U46619-유도의 혈소판 활성화 억제를 통한 Esculetin의 혈전 생성억제 효과

박창은 · 이동하

남서울대학교 임상병리학과 · 분자진단연구소

Esculetin Can Attenuate Thrombosis through Inhibition of U46619-Induced Platelet Activation

Chang-Eun Park and Dong-Ha Lee

Department of Biomedical Laboratory Science, Molecular Diagnostics
Research Institute, Namseoul University

ABSTRACT Esculetin, a bioactive 6,7-dihydroxy derivative of coumarin, displays pharmacological activity against obesity, diabetes, renal failure, and cardiovascular diseases (CVDs). It has been reported that esculetin inhibits collagen and arachidonic acid-induced platelet aggregation in washed human platelets. However, there are no effects on other agonists such as thrombin and U46619, and its mechanism of action has not been completely elucidated. This study investigated the effects of esculetin on the modulation of platelet function using human platelets induced by the agonist U46619 (9,11-dideoxy 9a,11a-methanoepoxy prostaglandin F2a), which is one of the analogues of thromboxane A₂. U46619 activates platelets, and increases intracellular calcium mobilization and fibrinogen binding. However, esculetin upregulated the cyclic nucleotides and downregulated intracellular calcium mobilization, glycoprotein II b/IIIa (α II b/ β ₃)-mediated fibrinogen binding, and clot retraction, dose-dependently. In conclusion, esculetin has demonstrated potent antiplatelet and antithrombotic properties, making it a potential therapeutic drug candidate to prevent platelet-related thrombosis and cardiovascular disease.

Key words: esculetin, cAMP/cGMP, intracellular Ca²⁺, fibrinogen binding, fibrin clot

서 론

혈소판은 손상된 혈관의 지혈에 관여하는 세포로 혈전증, 심근경색증, 동맥경화증 등의 순환기 장애를 일으킬 수 있는 것으로 잘 알려져 있다. 혈소판 활성화는 심혈관 질환에 직접적으로 영향을 미칠 수 있기에 이를 억제할 수 있는 많은 약물이 개발되었으며, 지속적인 연구가 활발히 진행되고 있지만 심혈관 질환으로 인한 사망률은 감소하지 않고 있다 (Jackson, 2011). 또한, 최근 코로나19 백신으로 뇌정맥동 혈전증(CVST, cerebral venous sinus thrombosis), 출혈성 뇌졸중 등의 부작용 사례가 보고되고 있으며, European Medicines Agency(EMA)는 특정 백신의 사용 제한을 권고한 바 있다(Kantarcioğlu 등, 2021). 향후 코로나19 백신의 사용에 항혈전제의 병행 사용이 고려될 것으로 예상되기 때문에 효과적이고 안정적인 항혈전 성분의 규명이 시급한 것

으로 판단된다.

혈소판이 활성화되면 세포질 막에 위치한 인지질이 가수분해되면서 방출된 arachidonic acid가 thromboxan A₂ (TXA₂)로 전환되어 분비된다(Jennings, 2009; Morello 등, 2009). 분비되어 나온 TXA₂는 주변의 다른 혈소판 막 수용체에 결합함으로써 혈소판 응집을 지속적으로 증폭시키는 작용제로 기능한다고 알려져 있다(Sabatine과 Jang, 2000). 또한, TXA₂의 유사체 중 하나인 U46619(9,11-dideoxy 9a,11a-methanoepoxy prostaglandin F2a)는 세포질 내로의 Ca²⁺ 동원을 증가시키고 세포골격 단백질인 myosin light chain과 pleckstrin을 인산화시켜 혈소판 응집을 유도한다(Cattaneo 등, 1991; Su 등, 1999).

정상적인 혈액순환이 일어날 때, 혈관 내피세포로부터 nitric oxide 및 prostaglandin I₂가 방출되면서 혈소판 내 cAMP 및 cGMP의 생성이 일어난다. 세포 내 증가한 cAMP

Received 24 August 2021; Revised 30 November 2021; Accepted 30 November 2021

Corresponding author: Dong-Ha Lee, Namseoul University, 91, Daehak-ro, Seonghwan-eup, Seobuk-gu, Cheonan-si, Chungnam 31020, Korea, E-mail: dhlee@nsu.ac.kr

Author information: Chang-Eun Park (Professor), Dong-Ha Lee (Professor)

Copyright © 2021 by The Korean Society of Food Science and Nutrition. All rights Reserved.

This is Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

는 protein kinase A(PKA)의 활성화를, cGMP는 protein kinase G(PKG)의 활성화를 유도하는데, PKA와 PKG는 기질 단백질인 inositol 1,4,5-triphosphate receptor(IP₃R)와 vasodilator-stimulated phosphoprotein(VASP)을 인산화하는 것으로 알려져 있다(Schwarz 등, 2001). IP₃R의 인산화를 통해 IP₃R의 비활성화가 이루어지며, 이는 dense tubular system으로부터 세포질 내로의 Ca²⁺ 동원을 억제하는 결과를 초래한다(Cavallini 등, 1996; Quinton과 Dean, 1992). 혈소판에서 VASP는 PKA 및 PKG의 주요 기질이며, cAMP-의존성인 VASP Ser¹⁵⁷ 및 cGMP-의존성인 VASP Ser²³⁹의 인산화가 일어날 때, αIIb/β₃ 활성화 및 actin filament 활성이 억제되는 것으로 보고된 바 있다(Laurent 등, 1999; Sudo 등, 2003). 결과적으로 IP₃R의 인산화가 Ca²⁺ 동원을 억제하고 VASP의 인산화가 αIIb/β₃의 억제를 일으킴으로써 혈소판의 활성을 저해하기 때문에 항혈소판 효과를 확인하는 데 이들 단백질의 인산화를 확인하는 것이 필요하다.

*Scopolia*나 *Artemisia* 속의 식물 뿌리에 주로 함유된 것으로 알려진 esculetin은 항염, 항당뇨병, 항발암성 등 여러 약리 활성을 나타낸다(Karthika 등, 2012). 앞선 연구에 따르면 esculetin은 심혈관계에 보호 효과가 있다고 보고되었다. Esculetin을 경구로 전처리하면 isoproterenol로 유도된 심근색증이 있는 쥐에서 anti-liperoxidative 효과를 나타냈는데, 이는 자유라디칼 소거 특성 때문일 것이라고 예상하였다(Liang 등, 2017). 다른 보고서에서 esculetin의 효과는 사람 혈소판 활성화 및 실험적 마우스 모델에서 조사되었으며, esculetin은 세척된 사람 혈소판에서 collagen 및 arachidonic acid로 유도한 혈소판의 응집을 억제하였다(Hsia 등, 2019). 그러나 thrombin 및 U46619와 같은 다른 작용제에는 영향을 미치지 않았고, esculetin의 혈소판 활성을 억제하는 기전이 명확히 알려지지 않았다. 본 연구는 U46619 유도의 혈소판 활성화와 그와 관련된 다양한 요인들에 미치는 esculetin의 효과를 확인함으로써 esculetin이 항혈소판 작용에 미치는 영향을 명확히 하고자 하였다.

재료 및 방법

시료

Esculetin(6,7-dihydroxy-2H-1-benzopyran-2-one)은 Avention Corp.(Incheon, Korea)에서 구입하였다(Fig.

Fig. 1. The structure of esculetin. PIN: 6,7-dihydroxy-2H-1-benzopyran-2-one, chemical formula: C₉H₆O₄, molar mass: 178.14 g/mol.

1). U46619는 Sigma Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 제공받았다. Cayman Chemical(Ann Arbor, MI, USA)에서 cAMP와 cGMP Enzyme Immunoassay(EIA) kits 및 serotonin과 ATP assay kits를 제공하였고, Invitrogen(Eugene, OR, USA)은 Fura 2-AM-(2-acetoxymethyl-) 및 Alexa Fluor 488-conjugate fibrinogen을 제공하였다. Cell Signaling(Beverly, MA, USA)은 vasodilator-stimulated phosphoprotein(VASP), inositol 3-phosphate receptor type I(IP₃RI), lysis buffer 및 anti-rabbit IgG-HRP-conjugate secondary antibody를 제공하였다. Enhanced chemiluminescence solution(ECL)과 polyvinylidene difluoride(PVDF) membrane은 General Electric Healthcare(Chalfont St. Giles, Buckinghamshire, UK)로부터 제공받았다.

사람 혈소판 부유액의 제조

대한적십자사 혈액원(Suwon, Korea)으로부터 사람의 혈소판 풍부 혈장(PRP, platelet rich plasma)을 제공받아 진행하였다. 세척 혈소판은 이전에 수행되었던 방법(Shin 등, 2019)에 따라 준비되었다. PRP를 1,300×g에서 10분 동안 원심분리하여 혈소판을 획득하여 세척완충액(138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 12 mM NaHCO₃, 0.36 mM NaH₂PO₄, 5.5 mM glucose 및 1 mM Na₂EDTA, pH 6.9)으로 2회 세척한 후, 현탁완충액(138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 12 mM NaHCO₃, 0.36 mM NaH₂PO₄, 0.49 mM MgCl₂, 5.5 mM glucose, 0.25% gelatin, pH 7.4)으로 최종 농도가 10⁸ cells/mL가 되도록 현탁시켰다. 저온에서 일어날 수 있는 혈소판 응집을 피하기 위해 상기 과정을 25°C에서 수행하였으며, 이 실험은 남서울대학교 Institutional Review Board (IRB)의 승인(1041479-HR-201803-003)을 받아 이루어졌다.

Cyclic nucleotides(cAMP 및 cGMP) 생성량의 측정

세척된 사람 혈소판(10⁸ cells/mL)을 여러 농도의 esculetin으로 전처리하여 37°C에서 3분간 배양한 후, 2 mM의 CaCl₂를 첨가하고 0.5 μM의 U46619로 자극하여 5분 동안의 응집을 유도하였다. 1 M HCl을 첨가함으로써 반응을 종결하였고, cAMP 및 cGMP ELISA kits를 사용하여 ELISA-reader(Molecular devices, San Jose, CA, USA)를 통해 cAMP 및 cGMP 수준을 측정하였다.

세포 내 Ca²⁺ 동원량의 측정

5 μM Fura 2-AM을 PRP에 첨가하여 37°C에서 60분 동안 배양하고, 세척완충액으로 2회 세척한 후 현탁완충액으로 최종 농도가 10⁸ cells/mL가 되도록 현탁하였다. 여러 농도의 esculetin을 전처리하고 2 mM CaCl₂를 첨가하여 37°C에서 3분 동안 배양한 후, 0.5 μM의 U46619로 자극하여 5분 동안 측정하였다. BioTek Instruments 사(Winooski,

VT, USA)의 분광 형광광도계(SFM 25, USA)를 이용하여 Fura 2의 형광을 측정하였다. 여기 파장은 초기 값 340 nm로 설정하였고 0.5초씩 증가하여 최종 380 nm에 도달되게 하였다. 방출 파장은 510 nm의 파장으로 설정하였다. 동원되는 Ca^{2+} 농도를 Grynkiewicz 등(1985)의 방법으로 계산하였다.

혈소판 막 $\alpha\text{IIb}/\beta_3$ 에 대한 fibrinogen binding 정도의 측정

세척된 사람 혈소판(10^8 cells/mL)에 여러 농도의 esculetin을 전처리하고 2 mM CaCl_2 를 첨가한 후, 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 Alexa Flour 488-human fibrinogen과 0.5 μM 의 U46619로 첨가하여 5분 동안 반응시켰다. 0.5% paraformaldehyde를 함유한 phosphate-buffered saline(pH 7.4)을 첨가하여 반응을 종결한 후, BD Bioscience 사(San Jose, CA, USA)의 유세포 분석기(FACS)를 통해 fibrinogen binding을 측정하였다. 형광을 유지하기 위해 모든 과정은 어두운 환경에서 진행하였으며, Cell-Quest software(BD Biosciences)를 통해 분석했다.

혈소판 매개의 fibrin clot 형성 정도 측정

PRP(400 μL)를 polyethylene tube로 옮기고 여러 농도의 esculetin을 전처리한 후, 2 mM CaCl_2 를 첨가하여 0.05 U/mL의 thrombin을 넣어 37°C에서 15분 동안 반응함으로써 fibrin clot 형성을 유발하였다. 디지털카메라를 사용하여 fibrin clot의 이미지를 촬영하였고, Image J Software(v1.46, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)를 사용하여 형성된 fibrin clot의 면적을 계산하였다.

Immunoblotting

세척된 사람 혈소판(10^8 cells/mL)을 다양한 농도의 esculetin을 전처리하여 37°C에서 3분 동안 배양하고, 2 mM의 CaCl_2 를 첨가한 후 0.5 μM 의 U46619로 5분 동안 자극하였다. 동량의 lysis buffer를 첨가하여 반응을 종결시키고,

BCA kit(Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)을 사용하여 혈소판 용해물의 단백질 농도를 확인하였다. 혈소판 용해물(20 μg 단백질)을 SDS-PAGE(8%)를 사용하여 분리하고 PVDF membrane으로 옮긴 후 항체 처리하였다. 1차 항체는 1:1,000의 희석배수에서, 2차 항체는 1:2,000의 희석배수에서 반응하였고, ECL 시약(General Electric Healthcare, Buckinghamshire, UK)을 사용하여 시각화한 다음 Image J Software(v1.46, National Institutes of Health)를 사용하여 면적을 계산하였다.

통계분석

실험 결과는 반복 실험을 통한 평균±표준편차로 표시하였다. 그룹 간의 차이를 Student's t-test 또는 ANOVA를 사용하여 분석하였고, $P<0.05$ 일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다. 분산분석에 따라 그룹 평균 간에 유의한 차이가 확인된 경우 Scheffe의 방법을 사용하여 그룹을 비교하였다.

결과 및 고찰

Esculetin이 cyclic nucleotides 생성에 미치는 효과

앞선 연구 결과를 통해 cyclic nucleotides(cAMP 및 cGMP)가 세포질 내 Ca^{2+} 동원량을 감소시키며, cAMP- 및 cGMP-의존성 단백질 kinase(PKA 및 PKG)를 활성화함으로써 혈소판 응집을 억제하는 신호전달 물질이라 보고된 바 있다(Kuo 등, 1980). 본 연구에서는 esculetin이 cAMP 또는 cGMP 생성에 어떤 영향을 미치는지 확인하였다. Fig. 2에 제시한 결과를 보면, U46619를 단독으로 처리했을 때 inact cell과 비교하여 cAMP 및 cGMP 생성에 유의적인 변화가 나타나지 않았다. 그러나 esculetin을 전처리하여 U46619를 처리하면 cAMP 생성이 4.07 ± 0.30 pmol/ 10^8 cells에서 10.45 ± 1.34 pmol/ 10^8 cells까지 강하게 증가시켰다. 또한, cGMP 생성도 esculetin에 의해 6.91 ± 0.63 pmol/ 10^8 cells에서 7.22 ± 1.45 pmol/ 10^8 cells로 유의하

Fig. 2. Effects of esculetin on cyclic nucleotides production. (A) Effects of esculetin on cAMP production stimulated by U46619. (B) Effects of esculetin on cGMP production stimulated by U46619. Data are expressed as means±SD (n=4). * $P<0.05$, ** $P<0.001$ compared with the U46619-stimulated platelets.

Fig. 3. Effects of esculetin on [Ca²⁺]_i mobilization and IP₃R phosphorylation. (A) Inhibitory effects of esculetin on U46619-induced [Ca²⁺]_i mobilization. (B) Effects of esculetin on U46619-induced IP₃R phosphorylation. Measurement of [Ca²⁺]_i mobilization and western blotting was described in "Materials and Methods" section. The data are expressed as the mean $\pm$ standard deviation (n=4). [#]*P*<0.05 compared with no-stimulated platelets, **P*<0.05, ***P*<0.001 compared with the U46619-stimulated platelets.

게 증가하였다(Fig. 2B). 이러한 결과는 U46619로 유도한 혈소판에서 esculetin이 cAMP 및 cGMP의 생성을 유의하게 증가시키면서 혈소판의 기능을 조절한다는 것을 보여준다.

Esculetin이 세포 내 Ca²⁺ 동원 및 IP₃R 인산화에 미치는 효과

증가한 cAMP 및 cGMP가 의존성 효소인 PKA 및 PKG를 활성화함으로써 관련된 기질들을 인산화하는 데 사용되는데, 그중 IP₃R의 인산화를 유발하는 것으로도 알려져 있다 (Schwarz 등, 2001). 혈소판의 dense tubular system에 위치하는 IP₃R는 inositol 1,4,5-trisphosphate와의 결합을 통해 세포질 내의 Ca²⁺ 동원([Ca²⁺]_i)을 유도하며, [Ca²⁺]_i은 세포골격 단백질인 myosin light chain과 pleckstrin의 인산화를 유발하여 혈소판 내 과립 분비와 P-selectin 발현을 유발함으로써 혈소판 활성화 및 응집을 유도하는 중요한 역할을 담당한다(Varga-Szabo 등, 2009).

본 연구에서 [Ca²⁺]_i에 미치는 esculetin의 효과를 확인하였다. 그 결과 Fig. 3A에 제시한 바와 같이, U46619에 의해 [Ca²⁺]_i 수준이 100.5 $\pm$ 0.6 nM에서 738.6 $\pm$ 12.3 nM로 상승하였고, esculetin은 U46619에 의해 증가한 [Ca²⁺]_i를 농도 의존적으로 강하게 감소시켰다(Fig. 3A). 그리고 우리는 [Ca²⁺]_i를 조절하는 단백질인 IP₃R가 esculetin에 영향을 받는지 확인하였다. Fig. 3B에 제시한 바와 같이, esculetin은 U46619로 유도한 혈소판에서 IP₃R의 인산화를 농도 의존적으로 증가시키는 것을 확인하였다. 이는 esculetin에 의한 cAMP/cGMP 생성 및 PKA/PKG의 활성 증가가 IP₃R의 인산화를 일으켜 dense tubular system으로부터의 [Ca²⁺]_i를 감소시켰음을 보여준다.

Esculetin이 VASP 인산화에 미치는 효과

앞선 연구를 통해 VASP가 혈소판 분비 및 점착을 조절함으로써 혈소판 활성화에 관여하는 cAMP/cGMP-의존성 PKA/PKG의 주요 기질 중 하나이며, VASP가 인산화될 때 integrin α IIb/ β ₃의 활성화가 억제되면서 혈소판 응집이 저

Fig. 4. Effects of esculetin on VASP phosphorylation. Western blotting was determined as described in "Materials and Methods" section. The data are expressed as the mean $\pm$ standard deviation (n=4). [#]*P*<0.05 compared with no-stimulated platelets, **P*<0.05 compared with the U46619-stimulated platelets.

해되는 것으로 보고된 바 있다(Wangorsch 등, 2011; Napeñas 등, 2013). 우리는 esculetin이 U46619 유도 혈소판에서 cAMP 및 cGMP 생성을 농도 의존적으로 증가시킨다는 것을 확인하였고(Fig. 2), 계속해서 esculetin이 PKA/PKG의 활성 증가를 통해 기질 단백질인 cAMP-의존성의 VASP Ser¹⁵⁷ 및 cGMP-의존성의 VASP Ser²³⁹의 인산화를 조절하는지 확인해 보았다. 그 결과 Fig. 4에서 제시한 바와 같이, esculetin에 의해 VASP Ser¹⁵⁷ 및 VASP Ser²³⁹ 인산화가 농도 의존적으로 유의하게 증가한 것을 확인하였다. 특히 VASP Ser²³⁹ 인산화보다 VASP Ser¹⁵⁷의 인산화를 더 강하게 일으켰는데, esculetin이 cGMP보다 cAMP 농도를 더 강하게 증가한 결과와 일치한다(Fig. 2). 이는 esculetin에 의한 cAMP 및 cGMP의 생성 증가가 VASP의 인산화에 이어진 것을 분명하게 보여준다.

Esculetin이 α IIb/ β ₃에 대한 fibrinogen binding에 미치는 효과

Integrin α IIb/ β ₃를 매개한 신호전달은 혈소판 세포 골격의 변형을 유발하여 혈소판 증식 및 혈전 생성과정에 영향을

미치는 것으로 알려져 있다(Topol 등, 1999). α IIb/ β ₃는 휴지기 혈소판에서 낮은 친화도 상태로 발현되는데, 응집유도제가 작용하면 inside-out 신호전달 경로를 통해 구조적 변화를 일으켜 α IIb/ β ₃의 친화도를 증가시킨다(Phillips 등, 2001). Fibrinogen이 수용체인 α IIb/ β ₃에 결합할 때 추가적인 형태 변화, 점착을 거쳐 혈소판 응집의 증폭을 초래한다.

본 연구에서는 esculetin이 fibrinogen이 α IIb/ β ₃에 binding 하는 데 영향을 미치는지 확인하였다. U46619를 처리했을 때 Fig. 5A에서 볼 수 있듯이 일정 이상의 형광을 가진 fibrinogen binding cell이 $1.0 \pm 0.2\%$ 에서 $85.0 \pm 1.2\%$ 로 증가하였다(Fig. 5A-b, 5B). 이는 U46619에 의해 혈소판의 α IIb/ β ₃에 대한 fibrinogen 결합능이 증가한 것을 의미한다. 그러나 esculetin(50~500 μ M)을 전처리했을 때 fibrinogen binding cell이 농도 의존적으로 억제되었고, 특히 500 μ M의 esculetin이 $14.5 \pm 0.8\%$ 까지 강하게 fibrinogen 결합을 억제한다는 것을 확인하였다(Fig. 5A-c~f, 5B). 이 결과는 esculetin에 의해 상향 조절된 VASP 인산화에 의해 integrin α IIb/ β ₃의 활성이 억제된 결과로 보인다. 또한, esculetin이 혈소판 세포에 독성을 가지는지 분비되어 나오는

Fig. 5. Effects of esculetin on U46619-induced fibrinogen binding. (A) The flow cytometry histograms on fibrinogen binding. a, Intact platelets (base); b, U46619 (0.5 μ M); c, U46619 (0.5 μ M) + esculetin (50 μ M); d, U46619 (0.5 μ M) + esculetin (100 μ M); e, U46619 (0.5 μ M) + esculetin (300 μ M); f, U46619 (0.5 μ M) + esculetin (500 μ M). (B) Effects of esculetin on U46619-induced fibrinogen binding (%). Measurement of fibrinogen binding was described in "Materials and Methods" section. The data are expressed as the mean $\pm$ standard deviation (n=4). # $P < 0.05$ compared with no-stimulated platelets, ** $P < 0.001$ compared with the U46619-stimulated platelets.

Fig. 6. Effects of esculetin on fibrin clot retraction. (A) Effects of esculetin on thrombin-retracted fibrin clot photographs. (B) Effects of esculetin on thrombin-retracted fibrin clot. Quantification of fibrin clot retraction was described in “Materials and Methods” section. The data are expressed as the mean±standard deviation (n=4). [#]*P*<0.05 compared with no-stimulated platelets, ^{*}*P*<0.05 compared with the thrombin-stimulated platelets.

lactate dehydrogenase를 통해 평가하였다. 그 결과, 사람 혈소판에 esculetin(50, 100, 200, 300 μM)의 처리에 의한 유의한 변화가 나타나지 않았다(data not shown). 이 결과는 esculetin이 세포독성 없이 기능한다는 것을 의미한다.

Esculetin이 혈소판 매개 fibrin clot 형성에 미치는 효과

혈전 생성은 혈관의 손상된 부분이 회복되는 과정에서 가장 중요한 단계로, 활성화된 혈소판이 손상부위에 축적되면 30~60분 동안 수축하기 시작하고 생성된 plug를 당김으로써 fibrin clot을 형성시킨다. 이때 αIIb/β₃와 fibrinogen 사이의 상호 작용이 혈소판 매개의 fibrin clot을 형성하는 데 중요한 역할을 하고, αIIb/β₃ 활성을 억제하는 물질은 혈전 형성까지 강하게 억제한다고 보고된 바 있다(Topol 등, 1999). 혈소판 활성화 유도제로 αIIb/β₃의 활성화를 일으키면 fibrinogen의 결합이 증가하고, 시간이 지나면서 αIIb/β₃ 신호전달 경로가 활성화되어 fibrin clot이 형성된다.

본 연구에서는 esculetin이 thrombin으로 유도한 fibrin clot 형성에 어떤 효과를 미치는지 확인하였다. Fig. 6A에 제시한 결과를 보면 thrombin을 처리했을 때 fibrin clot이 강하게 형성되었고, 이를 esculetin이 100 μM 이상의 농도에서 농도 의존적으로 억제할 것을 알 수 있다. Esculetin (100, 300 및 500 μM)의 억제율을 확인해보면 각각 19.6%, 37.1% 및 85.7%로 나타났다(Fig. 6B). 또한, 현재 항혈전제로 사용되고 있는 ticagrelor(10 μM)를 양성대조군으로 함께 측정함으로써 esculetin이 가지는 효과의 신뢰성을 확보하였다. 이러한 결과는 esculetin이 cAMP/cGMP 생성 및 VASP Ser¹⁵⁷/VASP Ser²³⁹ 인산화의 상향조절을 통해 αIIb/β₃를 친화도를 억제함으로써 결과적으로 fibrin clot 형성을 감소시켰음을 보여준다.

요약

Esculetin은 coumarin계 생리활성 6,7-디하이드록시 유도

체로서 비만, 당뇨병, 신부전 및 CVD에 대한 약리학적 활성이 있음이 알려져 있다. 어떤 연구에서는 사람 혈소판 활성화 및 실험적 마우스 모델에서 esculetin의 효과를 확인했으며, esculetin이 세척된 사람 혈소판에서 collagen 및 arachidonic acid로 유도한 혈소판 응집을 억제한 것으로 보고하였다. 그러나 thrombin 및 U46619와 같은 다른 작용제에는 효과가 없는 것으로 확인되었으며, esculetin이 어떤 기전으로 항혈소판 및 항혈전 효과를 가지는지 명확히 밝혀지지 않았다. 본 연구에서는 thromboxane A₂의 유사체 중 하나인 U46619(9,11-dideoxy 9a,11a-methanoepoxy prostaglandin F2a)에 의해 유도된 사람 혈소판을 사용하여 esculetin이 혈소판 기능 조절에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 U46619를 자극유도제로 처리했을 때 혈소판 활성화가 일어났고 U46619에 의해 세포질 내 칼슘 동원과 fibrinogen binding이 증가했다. 그러나 esculetin은 cyclic nucleotides를 상향 조절하였고, 세포질 내 칼슘 동원, 당단백질 IIb/IIIa(αIIb/β₃) 매개의 fibrinogen binding 및 혈전 수축을 농도 의존적으로 하향 조절하였다. 따라서 esculetin이 강력한 항혈소판 및 항혈전 특성을 갖고 있으며, 혈소판 관련 혈전증 및 심혈관 질환을 예방할 수 있는 잠재적인 치료 약물 후보가 될 수 있음을 제안한다.

감사의 글

이 논문은 2021년도 남서울대학교 학술연구비 지원에 의해 연구되었음.

REFERENCES

- Cattaneo M, Tenconi PM, Lecchi A, Mannucci PM. In vitro effects of picotamide on human platelet aggregation, the release reaction and thromboxane B2 production. *Thromb Res*. 1991. 62:717-724.
- Cavallini L, Coassin M, Borean A, Alexandre A. Prostacyclin and sodium nitroprusside inhibit the activity of the platelet

- inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and promote its phosphorylation. *J Biol Chem*. 1996. 271:5545-5551.
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*. 1985. 260:3440-3450.
- Hsia CW, Lin KC, Lee TY, Hsia CH, Chou DS, Jayakumar T, et al. Esculetin, a coumarin derivative, prevents thrombosis: inhibitory signaling on $\text{PLC}\gamma 2$ -PKC-AKT activation in human platelets. *Int J Mol Sci*. 2019. 20:2731. <https://doi.org/10.3390/ijms20112731>
- Jackson SP. Arterial thrombosis—insidious, unpredictable and deadly. *Nat Med*. 2011. 17:1423-1436.
- Jennings LK. Role of platelets in atherothrombosis. *Am J Cardiol*. 2009. 103:4A-10A.
- Kantarcioglu B, Iqbal O, Walenga JM, Lewis B, Lewis J, Carter CA, et al. An update on the pathogenesis of COVID-19 and the reportedly rare thrombotic events following vaccination. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2021. 27:10760296211021498. <https://doi.org/10.1177/10760296211021498>
- Karthika P, Rajadurai M, Ganapathy P, Kanchana G. Preventive effect of esculetin on lipid peroxides and antioxidants in isoproterenol-induced myocardial infarction in Wistar rats. *J Pharm Res*. 2012. 5:915-918.
- Kuo JF, Andersson RG, Wise BC, Mackerlova L, Salomonsson I, Brackett NL, et al. Calcium-dependent protein kinase: widespread occurrence in various tissues and phyla of the animal kingdom and comparison of effects of phospholipid, calmodulin, and trifluoperazine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980. 77:7039-7043.
- Laurent V, Loisel TP, Harbeck B, Wehman A, Gröbe L, Jockusch BM, et al. Role of proteins of the Ena/VASP family in actin-based motility of *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol*. 1999. 144:1245-1258.
- Liang C, Ju W, Pei S, Tang Y, Xiao Y. Pharmacological activities and synthesis of esculetin and its derivatives: a mini-review. *Molecules*. 2017. 22:387. <https://doi.org/10.3390/molecules22030387>
- Morello F, Perino A, Hirsch E. Phosphoinositide 3-kinase signaling in the vascular system. *Cardiovasc Res*. 2009. 82:261-271.
- Napeñas JJ, Oost FCD, DeGroot A, Loven B, Hong CHL, Brennan MT, et al. Review of postoperative bleeding risk in dental patients on antiplatelet therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2013. 115:491-499.
- Phillips DR, Nannizzi-Alaimo L, Prasad KS. Beta3 tyrosine phosphorylation in $\alpha \text{IIb}\beta 3$ (platelet membrane GP IIb/IIIa) outside-in integrin signaling. *Thromb Haemost*. 2001. 86:246-258.
- Quinton TM, Dean WL. Cyclic AMP-dependent phosphorylation of the inositol-1,4,5-trisphosphate receptor inhibits Ca^{2+} release from platelet membranes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992. 184:893-899.
- Sabatine MS, Jang IK. The use of glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in patients with coronary artery disease. *Am J Med*. 2000. 109:224-237.
- Schwarz UR, Walter U, Eigenthaler M. Taming platelets with cyclic nucleotides. *Biochem Pharmacol*. 2001. 62:1153-1161.
- Shin JH, Kwon HW, Lee DH. Ginsenoside F4 inhibits platelet aggregation and thrombus formation by dephosphorylation of IP_3RI and VASP. *J Appl Biol Chem*. 2019. 62:93-100.
- Su CY, Shiao MS, Wang CT. Differential effects of ganodermic acid S on the thromboxane A_2 -signaling pathways in human platelets. *Biochem Pharmacol*. 1999. 58:587-595.
- Sudo T, Ito H, Kimura Y. Phosphorylation of the vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) by the anti-platelet drug, cilostazol, in platelets. *Platelets*. 2003. 14:381-390.
- Topol EJ, Byzova TV, Plow EF. Platelet GP IIb/IIIa blockers. *Lancet*. 1999. 353:227-231.
- Varga-Szabo D, Braun A, Nieswandt B. Calcium signaling in platelets. *J Thromb Haemost*. 2009. 7:1057-1066.
- Wangorsch G, Butt E, Mark R, Hubertus K, Geiger J, Dandekar T, et al. Time-resolved *in silico* modeling of fine-tuned cAMP signaling in platelets: feedback loops, titrated phosphorylations and pharmacological modulation. *BMC Syst Biol*. 2011. 5:178. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-5-178>