

Effect of Udenafil on MUC5B Expression in Human Airway Epithelial Cells

Na Kyung Park¹, Yoon Seok Choi¹, Jun Hyuk Lee¹, Hoon-sung Kim¹, Joon Kon Kim¹, Ji Hoon Ahn¹, Yo Han Choi¹, Si-Youn Song¹, Chang Hoon Bae¹ and Yong-Dae Kim^{1,2}

¹Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, College of Medicine, Yeungnam University, Daegu; and

²Center for Respiratory Disease, Yeungnam University Medical Center, Daegu, Korea

인간 호흡기 상피세포에서 MUC5B 발현에 대한 Udenafil의 효과

박나경¹ · 최윤석¹ · 이준혁¹ · 김훈성¹ · 김준곤¹ · 안지훈¹ · 최요한¹ · 송시연¹ · 배창훈¹ · 김용대^{1,2}

영남대학교 의과대학 이비인후-두경부외과학교실, ¹ 영남대학교병원 호흡기전문 질환센터²

Received June 18, 2013

Revised July 15, 2013

Accepted July 15, 2013

Address for correspondence

Yong-Dae Kim, MD, PhD

Department of Otorhinolaryngology-

Head and Neck Surgery,

College of Medicine,

Yeungnam University,

170 Hyeonchung-ro, Nam-gu,

Daegu 705-703, Korea

Tel +82-53-620-3781

Fax +82-53-628-7884

E-mail ydkim@med.yu.ac.kr

Background and Objectives Mucus hypersecretion in the airway may lead to increased frequency and duration of infection, declined lung function, and increased morbidity and mortality in inflammatory respiratory diseases. Udenafil, a phosphodiesterase (PDE) 5 inhibitor, is an oral medication for erectile dysfunction. Recent studies show that PDE5 inhibitor has various anti-inflammatory properties. However, the effect of udenafil on mucus secretion in human airway epithelial cells is unclear. Therefore, the effect and brief signaling pathway of udenafil on MUC5B expression were investigated in human airway epithelial cells.

Materials and Method We analyzed the effects and brief signaling pathway of udenafil on the lipopolysaccharide (LPS) induced MUC5B expression in mucin-producing NCI-H292 epithelial cells using reverse transcription-polymerase chain reaction, enzyme-linked immunosorbent assay, and immunoblot analysis.

Results Udenafil attenuated the LPS-induced MUC5B mRNA expressions and glycoprotein production in NCI-H292 epithelial cells. It also attenuated LPS-induced toll like receptor 4 (TLR4) mRNA expression and phosphorylation of extracellular regulated kinase1/2 (ERK1/2) and p38 in NCI-H292 epithelial cells.

Conclusion These results suggest that udenafil attenuates the LPS induced MUC5B expression via TLR4, ERK1/2 and p38 mitogen activated protein kinase (MAPK) pathway in human airway epithelial cells, and that it could be a novel therapeutic agent for controlling chronic airway disease.

Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg 2013;56:501-5

Key Words Airway epithelial cells · MAPK · MUC5B · TLR4 · Udenafil.

서론

점액(mucus)은 호흡기 상피 표면을 덮고 있는 물질로서 흡기에 포함된 독성물질과 감염원에 대한 비점막의 일차 방어선이다. 그러나 만성 염증성 호흡기질환에서는 점액의 분비가 과도하게 일어나거나 그 성상이 변화하여 병의 경과를 악화시킬 수 있어 점액의 성상 및 과다 분비를 조절하는 것이 매우 중요하다.¹⁾ 점액의 여러 성분 중에서 점소(mucin)는 점액의 유

동학적 특성, 물리화학적 또는 생화학적 특성을 결정할 때 가장 큰 역할을 담당한다. 점소를 생성하는 유전자인 MUC 유전자는 현재 20개가 발견되었다.²⁾ 이 중 분비형 점소(secretory mucin)인 MUC5AC, MUC5B 및 MUC8의 유전자가 상기도 영역에서는 중요하다.³⁾

사람의 호흡기 상피세포에서 점액의 분비를 증가시키고 점액 유전자 발현을 증가시키는 것으로는 lipopolysaccharide (LPS), acrolein과 같은 외부물질과 interleukin(IL), platelet

activating factor, tumor necrosis factor- α 등의 사이토카인, insulin-like growth factor-1과 같은 호르몬들이 있다.⁴⁻¹³⁾ 그 중 LPS는 그람 음성 세균의 외막 성분으로 체내에서 toll like receptor(TLR)4를 활성화하여 mitogen activated protein kinase(MAPK) 경로를 통해 대식세포를 자극시켜 사이토카인을 유도하여 여러 염증 반응을 일으킨다.^{14,15)} Udenafil은 국내에서 시판 중인 2세대 경구용 발기부전 치료제로 phosphodiesterase(PDE)5 inhibitor로 pyrazolopyrimidine계에 속한다. 최근 많은 연구에서 PDE5 inhibitor가 다양한 조직에서 여러 가지 염증성 사이토카인의 발현, reactive oxygen species(ROS)의 증가, nitric oxide synthase 과발현 등의 염증 반응들을 억제하는 것으로 보고되고 있다.^{14,16)} 그러나 염증성 호흡기 질환에서 PDE5 inhibitor가 어떤 영향을 미치는지에 대한 보고는 미미한 상태이다.

따라서 인간 호흡기 상피세포에서 udenafil이 호흡기 염증 반응에서 나타나는 중요한 점액 유전자 중 하나인 MUC5B 유전자의 발현과 점액 단백 생성에 어떠한 영향을 미치는지 알아보고자 이 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

재 료

LPS는 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서, udenafil은 동아 제약(Seoul, Korea)에서, RPMI 1640 medium은 Invitrogen(Carlsbad, CA, USA), fetal bovine serum(FBS)은 Hyclone Laboratories(Logan, UT, USA)에서 구입하였다. MUC5B(SC-23024) 항체, anti-rabbit or anti-mouse horseradish peroxidase(HRP)-conjugated 이차 항체는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다.

세포 배양 및 처리

사람 폐의 점액상피양 암 세포주(human pulmonary mucopidermoid carcinoma cell line)인 NCI-H292 세포(American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)를 6-well plate에 1×10^6 cells/well의 농도로 접종한 후 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin과 10% FBS가 포함된 RPMI 1640 배지를 이용하여 95%의 산소와 5%의 이산화탄소가 혼합된 배양기에서 37°C의 온도로 배양하였다. 수일 후 70~80% 정도의 융합기가 되면 세포를 0.5% fetal calf serum이 포함된 RPMI 1640 배지로 교체한 후 24시간 동안 배양하고, 다시 FBS가 포함되지 않은 RPMI 1640 배지로 세척한 후 실험에 사용하였다.

Udenafil의 효과를 알아보기 위해서 NCI-H292 세포에 20,

40, 80, 100 ng/mL 농도의 udenafil을 전처리한 후 1시간 뒤에 100 ng/mL 농도의 LPS를 각각 투여하였다. 대조군은 동일한 시간 동안 배지에서 NCI-H292 세포를 단독으로 배양하였다.

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) 분석

GeneAmp RNA PCR core kit와 PTC-200(MJ Research Inc., Watertown, MA, USA) PCR machine을 사용하여 제조사의 방법대로 시행하였다. PCR에 사용된 oligonucleotide-primer는 밝혀진 염기서열에 의해 제작하였으며, 각 반응의 내부 양성 대조군(internal positive control)은 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)를 사용하였다. 실험에 사용된 primer의 염기배열은 MUC5B의 경우 sense는 5'-CAC ATC CAC CCT TCC AAC-3', antisense는 5'-GGC TCA TTG TCG TCT CTG-3'이고, TLR4의 경우 sense는 5'-ACA ACC TCC CCT TCT CAA CC-3', antisense는 5'-AAC TCT GGA TGG GGT TTC CT-3'이며, GAPDH의 경우 sense는 5'-CCT CCA AGG AGT AAG ACC CC-3', antisense는 5'-AGG GGT CTA CAT GGC AAC TG-3'을 사용하였다. 증폭된 mRNA 산물의 크기는 MUC5B는 245 bp, TLR4는 201 bp, GAPDH는 145 bp였다. 과정을 간략히 설명하면, 배양된 세포를 2% bovine serum albumin을 함유한 phosphate buffered saline(PBS)로 3회 세척한 후 Trizol[®] (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA)을 이용하여 총 mRNA를 추출하였다. MUC5B mRNA에 대한 PCR은 95°C에서 60초간 변성(denaturation)과정과 60°C에서 60초간 결합(annealing)반응 및 72°C에서 60초간 연장(extension)반응을 33회 반복한 후 72°C에서 20분간 최종 연장반응을 시행하였다. TLR4 mRNA에 대한 PCR은 95°C에서 60초간 변성(denaturation)과정과 61°C에서 60초간 결합(annealing)반응 및 72°C에서 60초간 연장(extension)반응을 30회 반복한 후 72°C에서 20분간 최종 연장반응을 시행하였다. 증폭된 증합효소연쇄반응의 산물은 SYBR green이 함유된 1% agarose gel을 통한 전기영동을 이용하여 분리 관찰하였다. 확인된 띠(band)의 세기는 Scion Image software(Scion Corporation, Frederick, MD, USA)를 이용하여 반정량적으로 분석하였고, 대조군의 density를 100으로 하였을 때 실험군의 density 값을 비율로 나타내어 relative density로 나타내었다.

면역분석법(Immunoassay)

MUC5B의 점액 단백질의 함량을 측정하기 위해서 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)법을 이용하였다. NCI-

H292 세포에서 lysis buffer[50 mM Tris·Cl(pH 7.5), 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride]로 단백을 추출하여 정량하였다. 추출한 단백 100 µg을 96-well plate에 담고 40℃에서 건조될 때까지 방치한 후 plate를 PBS로 3회 세척하였다. 비특이적 결합을 방지하기 위해 2% bovine serum albumin으로 실온에서 1시간 동안 차단한 후 PBS에 1 : 200으로 희석된 MUC5B 일차항체로 반응시켰다. 다시 PBS로 3회 세척한 후 HRP-conjugated 이차항체를 0.05% Tween 20을 함유한 PBS에 1 : 5000으로 희석하여 각 well에 첨가하였고, 1시간 후에 각 well을 PBS로 3회 세척하였다. 4시간 후 3,3', 5,5'-tetramethyl benzidine 용액으로 발색한 후, 2N-H₂SO₄를 이용하여 중단시켰다. ELISA reader(EL800®, BIO-TEK Instruments, Winooski, VT, USA)로 450 nm에서 흡광도를 측정한 후 표준곡선을 이용하여 단백의 양을 정량하였다.

Western blot 분석

Extracellular regulated kinase1/2(ERK1/2) 및 p38 MAPK의 활성도를 측정하기 위해 Western blot 분석법을 이용하였다. NCI-H292 세포를 6-well plate에 담고 농도에 따라 udenafil을 처리하여 각각 배양하였다. 이후 각 세포들을 trypsin에 노출시킨 후 4℃에서 700 g씩 각각의 pellet을 만들었다. 각 pellet은 다시 lysis buffer를 거친 후 원심분리시켰다. 그리고 분리된 상청액은 전체세포용해액으로 저장하였으며 추출한 단백 50 µg은 10% reducing sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel 전기영동하여 분리하였으며 nitrocellulose membrane으로 옮겼다. 이를 다시 5% nonfat dry milk로 차단하여 ERK1/2 혹은 p38 MAPK 일차항체로 반응시킨 후 각각 4시간씩 배양한 다음 ERK1/2 혹은 p38 MAPK 이차항체로 세척하여 다시 배양하였다. 1시간동안 HRP와 접합시키고 enhanced chemiluminescence reagent kit를 이용하여 현상하여 10초간 X-ray film에 노출시켰다.

통 계

통계 처리는 Windows용 SPSS version 10.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하였다. 모든 실험은 *p*값이 0.05 미만인 경우를 유의한 것으로 정하여 Student's t-test를 이용하였다.

결 과

NCI-H292 세포에서 udenafil이 LPS에 의해 유도된 MUC5B 발현에 미치는 영향

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-

PCR) 결과 NCI-H292 세포에서 LPS로 유도된 MUC5B mRNA 발현은 udenafil을 투여한 군에서 통계적으로 유의하게 감소하였다(*p*<0.05)(Fig. 1A). 그러나 udenafil의 농도에 따른 유의한 차이는 없었다. ELISA 결과 NCI-H292 세포에서 LPS로 유도된 MUC5B 점액 단백의 생성량은 udenafil을 투여한 군에서 통계학적으로 의미 있게 감소하였다(*p*<0.05)(Fig. 1B). 그러나 이 또한 udenafil의 농도에 따른 유의한 차이는 없었다.

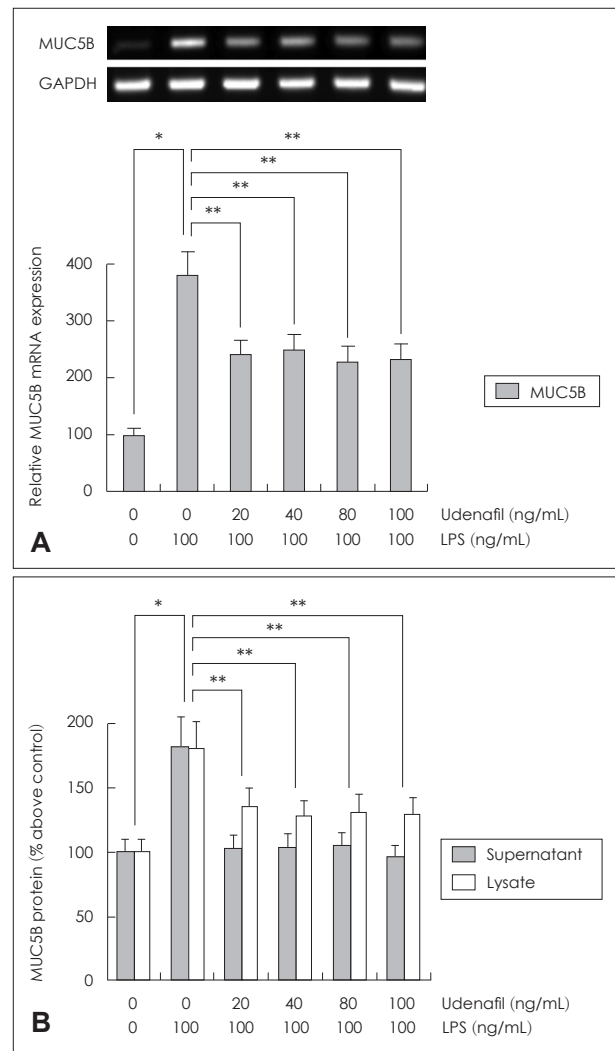


Fig. 1. The effects of udenafil on the LPS-induced MUC5B expression in human NCI-H292 cells. In NCI-H292 cells, RT-PCR revealed an attenuation of LPS-induced MUC5B mRNA expression by pre-treatment with udenafil, respectively (A). ELISA showed that udenafil significantly decreased LPS-induced MUC5B glycoprotein level (B). Images are representative of three separate experiments performed in triplicate. Bars indicate the mean $\pm$ SD of three independent experiments performed in triplicate. **p*<0.05 compared with zero value, ***p*<0.05 compared with LPS only. LPS: lipopolysaccharide, RT-PCR: reverse transcriptase-polymerase chain reaction, ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

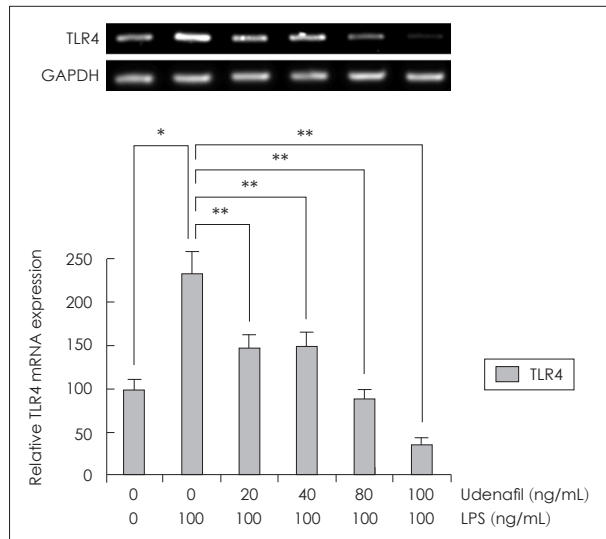


Fig. 2. The effects of udenafil on the LPS-induced TLR4 gene expression in human NCI-H292 cells. In NCI-H292 cells, RT-PCR revealed an attenuation of LPS-induced TLR4 mRNA expression by pretreatment with udenafil, respectively. Images are representative of three separate experiments performed in triplicate. Bars indicate the mean $\pm$ SD of three independent experiments performed in triplicate. * p <0.05 compared with zero value, ** p <0.05 compared with LPS only. LPS: lipopolysaccharide, TLR4: toll like receptor 4, RT-PCR: reverse transcriptase-polymerase chain reaction, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

NCI-H292 세포에서 udenafil이 LPS에 의해 유도된 TLR4 발현에 미치는 영향

RT-PCR 결과 NCI-H292 세포에서 LPS로 유도된 TLR4의 mRNA 발현은 udenafil을 투여한 군에서 유의하게 감소하였다. 그러나 udenafil의 농도에 따른 유의한 차이는 없었다(p <0.05)(Fig. 2).

NCI-H292 세포에서 udenafil이 LPS에 의해 유도된 ERK1/2, p38 MAPK phosphorylation에 미치는 영향

Western blot 분석 결과 LPS로 유도된 ERK1/2와 p38의 phosphorylation은 udenafil을 투여한 군에서 통계학적으로 의미 있게 감소하였다. 그러나 udenafil의 농도에 따른 유의한 차이는 없었다(p <0.05)(Fig. 3).

고찰

사람의 코 점막 상피세포에서 점액의 분비를 증가시키고 점액 유전자 발현을 증가시키는 것으로는 LPS, IL-1 β , IL-4, protein kinase C activator 등의 여러 가지 물질이 존재한다.⁴⁻¹³ 그 중 LPS는 그람 음성 세균의 외막 성분으로 체내에서 LPS 결합단백과 결합하여 TLR4에서 감지하여 MAPK 경로를 통해 대식세포를 자극시켜 사이토카인을 유도하여 여러 염증 반

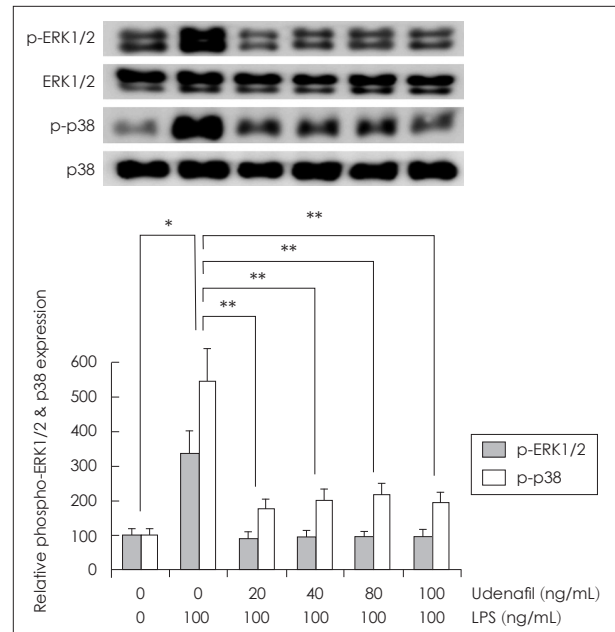


Fig. 3. The effects of udenafil on phosphorylation of LPS induced ERK1/2 and p38 MAPKs in human NCI-H 292 cells. In NCI-H292 cells, western blot showed that udenafil significantly decreased the LPS-induced phosphorylated ERK, p38 level. Images are representative of three separate experiments performed in triplicate. Bars indicate the mean $\pm$ SD of three independent experiments performed in triplicate. * p <0.05 compared with zero value, ** p <0.05 compared with LPS only. LPS: lipopolysaccharide, MAPK: mitogen-activated protein kinase, ERK1/2: extracellular regulated kinase1/2, p-ERK1/2: phosphorylated ERK1/2, p-p38: phosphorylated p38.

응을 일으킨다.^{14,16)}

Udenafil은 2세대 경구용 발기부전 치료제로 pyrazolopyrimidine계에 속하며 PDE5 inhibitor이다. Viagra®(Sildenafil citrate)로 대표되는 1세대 경구용 발기부전 치료제와 동일한 작용 기전으로 발기 지속 효과를 나타내나 생물학적 가용능은 더 높다.¹⁶⁾ 그 작용기전은 평활근에서 PDE5를 억제함으로써 cyclic guanosine monophosphate(cGMP)의 농도를 높게 유지하여 많은 종류의 protein kinase를 활성화하여 평활근의 이완, 굴모세혈관으로 적절한 혈액 공급, 음경정맥 압박 등의 기전으로 해면체의 발기를 지속하는 것이다.¹⁷⁾ PDE5는 음경 외에도 대뇌, 신장, 담낭, 폐 조직 등에서 풍부해 PDE5 inhibitor를 발기 부전 치료제 뿐만 아니라 다른 조직에서 다양한 약리학적 효과를 나타낼 수 있을지에 대한 연구가 활발하게 진행되어, 폐동맥 고혈압의 치료, 심혈관 보호작용, 폐의 섬유화 방지, 하부요로 증후군의 증상 완화 등의 효과를 가진 것으로 보고되고 있다.¹⁸⁾ 또한 최근 연구에서는 중추신경계에서 ROS의 억제를 통한 항염증 효과가 보고되었다.¹⁴⁾ 세포 내에서 cGMP는 PDE와 soluble guanylate cyclase(sGC)에 의해 조절된다. PDE의 활성화가 증가되면 cGMP는 감소하게 되고 sGCs의 활성화가 증가되면 cGMP는 증가하게 된다. 염증

반응에서 주로 나타나는 염증성 사이토카인, ROS, NO의 변화는 PDE를 활성화시키고 sGC의 발현을 감소시켜 cGMP의 감소를 유발시킨다.¹⁹⁾ 이러한 cGMP의 감소는 급성 폐손상, 염증성 호흡기 질환과 관련 있는 것으로 최근 보고되고 있다.²⁰⁾ 그러므로 cGMP 증가의 효과가 있는 PDE5 inhibitor는 호흡기 염증질환에서도 효과가 있을 것으로 생각되며 호흡기 염증 반응에서 중요한 역할을 차지하는 점액 유전자의 발현과 점액 단백 생성에도 영향을 줄 것으로 생각되었다. 이 연구에서도 NCI-H292 세포에서 LPS에 의해 증가된 MUC5B의 유전자 발현 및 단백 생성이 udenafil에 의해 억제되는 것을 확인할 수 있었고, 이 억제 효과는 LPS에 의해 유도된 TLR4, ERK1/2와 p38 MAPK 경로와 관계가 있음을 알 수 있었다.

그러나 udenafil이 LPS에 의해 유도된 MUC5B 발현에 관여하는 정확한 효과를 확인하기 위해서는 동물실험 등을 통한 추가적 실험이 필요할 것으로 사료된다. 또한 이 연구에서는 인체 내에서 udenafil이 점액 분비 억제효과에 대한 실험은 이루어지지 않아, 인체 내에서 udenafil의 상용 복용량에 의한 혈중농도로 어느 정도의 점액 분비 억제효과가 발생할 수 있을지는 알 수 없었다. 하지만 udenafil을 인체 내로 투여했을 때 상피세포에 대해서는 염증매개물질과 염증세포의 활성화에 다양한 변화를 일으켜 점액 분비를 조절할 것으로 생각되므로 이에 대한 추가적인 연구가 뒤따라야 할 것으로 생각된다.

이상의 연구 결과로 보아 호흡기 상피세포에서 udenafil이 점액의 과분비를 억제하는 작용이 있으므로, 이와 관련된 작용기전에 대한 연구와 *in vivo* 연구를 진행한다면 점액의 과분비를 억제할 수 있는 새로운 약제 개발에 도움이 될 것이다.

REFERENCES

- 1) Woo HJ, Min MK, Bae CH, Song SY, Kim YD. Roxithromycin suppresses MUC5B/8 mucin genes and mucin production in airway epithelial cells. *Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg* 2008; 51(7):617-22.
- 2) Ali MS, Pearson JP. Upper airway mucin gene expression: a review. *Laryngoscope* 2007;117(5):932-8.
- 3) Rose MC, Nickola TJ, Voynow JA. Airway mucus obstruction: mucin glycoproteins, MUC gene regulation and goblet cell hyperplasia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;25(5):533-7.
- 4) Lee JG, Moon HJ, Kim SS, Kim CW, Yoon JH. Expression and regulation of MUC8 & MUC5AC by various cytokines in normal human nasal epithelial cells. *Korean J Otolaryngol-Head Neck Surg* 2001;44(6):600-5.
- 5) Lee JH, Kim GO, Na HG, Park NK, Kim HS, Kim JK, et al. Effect of Anthocyanidin on MUC5AC and MUC5B Expression in Airway Epithelial Cells. *Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg* 2013; 56(5):291-6.
- 6) Borchers MT, Carty MP, Leikauf GD. Regulation of human airway mucins by acrolein and inflammatory mediators. *Am J Physiol* 1999; 276(4 Pt 1):L549-55.
- 7) Kim YD, Kwon EJ, Park DW, Song SY, Yoon SK, Baek SH. Interleukin-1beta induces MUC2 and MUC5AC synthesis through cyclooxygenase-2 in NCI-H292 cells. *Mol Pharmacol* 2002;62(5): 1112-8.
- 8) Dabbagh K, Takeyama K, Lee HM, Ueki IF, Lausier JA, Nadel JA. IL-4 induces mucin gene expression and goblet cell metaplasia in vitro and in vivo. *J Immunol* 1999;162(10):6233-7.
- 9) Hewson CA, Edbrooke MR, Johnston SL. PMA induces the MUC5AC respiratory mucin in human bronchial epithelial cells, via PKC, EGF/TGF-alpha, Ras/Raf, MEK, ERK and Sp1-dependent mechanisms. *J Mol Biol* 2004;344(3):683-95.
- 10) Song SY, Seo YJ, Kim YW, Park SY, Bae CH, Kim YD. Effect of *Onchocerca volvulus* chitinase on MUC5B expression in human airway epithelial cells. *Am J Rhinol Allergy* 2013;27(1):3-7.
- 11) Bae CH, Kim JS, Song SY, Kim YW, Park SY, Kim YD. Insulin-like growth factor-1 induces MUC8 and MUC5B expression via ERK1 and p38 MAPK in human airway epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;430(2):683-8.
- 12) Bae CH, Kim HS, Song SY, Kim YD. Phorbol 12-Myristate 13-Acetate Induces MUC16 Expression via PKCδ and p38 in Human Airway Epithelial Cells. *Clin Exp Otorhinolaryngol* 2012;5(3):161-9.
- 13) Bae CH, Kim JW, Ye SB, Song SY, Kim YW, Park SY, et al. AMPK induces MUC5B expression via p38 MAPK in NCI-H292 airway epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;409(4):669-74.
- 14) Zhao S, Zhang L, Lian G, Wang X, Zhang H, Yao X, et al. Sildenafil attenuates LPS-induced pro-inflammatory responses through down-regulation of intracellular ROS-related MAPK/NF-κB signaling pathways in N9 microglia. *Int Immunopharmacol* 2011;11(4):468-74.
- 15) Dauphinee SM, Karsan A. Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. *Lab Invest* 2006;86(1):9-22.
- 16) Toward TJ, Smith N, Broadley KJ. Effect of phosphodiesterase-5 inhibitor, sildenafil (Viagra), in animal models of airways disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169(2):227-34.
- 17) Kim BH, Lim HS, Chung JY, Kim JR, Lim KS, Sohn DR, et al. Safety, tolerability and pharmacokinetics of udenafil, a novel PDE-5 inhibitor, in healthy young Korean subjects. *Br J Clin Pharmacol* 2008;65(6):848-54.
- 18) Kouvelas D, Goulas A, Papazisis G, Sardeli C, Pourzitaki C. PDE5 inhibitors: in vitro and in vivo pharmacological profile. *Curr Pharm Des* 2009;15(30):3464-75.
- 19) Farrow KN, Groh BS, Schumacker PT, Lakshminrusimha S, Czech L, Gugino SF, et al. Hyperoxia increases phosphodiesterase 5 expression and activity in ovine fetal pulmonary artery smooth muscle cells. *Circ Res* 2008;102(2):226-33.
- 20) Papapetropoulos A, Simoes DC, Xanthou G, Roussos C, Gratziou C. Soluble guanylyl cyclase expression is reduced in allergic asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;290(1):L179-84.