

개오동나무 추출물의 내피세포 부착분자 발현 억제 효과

최병민^{1,#}, 정명수², 송호준^{3*}

1: 원광대학교 의과대학 생화학교실, 2: 원광대학교 한의과대학 예방의학교실,
3: 원광대학교 한의과대학 본초학교실

Inhibitory effect of the extract of *Catalpa ovata* G. Don. on endothelial adhesion molecule expression

Byung-Min Choi¹, Myong-Soo Chong², Ho-Joon Song^{3*}

1: Dept. of Biochemistry, School of Medicine, Wonkwang University, Iksan, Korea
2: Dept. of Preventive, School of Medicine, Wonkwang University, Iksan, Korea
3: Dept. of Herbology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan, Korea

ABSTRACT

Objectives : *Catalpa ovata* G. Don (Bignoniaceae) has been shown to possess a variety of pharmacological activities. However, the effect of *Catalpa ovata* G. Don on endothelial adhesion molecule expression has not been reported.

Methods : To examine the effect of *Catalpa ovata* G. Don on the expression of adhesion molecules in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) stimulated with tumor necrosis factor- α (TNF- α), we used various methods such as Western blot analysis, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), and luciferase activity assay.

Results : 1. The extract of *Catalpa ovata* G. Don inhibited the expression of intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in HUVECs stimulated with TNF- α .

2. The extract of *Catalpa ovata* G. Don reduced TNF- α -induced adhesion of leukocytes to HUVECs.

3. In addition, The extract of *Catalpa ovata* G. Don inhibited the promoter activities of ICAM-1 and VCAM-1.

Conclusions : These results that *Catalpa ovata* G. Don may be beneficial in the treatment of inflammatory such as atherosclerosis.

Key words : *Catalpa ovata* G. Don, intracellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, human umbilical vein endothelial cells.

* 교신저자 : 송호준, 원광대학교, 한의과대학 본초학교실
· Tel : 063-850-6844, · E-mail : songhj@wku.ac.kr

제1저자 : 최병민, 원광대학교, 의과대학 생화학교실
· Tel : 063-850-6924 · E-mail : bmchoi@wku.ac.kr

· 접수 : 2007년 11월 5일 · 수정 : 2007년 12월 12일 · 채택 : 2007년 12월 21일

서론

개오동나무(*Catalpa ovata* G. Don.)¹⁻³⁾는 능소화과(紫葳科; Bignoniaceae)에 속한 낙엽교목으로서 높이가 6~15m자라며¹⁻⁴⁾, 한약재의 이름으로는 本草學文獻의 최고 원전인 《神農本草經》⁵⁾에 “梓白皮”라고 기록된 것이 효시이다. 이후에 “梓白皮”³⁾ 또는 “梓根白皮”⁶⁾와 “梓木”³⁾ 및 “梓葉”³⁾와 “梓實”⁷⁾ 등으로 응용되고 있는 것으로 알려졌다. 그 동안 밝혀진 성분으로는 樹皮에 p-hydroxybenzoic acid³⁾, 根皮에 isoferulic acid³⁾, sitosterol³⁾, p-hydroxybenzoic acid³⁾, 木質에 catalpalactone³⁾과 여러 종류의 naphthoquinone derivatives를 함유하고 naphthoquinone derivatives 속에서 α-lapachone를 확인하였으며 葉에는 p-coumaric acid³⁾와 p-hydroxybenzoic acid³⁾, 果實에는 catalposide³⁾, des-p-hydroxybenzoil-catalposide³⁾, p-hydroxybenzoic acid³⁾, citric acid³⁾, 種子에는 p-hydroxybenzoic acid³⁾, β-sitosterol 등을 함유하는 것으로 밝혀졌다.

藥理作用으로는 葉의 경우에 있어서 冷浸液, 溫浸液은 黃色葡萄球菌, 大腸菌, aerogenes에 대한 억제 작용이 있으며^{3,8)}, 果實의 경우 水溶性 抽出物 및 果皮, 種子의 抽出物은 Rat에서 利尿作用을 갖는 동시에 電解質의 배출을 증가시키고 아울러 果實에서 利尿作用을 갖는 配糖體가 추출되고 있으며 Rat의 利尿實驗에서는 des-p-hydroxybenzoil-catalposide의 작용은 catalposide보다도 강하며 前者는 주로 natrium利尿를 나타내고 後者는 chlorine ion利尿를 나타내고 있다^{3,8)}.

염증은 죽상경화증의 발달⁹⁾에 중요한 역할을 수행하고 있는 것으로 알려졌다. 이러한 염증은 죽상경화증 부위에 부착분자의 발현을 촉진하는데, 세포간 부착분자-1 (intracellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 과 혈관세포 부착분자-1 (vascular cell adhesion molecule, VCAM-1)과 같은 부착분자는 다양한 염증성 자극에 의해서 내피세포에서 발현된다^{10,11)}. Tumor necrosis factor-α (TNF-α)는 염증반응을 매개하는 중요한 염증성 사이토카인의 하나로 혈관내피세포에 작용하여 부착분자의 발현과 백혈구(leukocyte)의 부착을 증가시키고 있음이 밝혀졌다¹²⁾.

개오동나무는 한의학 임상에서 염증성 질환에 응용되어 왔고 개오동나무에서 추출한 catalposide가 염증성 사이토카인의 발현을 억제한다는 보고가 있으나 아직까지 혈관내피세포에서 염증시 발현되는

부착분자의 발현에 관한 연구는 보고되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 혈관내피세포의 염증반응에 있어서 개오동나무의 억제효과에 대하여 조사하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에서 사용한 개오동나무는 전라북도 익산시 주변의 정원에 재식한 것을 채취하여 음건한 뒤에 썰어서 사용하였다. 정선된 개오동나무는 물 1L에 200g을 넣고 2시간 동안 전탕한 액을 동결 건조하여 3차 증류수에 녹여서 필터한 후에 사용하였다.

2) 시약

RPMI-1640, Fetal bovine serum (FBS), penicilin-streptomycin 등은 Gibco BRL (Grand Island, USA)사에서 구입하였다. EBM-2 배양액은 Cambrex Corp (Walkersville, MD)사에서, TRIZol reagent kit 와 LipofectAMINE reagent는 Invitrogen Corp (Grand Island, USA)사에서 구입하였다. Luciferase assay system은 Promega Corp (Madison, WI)에서 구입하였고, 실험에 사용된 항체인 ICAM-1 과 VCAM-1은 SantaCruz Biotechnology (SantaCruz, USA)사에서 구입하였다.

2. 방법

1) 세포배양

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)은 human umbilical cord vein에서 이전의 방법으로 분리하였다¹³⁾. HUVECs은 EGM-2 성장인자가 함유된 EBM-2 배양액을 넣고 37°C 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. U937 세포는 RPMI-1640 배양액에 10% FBS와 1% penicilin/streptomycin을 넣고 배양하였다.

2) 세포생존능력 측정

세포생존능력은 MTT (Sigma, USA) 분석방법을 이용하여 ELISA 분석기로 흡광도 570 nm에서 측정하였다. 50 μL의 MTT 반응용액 (0.05g MTT/50mL PBS)을 각 실험군에 처리한 다음 4 시간 동안 배양하고, 반응하지 않은 MTT 용액을 버리고 생존세포

에 의한 MTT 반응결과로 생성된 formazan을 DMSO로 용해하여 세포생존율을 간접적으로 계산하였다.

3) mRNA 추출 및 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 분석

mRNA는 세포를 PBS로 세척한 후에 TRIzol(TM) (Molecular Research Center) 시약과 제조사가 제공하는 protocol에 따라 분리하였다.

RT-PCR 분석은 1 mM dNTPs, 1.75 U/ μ RNase 억제효소, 2.5 U/ μ 의 M-MLV 역전사 효소 (Promega社), 25 U/ μ 의 올리고(dT) 프라이머, 추출된 25 ng RNA, 5 mM MgCl₂ 및 PCR 완충액 (5 mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 8.3)을 함유하고, 전체 20 μ L을 갖는 역전사 반응 혼합액을 제조하였다. 이후, 제조된 역전사 반응 혼합액은 상온에서 10분 동안 배양한 후 thermal cycler를 이용하여 역전사 반응을 수행하였다. PCR 반응용액은 2.5 U의 AmpliTagTM DNA 폴리머라아제 (Promega社), 센스 프라이머와 안티센스 프라이머 2 μ g/ μ L, 역전사 반응용액 4 μ L, 2 mM MgCl₂ 및 PCR 완충액, 최종 30 μ L로 하였다. PCR 반응은 GeneAmp PCR 시스템(Perkin Elmer)을 이용하여 수행하며, PCR 반응조건은 사이클 수행 전에 94°C에서 5분간 전처리하고 94°C에서 45초, 55°C에서 45초 및 72°C에서 45초의 사이클로하며 VCAM-1과 ICAM-1에 대해서는 25 사이클로, β -actin에 대해서는 20 사이클로 하였다. RT-PCR 반응산물은 1.5% 아가로스 겔에서 전기영동 후에 에티디움 브로마이드(Sigma社)로 염색하고, UV를 이용하여 핵산증폭을 확인하였다. RT-PCR 분석에 사용된 프라이머는 하기와 같고 모두 바이오니아사 (대한민국)에서 합성을 의뢰하여 구입하였다.

VCAM-1 (sense)

: 5'-GATCAACCGTCTTGGTCAGCCC-3'

VCAM-1 (antisense)

: 5'-CGCATCCTTCAACTGGCCTT-3'

ICAM-1 (sense)

: 5'-CAGTGACCATCTACAGCTTTCCGG-3'

ICAM-1 (antisense)

: 5'-GCTGCTACCACAGTGATGATGACAA-3'

β -actin (sense)

: 5'-CCTCTATGCCAACACAGT-3'

β -actin (antisense)

: 5'-AGCCACTCCACACAG-3'

4) Western blot 분석

Western blot 분석을 다음과 같이 수행하였다. 세포를 protease inhibitor 혼합물 (0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 μ g/ml aprotinin, 5 μ g/ml pepstatin A 및 1 μ g/ml chymostatin)이 포함된 20 mM Tris HCl buffer (pH 7.4)로 용혈시켰다. Lowry protein assay kit (P5626, Sigma)를 이용하여 단백질을 정량하였다. 동량의 단백질 시료를 12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 이용하여 분리하고 Hybond enhanced chemiluminescence (ECL) nitrocellulose membrane (Amersham)으로 전이하였다. Membrane을 5% skim milk로 blocking 하고 primary antibody (Santa Cruz Biotechnology) 및 horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody를 결합시킨 다음 표식하여 목적하는 단백질의 발현 여부를 판정하였다.

5) Reporter 유전자 분석

ICAM-1과 VCAM-1의 luciferase plasmid는 이전의 방법으로 만들었다(14). HUVECs에 plasmid 1 μ g과 pCMV- β -gal plasmid 1 μ g을 LipofectAMINE으로 transfection 시켰다. 12시간 후 5% FBS가 함유된 M199 배양액으로 5시간 동안 배양하고 개오동나무 추출물을 30분 전처리한 후 TNF- α (10 ng/ml)을 8시간 동안 처리하였다. 세포를 PBS로 세척한 후 용해하였고, 단백질을 Lowry protein assay kit로 정량한 하였다. Luciferase 활성은 Luciferase assay system으로 분석하였다.

3. 통계처리

실험결과에 대한 통계처리는 student's t-test에 준하였고 p-value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 개오동나무 추출물이 혈관내피세포에서 TNF- α 에 의해 유도되는 U937 세포의 부착에 미치는 영향

죽상경화증 뿐만 아니라 혈관내피세포의 염증반

응에 있어서 혈관내피세포에 백혈구가 부착되는 것은 잘 알려져 있다. 그러므로 개오동나무 추출물이 TNF- α 에 의해 촉진되는 백혈구의 부착에 미치는 영향을 알아보았다. 혈관내피세포에 개오동나무 추출물을 30분 전처리하고 TNF- α (10 ng/ml) 와 U937 세포를 동시에 6시간 동안 처리하였다. 그 결과 TNF- α 를 처리한 혈관내피세포에는 대조군에 비해 약 2.5배정도 U937 세포의 부착이 증가한 반면, 개오동나무 추출물을 처리한 혈관내피세포에서는 U937 세포의 부착이 현저히 감소하였음을 확인할 수 있었다 (Figure 1).

개오동나무 추출물의 세포독성을 알아보기 위하여 혈관내피세포에 개오동나무 추출물을 처리한 결과 본 실험에서 사용한 농도 (50 - 200 mg/ml)에서는 세포독성을 나타내지 않았다 (data not shown).

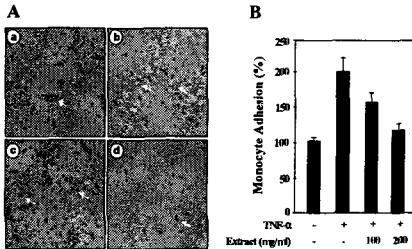


Figure 1. The extract of *Catalpa ovata* G. Don reduces TNF- α -induced adhesion of leukocytes to HUVECs. (A) HUVECs were stimulated with TNF- α (10 ng/ml) for 6 h after pretreatment with the extract for 30 min. Adhesion to U937 human monocytes was then measured as described in Methods. a: control; b: TNF- α alone; c: TNF- α + extract 100 mg/ml; d: TNF- α + extract 200 mg/ml. (B) Data indicate mean \pm SD of triplicate cultures from three independent experiments. * p <0.05 compared with control value.

2. 개오동나무 추출물이 TNF- α 에 의해 유도되는 ICAM-1 과 VCAM-1의 발현에 미치는 영향

개오동나무 추출물이 혈관내피세포에서 TNF- α 에 의해 유도되는 U937 세포의 부착을 감소시키는 것이 부착분자인 ICAM-1 과 VCAM-1의 발현과의 연관성이 있는지 관찰하였다. 혈관내피세포에 개오동나무 추출물 (200 mg/ml)을 30분간 전처리하고 TNF- α (10 ng/ml) 처리한 후 2, 4, 8 시간에 ICAM-1 과 VCAM-1의 발현을 Western blot

analysis으로 관찰하였다. 그 결과 개오동나무 추출물을 처리한 4, 8시간 후에는 TNF- α 에 의해 유도되는 ICAM-1 과 VCAM-1의 발현이 현저히 억제되었음을 알 수 있었다 (Figure 2A). 이러한 개오동나무 추출물의 억제효과는 농도 의존적 실험에서도 같은 결과를 보이고 있음을 확인할 수 있었다 (Figure 2B).

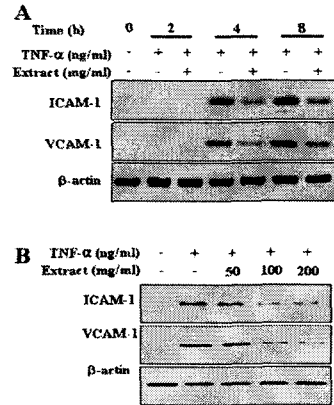


Figure 2. The extract of *Catalpa ovata* G. Don suppresses TNF- α -induced expression of ICAM-1 and VCAM-1 in HUVECs. HUVECs were treated with or without 10 μ g/ml TNF- α with the indicated concentrations of extract for 8 h and the indicated time periods. (A and B) Total protein level of ICAM-1 and VCAM-1 were determined by Western blot analysis.

3. 개오동나무 추출물이 TNF- α 에 의해 유도되는 ICAM-1 과 VCAM-1의 mRNA 발현과 그들의 promoter 활성에 미치는 영향

개오동나무 추출물이 혈관내피세포에서 ICAM-1 과 VCAM-1의 단백질 발현을 억제하는 것이 이들 유전자의 전사를 조절하여 야기되는지 알아보기 위하여 RT-PCR를 수행하였다. 그 결과 혈관내피세포에서 TNF- α (10 ng/ml)에 의한 증가된 ICAM-1 과 VCAM-1의 mRNA가 개오동나무 추출물에서 현저히 농도 의존적으로 감소하고 있음을 확인하였다 (Figure 3A). 이러한 두 ICAM-1 과 VCAM-1 mRNA 억제는 공히 개오동나무 추출물 50 mg/ml에서 감소하기 시작하여 200 mg/ml의 농도에서는 완전히 대조군과 같은 수준으로 억제되었다. 이런 개오동나무 추출물의 억제효과를 좀 더 확인하기 위하여 두 ICAM-1 과 VCAM-1의 promoter를 이용하여 전사 활성도를 측정하였다. Figure 3B에서 보는

바와같이 혈관내피세포에 ICAM-1 과 VCAM-1의 promoter construct를 일시적으로 transfection 시킨 후에 개오동나무 추출물 (200 mg/ml)을 전처리하고 TNF- α (10 ng/ml)를 처리하였다. 그 결과 TNF- α 를 처리한 혈관내피세포에서는 ICAM-1 과 VCAM-1의 promoter 활성이 증가한 반면, 개오동 추출물을 처리한 혈관내피세포에서는 TNF- α 에 의한 ICAM-1 과 VCAM-1의 promoter 활성이 유의하게 억제되었음을 확인할 수 있었다.

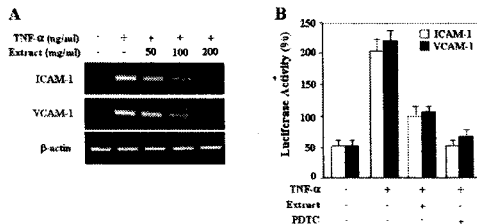


Figure 3. The extract of *Catalpa ovata* G. Don inhibits TNF- α -induced transcription of ICAM-1 and VCAM-1 and their promoter activities. (A) HUVECs were treated with TNF- α for 3 h in the presence or absence of extract, and ICAM-1 and VCAM-1 mRNA levels were determined by RT-PCR. (B) HUVECs were transiently transfected with luciferase plasmids containing the truncated ICAM-1 and VCAM-1 promoter regions. Cells were treated with TNF- α for 8 h in the presence or absence of extract (200 mg/ml) or PDTC (100 μ M). Luciferase activity was assayed in the cell lysates.

고찰

중양을 비롯한 대부분의 질환이 염증성 질환이라고 하여도 과언이 아니다. 문헌에 알려진 바에 의하면, 치료효과를 가지는 많은 약용식물은 iridoid 구성물로 이루어져 있다¹⁵⁾. 실제로, 특정 iridoid 생성 식물은 항염제로 사용되기도 하였다¹⁵⁾. 개오동나무도 iridoid 생성식물¹⁶⁾ 중 하나이며, 오랫동안 한의약에서 항염제로 사용되어 왔다. 최근 몇 년 동안 여러 가지 약리학적 및 생물학적 활성의 상승에 대한 개오동나무 추출물 및 구성성분의 효능에 활발한 연구가 진행되어 왔다^{17,18)}. 개오동나무 성분중 catalposid e가 산화성 DNA 손상을 억제하는 효과를 가지고 있으며, hydroxyl radical과 superoxide와 같은 산소 radical을 제거하는 활성을 가지고 있음이 알려졌다²⁰⁾. 따라서 본 연구에서는 약용식물인 개오동나무의

추출물이 혈관질환에서 항염 효과 및 그 작용기전을 규명하고자 TNF- α 로 자극된 혈관내피세포에서 백혈구 세포의 부착과 부착분자인 ICAM-1 과 VCAM-1의 발현에 미치는 효과에 대하여 조사하였다. 그 결과 개오동나무 추출물이 U937 세포가 혈관내피세포에 부착하는 것을 효과적으로 감소시켰으며, 부착분자인 ICAM-1 과 VCAM-1의 발현을 억제하여 일어나고 있음을 확인하였다 (Figure 1 and 2). 이전의 보고에 의하면, ICAM-1 과 VCAM-1과 같은 부착분자들은 혈관벽에 염증세포가 부착하는데 중요한 역할을 수행하고 있으며, ICAM-1 과 VCAM-1의 발현 억제는 백혈구 세포가 혈관내피세포에 부착하는 것을 감소를 야기한다고 밝혀졌다^{14,19)}. 이러한 결과는 개오동나무 추출물이 U937 세포가 혈관내피세포에 부착하는 것을 감소시키는 현상은 부착분자인 ICAM-1 과 VCAM-1의 발현을 통하여 이루어지고 있음을 암시하고 있다.

비록 백혈구가 혈관내피세포에 부착하는 것이 매우 복잡한 과정이지만, 많은 연구자들이 ICAM-1 과 VCAM-1이 혈관내피세포의 염증반응에 있어서 매우 중요한 부착분자임을 밝혔다^{14,19,20)}. 또한 ICAM-1 과 VCAM-1의 발현 증가가 죽상경화증과 같은 혈관의 염증성 질환에 직접적으로 관여하고 있음이 보고되었다²¹⁾. 다른 보고는 활성화된 혈관내피세포에 염증성 세포들이 부착하는 것이 죽상 형성 초기에 중요하다는 것을 입증하고 있다²²⁾. 이러한 증거는 ICAM-1 과 VCAM-1의 발현 억제를 통한 백혈구의 혈관내피세포 부착 억제는 죽상경화증의 병리적인 과정을 차단할 수 있음을 보여주고 있다. 그러므로 개오동나무 추출물이 ICAM-1 과 VCAM-1의 발현 억제를 통해 U937 세포가 혈관내피세포에 부착하는 것을 감소시킨다는 결과는 개오동나무 추출물이 혈관 염증반응을 조절함으로써 죽상경화증의 발생을 차단할 수 있음을 시사하고 있다. 한편, 이러한 항염증 역할에 있어서 개오동나무 추출물이 blood brain barrier를 통과하는지 또한 뇌에서 조직에 농축되는지는 아직 분명하게 밝혀지지 않았다. 그리고 동물 실험에서 이 추출물이 신경퇴행성 질환에 양성적인 효과를 갖는지는 아직 수행해야 할 과제로 남아있다. 그렇지만 죽상경화증, 암 같은 다양한 질병들이 염증과 연관되어 있기 때문에 항염적 치료 방법의 개발이 매우 중요하다. 따라서 이러한 항염 활성에 근거하여 개오동나무 추출물은 염증과 관련되어 있는 다양한 질환에 임상적으로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

결론

개오동나무 추출물을 혈관내피세포에 처리한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 개오동나무 추출물은 혈관내피세포에서 TNF- α 에 의해 촉진되는 U937 세포의 부착을 억제하였다.
2. 개오동나무 추출물은 혈관내피세포에서 TNF- α 에 의해 유도되는 ICAM-1 과 VCAM-1의 단백질 발현을 억제하였다.
3. 개오동나무 추출물은 혈관내피세포에서 TNF- α 에 의해 유도되는 ICAM-1 과 VCAM-1의 mRNA 발현 및 그들의 promoter 활성을 억제하였다.

이상의 결과는 개오동나무 추출물이 염증성 질환 치료에 사용될 수 있다는 실험적 근거를 제시하고 있다.

감사의 글

본 연구는 원광대학교 2006 교비지원에 의한 것으로 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 鄭台鉉, 韓國動植物圖鑑, 文教部(서울), 1965, p1050.
2. 李昌福, 大韓植物圖鑑, 鄉文社(서울), 1980, p686.
3. 牧野富太郎, 牧野 新日本植物圖鑑, 北陵館(日本), 1988, p569.
4. 辛民教·鄭普燮, 圖解 鄉藥(生藥)大事典, 圖書出版 永林社(서울), 1990, p871-872.
5. 清·孫星衍, 神農本草經, 聞名學社出版社(臺北), 1985, 卷三, p23.
6. 四川中藥志, 四川中藥志(一), 四川人民出版社(四川), 1979, p269-270.
7. 李萬林, 中國長白山藥用植物彩色圖志, 人民衛生出版社(北京), 1997, p382-383.
8. 江蘇新醫學院, 中藥大辭典, 上海科學技術出版社(上海), 1977, p1988-1989.
9. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J* 1999;138:S419-20.
10. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis the road head. *Cell* 2001;104:503-16.
11. M.I. Cybulsky, M.A. Gimbrone Jr, Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis, *Science* 251 (1991) 788-791.
12. Pfeffer K, Matsuyama T, Kunding TM, Wakeham A, Kishihara K, Shahinian A, Wiegmann K, Ohashi PS, Kronke M, Mak TW. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell* 1993;73:457-67.
13. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 1973;52:2745-56.
14. Kim I, Moon SO, Kim SH, Kim HJ, Koh YS, Koh GY. Vascular endothelial growth factor expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), and E-selectin through nuclear factor-kappa B activation in endothelial cells. *J Biol Chem* 2001;276:7614-20.
15. Recio MC, Giner RM, Manes S, Rios JL. Structural considerations on the iridoids as anti-inflammatory agents. *Planta Med* 1994;60:232-4.
16. Chiang LC, Ng LT, Chiang W, Chang MY, Lin C. Immunomodulatory activities of flavonoids, monoterpenoids, triterpenoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of *Plantago* species. *Planta Med* 2003;69:600-4.
17. Morita T, Perrella MA, Lee ME, Kourembanas S. Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:1475-9.
18. Christodoulides N, Durante W, Kroll MH, Schafer AI. Vascular smooth muscle cell heme oxygenases generate guanylyl cyclase-stimulatory carbon monoxide. *Circulation* 1995;91:2306-9.
19. Murase T, Kume N, Hase T, Shibuya Y, Nishizawa Y, Tokimitsu I, Kita T. Gallates inhibit cytokine-induced nuclear translocation of NF- κ B and expression of leukocyte adhesion

molecules in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1412-20.

20. Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J* 1995;9:899-909.

21. Oh GT, Choi JH, Hong JJ, Kim DY, Lee SB, Kim JR, Lee CH, Hyun BH, Oh SR, Bok SH, Jeong TS. Dietary hematein ameliorates fatty streak lesions in the rabbit by the possible mechanism of reducing VCAM-1 and MCP-1 expression. *Atherosclerosis* 2001;159:17-26.

22. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801-9.