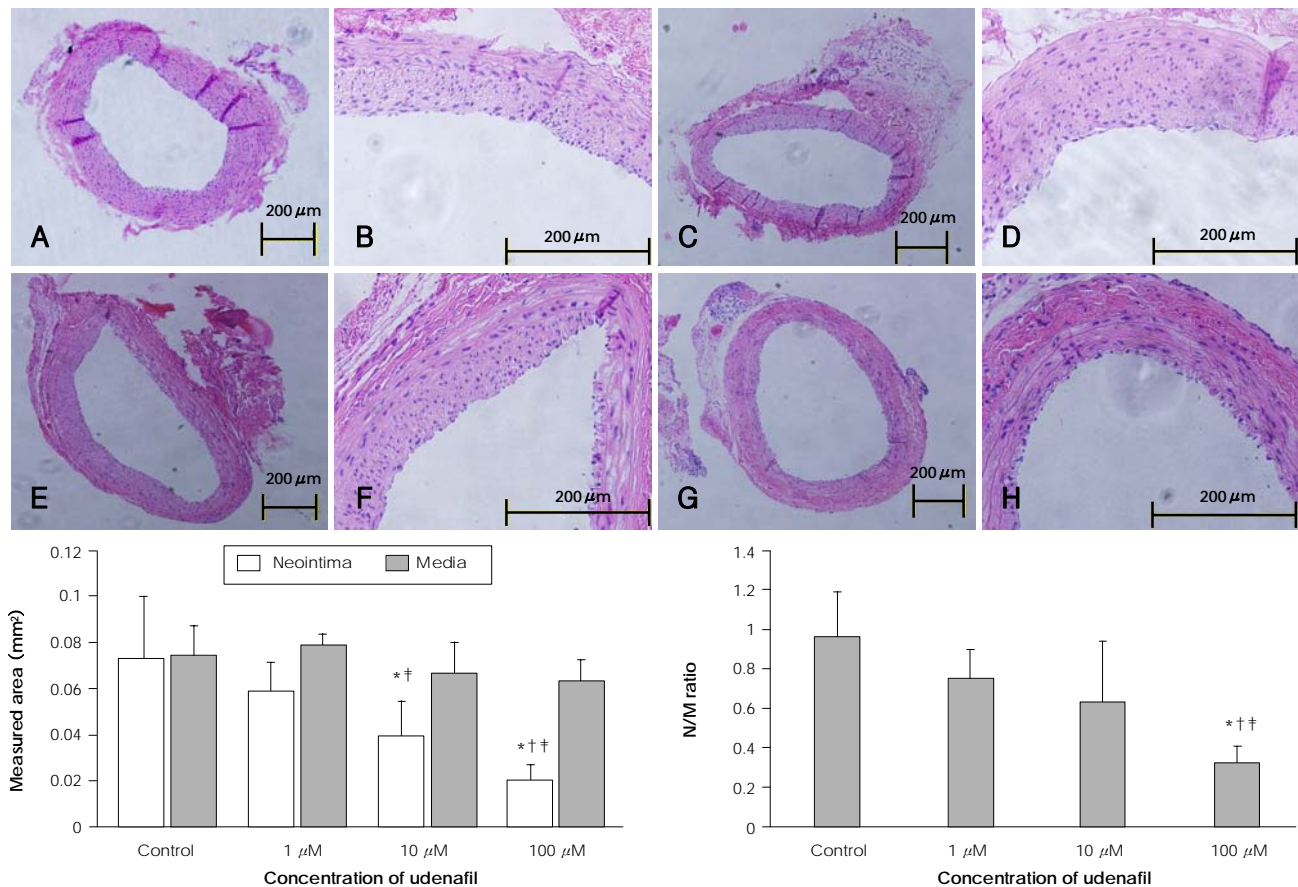


Fig. 2. Histology analysis of the carotid artery. A: control, 100 \times . B: control, 400 \times . C: 1 μ M udenafil, 100 \times . D: 1 μ M udenafil, 400 \times . E: 10 μ M udenafil, 100 \times . F: 10 μ M udenafil, 400 \times . G: 100 μ M udenafil, 100 \times . H: 100 μ M udenafil, 400 \times . The bars of the graph represent the neointima area and media area and the neointima/media ratio. *Vs control, † Vs 10 μ M, ‡ Vs 1 μ M, $p < 0.05$. N/M: neointima/media.

Table 1. Quantitative histomorphological analysis of the rat carotid artery obtained 21 days after the carotid artery injury

	Control (n=3)	1 μ m (n=3)	10 μ m (n=5)	100 μ m (n=5)
Neointima (mm ²)	0.07 \pm 0.03	0.06 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01*†	0.02 \pm 0.06*†‡
Media (mm ²)	0.07 \pm 0.01	0.08 \pm 0.05	0.07 \pm 0.01	0.06 \pm 0.09
Neointima/Media	0.96 \pm 0.22	0.75 \pm 0.15	0.69 \pm 0.31	0.32 \pm 0.08*†‡

*Vs control, †Vs 10 μ M, ‡Vs 1 μ M, $p < 0.05$

clitaxel 처치군과 비교했을 때 약 50~60% 정도의 형성억제 효과를 보였고,²⁵⁾²⁶⁾ Park 등⁴⁾이 Thalidomide로 실험한 결과에서는 약 71%가 억제되었다.

현재 udenafil에 대한 VSMCs의 증식 억제에 관한 연구는 아직 보고가 없다. Udenafil의 cell viability에 관한 실험과 신생내막 형성의 감소효과에 대한 실험은 본 실험에서 최초로 시행되었고 실험 결과 cell viability가 감소하고 신생내막의 생성을 유의하게 억제하였음을 보고하는 바이다.

결론적으로, 경동맥 손상 모델에서 udenafil은 효과적으로 신생내막의 형성을 억제하고 협착의 완화를 가져왔다. 세포독성이 약하고 세포증식을 억제하는 효과를 나타내는 udenafil은 차세대 DES에 적용될 약물로 훌륭한 조건을 갖추고 있다.

향후 udenafil의 혈관 내피세포의 증식에 관한 효과에 대한 실험이 필요할 것이며, 혈관 내피세포의 증식에 영향이

거의 없다면 이상적인 DES의 약제로써 사용될 수 있을 것이다. 또한 stent 코팅 모델을 이용한 동물 실험이 필요할 것으로 생각된다.

요 약

배경 및 목적

경피적 관동맥 중재술 후에 평활근 세포의 증식과 이주로 인해 신생내막이 증식된다. PDE 5 억제제는 VSMCs의 증식을 억제하는 능력을 가지고 있다. 이에 같은 PDE 5 억제제인 udenafil에서도 VSMCs의 증식을 억제하고 신생내막 증식을 억제할 수 있는지 알아보하고자 하였다.

방 법

평활근 세포에 1 mM, 100 μ M, 10 μ M, 1 μ M, 100 nM의 농

도로 udenafil을 처리한다. 평활근 세포의 viability는 MTT assay로 평가한다. 백서 경동맥은 풍선도자를 이용하여 손상을 가한다. Udenafil (100 μ M, 10 μ M, 1 μ M)은 풍선도자로 손상을 가한 후 경동맥 표면에 처리한다. Udenafil 처리 21일 후, 경동맥을 적출하고 H & E 염색을 한다. 신생내막과 중막의 면적은 이미지 분석 프로그램을 이용하여 측정한다.

결 과

In vitro 실험에서 udenafil (1 mM)을 처리한 군에서 대조군과 비교했을 때 평활근 세포의 viability는 $68.8 \pm 4.42\%$ 감소하였다. 백서 경동맥 풍선손상 모델에서 100 μ M의 udenafil을 처리했을 때 대조군과 비교해서 신생내막의 면적이 71.8% 감소하였다.

결 론

Udenafil은 평활근 세포의 증식을 억제하고 백서 경동맥 손상 모델에서 신생내막의 증식을 감소시킨다.

중심 단어: Udenafil; 신생내막; 평활근세포.

REFERENCES

- 1) Popma JJ, Califf RM, Topol EJ. *Clinical trials of restenosis after coronary angioplasty*. *Circulation* 1991;84:1426-36.
- 2) Tahk SJ. *Strategies for the prevention and treatment of intracoronary stent restenosis*. *Korean Circ J* 1997;27:251-64.
- 3) Clowes AW, Clowes MM. *Kinetics of cellular proliferation after arterial injury: II. inhibition of smooth muscle growth by heparin*. *Lab Invest* 1985;52:611-6.
- 4) Park SJ, Kim HS, Yang HM, et al. *Thalidomide as a potent inhibitor of neointimal hyperplasia after balloon injury in rat carotid artery*. *Korean Circ J* 2004;34:346-55.
- 5) Tanaka H, Sukhova G, Schwartz D, Libby P. *Proliferating arterial smooth muscle cells after balloon injury express TNF-alpha but interleukin-1 or basic fibroblastic growth factor*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:12-8.
- 6) Clausell N, de Lima VC, Molossi S, et al. *Expression of tumor necrosis factor alpha and accumulation of fibronectin in coronary artery restenotic lesions retrieved by atherectomy*. *Br Heart J* 1995;73:534-9.
- 7) Linder V, Reidy MA. *Expression of basic fibroblast growth factor and its receptor by smooth muscle cells and endothelium in injured rat arteries*. *Circ Res* 1993;73:589-95.
- 8) Baek SH, March KL. *Gene therapy for restenosis: getting nearer the heart of the matter*. *Circ Res* 1998;82:295-305.
- 9) Cho MC, Kwak NJ, Piao H, et al. *Effect of paclitaxel local delivery on neointimal formation after endothelial denudation of the rat carotid artery*. *Korean Circ J* 2000;30:198-207.
- 10) Califf RM, Fortin DF, Frid DJ, et al. *Restenosis after coronary angioplasty: an overview*. *J Am Coll Cardiol* 1991;17 (6 Suppl B): 2B-13B.
- 11) Seung KB. *Drug eluting stent and percutaneous coronary intervention*. *Korean Circ J* 2003;33:857-60.
- 12) Moses JW, Leon MB, Popma JJ, et al. *Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery*. *N Engl J Med* 2003;349:1315-23.
- 13) Stone GW, Ellis SG, Cox DA, et al. *One-year clinical results with the slow-release, polymer-based, paclitaxel-eluting TAXUS stent*. *Circulation* 2004;109:1942-7.
- 14) Kalsi JS, Ralph DJ, Thomas P, et al. *A nitric oxide-releasing PDE5 inhibitor relaxes human corpus cavernosum in the absence of endogenous nitric oxide*. *J Sex Med* 2005;2:53-7.
- 15) Tantini B, Manes A, Fiumana E, et al. *Antiproliferative effect of sildenafil on human pulmonary artery smooth muscle cells*. *Basic Res Cardiol* 2005;100:131-8.
- 16) Garg UC, Hassid A. *Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells*. *J Clin Invest* 1989;83:1774-7.
- 17) Wharton J, Strange JW, Möller GM, et al. *Antiproliferative effects of phosphodiesterase type 5 inhibition in human pulmonary artery cells*. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:105-13.
- 18) Fukumoto S, Koyama H, Hosoi M, et al. *Distinct role of cAMP and cGMP in the cell cycle control of vascular smooth muscle cells*. *Circ Res* 1999;85:985-91.
- 19) Chiche JD, Schlutsmeyer SM, Bloch DB, et al. *Adenovirus-mediated gene transfer of cGMP-dependent protein kinase increases the sensitivity of cultured vascular smooth muscle cells to the antiproliferative and pro-apoptotic effects of nitric oxide/cGMP*. *J Biol Chem* 1998;273:34263-71.
- 20) Lincoln TM, Cornwell TL. *Intracellular cyclic GMP receptor proteins*. *FASEB J* 1993;7:328-38.
- 21) Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. *An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:5193-7.
- 22) Sarkar R, Meinberg EG, Stanley JC, Gordon D, Webb RC. *Nitric oxide reversibly inhibits the migration of cultured vascular smooth muscle cells*. *Circ Res* 1996;78:225-30.
- 23) Mattsson EJ, Kohler TR, Vergel SM, Clowes AW. *Increased blood flow induces regression of intimal hyperplasia*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2245-9.
- 24) Liu MW, Anderson PG, Luo JF, Roubin GS. *Local delivery of ethanol inhibits intimal hyperplasia in pig coronary arteries after balloon injury*. *Circulation* 1997;96:2295-301.
- 25) Kwon JS, Park SS, Kim YG, et al. *Perivascular delivery of paclitaxel with F-127 pluronic gel inhibits neointimal hyperplasia in a rat carotid artery injury model*. *Korean Circ J* 2005;35:221-7.
- 26) Kim DW, Kwon JS, Kim YG, et al. *Novel oral formulation of paclitaxel inhibits neointimal hyperplasia in a rat carotid artery injury model*. *Circulation* 2004;109:1558-63.