

백수오, 우엉, 마 추출물 혼합비율에 따른 혈관부착인자 VCAM-1의 발현억제 효과

조영미^{1†}, 송해성^{1†}, 장선아¹, 박대원¹, 신유수², 정용준¹, 강세찬^{1*}

¹경희대학교 생명과학대학 한방재료공학과, ²농촌진흥청 국립원예특작과학원

Suppression of VCAM-1 Expression in Human Aortic Smooth Muscle Cells Treated with Ethanol Extracts of *Cynanchum wilfordii* Radix, *Arctium lappa* L., and *Dioscorea opposita*

Young-Mi Cho^{1†}, Hae-Seong Song^{1†}, Seon-A Jang¹, Dae-Won Park¹, Yu Su Shin²,
Yong Joon Jeong¹ and Se Chan Kang^{1*}

¹Department of Oriental Medicine Biotechnology, Kyung Hee University, Yongin 17104, Korea

²Department of Herbal Crop Research, NIHHS, RDA, Eumseong 55365, Korea

Abstract - *Cynanchum wilfordii* Radix (CWR), *Arctium lappa* L (ALL), and *Dioscorea opposita* (DO) have been known to improve blood lipid profile, blood pressure, and inflammation. To find the optimal combination ratio of CWR, ALL, and DO in terms of vascular health improvement, we compared the effects of various combinations on gene expression of Vascular cell adhesion protein 1 (VCAM-1) in human aortic smooth muscle cells (HASMC). VCAM-1 mediates endothelial leukocyte adhesion and is upregulated in atherosclerosis. Cells was stimulated by TNF- α (10 ng/ml, 2h) and treated with various combinations for 24 h. A combination (CADM5, CWR:ALL:DO = 2:1:1) showed the strongest suppression of VCAM-1 so that CADM5 was chosen for further experiments. We performed cell viability test with CADM5 (0, 3.125, 12.5, 25, 50, and 100 μ g/ml) and no cytotoxicity was found. We also investigated the effect of CADM5 on protein expression of VCAM-1, ICAM-1, Nrf-2, and HO-1 using western blotting. We found that CADM5 diminished the expression of VCAM-1 and increased the expression of Nrf-2 and HO-1. Therefore, we concluded that CADM5 (CWR:ALL:DO = 2:1:1) effectively improves vascular health by regulating the expression of VCAM-1.

Key words - *Cynanchum wilfordii* Radix, *Arctium lappa* L., *Dioscorea opposita*, VCAM-1, HASMCs

서 언

동맥 내벽 혈액 혈관장애로 인한 질환은 심장질환과 뇌혈관을 포함한 기타 혈관질환을 일컫는 매우 광범위한 질환으로, 동맥경화 진행에 의한 허혈성 심장질환, 고혈압, 심부전, 부정맥, 심근증, 심내막염, 뇌졸중, 말초혈관질환 등이 이에 포함된다 (Cai and Harrison, 2000).

동맥경화는 물리적 또는 화학적 자극, 생물학적 손상에 의한

혈과 내피세포의 손상에 의해 유발되며, 내피세포의 손상은 염증이 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 산화된 LDL이 혈액 중의 단백질을 혈관 내막 안으로 유입시키면서 동맥경화가 일어나기 시작한다. 유입된 단백질은 대식세포로 분화하여 산화 LDL 등 지방을 축적하며, 결국 대식세포에서 유래된 거품세포를 형성하여 죽상동맥경화를 일으키게 된다(Ito and Ikeda, 2003).

혈관내피에 염증이 일어나게 되면 혈관내피세포는 세포부착인자인 VCAM-1, ICAM-1을 발현하여 백혈구를 유인하고, 또한 chemokine을 분비하여 백혈구를 자극하며 VCAM-1, ICAM-1과 결합하는 integrin α 4, β 2을 증가시킨다. VCAM-1과 ICAM-1은 동맥경화가 일어나는 경우 동맥내피세포에서 발

*교신저자: sckang@khu.ac.kr

Tel. +82-31-201-5637

[†] These authors contributed equally to work.

현되었다. 고콜레스테롤혈증을 가진 동물에서 두 단백질은 증가되었으며, 특히 단핵구 부착이 높았던 주변부에서 증가되었다. VCAM-1은 병변에서 발현되었으며, ICAM-1은 병변이 아닌 곳에서도 발현되었다(Cybulsky *et al.*, 2001).

백수오(*Cynanchum wilfordii* Radix)는 다년생식물로 박주가리과(Asclepiadaceae) 은조롱(*Cynanchum wilfordii*)의 뿌리로 전통적으로 피로회복, 조절기능 완화, 동맥경화 완화에 사용되어 왔다. Choi *et al.* (2012)의 연구에 따르면 apolipoprotein knockdown과 고지방, 고콜레스테롤 식이로 유도된 동맥 내벽 혈액 혈관장애가 백수오 처리군에서 완화되었으며, 백수오 섭취가 혈관부착인자인 E-selectin, VCAM-1, ICAM-1의 발현을 감소시켰다. 또한 고콜레스테롤혈증을 유발한 쥐를 이용한 실험에서 백수오 섭취군의 HDL콜레스테롤 수치가 증가하고 동맥경화지수가 감소한 것이 보고되었다(Lee *et al.*, 2013).

우영(*Arctium lappa* L.)의 뿌리는 여러 국가에서 오랫동안 식품으로 사용되어 왔으며 항염증 효과를 가진다고 알려져 있고, 종자 부위는 이노자용, 해열작용, 해독작용을 하는 것으로 알려져 왔다(Kim *et al.*, 2012b; Park *et al.*, 2007). 우영 추출물은 폐 상피세포 A549의 염증반응을 완화하였으며 Lee *et al.* (2011)은 고지방, 고콜레스테롤 식이로 쥐의 혈관장애를 유발하였으며, 우영추출물 투여군에서 고혈압완화, VCAM-1, ICAM-1, MMP-2의 발현을 감소시켜 우영 추출물이 혈관염증을 완화했다고 보고했다. 또한 우영의 혈전 형성 저해 효과를 확인했으며, 우영의 주성분인 리그난도 혈전 형성을 저해하는 것으로 나타났다(Iwakami *et al.*, 1992). 본 연구팀에서도 우영주정추출물과 유효성분인 oleamide가 FcεRI 및 MAPK 신호전달 기전을 억제하여 히스타민 분비를 억제하므로 항알레르기 효과를 가진다고 발표한 바 있다(Yang *et al.*, 2016).

마(*Dioscorea opposita*)는 중국, 일본, 한국에서 식품으로 재배되어 왔으며, 위장 장애에 효력을 가진다고 알려져 왔다(Chen *et al.*, 2003). 마는 또한 인슐린저항성을 완화시킨다고 보고되었으며, 기억력 손상을 완화하는 등의 신경보호효과가 보고되었다(Gao *et al.*, 2007; Yang *et al.* 2009), 마에서 분리한 전분이 고지방, 고콜레스테롤 식이로 상승된 혈중 콜레스테롤, 중성지방, LDL콜레스테롤을 낮추었다(Shujun *et al.*, 2008).

이에 본 연구에서는 혈관염증을 완화시키고 동맥경화의 발생위험을 줄일 수 있는 소재를 개발하기 위하여, 혈관염증에 효능이 입증된 원료인 백수오, 우영, 마 혼합물이 혈관염증을 가장 효과적으로 억제하는 배합비율을 찾아내고자 하였다. 또한 혈관염증 억제효과가 뛰어난 배합비로 혼합한 백수오, 우영, 마

추출혼합물이 혈관세포에서 얼마나 독성을 나타내는지 실험하였고, 백수오, 우영, 마 추출혼합물이 혈관염증에 관여된 단백질 발현에 미치는 영향을 측정하였다. 본 연구를 통해 혈관염증 완화와 동맥경화 예방 및 치료에 효과적인 소재 개발에 필요한 기초자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료 및 추출물 제조

본 연구에 사용한 백수오는 박주가리과(Asclepiadaceae)에 속하는 *Cynanchum wilfordii* Hemsley의 뿌리이고, 우영은 국화과(Asteraceae)에 속하는 *Arctium lappa* L.의 뿌리이며, 마는 마과(Dioscoreaceae)에 속하는 *Dioscorea opposita*의 뿌리이다. 본 연구에 사용된 시료는 경희대학교, 한방재료공학과 강세찬 교수님의 식물학적 동정을 거쳤으며, 확증표본은 경희대학교 한방재료공학과에 보관되어 있다. 표본번호는 백수오(MPRBP00962), 우영(NMR114), 마(NMR256)이다. 본 연구에 사용된 백수오의 동정을 위하여 식품의약품안전처 공고 제 2014-231호에 명시된 백수오와 이엽우피소 감별법에 따라 종특이 프라이머를 이용하여 백수오 시료의 유전자를 PCR로 증폭하였다. 분석결과 표준시료와 동일한 크기의 증폭 산물을 확인하였다.

대한민국 제주에서 재배한 백수오 뿌리 25 kg을 70% 주정으로 82±2°C에서 24시간 추출 후, 여과하였으며, 85±2°C에서 14±1 Brix가 될 때까지 농축하였고, 동결건조하여 4.1 kg을 수득하였다. 제천 우영 12.5 kg을 70% 주정으로 추출/농축하고 동결건조한 결과 2.0 kg (수율 15.8%)의 우영추출물을 획득하였고, 마 12.5 kg을 70% 주정으로 추출/농축하고 동결건조한 결과 1.3 kg (수율 10.2%)의 마 추출물을 획득하였다. 상기와 같은 방법으로 추출한 백수오, 우영, 마를 중량비율로 혼합하여 실험에 사용하였다. Table 1은 혼합물의 이름과 배합비를 나타내었다.

세포주

Primary HASMC세포는 ScienCell Research Laboratories (San Diego, CA, USA)에서 구입하여 smooth muscle cell용 배지에 배양하였다. 이 배지는 필수아미노산, 비필수아미노산, 비타민, 유기질, 무기질, 호르몬, 성장인자, 미량무기질, 2% fetal bovine serum (FBS)를 포함하고 있다. 세포는 37°C, 95% 습도, 5% CO₂을 유지하는 세포배양기에서 배양되었다. 본 연구에서는 passages 2-6 사이의 세포를 사용하였다.

Table 1. Code names of different combination ratio

Code name	Combination ratio		
	<i>Cynanchum wilfordii</i> Radix	<i>Arctium lappa</i> L.	<i>Dioscorea opposita</i>
CWE	1	-	-
ALE	-	1	-
DOE	-	-	1
CADM1	1	1	-
CADM2	1	-	1
CADM3	-	1	1
CADM4	1	1	1
CADM5	2	1	1
CADM6	3	1	1
CADM7	1	2	1
CADM8	1	3	1
CADM9	1	1	2
CADM10	1	1	3
CADM11	2	2	1
CADM12	2	1	2
CADM13	1	2	2

Real-time PCR

HASMC 세포를 100 mm dish에 1×10^6 cells로 분주하고 24 시간 배양한 후 TNF- α (10 ng/ml)를 2시간동안 처리하여 염증을 유도한 후, 시료(32 μ g/ml)를 처리하여 12시간 동안 배양하였다. 배양한 HASMC 세포를 PBS로 두 번 wash 한 후 TRIzol reagent (Invitrogen Co., CA, USA)를 이용하여 튜브에 모았다. 원심분리(12,000rpm, 4°C, 5분)하여 분리한 상층액과 70% EtOH을 혼합하여 RNA를 침전시킨 후 EtOH로 2회 세척하여 total RNA를 분리하였다. cDNA를 합성은 1 μ g RNA, 1 mM dNTP mix, 50 ng/ml Oligo(dT)12-18, DEPC-treated water를 10 μ l가 되도록 혼합하였으며 65°C에서 5분간 반응한 후 4°C에서 2분간 방치하였다. 여기에 2 μ l의 10X RT buffer, 4 μ l의 25 mM MgCl₂, 1 μ l의 100 mM DTT와 1 μ l의 RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor를 첨가하여 혼합한 후 42°C에서 2분간 반응시켰다. 그 후, 1 μ l (50 units)의 SuperScript II RT를 첨가한 후 42°C에서 50분간 추가 반응시킨 다음 70°C에서 15분간 방치하여 반응을 종료하였다. 여기에 1 μ l의 RNase H를 각 시료에 첨가하고 37°C에서 20분간 반응하여 template mRNA를 제거하였다. Real-time PCR은 cDNA, SYBR Green, VCAM-1 primer를 이용하여 진행되었다. PCR 조성은 cDNA를 증류수로 1/100으로 희석하여 8 μ l를 사용하였고, 10 pM primer를 각각 0.5 μ l, ROX plus 12.5 μ l, 증류수 4 μ l로 사용하여 total volume을 25 μ l로 맞

Table 2. The primer sequences used for real-time PCR

Gene name	Primer sequences
VCAM-1	5'-ATGACATGCTTGAGCCAGG-3' (F)
	5'-GTCTCTCCTTCTTTGACACT-3' (R)
β -actin	5'-CCTGGCACCCAGCACAAT-3' (F)
	5'-GCCGATCCACACACGGAGTACT-3' (R)

추었다. Real-time PCR cycle은 초기변성은 95°C 10분, 변성은 95°C 30초, annealing은 60°C 1분, 신장반응은 95°C 1분으로 하여 40 cycle을 진행하였고 용해곡선은 55°C로 시작하여 95°C를 끝으로 하여 0.5°C씩 상승시키며 80번을 반응하여 원하는 형광값을 검출하였다. 형광신호 정량은 MAX Pro program을 사용하였다. 각각의 RT-PCR에서 동량의 RNA가 사용되었음을 확인하기 위하여 house keeping gene인 β -actin에 대한 RT-PCR을 함께 진행하였다(Table 2).

백수오, 우영, 마 혼합물의 세포독성

시료의 세포독성은 3-4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT)를 이용하여 측정하였다 (Kim *et al.*, 2012a). HASMC 세포를 96 well plate에 5×10^3 cells/well로 분주하고 37°C에서 24시간 배양한 다음, 시료 용액 0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μ g/ml를 처리한 후 24시간

동안 배양하였다. 배지를 제거하고, 최종 농도가 1 mg/ml가 되도록 MTT를 첨가한 후, 4시간 동안 배양하였다. 4시간 후 배지를 제거하고 DMSO를 150 μ l를 첨가하여 formazan dye를 용해시키고 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 실험결과는 대조군의 흡광도 값으로 나누어 상대값으로 표시하였다.

Western blot

HASMC 세포를 100 mm dish에 1×10^6 cells로 분주하고 24 시간 배양한 후 TNF- α (10 ng/ml)를 2시간동안 처리하여 염증을 유도한 후, 시료를 16 또한 32 μ g/ml를 처리하여 12시간 동안 배양하였다. 세포에 Protein Extraction solution (iNtRON, Gyeonggi, Korea)을 첨가하고 얼음에서 1시간 방치한 후, 4 $^{\circ}$ C, 12,000rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 단백질 정량은 Bicinchoninic acid assay (BCA) protein Assay kit (Bio-Rad, CA, U.S.A.)를 이용하였고 각각의 시료를 10% SDS polyacrylamide gel에서 전기영동하고 Nitrocellulose membrane으로 전사하였다. 전사된 membrane을 5% nonfat milk/TBST (Tris-buffered saline and 0.1% Tween 20)에서 넣고 상온에서 1시간동안 blocking하였다. 1차 antibody 용액(5% nonfat milk/TBST에 1:1000 비율로 희석)에 넣고 4 $^{\circ}$ C에서 16시간 동안 반응시켰다. Membrane을 TBST buffer로 3번 이상 wash한 후, 2차 antibody 용액(5% nonfat milk/TBST에 1:4000 비율로 희석)에 넣어 1시간 동안 상온에서 반응하였다. TBST buffer로 3번 이상 washing 후, ECL solution을 반응시켜 단백질 발현 정도를 Chemidoc image analyzer (Bio-Rad, CA, USA)를 사용하여 측정 후 정량하였다.

통계분석

실험결과는 평균 \pm 표준오차로 나타내었다. 실험에서 얻어진 결과는 SPSS (version 22.0; IBM corp., NY, USA)를 이용하여 통계처리 하였으며 실험 결과의 유의성은 One-way ANOVA test, LSD 사후검정을 통하여 p가 0.05 이하인 경우 유의한 차이로 판정하였다.

결과 및 고찰

백수오, 우영, 마 혼합물의 VCAM-1 mRNA expression 억제 효과

혈관내 염증 완화 효과가 있다고 알려진 백수오, 우영, 마를 혼합했을 때 효과를 극대화시킬 수 있는 혼합비율을 찾기 위해 Table 1과 같이 다양한 혼합비율로 혼합물을 제조하였다. 염증 완화 효과는 VCAM-1의 mRNA 발현을 real time qPCR으로 측

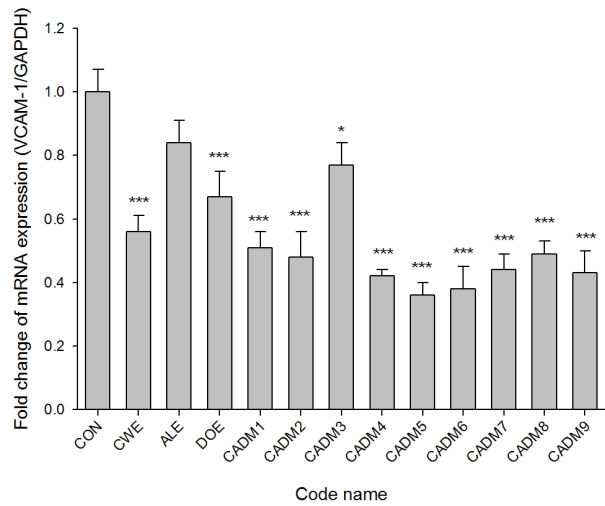


Fig. 1. Effects of different ratio mixture of *Cynanchum wilfordii* Radix, *Arctium lappa* L., and *Dioscorea opposita* on mRNA level of Vascular cell adhesion protein 1(VCAM-1). Human arterial smooth muscle cells(HASMC) were treated with TNF- α for 2 hours then treated with samples (32 μ g/ml) for 12h. * p<0.05 or *** p<0.001 compared with control (n=3). Values are means \pm SEM.

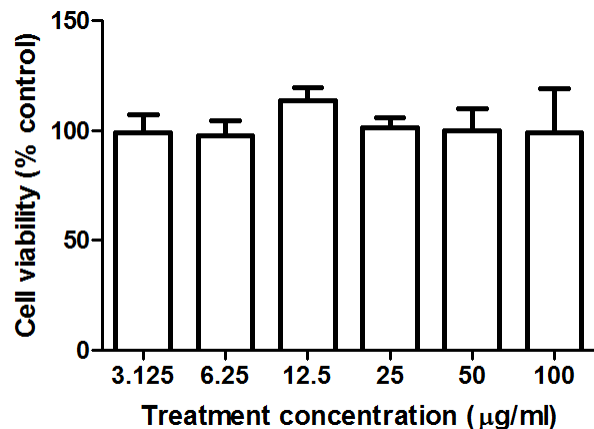


Fig. 2. Effects of combination extracts (CADM5) of *Cynanchum wilfordii* Radix, *Arctium lappa* L., and *Dioscorea opposita* on cell viability of human arterial smooth muscle cells(HASMC). Cells were treated with CADM5 (0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, and 100 μ g/ml) for 24 h. No significant difference between groups was found (n=3). Values are means \pm SEM.

정하여 이를 비교하였다. 그 결과 백수오 처리군, 마 처리군, 모든 혼합물 처리군에서 유의적인 억제효과가 관찰되었으며, 특히 백수오, 우영, 마를 2:1:1 비율로 혼합제조한 CADM5 처리군에서 VCAM-1 발현이 가장 크게 억제되었다(Fig. 1).

CADM5 (백수오, 우영, 마 = 2:1:1)의 인간 유래 동맥 평활근 세포에서의 세포활성

VCAM-1 mRNA 발현억제효과가 가장 뛰어났던 CADM5의 세포독성을 확인하기 위하여 MTT assay를 수행하였다. CADM5 (3,125, 6,25, 12.5, 25, 50, 100 µg/ml)는 인간 유래 동맥 평활근 세포의 생존율에 영향을 미치지 않았다(Fig. 2).

CADM5 (백수오, 우영, 마 = 2:1:1)에 의한 인간 유래 동맥 평활근 세포에서의 세포부착인자 발현 억제

VCAM-1, ICAM-1 등의 세포부착인자의 발현은 혈관내피세포와 단핵구 또는 T 림프구의 유착에 관여하며 염증에서 중요한 역할을 한다(Quagliario *et al.*, 2005). 세포에 TNF-α (10 ng/ml)를 2시간동안 처리하여 염증을 유도한 후 CADM5의 처리가 세포부착인자의 발현에 미치는 영향을 알아보았다. TNF-α는

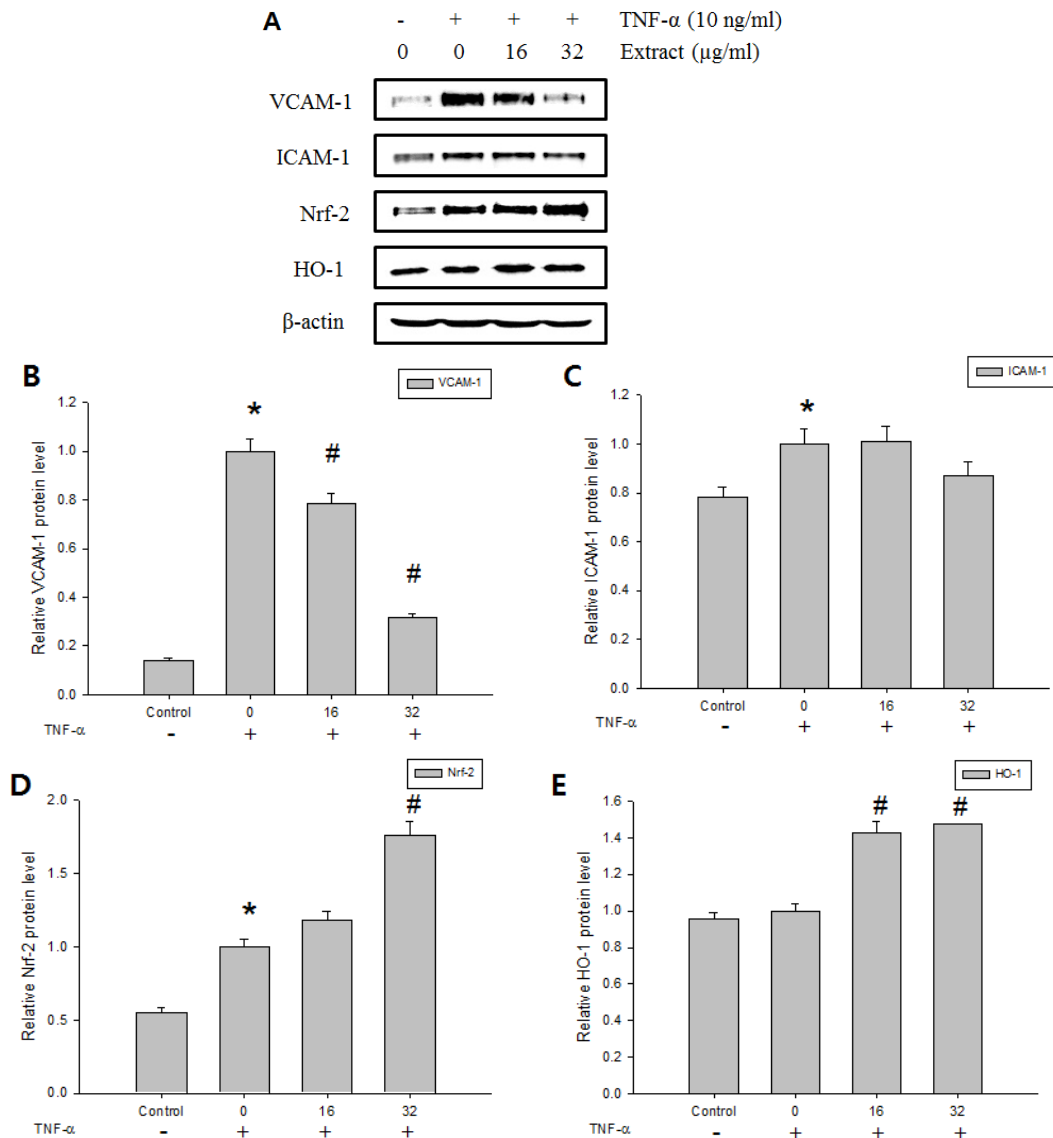


Fig. 3. Effects of combination extracts (CADM5) of *Cynanchum wilfordii* Radix, *Arctium lappa* L., and *Dioscorea opposita* on protein levels of VCAM-1, ICAM-1, Nrf-2, and HO-1. Human arterial smooth muscle cells (HASMC) were stimulated with 10 ng/ml of TNF-α for 2 h, followed by sample treatments for 12 h. Protein levels were determined with Western blot (A) and densitometric analyses ((B) VCAM-1; (C) ICAM-1; (D) Nrf-2; and (E) HO-1). Each value represents the means ± SEM of three independent experiments (*significantly different from control, # significantly different from TNF-α treated group).

대조군에 비해 VCAM-1과 ICAM-1의 발현을 유의적으로 증가시켰다. CADM5을 12시간 동안 처리한 결과 염증으로 인하여 증가하였던 ICAM-1과 VCAM-1 단백질의 발현이 감소하였다 (Fig. 3). 특히 CADM5는 농도의존적으로 VCAM-1 발현을 억제하였다. 따라서 백수오, 우영, 마 혼합추출물이 염증에 의해 유도된 ICAM-1 그리고 VCAM-1의 발현을 조절함으로써 동맥경화증을 유발하는 혈관 염증의 초기단계를 억제하여 항염증 작용에 효과가 있음을 기대할 수 있다.

인간 유래 동맥 평활근 세포에서의 CADM5 (백수오, 우영, 마 = 2:1:1)에 의한 HO-1과 Nrf-2의 발현 증가

Heme oxygenase (HO)-1은 혈관내피세포에서 산화적 손상과 염증에 대한 보호기전에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. HO-1의 발현이 증가된 경우 산화스트레스로부터 세포방어가 잘 이루어짐을 뜻한다(Duckers *et al.*, 2001). Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf-2)는 promoter 부분의 antioxidant response elements와 결합하여 항산화 관련 유전자의 발현을 조절하는 전사인자이며, 특히 HO-1의 발현 조절에 관여한다(Li *et al.*, 2007). 동맥경화 예방효과가 있다고 알려진 녹차의 성분인 epigallocatechin gallate (EGCG) 또는 *Ginkgo biloba* extract의 기전을 연구한 결과, 공통적으로 Nrf-2의 발현을 증가시키고 Nrf-2가 HO-1의 발현을 증가시키며 활성화시킨다고 보고하였다(Chen *et al.*, 2011; Pullikotil *et al.*, 2012). CADM5을 12시간 동안 처리한 결과 HO-1과 Nrf-2 단백질의 발현이 증가하였다(Fig. 3). 따라서 백수오, 우영, 마 혼합추출물이 HO-1과 Nrf-2 단백질 발현을 증가시켜 혈관내피세포 염증 억제효능을 나타낼 것으로 사료된다.

적 요

본 연구에서는 혈관염증 억제 효능이 입증된 원료인 백수오, 우영, 마를 혼합하여 혈관염증을 완화시키고 동맥경화의 발생 위험을 줄일 수 있는 소재를 개발하기 위하여, 혼합물이 혈관염증을 가장 효과적으로 억제하는 배합비율을 찾아내고자 하였다. 백수오, 우영, 마 단독투여 및 다양한 혼합비로 혼합물을 제조하여 인간유래 동맥 평활근 세포에 공급하였다. 세포부착인자인 VCAM-1의 mRNA 발현에 미치는 영향을 비교하여 가장 강한 억제효과를 나타낸 CADM5 (백수오:우영:마=2:1:1)을 선택하였다. 선택된 혼합물이 혈관세포에서 얼마나 독성을 나타내는지 실험하였고, 백수오, 우영, 마 추출혼합물이 혈관염증

에 관련된 단백질 발현에 미치는 영향을 측정하였다. CADM5처리 결과 염증으로 인하여 증가하였던 ICAM-1과 VCAM-1 단백질의 발현이 감소하였다. 또한 CADM5를 처리한 결과 혈관내피세포에서 산화적 손상 및 염증 방어와 관련이 있는 HO-1과 Nrf-2의 발현이 증가되었다. 따라서 CADM5이 염증에 의해 유도된 ICAM-1 그리고 VCAM-1의 발현을 조절하고 산화스트레스의 방어기전을 활성화 함으로써 동맥경화증을 유발하는 혈관염증의 초기단계를 억제하여 항염증 작용에 효과가 있음을 기대할 수 있다. 비교적 저농도인 32 µg/ml에서 효과적으로 혈관염증 관련 단백질 발현을 조절하였으므로 본 연구를 통해 선택된 CADM5의 혈관염증개선 및 혈관건강개선 소재로서의 개발 가능성을 확인하였다.

사 사

본 논문은 농촌진흥청 차세대바이오그린21사업(과제번호: PJ01130402)의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

- Cai, H. and D.G. Harrison. 2000. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ. Res.* 87(10):840-844.
- Chen, H.-L., C.-H. Wang, C.-T. Chang and T.-C. Wang. 2003. Effects of Taiwanese yam (*Dioscorea japonica* THUNB. var. *pseudojaponica* YAMAMOTO) on upper gut function and lipid metabolism in Balb/c mice. *Nutrition* 19(7-8):646-651.
- Chen, J.S., P.H. Huang, C.H. Wang, F.Y. Lin, H.Y. Tsai, T.C. Wu, S.J. Lin and J.W. Chen. 2011. Nrf-2 mediated heme oxygenase-1 expression, an antioxidant-independent mechanism, contributes to anti-atherogenesis and vascular protective effects of *Ginkgo biloba* extract. *Atherosclerosis* 214(2):301-309.
- Choi, D.H., Y.J. Lee, H.C. Oh, Y.L. Cui, J.S. Kim, D.G. Kang and H.S. Lee. 2012. Improved Endothelial Dysfunction by *Cynanchum wilfordii* in *Apolipoprotein E^{-/-}* mice fed a high fat/cholesterol diet. *J. Med. Food.* 15(2):169-179.
- Cybulsky, M.I., K. Iiyama, H. Li, S. Zhu, M. Chen, M. Iiyama, V. Davis, J.C. Gutierrez-Ramos, P.W. Connelly and D.S. Milstone. 2001. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* 107(10):1255-1262.
- Duckers, H.J., M. Boehm, A.L. True, S.F. Yet, H. San, J.L.

- Park, R. Clinton Webb, M.E. Lee, G.J. Nabel and E.G. Nabel. 2001. Heme oxygenase-1 protects against vascular constriction and proliferation. *Nat. Med.* 7(6):693-698.
- Gao, X., B. Li, H. Jiang, F. Liu, D. Xu and Z. Liu. 2007. *Dioscorea opposita* reverses dexamethasone induced insulin resistance. *Fitoterapia* 78(1):12-15.
- Ito, T. and U. Ikeda. 2003. Inflammatory cytokines and cardiovascular disease. *Curr. Drug. Targets Inflamm. Allergy* 2(3):257-265.
- Iwakami, S., J.B. Wu, Y. Ebizuka and U.Sankawa. 1992. Platelet activating factor (PAF) antagonists contained in medicinal plants: lignans and sesquiterpenes. *Chem Pharm Bull, Tokyo, Japan.* 40(5):1196-1198.
- Kim, I., J.-B. Kim., K. Cho, J.-H. Kim and A.-S. Om. 2012a. Cytoprotective effect of ethanol extract from Maesil (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) on Alloxan-induced oxidative damage in pancreatic-cell, HIT-T15. *Korean J. Plant Res.* 25(2): 184-192 (in Korean).
- Kim, Y.-J., S.-C. Kang, S. Namkoong, M.-G. Choung and E.-H Sohn. 2012b. Anti-inflammatory effects by *Arctium lappa* L. root extracts through the regulation of ICAM-1 and nitric oxide. *Korean J. Plant Res.* 25(1):1-6 (in Korean).
- Lee, H.-S., J.-H. Choi, Y.-E. Kim, I.-H. Kim, B.-M. Kim and C.-H. Lee. 2013. Effects of the *Cynanchum wilfordii* ethanol extract on the serum lipid profile in hypercholesterolemic rats. *Prev. Nutr. Food Sci.* 18(3):157-162. <http://doi.org/10.3746/pnf.2013.18.3.157>
- Lee, Y.J., D.H. Choi, G.H. Cho, J.S. Kim, D.G. Kang and H.S. Lee. 2012. *Arctium lappa* ameliorates endothelial dysfunction in rats fed with high fat/cholesterol diets. *BMC Complement. Altern. Med.* 12(1):116. <http://doi: 10.1186/1472-6882-12-116>.
- Li, H.Y., S.Y. Wu and N. Shi. 2007. Transcription factor Nrf2 activation by deltamethrin in PC12 cells: involvement of ROS. *Toxicol Lett.* 171(1-2):87-98.
- Shujun, W., Y. Jinglin, L. Hongyan, and C. Weiping. 2008. Characterisation and preliminary lipid-lowering evaluation of starch from Chinese yam. *Food Chem.* 108(1):176-181.
- Park, S.Y., S.S. Hong, X. Han, J.S. Hwang, D. Lee, J.S. Ro and B.Y. Hwang. 2007. Lignans from *Arctium lappa* and their inhibition of LPS-induced nitric oxide production. *Chem. Pharm. Bull.* 55(1):150-152.
- Pullikotil, P., H. Chen, R. Muniyappa, C.C. Greenberg, S. Yang, C.E. Reiter, J.W. Lee, J.H. Chung and M.J. Quon. 2012. Epigallocatechin gallate induces expression of heme oxygenase-1 in endothelial cells via p38 MAPK and Nrf-2 that suppresses proinflammatory actions of TNF- α . *J. Nutr. Biochem.* 23(9):1134-1145.
- Quagliaro, L., L. Piconi, R. Assaloni, R. Da Ros, A. Maier, G. Zuodar and A. Ceriello. 2005. Intermittent high glucose enhances ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin expression in human umbilical vein endothelial cells in culture: the distinct role of protein kinase C and mitochondrial superoxide production. *Atherosclerosis* 183(2):259-267.
- Yang, M.H., K.D. Yoon, Y.W. Chin, J.H. Park, S.H. Kim, Y.C. Kim and J. Kim. 2009. Neuroprotective effects of *Dioscorea opposita* on scopolamine-induced memory impairment in *in vivo* behavioral tests and *in vitro* assays. *J. Ethnopharmacol.* 121(1):130-134.
- Yang, W.S., S.R. Lee, Y.J. Jeong, D.W. Park, Y.M. Cho, H.M. Joo, I. Kim, Y.-B. Seu, E.-H. Sohn and S.C. Kang. 2016. Antiallergic activity of ethanol extracts of *Arctium lappa* L. undried roots and its active compound, oleamide, in regulating Fc ϵ RI-mediated and MAPK signaling in RBL-2H3 cells. *J. Agric. Food. Chem.* 64(18):3564-3573.

(Received 8 August 2016 ; Revised 27 September 2016 ; Accepted 5 October 2016)