PI3K/MAPK 경로 조절을 통한 Isoscapoletin의 U46619 유도의 혈소판 응집 억제 효과

박창은 · 이동하

남서울대학교 임상병리학과 · 분자진단연구소

Isoscapoletin Inhibits U46619-Induced Platelet Aggregation by Regulating PI3K/MAPK Pathway

Chang-Eun Park and Dong-Ha Lee

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

ABSTRACT When blood vessels are damaged, platelet activation and aggregation reactions are essential for the hemostasis process. On the other hand, abnormal or excessive platelet aggregation can cause cardiovascular disease. Therefore, it is important to find a substance that can inhibit platelet aggregation for the prevention and treatment of cardiovascular disease. This study examined the effects of isoscapoletin on U46619-induced human platelet aggregation and the effect on TXA₂ production and granule secretion, including ATP and serotonin, which are the major controls. Furthermore, this study examined the effects of isoscapoletin on the regulation of PI3K/Akt and MAPK, which are phosphoproteins that act in the signaling process in platelet aggregation. As a result, isoscapoletin inhibited the phosphorylation of PI3K, Akt, and MAPK, which dose-dependently inhibited platelet aggregation via TXA₂ production and decreased intracellular granule secretion, including ATP and serotonin. This paper proposes isoscapoletin as an antiplatelet substance that regulates the phosphorylation of PI3K/Akt and MAPK, which is valuable as a prophylactic and therapeutic agent for cardiovascular diseases derived from platelets.

Key words: isoscapoletin, platelet aggregation, PI3K/Akt, granule secretion

서 론

혈액은 조직과 장기에 산소와 영양분을 공급하고 노폐물을 제거하는 역할을 담당하고 있으며, 이를 위해 정상적인 혈액 순환이 필수적이다. 혈관이 손상된 경우 출혈을 최소화하고 혈액 순환을 유지하기 위한 지혈 반응이 일어나는데, 혈소판의 활성화와 응집반응으로부터 이 과정이 시작된다(Jackson, 2011). 그러나 혈소판의 과도하거나 비정상적인 활성화와 응집은 뇌졸중, 심근경색, 죽상 동맥 경화증을 포함한 다양한 심혈관 질환을 유발할 위험성이 있다(Schwartz 등, 1990). 따라서 혈소판 활성화를 조절하여 응집을 억제시킬 수 있는 물질을 탐색하는 것은 심혈관 질환의 예방이나 치료에 매우 중요하다(Schwartz 등, 1990). 혈관의 손상이 발생할 때 다량의 혈소판이 손상 부위로 모이고 혈소판 활성

화 유도제(ADP, thrombin, collagen 등)에 의해 활성화된다. 이때 활성화되는 phospholipase C가 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate를 inositol 1,4,5-triphosphate(IP₃)와 diacylglycerol(DG)로 가수 분해하고, 생성된 IP₃는 혈소판의 dense tubular system에 위치한 Ca²⁺ 채널을 열어서 Ca²⁺의 농도가 증가한다(Payraastre 등, 2000). 또한, 혈소판이 활성화되면 세포질 막 인지질이 가수 분해되어 방출된 arachidonic acid가 TXA₂(Thromboxane A₂) synthase와 cyclooxygenase-1(COX-1)의 효소 작용에 의해 TXA₂로 전환되어 혈소판에서 분비된다(Morello 등, 2009; Jennings, 2009). 방출된 TXA₂는 다른 혈소판 막 수용체와의 결합을 통해 혈소판 응집을 지속적으로 증폭시키는 작용제 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Sabatine과 Jang, 2000). 또한, TXA₂의 유사체인 U46619(9,11-dideoxy-9a,11a-methanoepoxy prostaglandin F_{2a})는 세포질에서 Ca²⁺의 수준을 높이고, 세포 골격 단백질인 myosin light chain 및 pleckstrin을 인산화하여 혈소판 응집을 유도하는 것으로 보고되고 있다(Cattaneo 등, 1991; Su 등, 1999).

Mitogen-activated protein kinases(MAPK)는 세포 내 신호전달 작용을 하는 것으로 알려진 인산화 효소로 c-Jun

Received 16 Dec 2020; Revised 23 Feb 2021; Accepted 23 Feb 2021
Corresponding author: Dong-Ha Lee, Department of Biomedical Laboratory Science, 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)

N-terminal kinase(JNK), extracellular signal-regulated kinase(ERK) 및 p38로 분류되고 있으며 그 역할에 대해서는 꾸준히 연구되고 있다(Adam 등, 2008). JNK, ERK 및 p38의 MAPK는 사람 혈소판에서 검출되며, 혈소판이 유도될 때 여러 단백질의 인산화 작용을 거치며 활성화된다고 보고되고 있다(Bugaud 등, 1999; Kramer 등, 1995; Nadal-Wollbold 등, 2002). 특히, 혈소판에서 MAPK의 인산화가 혈소판의 과립 분비에 있어서 중요한 역할을 한다고 보고되어 있다(Patrono, 1994; Flevaris 등, 2009). 또한, MAPK는 세포막에서 cytosolic phospholipases A₂(cPLA₂)를 강하게 인산화하여 혈소판 막의 인지질로부터 아라키돈산을 생성 및 분비하고, TXA₂로의 전환을 통해 주변 혈소판의 활성화 및 응집을 증폭시킨다(Kramer 등, 1996; McNicol과 Shibou, 1998). 또한, 혈소판에서 phosphoinositide 3-kinase(PI3K) 및 Akt 경로는 과립 분비 및 혈소판 응집을 포함한 혈소판 기능을 조절하는 데 중요한 역할을 한다(Chuang 등, 2013).

주로 *Scopolia* 또는 *Artemisia* 속의 식물 뿌리가 함유하고 있다고 알려진 isoscapoletin은 암과 알츠하이머병에 도움이 되는 약리학적 특성들이 보고되었다(Ali 등, 2016; Dong 등, 2017). 이전 연구에 따르면, isoscapoletin과 유사한 구조의 성분물질인 scoparone이 PI3K/Akt/nuclear factor- κ B(NF- κ B) 경로를 조절하면서 interleukin-1 β (IL-1 β)가 매개하는 염증 반응을 저해한다고 보고되었다(Huang 등, 1991; Huang 등, 1992; Lu 등, 2018). 그러나 사람의 혈소판 응집에서 isoscapoletin의 역할과 작용 기전은 명확하게 알려지지 않았다. 본 연구에서는 U46619 유도의 혈소판 응집과 이 반응을 일으키는 주요 인자인 TXA₂ 생성, 과립 분비, PI3K/Akt와 MAPK 같은 인산화 단백질에 미치는 isoscapoletin의 효과를 확인하기 위해 실시하였다.

재료 및 방법

시료

Isoscapoletin(6-hydroxy-7-methoxy-2H-chromen-2-one)은 Avention Co.(Incheon, Korea)에서 제공받았다(Fig. 1). U46619는 Chrono-Log Corporation(Havertown, PA, USA)에서 공급받았다. Cayman Chemical Co.(Ann Arbor, MI, USA)에서 ATP 측정 kit 및 serotonin enzyme immunoassay(EIA) kit, TXB₂ EIA kit을 제공하였다.

Fig. 1. The structure of isoscapoletin. PIN: 6-hydroxy-7-methoxy-2H-chromen-2-one, chemical formula: C₁₀H₈O₄, molar mass: 192.17 g/mol.

다. 다른 시약들은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 공급받았다. Western blotting에 필요한 항체 및 lysis buffer를 Cell Signaling(Beverly, MA, USA)에서 공급받았다. Polyvinylidene difluoride(PVDF) membrane과 enhanced chemiluminescence 시약(ECL)은 General Electric Healthcare(Chalfont St. Giles, Buckinghamshire, UK)에서 제공하였다.

사람 세척 혈소판 부유액의 준비

대한적십자사 경기혈액원(Suwon, Korea)은 사람 혈소판 풍부 혈장(platelet rich plasma, PRP)을 제공하였다. Shin 등(2019)의 방법에 따라 세척 혈소판은 이전에 수행한 방법에 따라 준비하였다. PRP를 1,300×g에서 10분간 원심 분리하여 혈소판을 얻은 다음 세척 완충액(138 mM NaCl, 12 mM NaHCO₃, 5.5 mM glucose, 2.7 mM KCl, 1 mM Na₂EDTA 및 0.36 mM NaH₂PO₄, pH 6.9)으로 두 번 세척하였다. 세척 혈소판은 10⁸ cells/mL의 최종농도가 되도록 현탁 완충액(138 mM NaCl, 12 mM NaHCO₃, 5.5 mM glucose, 2.7 mM KCl, 0.36 mM NaH₂PO₄ 및 0.25% gelatin, pH 7.4)으로 현탁하였다. 모든 절차는 혈소판이 저온에서 자가 응집되는 특성을 고려하여 실온에서 수행하였고, 이 실험은 남서울대학교 생명윤리 심의위원회(IRB)의 승인을 받아 이루어졌다(1041479-HR-201803-003).

사람 혈소판 응집반응의 측정

위에서 준비한 세척 혈소판(10⁸ cells/mL)에 여러 농도의 isoscapoletin을 첨가하여 37°C에서 3분 동안 배양한 다음, 2 mM CaCl₂를 첨가하여 0.5 μ M U46619로 5분 동안 자극하였다. 실험은 혈소판 응집기(Chrono-Log Corporation)를 사용하여 1,000 rpm 교반 속도에서 측정하였고 광 투과율의 정도에 따라 응집률을 계산하였다. 현탁 완충액의 현탁 투과율 0%를 기준 값으로 사용하였다. Isoscapoletin을 최종 0.1% dimethyl sulfoxide(DMSO)가 되도록 용해하였고, 모든 실험에서 동일한 용량의 DMSO를 첨가하여 수행하였다.

세포독성의 측정

세포독성은 세포질로 분비된 lactate dehydrogenase(LDH)를 확인하여 측정하였다. 사람의 세척 혈소판에 여러 농도의 isoscapoletin을 첨가하여 실온에서 1시간 동안 배양한 후, 12,000×g에서 2분간 원심분리하여 상층을 얻었다. 상층액을 LDH 측정 kit(Cayman Chemical Co.)을 사용하여 synergy HT multi-reader(BioTek Instruments, Winooski, VT, USA)로 측정하였다.

TXB₂ 생성량의 측정

TXA₂는 불안정한 물질이기에 안정적인 대사산물인 TXB₂를 측정함으로써 TXA₂의 생성량을 확인할 수 있다. 세척

혈소판에 여러 농도의 isoscapoletin을 첨가하여 37°C에서 3분 동안 배양한 다음, 2 mM CaCl₂를 첨가하여 0.5 μ M U46619로 5분 동안 자극하였다. Ice-cold 2 mM EDTA 및 0.2 mM indomethacin이 함유된 반응 정지액을 첨가하여 반응을 정지시킨 후, TXB₂ EIA kit을 이용하여 synergy HT multi-model microplate 효소면역측정기(BioTek Instruments)에서 측정하였다.

ATP 및 serotonin 방출량의 측정

세척 혈소판에 다양한 농도의 isoscapoletin을 첨가하여 37°C에서 3분 동안 배양한 다음, 2 mM CaCl₂를 첨가하여 0.5 μ M U46619로 5분 동안 자극하였다. 2 mM EDTA를 첨가하여 반응을 정지한 후 원심분리하여 상층을 모은다. 상층액에 분비되어 나온 ATP 또는 serotonin을 ATP 또는 serotonin 측정 kit을 이용하여 synergy HT multiplate 효소면역측정기(BioTek Instruments)에서 측정하였다.

Western blot으로 phosphoprotein 인산화의 측정

1×lysis buffer를 첨가함으로써 혈소판 응집반응을 정지시켰다. 혈소판 용해물의 단백질 농도를 BCA protein 측정 kit(Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)을 이용하여 확인하였다. 단백질을(20 μ g)을 8% SDS-PAGE에서 분리한 다음 PVDF 막으로 옮겼다. 1차 항체는 희석 계수 1:1,000으로 처리하고, 2차 항체는 희석 계수 1:2,000으로 처리하였다. ECL 시약(General Electric Healthcare)으로 반응하여 단백질을 시각화하였고, Quantity One, Ver 4.5(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 통해 band를 정량하였다.

통계분석

평균±표준편차가 실험 결과를 나타내는 데 사용되었다. Western blot 결과는 SPSS(ver. 25, IBM, Armonk, NY, USA)를 이용하여 ANOVA로 분석하였다. 나머지 결과들은 microsoft excel(Redmond, WA, USA)에서 제공하는 Student's t-test를 통해 분석되었으며, $P < 0.05$ 및 $P < 0.001$ 인 경우 통계적으로 유의미한 결과로 간주하였다. 분산분석을 통해 그룹 평균 사이에 유의성이 나타나는 경우에는 Scheffe의 방법으로 그룹을 비교 분석하였다.

결 과

U46619 유도의 혈소판 응집에 미치는 isoscapoletin의 효과

혈소판 응집을 유도하는 TXA₂ 유사체인 U46619의 최대 응집을 일으키는 농도가 0.5 μ M로 확인되었기에 0.5 μ M의 U46619를 사용하여 혈소판 응집을 유도하였다(Fig. 2A). 혈소판을 0.5 μ M U46619로 유도하였을 때 응집률은 80.5 ± 2.1%였다. Isoscapoletin을 다양한 농도(50, 100, 200, 300 μ M)로 전처리하여 응집을 유도할 때 응집이 58.0 ± 6.5, 37.3 ± 13.9, 10.0 ± 1.2, 5.5 ± 2.1%로 각각 억제되었고(Fig.

2B), isoscapoletin의 half-maximal inhibitory concentration(IC₅₀)은 88.43 μ M로 확인되었다(Fig. 2C). 또한, isoscapoletin이 혈소판에 세포독성을 가지지 않는 것을 확인하였다(Fig. 2D). 이 결과들은 isoscapoletin이 세포독성 없이 혈소판 응집 억제 효과를 가진다는 것을 보여준다.

Isoscapoletin이 TXA₂ 생성에 미치는 효과

TXA₂는 혈소판에서 방출되어 다른 혈소판을 자극하여 응집을 증폭시키는 autacoid이다. Isoscapoletin이 TXA₂의 생성에 미치는 효과를 확인하였다. Fig. 3에 나타난 바와 같이 TXA₂ 생성은 U46619에 유도되지 않은 혈소판에서 2.97 ± 0.81 ng/10⁸ cells였지만 U46619로 유도하였을 때 48.93 ± 5.41 ng/10⁸ cells로 증가하였다. 그러나 isoscapoletin(50, 100, 200, 300 μ M)에 의해 TXA₂ 생성이 28.21 ± 7.28, 20.11 ± 1.87, 12.20 ± 2.92, 8.67 ± 3.42 ng/10⁸ cells로 유의하게 감소하였다($P < 0.05$).

Isoscapoletin이 과립 분비(ATP & serotonin)에 미치는 효과

Isoscapoletin이 혈소판의 과립 방출을 나타내는 지표인 ATP 및 serotonin의 방출에 미치는 효과를 확인하였다. Fig. 4A에서 보는 바와 같이 0.5 μ M U46619는 ATP 방출을 0.21 ± 0.02 μ M에서 7.74 ± 0.17 μ M로 증가시켰지만, isoscapoletin(50, 100, 200, 300 μ M)은 증가한 ATP의 방출을 7.50 ± 0.24, 5.20 ± 0.23, 3.80 ± 0.11 및 1.30 ± 0.03 μ M로 각각 억제하였다. 또한, 0.5 μ M U46619는 serotonin 방출을 8.65 ± 0.58 ng/10⁸ cells에서 150.36 ± 1.30 ng/10⁸ cells로 강하게 증가시켰다. 그러나 isoscapoletin(50, 100, 200, 300 μ M)은 U46619에 의해 방출이 증가한 serotonin을 각각 149.87 ± 15.37, 128.08 ± 4.87, 84.03 ± 3.33 및 49.91 ± 2.53 ng/10⁸ cells로 억제하였다(Fig. 4B). 이러한 결과는 isoscapoletin이 혈소판의 과립 분비를 억제하는 데 효과적이라고 판단된다.

Isoscapoletin이 PI3K/Akt의 인산화에 미치는 효과

Isoscapoletin이 혈소판의 과립 방출에 관여하는 인산화 단백질로 알려진 PI3K/Akt의 인산화에 미치는 효과를 확인하였다. Fig. 5에서 볼 수 있듯이 U46619는 intact cell보다 PI3K/Akt의 인산화를 크게 증가시켰다. 그러나 U46619에 의해 증가하였던 PI3K/Akt의 인산화가 isoscapoletin에 의해 현저하게 감소하였다(Fig. 5). 이 결과를 통해 isoscapoletin이 U46619에 의해 촉진되는 PI3K/Akt의 인산화를 효과적으로 억제한다는 것을 확인하였다.

Isoscapoletin이 MAPK의 인산화에 미치는 효과

Isoscapoletin이 혈소판의 과립 방출 및 TXA₂ 생성과 관련된 MAPK의 인산화에 미치는 효과를 확인하였다. Fig. 6에서 볼 수 있듯이 U46619는 intact cell에 비해 JNK 및 p38

Fig. 2. Effects of isoscoipoletin on U46619-induced platelet aggregation. (A) Concentration threshold of U46619 on platelet aggregation. (B) Effects of isoscoipoletin pretreatment on U46619-induced platelet aggregation. (C) IC_{50} value of isoscoipoletin on U46619-induced platelet aggregation. (D) Cytotoxicity of isoscoipoletin on human platelets. Data are expressed as mean $\pm$ SD (n=4). * P <0.05, ** P <0.001 compared with the U46619-induced platelets.

Fig. 3. Effects of isoscoipoletin on TXA₂ production. Measurement of TXA₂ production was described in the materials and methods part. Data are expressed as mean $\pm$ SD (n=4). # P <0.05 compared with no-stimulated platelets, * P <0.05, ** P <0.001 compared with the U46619-induced platelets.

의 인산화를 강하게 증가시켰고, ERK의 인산화에는 큰 영향을 미치지 않았다. 그러나 isoscoipoletin은 U46619에 의해 증가된 JNK와 p38의 인산화를 억제하였다(Fig. 6). 이 결과를 통해 isoscoipoletin이 MAPK 중에서 JNK 및 p38의 인산화를 저해시킴으로써 혈소판 세포의 신호전달 과정을 조절하는 것을 확인하였다.

고 찰

혈소판에 응집에 관련하여 isoscoipoletin의 억제 효과 및 인산화 단백질과 같은 신호전달 물질에 미치는 효과가 잘 알려져 있지 않기에, 본 연구는 U46619가 유도한 혈소판에서 isoscoipoletin이 어떤 효과를 가지는지 명확히 확인하고자

Fig. 4. Effects of isoscoipoletin on granule secretion. (A) Effects of isoscoipoletin on ATP release. (B) Effects of isoscoipoletin on serotonin release. Measurement of granule secretion was described in the materials and methods part. Data are expressed as mean±SD (n=4). [#]*P*<0.05 compared with no-stimulated platelets, **P*<0.05, ***P*<0.001 compared with the U46619-induced platelets.

실시하였다.

PI3K/Akt 경로는 혈소판이 활성화될 때 세포 내 신호전달 중에 작용하는 인산화 단백질로 알려져 있으며, 이들 단백질의 인산화는 혈소판 응집 및 dense 과립 분비를 포함하여 혈소판 기능 조절에 중요한 역할을 한다(Chuang 등, 2013). 또한, MAPK는 ERK, JNK 및 p38을 포함한 인산화 효소로 혈소판 활성화 및 응집에 관여하는 것으로 알려져 있다(Adam 등, 2008). MAPK는 사람 혈소판에 존재하며 혈소판이 여러 활성화 작용제에 의해 활성화될 때 인산화를 통해 활성을 띠는 것으로 보고되었다(Bugaud 등, 1999; Kramer 등, 1995; Nadal-Wollbold 등, 2002). 선행연구(Chang 등, 2011)에 의하면, p38 등의 MAPK의 인산화가 TXA₂의 전구체로 알려진 arachidonic acid의 분비와 TXA₂의 생성에 중요하며 혈소판 응집반응과 관련이 있다고 보고되었다. 혈소판 억제 활성화에 대한 물질을 평가할 때 TXA₂ 생성에 미치는 효과를 중요한 지표로 확인하는데, 이는 TXA₂가 다른 혈소판을 더 활성화하고 응집시키는 강력한 autacoid로 작용하기 때문이다. 실제로 TXA₂ 생성을 억제하는 물질들이 항혈소판제로 알려져 있으며, 예를 들어 aspirin 및 ozagrel과 같은 제제가 유용하게 이용된다(Cipoll-

one 등, 1997; Patrono, 2001).

본 연구에서 isoscoipoletin은 U46619로 유도한 혈소판 응집을 농도 의존적으로 억제하였고, 88.43 μM이 IC₅₀로 확인되었다. 이는 isoscoipoletin과 유사하게 *Artemisia* 및 *Scopolia* 속 식물의 뿌리에서 추출할 수 있는 물질로 알려진 scoipoletin이 가지는 U46619 유도의 혈소판 응집 억제 효과(IC₅₀=326.3 μM)에 비해 3배 이상 강한 것으로 보인다(Lee, 2019). 또한, 본 연구에서는 isoscoipoletin이 혈소판 응집의 중요한 지표인 TXB₂ 생성 및 과립 분비(ATP 또는 serotonin 방출)에 미치는 영향을 측정하였고, PI3K/Akt 및 MAPK의 인산화와의 관계를 규명하고자 실시하였다. 그 결과, isoscoipoletin이 U46619에 의해 크게 증가한 TXB₂의 생성을 강하게 억제하였다. TXA₂는 안정적이지 않은 물질로서 30초 이내에 물 분자와 결합한 형태인 TXB₂로 수화되기 때문에(Yokomizo, 2015), 이 결과는 isoscoipoletin이 TXA₂ 생성을 억제하는 작용이 있음을 그대로 보여준다. 또한, isoscoipoletin은 혈소판에서 과립 분비의 지표인 ATP 및 serotonin의 방출을 농도 의존적으로 감소시켰다(Fig. 4). 과립 분비는 혈소판 활성화를 촉진하고 순환하는 혈소판을 손상된 혈관으로 동원함으로써 혈전이 형성되는 데 있어

Fig. 5. Effects of isoscoipoletin on PI3K/Akt phosphorylation. (A) Western blotting band on PI3K/Akt phosphorylation. (B) Effects of isoscoipoletin on PI3K/Akt phosphorylation. Western blotting was determined as described in the materials and methods part. Data are expressed as mean $\pm$ SD (n=4). [#] $P<0.05$ compared with no-stimulated platelets, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.001$ compared with the U46619-induced platelets.

서 중요하게 작용한다고 알려져 있다(Calderwood, 2004). 본 연구에서 isoscoipoletin은 U46619로 유도한 혈소판의 dense 과립에서 ATP 방출 및 serotonin 방출을 감소시킴으로써 혈소판의 활성화와 이를 통한 혈전 형성을 억제하는데 기여한다고 판단된다.

PI3K는 GPVI 또는 $\alpha IIb\beta_3$ 에 의해 시작된 tyrosin 인산화 기반의 신호전달 경로를 통해 혈소판 활성화와 응집에 관여하며(Senis 등, 2014), MAPK는 인산화될 때 내부에서 외부로의 신호전달을 통한 혈소판 응집을 증폭시키는 데 중요하게 작용한다고 알려져 있다(Adam 등, 2010). 최근 *Rumex acetosa* 추출물이 혈소판 활성화 억제를 통하여 혈전 형성 억제에 기여한다고 보고한 연구(Jeong 등, 2020)에서는 *Rumex acetosa* 추출물이 PI3K-Akt 경로를 차단하고 MAPK의 인산화를 억제한다는 결과를 확인한 것을 알 수 있다. 본 연구에서도 isoscoipoletin이 신호전달 물질로서 과립 분비를 조절하는 인산화 단백질인 PI3K/Akt 및 MAPK의 인산화를 유의하게 억제하는 것을 확인하였다. 특히 MAPK 중 ERK의 경우, U46619에 의해 유의하게 인산화가 일어나지 않았고 isoscoipoletin에 의한 저해 효과도 나타나지 않았다(Fig. 6). 혈소판 응집의 억제를 나타내는 물질이 가지는 ERK 인산화 저해 정도가 JNK 및 p38보다 약하게 나타나는 경향이 있고, ERK의 억제는 사람 혈소판 응집과 관련되지

않는다고 보고된 바 있다(Irfan 등, 2019; McNicol과 Jackson, 2003). 따라서 isoscoipoletin은 MAPK 중에서 JNK 및 p38의 인산화를 조절하여 사람 혈소판의 응집을 억제하며, MAPK가 사람 혈소판 응집에 있어서 어떤 역할을 하는지에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 판단된다. 또한, 본 연구를 통해 isoscoipoletin은 PI3/Akt 및 MAPK 경로를 조절함으로써 TXA₂ 생성 및 과립 분비를 감소시켜 혈소판 응집을 억제하는 것이 확인되었다.

본 연구 결과를 종합해볼 때, isoscoipoletin은 PI3K/Akt 및 MAPK 경로의 인산화를 조절하는 항혈소판제로서 가치가 있음을 규명하였다. 또한, 본 연구를 통해 isoscoipoletin은 혈소판 응집이 매개하는 심혈관 질환의 효과적인 치료제 또는 예방제로 개발될 수 있음을 제안한다.

요 약

혈관이 손상되면 출혈을 최소화하고 정상적인 순환을 유지하기 위해 빠른 지혈 반응이 일어나야 하는데 초기반응에서 혈소판 활성화 및 응집이 필수적이다. 그러나 비정상적이거나 과도한 혈소판 응집은 혈전증, 동맥 경화증 및 뇌졸중과 같은 심혈관 질환의 원인으로 작용하기도 한다. 따라서 심혈관 질환의 예방 및 치료를 위해서는 혈소판의 활성을 조절하

Fig. 6. Effects of isoscooletin on MAPK phosphorylation. (A) Western blotting band on MAPK phosphorylation. (B) Effects of isoscooletin on MAPK phosphorylation. Western blotting was determined as described in the materials and methods part. Data are expressed as mean±SD (n=4). [#]*P*<0.05 compared with no-stimulated platelets, ^{*}*P*<0.05, ^{**}*P*<0.001 compared with the U46619-induced platelets.

여 혈소판 응집을 저해시킬 수 있는 물질을 찾는 것이 중요하다. 일반적으로 *Scopolia* 또는 *Artemisia* 속의 식물 뿌리가 함유하는 isoscooletin은 알츠하이머병과 암에 대한 약리학적 효과가 보고되어 있지만 혈소판 응집 및 그 기전에 대한 효과는 불명확한 실정이다. 본 연구는 U46619에 의해 유도된 사람 혈소판 응집에 대한 isoscooletin의 효과와 TXA₂ 생성, ATP 및 serotonin을 포함한 과립 분비에 미치는 영향을 연구하였다. 또한, 혈소판 응집에서 신호전달 과정에서 작용되는 인산화 단백질인 PI3K/Akt 및 MAPK 경로의 조절에 대한 isoscooletin의 효과를 살펴보았다. 그 결과, isoscooletin은 PI3K/Akt 및 MAPK의 인산화를 억제하여 TXA₂ 생성을 통한 혈소판 활성화를 억제하였고, ATP 및 serotonin을 포함한 세포 내 과립 분비를 감소시켰으며 최종적으로 혈소판 응집을 농도 의존적으로 억제시켰다. 따라서 본 연구는 isoscooletin이 PI3K/Akt 및 MAPK의 인산화를 조절하는 항 혈소판 물질이며, 혈소판 유래 심혈관 질환의 예방 및 치료제로 가치가 있다고 판단된다.

감사의 글

이 논문은 2021년도 남서울대학교 학술연구비 지원에 의해 연구되었음.

REFERENCES

- Adam F, Kauskot A, Nurden P, Sulpice E, Hoylaerts MF, Davis RJ, et al. Platelet JNK1 is involved in secretion and thrombus formation. *Blood*. 2010. 115:4083-4092.
- Adam F, Kauskot A, Rosa JP, Bryckaert M. Mitogen-activated protein kinases in hemostasis and thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2008. 6:2007-2016.
- Ali MY, Jannat S, Jung HA, Choi RJ, Roy A, Choi JS. Anti-Alzheimer's disease potential of coumarins from *Angelica decursiva* and *Artemisia capillaris* and structure-activity analysis. *Asian Pac J Trop Med*. 2016. 9:103-111.
- Bugaud F, Nadal-Wollbold F, Lévy-Toledano S, Rosa JP, Bryckaert M. Regulation of c-jun-NH2 terminal kinase and extracellular-signal regulated kinase in human platelets. *Blood*. 1999. 94:3800-3805.
- Calderwood DA. Integrin activation. *J Cell Sci*. 2004. 117:657-666.

- 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.
- Chang MC, Wang TM, Yeung SY, Jeng PY, Liao CH, Lin TY, et al. Antiplatelet effect by *p*-cresol, a uremic and environmental toxicant, is related to inhibition of reactive oxygen species, ERK/p38 signaling and thromboxane A₂ production. *Atherosclerosis*. 2011. 219:559-565.
- Chuang WY, Kung PH, Kuo CY, Wu CC. Sulforaphane prevents human platelet aggregation through inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Thromb Haemost*. 2013. 109:1120-1130.
- Cipollone F, Patrignani P, Greco A, Panara MR, Padovano R, Cuccurullo F, et al. Differential suppression of thromboxane biosynthesis by indobufen and aspirin in patients with unstable angina. *Circulation*. 1997. 96:1109-1116.
- Dong J, Yuan J, Wang JL, Ji RF, Quan QH, Guo XY, et al. Study on screening antitumor active fractions and chemical components in active fractions from root of *Anayecclus pyrethrum*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2017. 42:3932-3937.
- Flevaris P, Li Z, Zhang G, Zheng Y, Liu J, Du X. Two distinct roles of mitogen-activated protein kinases in platelets and a novel Rac1-MAPK-dependent integrin outside-in retractile signaling pathway. *Blood*. 2009. 113:893-901.
- Huang HC, Chu SH, Chao PDL. Vasorelaxants from Chinese herbs, emodin and scoparone, possess immunosuppressive properties. *Eur J Pharmacol*. 1991. 198:211-213.
- Huang HC, Lee CR, Weng YI, Lee MC, Lee YT. Vasodilator effect of scoparone (6,7-dimethoxycoumarin) from a Chinese herb. *Eur J Pharmacol*. 1992. 218:123-128.
- Irfan M, Jeong D, Saba E, Kwon HW, Shin JH, Jeon BR, et al. Gintonin modulates platelet function and inhibits thrombus formation via impaired glycoprotein VI signaling. *Platelets*. 2019. 30:589-598.
- 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.
- Jeong D, Irfan M, Lee DH, Hong SB, Oh JW, Rhee MH. *Rumex acetosa* modulates platelet function and inhibits thrombus formation in rats. *BMC Complement Med Ther*. 2020. 20:98. <https://doi.org/10.1186/s12906-020-02889-5>
- Kramer RM, Roberts EF, Striffler BA, Johnstone EM. Thrombin induces activation of p38 MAP kinase in human platelets. *J Biol Chem*. 1995. 270:27395-27398.
- Kramer RM, Roberts EF, Um SL, Börsch-Haubold AG, Watson SP, Fisher MJ, et al. p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylates cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂) in thrombin-stimulated platelets. Evidence that proline-directed phosphorylation is not required for mobilization of arachidonic acid by cPLA₂. *J Biol Chem*. 1996. 271:27723-27729.
- Lee DH. Inhibitory effect of scopoletin on U46619-induced platelet aggregation through regulation of Ca²⁺ mobilization. *Biomed Sci Lett*. 2019. 25:123-130.
- Lu C, Li Y, Hu S, Cai Y, Yang Z, Peng K. Scoparone prevents IL-1 β -induced inflammatory response in human osteoarthritis chondrocytes through the PI3K/Akt/NF- κ B pathway. *Biomed Pharmacother*. 2018. 106:1169-1174.
- McNicol A, Jackson ECG. Inhibition of the MEK/ERK pathway has no effect on agonist-induced aggregation of human platelets. *Biochem Pharmacol*. 2003. 65:1243-1250.
- McNicol A, Shibou TS. Translocation and phosphorylation of cytosolic phospholipase A₂ in activated platelets. *Thromb Res*. 1998. 92:19-26.
- Morello F, Perino A, Hirsch E. Phosphoinositide 3-kinase signaling in the vascular system. *Cardiovasc Res*. 2009. 82:261-271.
- Nadal-Wollbold F, Pawlowski M, Lévy-Toledano S, Berrou E, Rosa JP, Bryckaert M. Platelet ERK2 activation by thrombin is dependent on calcium and conventional protein kinases C but not Raf-1 or B-Raf. *FEBS Lett*. 2002. 531:475-482.
- Patrono C. Aspirin as an antiplatelet drug. *N Engl J Med*. 1994. 330:1287-1294.
- Patrono C. Aspirin: new cardiovascular uses for an old drug. *Am J Med*. 2001. 110:S62-S65.
- Payrastre B, Missy K, Trumel C, Bodin S, Plantavid M, Chap H. The integrin α IIb/3 in human platelet signal transduction. *Biochem Pharmacol*. 2000. 60:1069-1074.
- Sabatine MS, Jang IK. The use of glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in patients with coronary artery disease. *Am J Med*. 2000. 109:224-237.
- Schwartz SM, Heimark RL, Majesky MW. Developmental mechanisms underlying pathology of arteries. *Physiol Rev*. 1990. 70:1177-1209.
- Senis YA, Mazharian A, Mori J. Src family kinases: at the forefront of platelet activation. *Blood*. 2014. 124:2013-2024.
- Shin JH, Kwon HW, Lee DH. Ginsenoside F4 inhibits platelet aggregation and thrombus formation by dephosphorylation of IP₃RI 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 A₂-signaling pathways in human platelets. *Biochem Pharmacol*. 1999. 58:587-595.
- Yokomizo T. Two distinct leukotriene B₄ receptors, BLT1 and BLT2. *J Biochem*. 2015. 157:65-71.