

9842 食塩による血管リモデリングの修飾機構

助成研究者：東 洋 (東京医科歯科大学 生体材料工学研究所)
 共同研究者：辻井 俊彦 (東京医科歯科大学 医学部 泌尿器科)
 磯谷 栄二 (東京医科歯科大学 医学部 脳神経外科)
 尾林 聡 (東京医科歯科大学 医学部 産婦人科)
 増田 均 (東京医科歯科大学 医学部 泌尿器科)
 坂本 秀一 (東京医科歯科大学 医学部 産婦人科)
 増田 宏 (東京医科歯科大学 生体材料工学研究所)

ウサギ総頸動脈内皮剥離後の血管リモデリング過程が、食塩負荷によってどのように修飾されるのか、また、その機序を明らかにすることを目的として、本研究を企図した。総頸動脈内皮剥離4週後に著明な内膜肥厚が観察された。内皮剥離術施行前8週間と剥離術施行後4週間の計12週間にわたる食塩負荷によって内膜肥厚は有意に抑制された。肥厚血管におけるcyclic GMPすなわち再生内皮細胞におけるNO産生は著明に低下していた。再生内皮細胞における(L-NMMA+ADMA)/L-arginine比は著しく上昇し、すなわち、内因性NOS阻害物質(L-NMMAおよびADMA)濃度の上昇とL-arginine濃度が減少するために、NO産生能は著しく低下していたが、いずれのパラメータも食塩負荷によってほぼ正常値にまで回復した。内因性NOS阻害物質濃度の上昇とL-arginine濃度の減少が、食塩負荷によって抑制されるために、NO産生能がほぼ正常値にまで回復し、内膜肥厚の抑制をもたらしたものと解釈し得る。食塩負荷によって血管壁におけるC-type natriuretic peptide 22 (CNP 22)含量が、恐らくは代償性に増加し、このことも食塩負荷による内膜肥厚抑制機序の一部を担うものと考えられた。CNP 22はcyclic GMP産生を亢進し、培養血管平滑筋細胞の増殖抑制や内皮剥離後に惹起される内膜肥厚抑制作用を発現すること、また、食塩負荷後にA-type natriuretic peptide (ANP)やB-type natriuretic peptide (BNP)含量が増加することも知られている。

9 8 4 2 食塩による血管リモデリングの修飾機構

助成研究者：東 洋 (東京医科歯科大学 生体材料工学研究所)
共同研究者：辻井 俊彦 (東京医科歯科大学 医学部 泌尿器科)
磯谷 栄二 (東京医科歯科大学 医学部 脳神経外科)
尾林 聡 (東京医科歯科大学 医学部 産婦人科)
増田 均 (東京医科歯科大学 医学部 泌尿器科)
坂本 秀一 (東京医科歯科大学 医学部 産婦人科)
増田 宏 (東京医科歯科大学 生体材料工学研究所)

1. 研究の目的

ウサギ頸動脈内皮細胞剥離後の血管リモデリング過程が、食塩負荷によってどのように修飾されるのか、また、その機序を明らかにすることを目的として、本研究を企図した。

2. 研究の方法

2.1. 実験動物

日本白色在来種の雄性ウサギを8週齢にて購入し、2週間普通食(RC-4, オリエンタル酵母)にて予備飼育した後実験に供した。1群9羽よりなるA, B 2群を設けた。12週間の実験期間中(内皮細胞剥離術または偽手術施行前8週間と施行後4週間)、A群には普通食(RC-4)を与えて対照群とし、B群には3%食塩負荷RC-4を与え高食塩食群(High Salt Diet: HSD)とした。なお、100g/頭/日の制限給餌とした。

2.2. 総頸動脈内皮細胞の剥離

既報の方法(1-13)に従って総頸動脈内皮細胞を剥離し、内膜肥厚モデルを作製した。すなわち、sodium pentobarbital (25 mg/kg, i.v.)麻酔下に、頸部を正中切開し、左総頸動脈を露出した。内外頸動脈分岐部近傍を小さく切開し、動脈塞栓除去用バルーンカテテル(12-40-3F, American Edwards Laboratories)を挿入した。内弾性板の損傷を避け、内皮細胞のみ剥離した。バルーンカテテル抜去後、10-0ナイロン糸を用いて切開部を縫合した。縫合部位の狭窄が可及的少なくなるよう十分な注意を払った。右総頸動脈には切開のみの偽手術を施行し、対照とした。

2.3. Cyclic GMP (cGMP)含量の測定

血管壁cGMP含量を、既報の方法(13-16)に準拠して定量し、その結果を左右総頸動脈ならびにA, B 2群で比較した。なお、 10^{-6} M norepinephrine (NE) および 10^{-6} M acetylcholine (ACh)共存下のcGMP産生から 10^{-6} M NE, 10^{-6} M AChおよび 10^{-4} M N^G -nitro-L-arginine共存下のそれとの差を正味のcGMP産生量とした。

2.4. 内皮細胞中L-arginine, L-NMMAおよびADMA濃度の測定

正常ならびに再生内皮細胞におけるL-arginine, L-NMMAおよびADMAを既報の方法(7, 10, 13, 16)に準拠して定量した。結果を内皮細胞中の濃度として表した。

2.5. DNAおよび蛋白の定量

DNAおよび蛋白は、それぞれKissane & Robins法(17) およびLowry法(18)により定量した。

2.6. 病理組織学的検討

A, B 2群のウサギから摘出した左右総頸動脈を10%中性フォルマリン溶液にて固定後、常法にしたがってパラフィン包埋した。薄切片をElastica van Gieson染色し、既報の方法(19, 20)に準拠して内膜および中膜の面積を計測し、肥厚の程度を内膜：中膜比(Intima:Media ratio)(%)で表した。

2.7. 血管壁CNP含量の測定

左右総頸動脈の一部をRIA アッセイプロトコル(Peninsula Laboratories Inc)に従って処理し、血管壁中C-type natriuretic peptide 22(CNP)含量を測定した。

3. 研究の結果

3.1. 内膜肥厚に及ぼす食塩負荷の影響

ウサギ総頸動脈内皮細胞剥離4週後に、著明な内膜肥厚が観察された。正常食での肥厚の程度に比較して、3%食塩を含む飼料によって、内皮細胞剥離前8週間ならびに剥離後4週間の計12週間にわたって飼育した高食塩食群ではこれが有意($p < 0.05$)に抑制されていた(Fig. 1)。抑制の程度は、内皮細胞剥離前6週間ならびに剥離後6週間の計12週間にわたって飼育した高食塩食群での場合とほぼ同等であった。

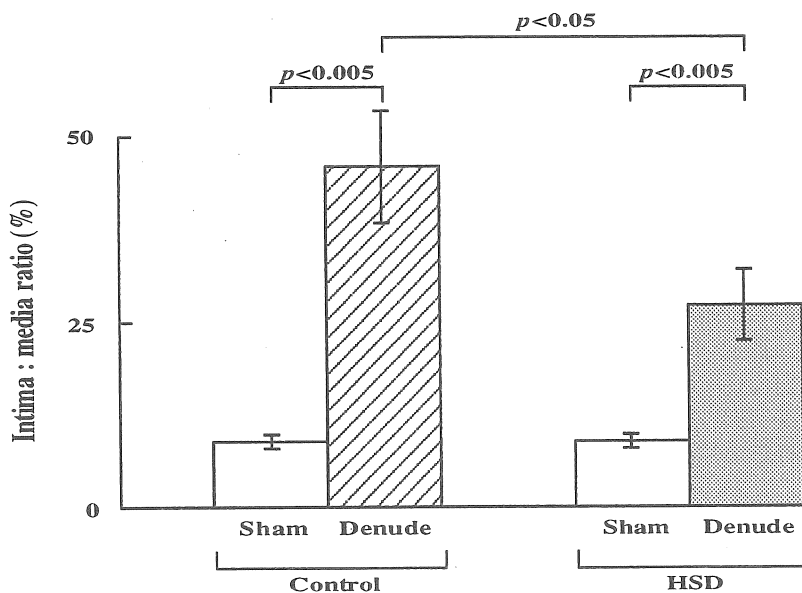


Fig. 1 Intimal hyperplasia after endothelial denudation and inhibition with high salt diet (HSD)

Results are expressed as mean \pm s.e.m. of 6 determinations from 6 different rabbits. Control rabbits were given regular chow (RC-4) throughout the experimental periods. HSD rabbits were given high salt diet (RC-4 containing 3% NaCl) for 8 weeks before and 4 weeks after endothelial denudation (Denude) or sham operation (Sham) of the carotid arteries.

3.2. Cyclic GMP産生に及ぼす食塩負荷の影響

Figure 2に示すように、 10^{-6} M norepinephrineと 10^{-6} M acetylcholine刺激によるcyclic GMPの正味産生量は肥厚血管において有意($p < 0.05$)に低下していた。食塩負荷群での肥厚血管におけるcyclic GMPの正味産生量も低下していたが、統計的に有意ではなかった。また、食塩負荷群でのcyclic GMPの正味産生量は、内皮細胞非剥離ならびに剥離側何れの血管標本においても正常食群での対応する値に比較して高値を示したが、統計的には有意でなかった。

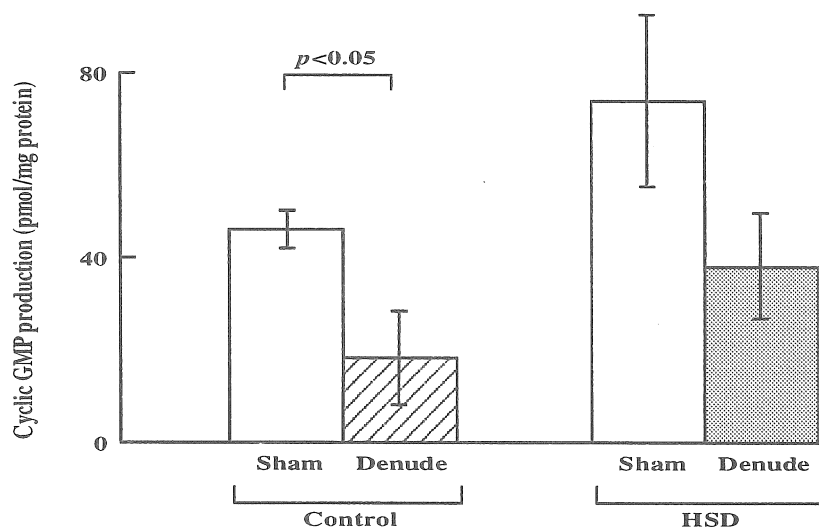


Fig. 2 Cyclic GMP production within the vessel wall from control and high salt diet (HSD) groups

Results are expressed as mean \pm s.e.m. of 4 to 5 determination from 4 to 5 different rabbits. Cyclic GMP net production was expressed as the difference between the production with 10^{-6} M norepinephrine (NE) plus 10^{-6} M acetylcholine (ACh) and that with 10^{-6} M NE plus 10^{-6} M ACh plus 10^{-4} M N^G -nitro-L-arginine as a NOS inhibitor. Contents of Sham, Denude, Control and HSD are as in Fig. 1.

3.3. 内皮細胞中L-NMMA, ADMAおよびL-Arginine濃度に及ぼす食塩負荷の影響

各群の血管より採取した内皮細胞におけるL-NMMA, ADMAおよびL-Arginine濃度を測定し、結果を(L-NMMA + ADMA)/L-Arginine比(%)として表した。正常食群肥厚血管での(L-NMMA + ADMA)/L-Arginine比は著明($p < 0.005$)に増加していた。すなわち、この群の肥厚血管より採取した内皮細胞中L-NMMA + ADMA濃度は著明に上昇し、一方、L-Arginine濃度は著明に低下していた。これに対して、食塩負荷群の肥厚血管内皮細胞中L-NMMA + ADMA濃度は軽度上昇するのみであったが、L-Arginine濃度の低下にともなって(L-NMMA + ADMA)/L-Arginine比は上昇していた。しかしながら、その程度は正常食群肥厚血管に比し、有意($p < 0.005$)に小さかった(Fig. 3)。

3.4. 血管壁中CNP含量に及ぼす食塩負荷の影響

正常食群の肥厚血管におけるCNP含量は増加傾向を示したが、統計的に有意ではなかった。高食塩食負荷によって肥厚血管でのCNP含量は有意($p < 0.05$)に増加し、また、偽手術血管のみならず肥厚血管でのCNP含量も

正常食群でのそれぞれ対応する値に対して有意($p < 0.05$, $p < 0.005$)に増加していた(Table 1)。

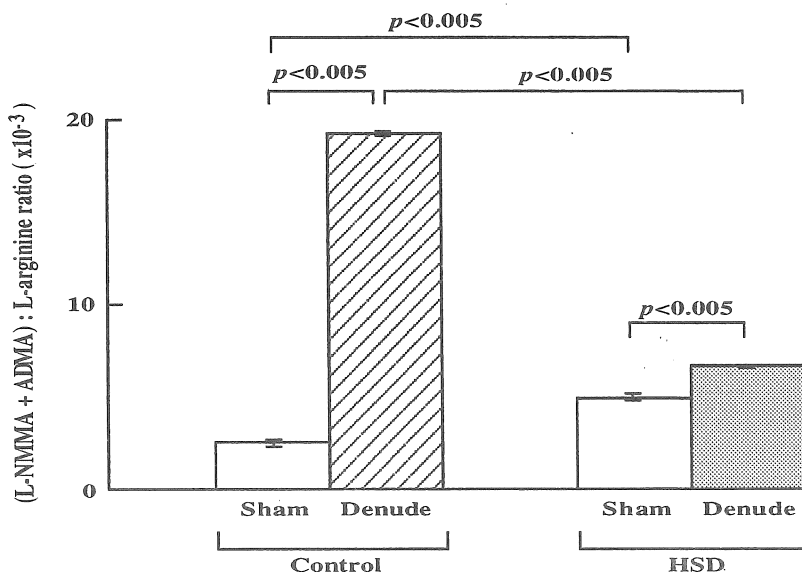


Fig. 3 Ratio of L-NMMA plus ADMA to L-arginine concentrations in endothelial cells collected from control and high salt diet (HSD) rabbit carotid arteries

Results are expressed as mean \pm s.e.m. of 3 determinations. L-Arginine concentrations in endothelial cells were determined as $(13.0 \pm 0.12) \times 10^{-4} M$ for sham operation of control, $(2.1 \pm 0.04) \times 10^{-4} M$ for the denudation of control, $(5.8 \pm 0.04) \times 10^{-4} M$ for sham operation of HSD and $(2.3 \pm 0.04) \times 10^{-4} M$ for the denudation of HSD. Contents of Sham, Denude, Control and HSD are as in Fig. 1.

Table 1 Changes in C-type natriuretic peptide 22 (CNP-22) within the vessel wall

Group	CNP-22 content (ng/g wet weight)
(1) Control diet (Sham operation)	72.0 ± 8.1 (n=3)
(2) Control diet (Denudation)	93.8 ± 6.8 (n=3)
(3) HSD (Sham operation)	117.6 ± 16.9 (n=3) ^b
(4) HSD (Denudation)	182.0 ± 9.6 (n=3) ^{a,c}

Results are expressed as mean \pm s.e.m. ^a: Significant difference vs. corresponding value in the sham operation group at $p < 0.05$. ^b and ^c: Significant difference vs. corresponding value in the control diet group at $p < 0.05$ and $p < 0.005$, respectively.

4. 考察

今回の検討の結果、内皮細胞剥離後に惹起される内膜肥厚が3%食塩負荷によって明らかに抑制されることが判明した。内皮細胞剥離前6週間と剥離後6週間の計12週間にわたって3%食塩負荷した前報(21)での結果と良く一致した。なお、今回の食塩負荷条件は、内皮細胞剥離術施行前8週間と剥離術施行後4週間の計12週間とした。

内皮細胞でのNO産生能と内膜肥厚の程度との間には高い負の相関関係が認められ(3, 13)、また、NOは血管平滑筋細胞増殖抑制因子としても良く知られている(22)。さらに、NOは血小板凝集抑制作用を有し(23)、その結果、血小板由来増殖因子(PGDF)の放出を抑制する。内皮細胞剥離後の再生内皮細胞におけるNO産生能は著明に低下していることについても既に明らかにされており(1-3, 6, 7, 10, 13, 19-21)、今回この点をcyclic GMP産生能の低下として捉えた(24, 25)。Norepinephrine (NE)による収縮下の頸動脈条片にacetylcholine (ACh)を添加すると内皮依存性の弛緩反応が惹起される。その際のcyclic GMP産生量を測定し、各群で比較した。その結果、肥厚血管でのcyclic GMP産生能は有意に低下しており、3%食塩負荷によってこの低下が減弱した。すなわち、再生内皮細胞におけるNO産生能の低下が3%食塩負荷によって抑制されることが示唆された。

NO合成酵素(NOS)の内因性阻害物質であるL-NMMAおよびADMAの増加とNOS基質としてのL-arginineが減少するためにNO産生能の低下を招き、その結果、内膜肥厚が惹起される可能性について既に報告した(7, 10, 13)。今回得られた結果もこれを裏付けるものであった。また、再生内皮細胞でのL-NMMAおよびADMAの増加とL-arginineの減少は3%食塩負荷によって明らか抑制されており、その結果としてNO産生能低下の抑制を来したのであろう。しかしながら、食塩負荷が如何なる機序によって再生内皮細胞でのL-NMMAおよびADMAの増加とL-arginineの減少をもたらすかについては今後の検討を要する。

食塩負荷によって血漿中A-type natriuretic peptide (ANP)ならびにB-type natriuretic peptide (BNP)の増加をもたらすことが知られている(26-27)。ANPならびにBNP以外のナトリウム利尿ペプチドとしてCNPが、血管を含む種々の末梢組織に分布する(28-30)。CNPは膜結合型guanylate cyclaseを活性化して、cyclic GMP産生を亢進し(31)、内皮細胞剥離後に惹起される内膜肥厚抑制作用を発現する(32, 33)。そこで今回、食塩負荷による血管壁CNP含量の変化の有無について検討した。正常食群の肥厚血管においてCNP含量が軽度増加していたが、統計的には有意ではなかった。しかしながら、3%食塩負荷群では正常血管のみならず肥厚血管でのCNP含量は有意に増加していた。食塩負荷によって肥厚血管でのcyclic GMP産生能低下の抑制をもたらす、ひいては内膜肥厚の程度を減弱する可能性が考えられた。詳細については今後の検討を要する。

5. 今後の課題

予備実験の結果、ウサギ総頸動脈内皮細胞剥離48時間以降、癌抑制遺伝子でアポトシス活性化因子のp53蛋白陽性細胞がわずかに検出され、以後時間経過とともに増加した。2週後にピークを示した後、4週後にはほぼ消失した。アポトシス陽性細胞数もこれとほぼ同様の時間経過で推移することを確認している。食塩負荷がこの過程をどのように修飾するか興味深い。

6. 引用文献

1. Azuma H, Funayama N, Kubota T & Ishikawa M. Regeneration of endothelial cells after balloon denudation of the rabbit carotid artery and changes in responsiveness. *Jpn J Pharmacol* 1990; 52: 541-552.
2. Azuma H, Niimi Y & Hamasaki H. Prevention of intimal thickening after endothelial removal by a nonpeptide angiotensin II receptor antagonist, losartan. *Br J Pharmacol* 1992; 106: 665-671.
3. Niimi Y, Azuma H & Hirakawa K. Repeated endothelial removal augments intimal thickening and attenuates EDRF release. *Am J Physiol* 1994; 266: H1348-H1356.
4. Azuma H, Hamasaki H, Niimi Y, Terada T & Matsubara O. Role of endothelin-1 in the neointima formation after endothelial removal in rabbit carotid arteries. *Am J Physiol* 1994; 267: H2259-H2267.
5. Azuma H, Hamasaki H, Sato J, Isotani E, Obayashi S & Matsubara O. Different localization of ET_A and ET_B receptors in the hyperplastic vascular wall. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 25: 802-809.
6. Azuma H, Niimi Y, Terada T & Hamasaki H. Accelerated endothelial regeneration and intimal hyperplasia following a repeat denudation of rabbit carotid arteries. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1995; 22: 748-754.
7. Azuma H, Sato J, Hamasaki H, Sugimoto A, Isotani E & Obayashi S. Accumulation of endogenous inhibitors for nitric oxide synthesis and decreased content of L-arginine in the regenerated endothelial cells. *Br J Pharmacol* 1995; 115: 1001-1004.
8. Aoyagi M, Yamamoto M, Wakimoto H, Azuma H, Hirakawa K & Yamamoto K. Immunohistochemical detection of Ki-67 in replicative smooth muscle cells of rabbit carotid arteries after balloon denudation. *Stroke* 1995; 26: 2328-2332.
9. Aoyagi M, Yamamoto M, Azuma H, Niimi Y, Tajima S, Hirakawa K & Yamamoto K. Smooth muscle cell proliferation, elastin formation and tropoelastin transcripts during the development of intimal thickening in rabbit carotid arteries after endothelial denudation. *Histochem Cell Biol* 1997; 107: 11-17.
10. Hamasaki H, Sato J, Isotani E, Obayashi S, Udagawa T & Azuma H. Effect of nicotine on the intimal hyperplasia after endothelial removal of the rabbit carotid artery. *Gen Pharmacol* 1997; 28: 653-65.
11. Aoyagi M, Yamamoto M, Azuma H, Nagashima G, Niimi Y, Hirakawa K & Yamamoto K. Expression of p53 protein and p53 gene transcripts in rabbit carotid arteries after balloon denudation. *Histochem Cell Biol* 1997; 107: 365-

370.

12. Aoyagi M, Yamamoto M, Azuma H, Nagashima G, Niimi Y, Tamaki M, Hirakawa K & Yamamoto K. Immunolocalization of matrix metalloproteinases in rabbit carotid arteries after balloon denudation. *Histochem Cell Biol* 1998; 109: 97-102.

13. Masuda H, Goto M, Tamaoki S & Azuma H. Accelerated intimal hyperplasia and increased endogenous inhibitors for NO synthesis in rabbits with alloxan-induced hyperglycemia. *Br J Pharmacol* 1999; 126: 211-218.

14. Masuda H, Tamaoki S, Goto M, Kamikawatoko S, Tokoro T & Azuma H. Nitric-oxide induced ciliary muscle relaxation during contraction with endothelin-1 is mediated through elevation of cyclic GMP. *Curr Eye Res* 1997; 16: 1245-1251.

15. Kamikawatoko S, Tokoro T, Ishida A, Masuda H, Hamasaki H, Sato J & Azuma H. Nitric oxide relaxes bovine ciliary muscle contracted by carbachol through elevation of cyclic GMP. *Exp Eye Res* 1998; 66: 1-7.

16. Sato J, Masuda H, Tamaoki S, Hamasaki H, Ishizaka K, Matsubara O & Azuma H. Endogenous asymmetrical dimethylarginine and hypertension associated with puromycin nephrosis in the rat. *Br J Pharmacol* 1998; 125: 469-476.

17. Kissane JM & Robins E. The fluorometric measurement of deoxyribonucleic acid in animal tissue with special reference to the central nervous system. *J Biol Chem* 1958; 233: 184-188.

18. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL & Randall RT. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.

19. Azuma H, Obayashi S, Hamasaki H, Koyama T & Aso T. Role of endothelium in the human uterine arteries during normal menstrual cycle. *Br J Pharmacol* 1995; 114: 902-908.

20. Obayashi S, Aso T, Sato J, Hamasaki H & Azuma H. Intimal hyperplasia in human uterine arteries accompanied by impaired synergism between prostaglandin I₂ and nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1996; 119: 1072-1078.

21. 東 洋、濱崎秀久、佐藤 潤、平川公義、磯谷栄二、麻生武志、尾林聡. 食塩による肥厚性血管病変の修飾機構. ソルト・サイエンス研究財団平成7年度助成研究報告集 II生理・食品・栄養編. 1997; PP181-PP190.

22. Garg UC & Hassid A. Nitric oxide generating vasodilators and 8-bromocyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989; 83: 1774-1777.

23. Azuma H, Ishikawa M & Sekizaki S. Endothelium-dependent inhibition of platelet aggregation. *Br J Pharmacol* 1986; 88: 411-415.
24. Rapoport RM & Murad F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cyclic GMP. *Circ Res* 1983; 52: 352-357.
25. Ignarro RJ. Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. *Circ Res* 1989; 65: 1-21.
26. Sumimoto T, Murakami E & Hiwada K. Plasma atrial natriuretic factor in isolated systolic hypertension in the elderly: response to hypertonic saline infusion. *J Human Hypertension* 1991; 5: 411-415.
27. Lang CC, Coutie WJ, Khong TK, Choi AMJ & Sturthers AD. Dietary sodium loading increases plasma brain natriuretic peptide level in man. *J Hypertension* 1991; 9: 779-782.
28. Suga S, Nakao K, Ito H, Komatsu Y, Ogawa Y, Hama N & Imura H. Endothelial production of C-type natriuretic peptide and its marked augmentation by transforming growth factor- β . *J Clin Invest* 1992; 90: 1145-1149.
29. Heublein DM, Clavell AL, Stingo AJ, Lerman A, Wold L & Burnett JC. C-type natriuretic peptide immunoreactivity in human breast vascular endothelial cells. *Peptides* 1992; 13: 1017-1019.
30. Stingo AJ, Clavell AL, Heublein DM, Wei C-M, Pittelkow MR & Burnett JC. Presence of C-type natriuretic peptide in cultured human endothelial cells and plasma. *Am J Physiol* 1992; 263: H1318-H1321.
31. Chinkers M & Garbers DI. Signal transduction by guanylyl cyclases. *Ann. Rev Biochem* 1991; 60: 553-575.
32. Shinomiya M, Tashiro J, Saito Y, Yoshida S, Furuya M, Oka N, Tanaka S, Kangawa K & Matsuo H. C-type natriuretic peptide inhibits intimal thickening of rabbit carotid artery after balloon catheter injury. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 205: 1051-1056.
33. Brown J, Chen Q & Hong G. An autocrine system for C-type natriuretic peptide within rat carotid neointima during arterial repair. *Am J Physiol* 1997; 272: H2919-H2931.

MODULATION WITH HIGH SALT DIET OF THE VASCULAR REMODELLING AFTER ENDOTHELIAL DENUDATION OF RABBIT CAROTID ARTERY

Hiroshi AZUMA, *Toshihiko TSUJII, **Eiji ISOTANI, ***Satoshi
OBAYASHI, *Hitoshi MASUDA, ***Shuichi SAKAMOTO & Hiroshi
MASUDA

Institute of Biomaterials & Bioengineering, and Departments of
*Urology, **Neurosurgery and ***Obstetrics & Gynecology, School of
Medicine, Tokyo Medical & Dental University, 2-3-10 Surugadai, Kanda,
Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan.

Summary

Present experiments were designed to investigate the effects of chronic high salt diet on the vascular remodelling after endothelial denudation of the rabbit carotid artery. Marked intimal hyperplasia which had been histologically assessed (intima: media ratio, %) was observed 4 weeks after the endothelial denudation with balloon embolectomy catheter. The intimal hyperplasia was significantly attenuated when rabbits were given high salt diet (RC-4 containing 3% NaCl) for 8 weeks before and 4 weeks after the endothelial denudation. Net production of cyclic GMP stimulated by 10^{-6} M norepinephrine and 10^{-6} M acetylcholine was significantly decreased in the hyperplastic vessel wall, indicating the decreased NO production in the regenerated endothelial cells, which was recovered with high salt diet. Concentrations of N^G -monomethyl-L-arginine (L-NMMA) and asymmetric N^G, N^G -dimethyl-L-arginine (ADMA) in the regenerated endothelial cells as endogenous NOS inhibitors were significantly increased, while L-arginine concentration as a substrate for NO synthesis significantly decreased, leading to a significant increase in (L-NMMA + ADMA)/L-arginine ratio in the hyperplastic vessel wall. The increment of the ratio was significantly reduced after loading the high salt diet. These results suggest that accumulation of endogenous NOS inhibitors and decrease in L-arginine content are associated with the decreased NO production in endothelial cells and with neointimal formation. Loading high salt diet may inhibit these processes and, in turn, brings about an inhibition of the intimal hyperplasia. C-type natriuretic peptide 22 (CNP 22) are detectable in various peripheral tissues including blood vessel and plays an important role as a natriuretic factor and an inhibitory factor for intimal hyperplasia through increasing cyclic GMP production. The increase in CNP 22 content within the hyperplastic vessel wall was significantly augmented by loading high salt diet, suggesting compensatory natriuresis by increasing CNP 22 after loading high salt diet results in an inhibition of intimal hyperplasia.