

Inhibitory Effect of Cordycepin on Human Platelet Aggregation

Hyun-Jeong Cho¹, Hye-Seon Ham², Tae-Kyung Lee¹, Young-Jin Jung¹, Sun-A Choi¹,
Hyo-Chan Kang¹ and Hwa-Jin Park^{1†}

¹Department of Biomedical Laboratory Science, College of Biomedical Science and Engineering, Inje University, 607, Obangdong, Gimhae, Gyungnam 621-749, Korea, ²Cancer Research Institute, Seoul National University, College of Medicine Yeongeon-dong, Jongno-gu, Seoul, Korea

Cordycepin separated from *Cordyceps militaris* is a major physiologic active component in *Cordyceps militaris*. The platelet aggregation is stimulated by Ca²⁺, which is either mobilized from intracellular endoplasmic reticulum or transported from extracellular space. cGMP antagonizes the actions of Ca²⁺. Based on these facts, we have investigated the effects of cordycepin on the mobilization of Ca²⁺ and the production of cGMP on collagen (10 µg/ml)-induced human platelet aggregation. Cordycepin potently stimulated the human platelet aggregation induced by collagen (10 µg/ml) in a dose-dependent manner. Cordycepin (500 µM) inhibited also the collagen-induced human platelet aggregation in the presence both 1 mM and 2 mM of CaCl₂. These are in accord with the results that cordycepin inhibited the Ca²⁺-influx on collagen-induced human platelet aggregation. These results suggest that cordycepin decrease the intracellular Ca²⁺ concentration to inhibit collagen-induced human platelet aggregation. Besides, cordycepin increased the level of cGMP on collagen-induced human platelet aggregation. This result is related with the decrease of intracellular Ca²⁺ concentration, because cGMP inhibits the mobilization of Ca²⁺. In addition, cordycepin inhibited the human platelet aggregation induced by LY-83583, inhibitor of guanylate cyclase. This result suggested that cordycepin inhibit the platelet aggregation by stimulating the activity of guanylate cyclase. In conclusion, we demonstrated that cordycepin might have the antiplatelet function by inhibiting Ca²⁺-mobilization via the stimulation of the production of cGMP.

Key Words: Cordycepin, Platelet aggregation, Ca²⁺-mobilization, LY-83583, cGMP

서 론

*Cordyceps militaris*에서 분리한 cordycepin은 동충하초의 주요 생리활성 성분으로 nucleoside의 대사물질이다. Cordycepin의 생리 기능으로는 DNA와 RNA의 합성 억제, 세포의 cytoskeleton distribution^{2,22,27}, cell differentiation의 강화¹², 방광암, 폐암, 결장암 및 fibrosarcoma의 억제작용¹⁰, protein kinase activity의 억제⁹, nucleic acid의 methylation 억제작용¹⁹, 그리고 면역증강 및 항균작용^{15,16} 등이 알려져 있다. 그러나 심혈전, 뇌혈전, 동맥경화 등의 병리현상인 혈전 형성에 중요한 인자로서 작용하는 혈소판 응집반응에 미치는 영향에 관한 연구는 거의 찾아 볼 수 없다.

혈소판은 혈관이 손상되었을 때 각종 agonists의 자극에 응

답해서 활성화되어 점착반응, 방출반응 및 응집반응을 일으켜 혈전 형성에 관여한다. 현재 많은 항혈소판제, 항응고제, 혈전용해제가 사용되어 혈전 치료에 이용되고 있지만 이들은 모두 정제된 화학물질로 인체에 미치는 여러 부작용이 문제시되고 있다. 따라서 천연물에서 기능성 물질을 개발하여 항혈전제로 사용할 수 있다면 그 해결책이라 할 수 있기 때문에 본 연구에서는 동충하초의 주요 생리활성 물질인 cordycepin이 혈소판 응집반응 촉진인자인 Ca²⁺ 동원에 미치는 영향을 검토하였다.

한편, theophylline, molsidomine 등과 같은 혈관 확장제 (vasodilator)는 cyclic adenosine monophosphate (cAMP) - specific phosphodiesterase 또는 cyclic guanosine monophosphate (cGMP) - specific phosphodiesterase의 활성을 억제시키거나, adenylate cyclase와 guanylate cyclase의 활성을 촉진시킴으로써 각각 cAMP, cGMP의 생성을 촉진시켜 혈소판 응집반응을 억제시키는 혈전 형성 억제제이다. 그리고 cAMP와 cGMP는 Ca²⁺의 동원을 억제시켜 혈소판 응집반응의 억제에 관여한다는 것이 이미 알려져 있다^{11,17,20,23,25,26}. 따라서 혈전 형성을 일으키는 혈소판 응집반응에 있어서 cAMP와 cGMP 등의 cyclic

*논문 접수: 2004년 1월 6일

수정재접수: 2004년 1월 31일

†별책 요청 저자: 박화진, (우) 621-749 경남 김해시 어방동 607, 인제대학교 임상병리학과

Tel: 055-320-3538, Fax: 055-334-3426

e-mail: mlsjpark@inje.ac.kr

nucleotides 생성과 Ca^{2+} 동원 관계를 연구하는 것은 항혈전제 개발에 유익한 정보를 제공할 것으로 사료된다.

이에 본 연구에서는 cordycepin이 cGMP의 생성 증가를 촉진시킴으로써 혈소판 내부의 Ca^{2+} 의 동원을 억제시키는 작용을 가지고 있음을 확인하였다.

재료 및 방법

1. 재료

본 연구에 이용된 동충하초의 생리활성 성분인 cordycepin은 Sigma Chemical Co.로부터 구입하였다. 또한 혈소판의 agonist로 사용된 collagen은 Chrono-Log Corp.의 제품을 이용하였으며, Ca^{2+} -probe인 Fura 2/AM은 Sigma Chemical Co.의 제품을 구입하였으며, guanylate cyclase inhibitor로 사용된 LY-83583은 Biomol. Research Lab.의 제품을 사용하였다.

2. Concentrated human platelet-rich plasma (PRP) 제조

사람 혈소판 풍부 혈장 (platelet-rich plasma)을 180 × g, 25°C에서 15분 동안 원심 분리하여 여분의 다른 세포 즉 백혈구, 적혈구를 침전시킨 후 순수한 PRP만을 얻었다. 이것을 다시 1,100 × g, 25°C에서 10분 동안 원심하여 PPP (platelet-poor plasma)와 혈소판 pellets (PLTs)으로 분리하였다. 상층의 PPP 적당량을 PLTs에 조심스럽게 첨가하여 cell suspension (5×10^8 platelets/ml)을 제조하였다.

3. Washed human platelets 제조

Concentrated human PRP를 제조하는 과정의 마지막 원심 후, PPP (platelet-poor plasma)와 혈소판 pellets (PLTs)으로 분리되면 상층의 PPP를 조심스럽게 덜어낸 후 washing buffer (129 mM NaCl, 10.9 mM Na · citrate dihydrate, 8.9 mM NaHCO₃, 1 mg/ml Glucose, 10 mM Tris-hydroxymethylamino methane, 2.8 mM KCl, 0.8 mM KH₂PO₄, 2 mM EDTA, pH 6.5)를 적당량 취하여 혈소판 pellets을 조심스럽게 세척한다. Washing buffer를 이용하여 cell suspension을 만들어 충분히 세척한 후, 1,100 × g, 25°C에서 10분 동안 원심하여 buffer층과 PLTs층으로 분리했다. 이 과정을 3회 정도 반복한 후, 하층의 PLTs에 suspending buffer (129 mM NaCl, 10.9 mM Na · citrate dihydrate, 8.9 mM NaHCO₃, 1 mg/ml Glucose, 10 mM Tris-hydroxymethylamino methane, 2.8 mM KCl, 0.8 mM KH₂PO₄, pH 6.9)를 첨가하여 cell suspension을 제조한 후, suspending buffer를 적당량 첨가하여 cell 수를 5×10^8 platelets/ml가 되도록 조정하였다.

4. Fura 2/AM-loaded human platelets 제조

Concentrated human PRP 20 ml에 20 mM의 Fura 2/AM을 5

μl를 넣어서 Fura 2/AM의 final 농도가 5 μM이 되도록 첨가했다. 이것을 부드럽게 inversion한 후, 37°C에서 60분간 incubation하고, incubation이 끝나면 1,100 × g, 25°C에서 10분 동안 원심시켜 상층의 PPP층과 Fura 2/AM이 loading된 PLTs층으로 분리했다. 하층의 PLTs에 washing buffer (129 mM NaCl, 10.9 mM Na · citrate dihydrate, 8.9 mM NaHCO₃, 1 mg/ml Glucose, 10 mM Tris-hydroxymethylamino methane, 2.8 mM KCl, 0.8 mM KH₂PO₄, 2 mM EDTA, pH 6.5)를 첨가하여 2회 세척 후, suspending buffer (129 mM NaCl, 10.9 mM Na · citrate dihydrate, 8.9 mM NaHCO₃, 1 mg/ml Glucose, 10 mM Tris-hydroxymethylamino methane, 2.8 mM KCl, 0.8 mM KH₂PO₄, pH 6.9)를 첨가하여 cell suspension을 제조하였고, cell을 counting하여 5×10^8 platelets/ml로 조정하였다. 한편, 빛을 차단하기 위해 aluminum foil로 wrapping하여 위의 모든 과정을 수행하였다.

5. Human platelet aggregation 측정

모든 platelets aggregation은 Aggregometer (Chrono-Log Corp.)를 이용하여 37°C에서 light transmission (%)의 변화를 측정하였다.

1) Concentrated human PRP를 이용한 경우

In vitro 반응계 250 μl에서 concentrated human PRP를 37°C에서 3분 동안 preincubation한 후, 자극제인 collagen (10 μg/ml)을 첨가하여 5분간 혈소판 응집반응을 보았다. 이것을 control로 하였으며, 같은 방법으로 concentrated human PRP에, 응집 억제 효과를 보고자 하는 cordycepin을 농도별 (50, 100, 500 μM)로 첨가하여 각각 3분 동안 preincubation한 후 collagen으로 자극하여 5분간 혈소판 응집반응을 보았다. Collagen (10 μg/ml)의 자극에 의해 혈소판 응집이 일어나게 되면 투과도가 증가하게 된다. 따라서 사용한 cordycepin이 혈소판 응집반응에 미치는 영향을 투과도의 변화로 측정하였다.

2) Washed human PLTs를 이용한 경우

In vitro에서 반응계를 250 μl로 하여 외부의 CaCl₂ 농도에 따른 cordycepin의 영향을 검토하였다. 따라서 washed human PLTs에 CaCl₂의 농도를 1 mM과 2 mM로 각각 달리 첨가하여 3분간 preincubation하고, collagen (10 μg/ml)으로 자극하여 혈소판 응집반응을 측정할 것을 control로 하였다. 그리고 같은 조건에서 검토하고자 하는 cordycepin을 함께 첨가한 후, collagen (10 μg/ml)으로 자극하여 혈소판 응집반응을 측정하여 cordycepin의 영향을 측정하였다.

6. Fura 2/AM-loaded human platelets를 이용하여 intracellular Ca^{2+} -mobilization 측정

세포질 내 Ca^{2+} 농도 ($[Ca^{2+}]_i$)를 측정하기 위해 fluorescent indicator dye인 Fura 2/AM을 platelet 내에 loading하여 fluorescence의 변화를 SPF 25 fluorimeter (Kontron)를 이용하여

Table 1. Threshold concentration of collagen on human platelet aggregation

	Collagen ($\mu\text{g/ml}$)		
	5	7	10
Light transmission (%)	38 \pm 3	54 \pm 4	55 \pm 5

측정하였다. Excitation 340 nm, emission 510 nm로 setting하여 37°C에서 8분간 time drive를 시행하였는데, 3분 되는 지점에서 collagen (10 $\mu\text{g/ml}$)을 첨가하여 세포질 내 Ca^{2+} 의 양을 측정하였다. 실제 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 은 relative fluorescence (rf)로 나타나기 때문에 F_{max} 와 F_{min} 을 각각 측정한 후 이들 값과 Fura 2/AM의 분해정수 ($K_d = 224 \text{ nM}$, 37°C)를 아래의 식에 대입하여 혈소판 내부의 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 을 계산하였다.

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \times (F_o - F_{\text{min}}) / (F_{\text{max}} - F_o)$$

F_o 는 자극 전의 fluorescence이다. 또 F_{min} 는 최소 fluorescence로서, CaCl_2 를 첨가하지 않은 상태에서 10% Triton X-100과 2 M Tris-300 mM EGTA를 첨가하여 측정하였고, F_{max} 는 최대 fluorescence로서, 충분한 CaCl_2 (2 mM CaCl_2)가 존재하는 상태에서 10% Triton X-100을 첨가하여 측정하였다. 따라서 CaCl_2 2 mM일 때의 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 의 양을 구한 후 이것을 각각 control로 하였으며, 같은 조건에서 검토하고자 하는 시료를 첨가하여 세포질 내 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 의 변화를 측정하였다.

7. cGMP 측정

PRP (10^8 platelets/ml)에 cordycepin을 첨가하지 않거나, 농도를 달리해서 첨가하여 37°C에서 3분 동안 preincubation 시킨 다음 collagen (10 $\mu\text{g/ml}$)을 첨가하여 5분 동안 incubation 시켰다.

Incubation이 끝난 즉시 ice - cold ethanol (concentration, 80%)을 첨가하여 반응을 정지시킨 후, 80% ethanol로 cGMP를 3번 추출해 냈다. cGMP의 농도는 [^3H]-cGMP assay kits (Amersham Pharmacia Biotech)를 이용하여 측정하였다.

결 과

1. Collagen이 유인하는 platelet aggregation에 있어서 collagen의 threshold농도 결정

Platelet-rich plasma (PRP)에는 혈소판 응집반응에 필요한 CaCl_2 가 존재하므로 CaCl_2 를 첨가하지 않고, PRP (10^8 platelets/ml)에 5 $\mu\text{g/ml}$, 7 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 collagen을 첨가하여 37°C에서 5분간 incubation시키면, light transmission (%)이 각각 38 \pm 3%, 54 \pm 4% 및 55 \pm 5%로 증가했다 (Table 1). 이것은 5 $\mu\text{g/ml}$, 7 $\mu\text{g/ml}$ 및, 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 collagen에 의해 혈소판 (10^8

Table 2. Effect of cordycepin on human platelet aggregation induced by collagen

Factors	Light transmission (%)
Collagen (10 $\mu\text{g/ml}$)	61 \pm 2
Collagen + cordycepin 50 μM	47 \pm 1*
Collagen + cordycepin 100 μM	17 \pm 1*
Collagen + cordycepin 500 μM	7 \pm 1*

Data are given as the mean \pm S.D. (n=4). * $P < 0.05$ compared with that of collagen-induced light transmission (%).

platelets/ml)의 응집반응이 각각 38 \pm 3%, 54 \pm 4% 및 55 \pm 5%까지 일어났음을 의미한다. 이에 본 연구에서는 최고의 응집률을 보이는 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 collagen으로 혈소판을 자극시켜 응집반응을 관찰하였다.

2. Cordycepin의 적정 농도 결정

PRP (10^8 platelets/ml)에 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 collagen을 첨가하여 37°C에서 5분간 반응시키면, 61 \pm 2%의 빛 투과도를 보였고 (Table 2), cordycepin을 50 μM , 100 μM , 500 μM 을 첨가하여 37°C에서 5분간 반응시키면 각각 47 \pm 1%, 17 \pm 1%, 7 \pm 1%까지 빛의 투과도가 감소했다 (Table 2). 이것은 collagen에 의한 응집반응 61 \pm 2%에 대해 47 \pm 1%, 17 \pm 1%, 7 \pm 1%까지 응집반응이 저해되고 있음을 의미한다. 이 결과로부터 cordycepin에 의한 collagen (10 $\mu\text{g/ml}$) 유인 혈소판 응집반응이 각 실험에서 collagen (10 $\mu\text{g/ml}$)의 응집반응에 대해 7%까지 억제하는 500 μM 의 cordycepin을 적정 농도로 사용하기로 했다.

3. Ca^{2+} 농도 증가에 따른 collagen 유인 혈소판 응집반응에 미치는 cordycepin의 영향

Washed human platelets (10^8 platelets/ml) suspension 용액에 Ca^{2+} source로서 1 mM의 CaCl_2 를 첨가하여 collagen (10 $\mu\text{g/ml}$)을 첨가하면 약 55%까지 빛의 투과도가 증가하였다 (Fig. 1-A-a). 이것은 collagen (10 $\mu\text{g/ml}$)의 자극을 받은 혈소판이 55%의 응집을 일으킨 것을 의미한다. 그러나 1 mM CaCl_2 존재 하에서 cordycepin (500 μM)을 첨가하여 3분간 preincubation 시킨 후, 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 collagen을 첨가하면 빛의 투과도가 55%에서 18%로 낮아졌다 (Fig. 1-A-b). 한편, 혈소판 응집반응은 Ca^{2+} 의 농도에 의해 증가되므로, Ca^{2+} 의 농도를 2 mM로 증가시켰을 때 collagen에 의해 유인되는 혈소판 응집반응에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 Fig. 1-B를 보면, 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 collagen 단독으로 washed human platelet ($10^8/\text{ml}$)를 5분 동안 자극시키면 빛의 투과도는 약 75%까지 증가했다 (Fig. 1-B-a). 혈소판 suspension 용액에 1 mM의 CaCl_2 를 첨가하여 collagen (10 $\mu\text{g/ml}$)으로 자극했을 때의 응집도 (55%) (Table 1) 보다 약 20% 더 증가했다. 이 결과는 collagen에 의

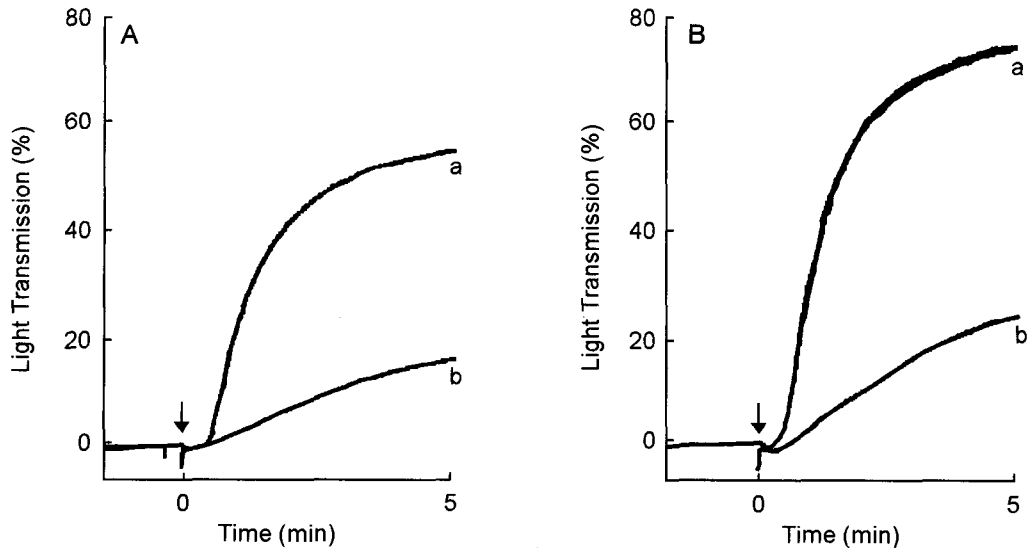


Fig. 1. Effects of cordycepin in the presence of extracellular CaCl_2 1 mM or 2 mM on washed human platelets induced by collagen (10 $\mu\text{g/ml}$). Arrow is indicated as a collagen-addition point. **A:** CaCl_2 1 mM, **B:** CaCl_2 2 mM, a: collagen 10 $\mu\text{g/ml}$, b: collagen + cordycepin 500 μM .

한 혈소판 응집반응은 혈소판의 suspension 용액에 첨가해 주는 CaCl_2 의 농도 즉, Ca^{2+} 농도에 의존하여 증가함을 의미한다. 그러나 2 mM의 CaCl_2 를 첨가한 washed human platelets (10^8 platelets/ml)의 suspension 용액에 cordycepin (500 μM)을 첨가하여 3분간 preincubation 시킨 후, 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 collagen으로 혈소판을 자극하면 빛의 투과도는 22%까지 저하되었다 (Fig. 1-B-b). 이것은 CaCl_2 2 mM의 존재하에서 collagen (10 $\mu\text{g/ml}$)에 의해 일어나는 혈소판 응집도 (75%)가 cordycepin에 의해 22%까지 저해됨을 의미한다.

한편 기존의 항혈전제로써 혈소판에서 cGMP의 생성을 촉진시키는 molsidomine (10 μM), cAMP의 생성을 촉진시키는 theophylline (10 μM)과 cordycepin (500 μM)과의 상승 효과를 검토했다. 그 결과 CaCl_2 1 mM과 CaCl_2 2 mM의 실험계에서 molsidomine (10 μM)과 theophylline (10 μM)은 collagen (10 $\mu\text{g/ml}$) 단독에 의한 응집률 (54.4%)과 비교했을 때 응집 억제 효과가 거의 없었지만, CaCl_2 1 mM의 반응계에서 cordycepin 500 μM 과 molsidomine 10 μM 을 동시에 첨가하여 collagen으로 혈소판 응집반응을 유도한 것은 그 응집률이 22.5%로 collagen 단독에 의한 혈소판 응집반응 (54.4%)에 비해 58.6%의 응집 억제율을 나타내었고, cordycepin 500 μM 과 theophylline 10 μM 을 동시 첨가하여 collagen으로 혈소판 응집반응을 유도하였을 때의 그 응집률은 24.4%로 55.1%의 억제 효과를 보였다. 또한 CaCl_2 2 mM의 반응계에서는 각각 53.3%, 52.4%의 억제 효과를 나타내었다 (data not shown). 이와 같은 결과는 cordycepin이 collagen 유인 혈소판 응집반응에서 molsidomine, theophylline과 함께 혈소판 응집반응을 상승적으로 억제시키고 있음을 의미한다.

이상과 같이 혈소판 suspension 용액에 첨가해 주는 Ca^{2+} 의 농도가 증가함에도 불구하고 응집반응이 억제되는 것은 cordycepin이 Ca^{2+} 의 동원을 억제시켜 혈소판의 응집을 저해할 것으로 추측된다. 따라서 collagen이 유인하는 Ca^{2+} 동원에 미치는 cordycepin의 영향을 조사했다.

4. Cordycepin이 세포질내 Ca^{2+} 의 동원에 미치는 영향

Ca^{2+} probe인 Fura 2/AM을 preloading시킨 washed human platelet (10^8 platelets/ml) suspension 용액에 2 mM의 CaCl_2 를 첨가하여 collagen (10 $\mu\text{g/ml}$)으로 혈소판을 자극한 결과, 원래 혈소판 내부에 있던 89.6 ± 11.2 nM ($n=5$)의 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 으로부터 145.3 ± 15.3 nM ($n=5$)의 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 으로 증가했다 (Fig. 2). 이것은 collagen (10 $\mu\text{g/ml}$)에 의해서 89.6 ± 11.2 nM의 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 에서 145.3 ± 15.3 nM의 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 을 동원시키고 있음을 의미한다. 그러나 Fura 2/AM preloading된 washed human platelet (10^8 platelets/ml) suspension 용액에 cordycepin (500 μM)을 첨가하여 37°C에서 preincubation 시킨 후 collagen (10 $\mu\text{g/ml}$)을 첨가하여 5분간 혈소판을 자극시키면 collagen (10 $\mu\text{g/ml}$) 단독에 비해 세포질 내 Ca^{2+} 농도는 88.6 ± 9.0 (n=5) nM까지 저하되었다. 이것은 원래 혈소판 내부에 존재하는 free- Ca^{2+} 의 농도 (89.6 ± 11.2 nM, $n=5$)와 거의 비슷하다. 이것은 cordycepin이 collagen에 의해서 유도된 Ca^{2+} 농도 (145.3 ± 15.3 nM)를 원래 혈소판 내부에 존재하는 Ca^{2+} 의 농도까지 저해하고 있음을 의미한다.

한편, cordycepin에 의한 Ca^{2+} 농도 저하는 cGMP의 생성 증가에서 기인하는 것으로 추측할 수 있기 때문에, 우선 혈소판 내부의 GTP (guanosine triphosphate)로부터 cGMP의 생

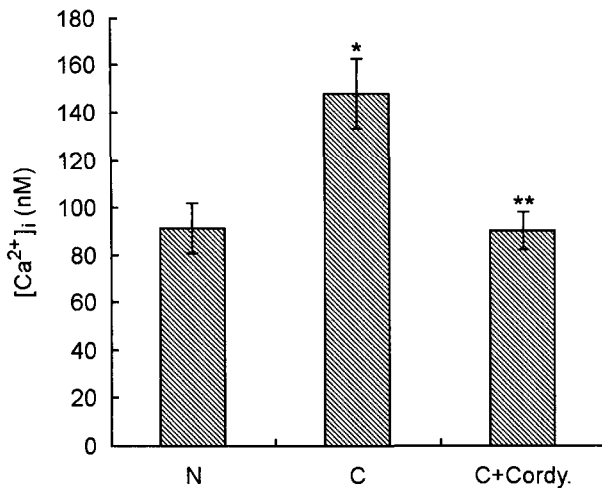


Fig. 2. Effects on Ca²⁺-influx on washed human platelet aggregation induced by collagen. Ca²⁺-determination was assayed as described in "Materials and Method". N: normal (intact cell), C: collagen 10 µg/ml, C + Cordy.: collagen + cordycepin 500 µM. Data are given as the mean ± S.D. (n=5). *P<0.05 compared with that of normal. **P<0.05 compared with that of collagen-induced [Ca²⁺]_i.

성을 촉진시키는 guanylate cyclase의 저해제인 LY-83583에 대한 cordycepin의 효과를 검토했다.

5. Guanylate cyclase의 저해제인 LY-83583에 의한 collagen 유인 혈소판 응집반응에 대한 cordycepin의 영향

혈소판 내부의 GTP에 guanylate cyclase가 작용하면 cGMP가 생성된다. cGMP는 세포 내부의 free-Ca²⁺ 농도를 저하시킴으로써 혈소판 응집 억제반응에 관여하는 혈소판 내부의 second messenger이다. 만약 guanylate cyclase의 활성을 저해시켜 cGMP의 생성이 저하된다면 혈소판 응집반응은 증가할 것이다. 이와 같은 이론을 근거로 하여 guanylate cyclase의 저해제인 LY-83583을 이용하여 이것에 의한 혈소판 응집반응에 미치는 cordycepin의 영향을 검토했다. Fig. 3에서 볼 수 있듯이 LY-83583 1 µM은 collagen (10 µg/ml) 단독에 의한 혈소판 응집반응 (Fig. 3-A-a, 3-B-a)과 비교해 보았을 때, CaCl₂ 1 mM (Fig. 3-A)와 2 mM (Fig. 3-B)의 반응계에서 각각 60.0% (Fig. 3-A-b)와 62.5% (Fig. 3-B-b)의 혈소판 응집을 일으킨다. 그러나 cordycepin (500 µM)과 LY-83583 (1 µM)을 동시에 혈소판 suspension 용액에 첨가하여 37°C에서 3분간 preincubation 시킨 후, collagen (10 µg/ml)을 첨가하여 37°C에서 5분간 반응시켰더니 빛의 투과도가 현저하게 저하되었다 (Fig. 3-A-c, 3-B-c). 이것은 LY-83583에 의한 혈소판 응집반응이 cordycepin (500 µM)에 의해 저하되고 있음을 시사한다. 또한 cordycepin은 LY-83583의 guanylate cyclase 저해에 의한 cGMP의 생성 저하를 억제시켜서 cGMP의 생성을 촉

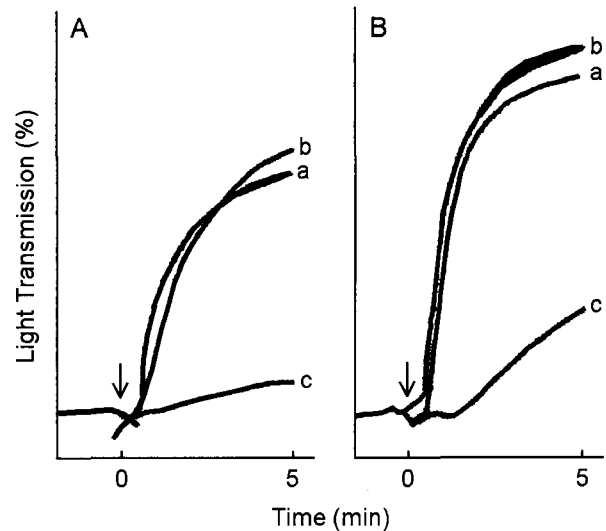


Fig. 3. Effect of LY-83583, an inhibitor of guanylate cyclase, and cordycepin on collagen-induced human platelet aggregation in the presence of extracellular CaCl₂ 1 mM or 2 mM. Arrow is indicated as a collagen-addition point. A: CaCl₂ 1 mM, B: CaCl₂ 2 mM, a: collagen (10 µg/ml) only, b: collagen + LY-83583 1 µM, c: collagen + LY-83583 1 µM + cordycepin 500 µM.

Table 3. Effects of cordycepin in cGMP-production

	cGMP (fmol/10 ⁸ platelets)
Base	230±39
Collagen (10 µg/ml)	204±50*
Collagen + cordycepin (500 µM)	786±71**

Data are given as the mean ± S.D. (n=4). *P<0.001 compared with that of base. **P<0.001 compared with that of collagen-induced cGMP levels.

진시킬 수 있음을 알 수 있다. 이것은 cordycepin이 collagen (10 µg/ml)의 자극에 의해 동원된 세포질 내 free-Ca²⁺ 농도를 저하시킨 결과 (Fig. 2)를 반영한다. 따라서 cGMP의 생성에 미치는 cordycepin의 영향에 대하여 검토했다.

6. cGMP의 생성에 미치는 cordycepin의 영향

휴지 상태의 혈소판 (10⁸ platelets/ml) 내부에 약 230±39 fmol/10⁸ platelets의 cGMP가 존재하지만, 10 µg/ml의 collagen으로 혈소판 (10⁸ platelets/ml)을 자극하면 204±50 fmol/10⁸ platelets로 저하된다 (Table 3). 이것은 collagen이 cGMP의 농도를 저하시킴으로써 혈소판의 응집을 증가시킴을 의미한다. 그러나 cordycepin (500 µM)을 첨가하여 37°C에서 3분간 preincubation 시킨 다음, collagen (10 µg/ml)을 처리한 후 5분간 반응시키면 cGMP의 농도는 786±71 fmol/10⁸ platelets으로 증가한다 (Table 3). 이것은 cordycepin이 혈소판 응집반응에

서 저하된 cGMP의 생성을 증가시킴으로써 collagen에 의한 응집반응을 억제시키고 이에 관여하는 Ca²⁺ 농도를 저하 (Fig. 2) 시킴을 의미한다.

고 찰

Collagen은 혈관이 손상되었을 때 혈관 내피세포에서 분비되는데 이것은 혈소판의 응집을 촉진시킴으로서 혈전에 관여하는 단백질이다. 만약 collagen에 의한 혈소판의 응집을 억제시키면 혈전의 형성을 저해시킬 수 있음을 의미한다. 이러한 혈소판의 응집을 억제시키는 항혈소판제는 항혈전 작용을 가지는데, 이러한 약물로서는 aspirin, theophylline, verapamil, molsidomine, indomethacin 등이 알려져 있다^{7,18)}. Aspirin과 indomethacin은 non-steroid drugs로서 혈소판의 응집을 강하게 촉진시키는 thromboxane A₂ (TXA₂)의 생성을 억제하는 작용을 가지고 있다²⁴⁾. 또한 theophylline, verapamil 및 molsidomine은 혈소판의 내부에 cAMP 또는 cGMP의 생성을 증가시키고, 이들은 TXA₂의 생성 전구물질인 arachidonic acid의 생성을 억제시키며, 혈소판 막의 인지질 (예, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate)에 작용하는 Ca²⁺ 의존성 phospholipase C의 활성을 억제⁴⁾시켜 항혈소판 작용에 관여한다. 이 phospholipase C의 활성은 Ca²⁺의 증가에 의해 촉진되므로, Ca²⁺의 증가를 억제시키는 약물 즉 cGMP나 cAMP의 생성을 촉진시키는 약물은 모두 Ca²⁺-antagonist로서 혈소판의 응집을 억제시키는 항혈전제로 이용될 수 있다.

한편 혈소판 응집을 억제시켜 항혈전 작용을 가지는 식품 또는 천연 물질로는 인삼의 사포닌류²¹⁾, 생선의 eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5)^{3,8)}, 올리브의 olive oil에 있는 oleic acid¹³⁾, 달맞이꽃의 α-linoleic acid (α-18:3)¹⁴⁾, 마늘의 garlic acid¹⁾, 미나리의 polyphenol류⁹⁾ 등이 알려져 있지만, 동충하초의 주요 생리활성성분인 cordycepin이 혈소판의 응집을 억제시키는 연구 보고서는 거의 없다. 따라서 본 연구에서는 cordycepin이 혈소판 응집을 억제시키는 항혈전 작용을 가지는 기능성 소재가 될 수 있는지 탐색했다.

그 결과 세포 외부에 Ca²⁺의 농도를 증가시키면서 collagen에 의한 혈소판 응집반응을 유도하여도 cordycepin에 의해 혈소판 응집반응은 저해되었다. 이것은 cordycepin이 혈소판 외부에 있는 Ca²⁺을 혈소판 내부로의 유입을 억제시키거나, 세포 내부에 저장되어 있는 Ca²⁺-pool (예, endoplasmic reticulum)로부터 세포질로의 Ca²⁺의 동원을 억제시킨 결과로 생각할 수 있다. 만약 cordycepin에 의한 혈소판 응집반응의 억제가 Ca²⁺의 유입 또는 소포체로부터 동원에 의한 Ca²⁺ 증가 억제에 기인하지 않는다면, collagen에 의한 free-Ca²⁺의 농도는 cordycepin에 의해 저해되지 않을 것이다. 그러나 cordycepin은 collagen에 의한 혈소판 내부의 Ca²⁺ 농도의 증가

를 휴지 상태의 Ca²⁺ 농도로까지 감소시켰다 (Fig. 2). 한편, 이 Ca²⁺ 농도의 저하에 의한 cordycepin의 혈소판 응집 억제 작용은 cGMP 생성 증가를 거쳐 일어날 수 있다. 그래서 cGMP의 생성에 미치는 효과를 검토한 바 cordycepin은 collagen에 의한 사람 혈소판 응집반응에서 99.9%의 유의성 (p<0.001)을 가지고 cGMP의 생성을 증가시켰다 (Table 3). cGMP의 생성 증가는 GTP에 작용하는 guanylate cyclase라는 효소의 활성에 의해 촉진된다⁶⁾. 따라서 cordycepin에 의한 혈소판 응집반응의 억제 (Table 2, Fig. 1)가 guanylate cyclase의 활성 촉진에 의한 cGMP의 생성 증가에 기인하지 않는다면 guanylate cyclase의 활성을 저해시킨 상태에서 cordycepin은 혈소판 응집반응 억제에 영향을 끼치지 않을 것이다. 그러나 guanylate cyclase의 저해제인 LY-83583 (1 μM)에 의해 촉진된 혈소판 응집반응은 cordycepin에 의해서 강하게 억제되었다 (Fig. 3).

혈소판 응집반응을 강력히 촉진하는 TXA₂는 Ca²⁺ 의존성 phospholipase A₂ 또는 phospholipase C에 의해 혈소판 막의 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 등의 phosphoinositides나 phosphatidylcholine으로부터 분해되어 나오는 arachidonic acid로부터 생성된다. 우리는 다른 실험에서 cordycepin이 collagen 유인 혈소판 응집반응에서 TXA₂의 생성을 강력히 억제함을 관찰했다 (data not shown). 이 관찰은 cordycepin이 collagen 유인 혈소판 응집반응에서 Ca²⁺의 동원을 억제시키고 (Fig. 2), cGMP의 생성을 촉진시키는 결과 (Table 3)를 반영해 주는 것이다.

따라서 이러한 결과를 통해 cordycepin은 cGMP 생성 증가 ⇒ Ca²⁺ 동원 억제라는 기전을 통하여 혈소판의 응집을 억제시키는 작용을 한다고 사료된다.

감사의 말씀

이 논문은 인제대학교 학술 연구 조성비 (연구과제번호: 00012000169) 지원에 의해 수행된 결과이며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- 1) Ali M, Bordia T and Mustafa T (1999): Effect of raw versus boiled aqueous extract of garlic and onion on platelet aggregation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acid*, **60**: 43-47.
- 2) Deithch A and Sawick S (1979): Effect of cordycepin on microtubules of cultured mammalian cells. *Exp Cell Res*, **118**: 1-13.
- 3) Dyerberg J, Bang HO, Stoffersen E, Moncada S and Vane JR (1978): Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis?. *Lancet*, **2**: 117-119.

- 4) Geiger J, Nolte C, Butt E, Sage SO and Walter U (1992): Role of cGMP and cGMP-dependent protein kinase in nitrovasodilator inhibition of agonist-evoked calcium elevation in human platelets. *Proc Natl Acad Sci USA*, **89**: 1031-1035.
- 5) Glazer R and Kuo J (1977): Inhibition effect of cordycepin on cyclic nucleotide-dependent and cyclic nucleotide-independent protein kinases. *Biochem Pharmacol*, **26**: 1287-1290.
- 6) Gukovskaya AS, Gukovsky S, and Pandol SJ (2000): Endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase inhibitors stimulate membrane guanylate cyclase in pancreatic acinar cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, **278**: C363-371.
- 7) Kristek F, Faberova VV and Varga I (2003): Long-term effect of molsidomine and pentaerythryl tetranitrate on cardiovascular system of spontaneously hypertensive rats. *Physiol Res*, **52**: 709-717.
- 8) Hida M, Fujita H, Ishikura K, Omori S, Hoshiya M and Awazu M (2003): Eicosapentaenoic acid inhibits PDGF-induced mitogenesis and cyclin D1 expression via TGF-beta in mesangial cells. *J Cell Physiol*, **196**: 293-300.
- 9) Hubbard GP, Wolffram S, Lovegrove JA and Gibbins JM (2003): The role of polyphenolic compounds in the diet as inhibitors of platelet function. *Proc Nutr Soc*, **62**: 469-478.
- 10) Hubbell HR, Pequignot EC, Willis DH, Lee C and Suhadolnik RJ (1985): Differential antiproliferative actions of 2', 5' oligo A trimer core and its cordycepin analogue on human tumor cells. *Int J Cancer*, **36**: 389-394.
- 11) Leibovic KN (2001): The response gradient along the rod outer segment: cGMP, age and calcium. *Prog Brain Res*, **131**: 359-368.
- 12) Mathew P, Ellis L and Strdzinski G (1989): Enhanced messenger RNA stability and differentiation of HL 60 cells treated with 1, 25-dihydroxy-vitamin D₃ and cordycepin. *J Cell Physiol*, **140**: 212-218.
- 13) Misikangas M, Freese R, Turpeinen AM and Mutanen M (2001): High linoleic acid, low vegetable, and high oleic acid, high vegetable diets affect platelet activation similarly in healthy women and men. *J Nutr*, **131**: 1700-1705.
- 14) Miyazawa D, Ikemoto A, Fujii Y and Okuyama H (2003): Dietary alpha-linolenic acid suppresses the formation of lysophosphatidic acid, a lipid mediator, in rat platelets compared with linoleic acid. *Life Sci*, **73**: 2083-2090.
- 15) Montefiori DC, Sobol RW Jr, Li SW, Reichenbach NL, Suhadolnik RJ, Charubala R, Pfliegerer W, Modliszewski A, Robinson WE Jr and Mitchell WM (1989): Phosphorothioate and cordycepin analogues of 2', 5'-oligoadenylate: Inhibition of human immunodeficiency type I reverse transcriptase and infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*, **86**: 7191-7194.
- 16) Muller WE, Weiler BE, Charubala R, Pfliegerer W, Leserman L, Sobol RW, Suhadolnik RJ and Schroder HC (1991): Cordycepin analogues of 2', 5'-oligo-adenylate inhibit human immunodeficiency virus infection via inhibition of reverse transcriptase. *Biochemistry*, **30**: 2027-2033.
- 17) Nascimento JH, Salle L, Hoebeke J, Argibay J and Peineau N (2001): cGMP-mediated inhibition of cardiac L-type Ca²⁺ current by a monoclonal antibody against the M (2) ACh receptor. *Am J Physiol Cell Physiol*, **281**: C1251-1258.
- 18) Nolte C, Eigenthaler M, Schanzenbacher P and Walter U (1991): Endothelial cell-dependent phosphorylation of a platelet protein mediated by cAMP- and cGMP-elevating factors. *J Biol Chem*, **266**: 14808-14812.
- 19) Noval-Fernandes A and Leroy F (1980): Inhibition of nucleic acid methylation by cordycepin. *J Biol Chem*, **255**: 7380-7385.
- 20) Park SH, Shin SS and Han HJ (2001): High glucose levels alter angiotensin II-induced Ca²⁺ uptake via PKC and cAMP pathways in renal proximal tubular cells. *Kidney Blood Press Res*, **24**: 84-91.
- 21) Park HJ, Rhee MH, Park KM, Nam KY and Park KH (1995): Effect of non-saponin fraction from Panax ginseng on cGMP and thromboxane A₂ in human platelet aggregation. *J Ethnopharmacology*, **49**: 157-162.
- 22) Plagemann PG (1971): Effect of 3'-deoxyadenosine (cordycepin) and 2'-deoxyadenosine on nucleoside transport, macromolecular synthesis, and replication of cultured Novikoff hepatoma cells. *Arch Biochem Biophys*, **144**: 401-412.
- 23) Romanello M, Moro L, Pirulli D, Crovella S and D'Andrea P (2001): Effects of cAMP on intercellular coupling and osteoblast differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*, **282**: 1138-1144.
- 24) Sheu JR, Hsiao G, Shen MY, Lin WY and Tzeng CR (2002): The hyperaggregability of platelets from normal pregnancy is mediated through thromboxane A₂ and cyclic AMP pathways. *Clin Lab Haematol*, **24**: 121-129.
- 25) Wang JP, Chang LC, Huang LJ and Kuo SC (2001): Inhibition of extracellular Ca²⁺ entry by YC-1, an activator of soluble guanylyl cyclase, through a cyclic GMP-independent pathway in rat neutrophils. *Biochem Pharmacol*, **62**: 679-684.
- 26) Yoshimura N, Seki S and de Groat WC (2001): Nitric oxide modulates Ca²⁺ channels in dorsal root ganglion neurons innervating rat urinary bladder. *J Neurophysiol*, **86**: 304-311.

27) Zieve G and Roemer E (1988): Cordycepin rapidly collapses
the intermediate filament networks into juxtannuclear caps in

fibroblast and epidermal cells. *Exp Cell Res*, 177: 19-26.
