

<원 저>

쌀겨발효추출물의 항혈전효과

전보라¹ · 지현동¹ · 김수정² · 이천희³ · 김태완¹ · 이만휘^{1,*}

¹경북대학교 수의과대학, ²대구보건대학교, ³엔자임라파

(접수: 2015년 9월 14일, 수정: 2015년 11월 20일, 게재승인: 2015년 11월 25일)

Anti-thrombotic activity of fermented rice bran extract with several oriental plants *in vitro* and *in vivo*

Bo-Ra Jeon¹, Hyun Dong Ji¹, Su Jung Kim², Chun-Hee Lee³, Tae-Wan Kim¹, Man-Hee Rhee^{1,*}

¹Laboratory of Veterinary Physiology and Cell Signaling, College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

²Department of Clinical Pathology, Daegu Health College, Daegu 41453, Korea

³Enzyme LAPA Co., Cheonan 31164, Korea

(Received: September 14, 2015; Revised: November 20, 2015; Accepted: November 25, 2015)

Abstract : Although the effects of the rice bran have recently been investigated, there is no information regarding platelet physiology available. However, it is well known that fermented natural plants have a beneficial effect on cardiovascular diseases. Therefore, this study was conducted to investigate whether fermented rice bran extract (FRBE) with several plants (*Artemisia princeps*, *Angelica Gigantis Radix*, *Cnidium officinale*, and *Camellia sinensis*) affected agonist-induced platelet aggregation, and if so, what the underlying mechanism of its activity was. We performed several experiments, including *in vitro* platelet aggregation, intracellular calcium concentration and adenosine triphosphate release. In addition, the activation of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ was determined using fibrinogen binding. Thrombus formation was also evaluated *in vivo* using an arterio-venous shunt model. The FRBE inhibited collagen-induced platelet aggregation in a concentration-dependent manner. FRBE significantly and dose dependently attenuated thrombus formation using rat arterio-venous shunt. FRBE suppressed the intracellular calcium mobilization in collagen-stimulated platelets. We also found that FRBE inhibited extracellular stimuli-responsive kinase 1/2, p38-mitogen-activated protein kinases and c-Jun N-terminal kinase phosphorylation. These results suggested that FRBE inhibited collagen-induced platelet aggregation, which was mediated by modulation of downstream signaling molecules. In conclusion, FRBE could be developed as a functional food against aberrant platelet activation-related cardiovascular diseases.

Keywords : collagen, mitogen-activated protein kinase, platelet aggregation, rice bran, thrombosis

서 론

혈소판은 혈관이 손상됐을 때 정상적인 지혈 과정에 필수적인 역할을 하지만 과도한 혈소판의 활성화는 혈전증과 같은 심혈관 질환을 유발할 수 있다 [31]. 혈소판에 다양한 ligand(e.g., collagen, thrombin and adenosine diphosphate [ADP])가 G-단백질 결합 수용체 또는 당단백 수용체에 결합하여 활성화되면 인지질 분해효소(phospholipase C, PLC)를 활성화해서 세포 내부 신호 분자의 활성화로 이어질 수 있

다. 즉 활성화된 인지질 분해효소는 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate로부터 2차 신호전달 물질인 inositol-1,4,5-trisphosphate(IP₃)와 diacylglycerol을 생성한다 [2, 13]. IP₃는 칼슘 저장소(i.e., dense tubular system)의 IP₃ 수용체에 결합하여 세포질 내로 Ca²⁺을 방출한다. 따라서, 세포 내 칼슘 이온([Ca²⁺]_i) 농도는 수십 배 이상 증가하고 칼슘 결합 단백질인 calmodulin에 결합하여 myosin light chain kinase를 활성화할 수 있다 [23, 28]. 이러한 일련의 효소 활성화 작용으로 인하여 혈소판 응집반응이 일어난다. 따라서 혈소

*Corresponding author

Tel: +82-53-950-5967, Fax: +82-53-950-5955

E-mail: rheemh@knu.ac.kr

판 활성 기능을 억제하는 것이 혈전증 예방을 위한 유망한 접근법임을 알 수 있다 [29]. 혈전증뿐만 아니라 죽상동맥경화증의 부작용을 예방하고 치료하기 위해 개발된 항 혈소판 약제들은 위장관 부작용, 출혈, 혈소판 감소증 등 여러 부작용을 일으키는 단점이 있다 [3, 9]. 그래서 현재 심장혈관 질환의 예방 또는 치료를 위해 천연물 또는 한방 유래 의약품 및 기능성 식품의 개발이 활발히 이루어지고 있다 [10].

쌀은 우리나라 주곡작물로서 최근에는 식생활의 서구화로 인해 쌀의 소비량이 급속히 감소하여 과잉생산이 문제가 되고 있다 [8, 18, 33]. 쌀의 과잉생산과 더불어 부산물인 쌀겨, 벚짳, 왕겨 등의 처리도 문제가 되고 있어 쌀의 저장 및 가공법 개발뿐만 아니라 부산물 처리도 관심을 가져야 할 부분이다. 쌀겨는 착유의 재료로 주로 이용되고 있으며, vitamin B₁, B₂, 지질, 탄수화물 및 무기질 등의 영양성분을 함유하고 있어 사료 및 영양제 등 다양한 형태의 자원으로 이용된다 [4]. 최근 쌀겨 추출물의 고콜레스테롤 억제 [22], 항암, 항알레르기, 비만 억제 효과 등에 대한 연구 [8]가 계속되고 있으며 쌀겨 내에 존재하는 새로운 물질의 탐색이 진행되고 있다. 그렇지만 이러한 쌀겨의 효능이 제대로 활용되지 못하고 있어 자원이 낭비되는 실정이며 다양한 활용방안의 모색이 필요하다 [16]. 또한 쌀겨와 함께 발효를 시켜 추출한 첨가물인 당귀(*Angelica gigas*)는, 혈을 보하여 주며 청열작용과 혈의 흐름을 좋게 하고, 항산화 [14], 항암 [27], 항염증 [32] 및 혈액순환의 개선 효과가 있다. 천궁(*Cnidium officinale*)은 항산화 [17], 소염 및 진통작용 [5] 그리고 혈소판 응집 억제 활성 [38] 등의 보고가 있다. 또한 민들레(*Taraxacum: Dandelion*)는 강장, 해열 이뇨, 해독제 등에 이용됐으며 [37], 지질대사 개선 효과도 보고되고 있다 [6]. 그리고 쑥(*Artemisia princeps var orientalis*)은 지혈과 심혈관계 질환에 효과가 있다 [20]. 차나무(*Carnellia sinensis*)는 카테킨, 카페인, 단백질, 아미노산 섬유소 등이 함유되어 있다 [36]. 이들 성분 중 카테킨에서 콜레스테롤 재흡수 억제, 항균, 충치 예방 등의 여러 가지 효능이 계속 밝혀지고 있다 [21, 26]. 위에서 기술한 바와 같이 각각의 천연물 단독으로 여러 가지 효능을 연구한 보고는 있으나, 천연물과 쌀겨를 발효시켜 추출한 혼합물이 심혈관 질환과 밀접한 혈소판 응집반응에 미치는 효과에 관한 연구는 아직 이루어지지 않고 있다. 따라서 본 연구는 쌀겨발효추출물의 혈소판 응집반응 억제 효과에 대하여 조사하였다.

재료 및 방법

시료

쌀겨는 아산과 천안 지역 정미소로부터 얻은 것이다. 쌀겨 발효추출물은 다음과 같이 제조하였다. 당귀, 천궁, 민들레, 쑥, 및 차나무가 포함 된 쌀겨(쌀겨 80의 비율에 각각 8:6:2:2:2, v/v 비율로 혼합)에 *Lactobacillus rhamnosus*(6.2×10^5 CFU/mL)를 주입하고 *Pichia deserticola*(3.7×10^4 CFU/mL), *Lactobacillus rhamnosus* 및 효모(*Pichia deserticola*)

를 추가하여 잘 혼합한 다음 어두운 용기에 넣어 실온에서 발효하였다. 쌀겨발효혼합물을 Whatmann 여과지로 여과하고, 50% 에탄올로 추출하여 감압 농축하였다.

Gas chromatography-mass spectrometry(GC-MS) 분석

쌀겨발효추출물의 생리활성 성분을 동정하기 위해서 GC-MS를 이용하여 측정하였다. 기기는 Agilent Technology 7890A GC가 장착된 Agilent 5975C Series GC/MSD(Agilent Technologies, USA)를 사용하였으며, 분리용 칼럼은 HP-Innowax(30 m × 0.25 mm, 0.25 μm)을 사용하였다. 각 성분의 상대적인 비율은 전체 영역의 평균 피크 면적과 비교하여 계산하였다.

고속액체 크로마토그래피(HPLC) 분석

쌀겨발효추출물의 생리활성 지표 성분을 동정하기 위하여 Waters Alliance e2695 system(Waters, USA)가 장착된 2998 광다이오드 검출기를 이용하여 HPLC로 분석하였다. 시료와 기준물질은 80% 메탄올(sample: MeOH, 20 mg/mL; standards: MeOH, 0.1 mg/mL)을 이용하여 용해하였으며, 데이터는 Empower 3 software(Waters)를 사용하여 분석하였다. 각각 시료는 피크면적의 UV 최대 흡광도 파장에 의해 결정되며 시료들의 샘플 농도는 피크면적에 의해 계산되었다.

실험동물

수컷 Sprague-Dawley rat(300~350 g)는 오리엔트(대한민국)로부터 구입하였다. 동물은 1주간 순화시켰으며 습도 50 ± 10%, 온도 22 ± 1°C에서 12시간은 밝고 12시간은 어둡게 순환하는 동물실에 수용하였다. 동물은 실험 식이와 물을 임의로 섭취시켰다. 동물의 사용과 관련된 모든 실험은 경북대학교 실험윤리위원회의 규정에 따라 진행하였다(승인번호 2012-125).

Rat 혈소판 준비

혈액은 복부 대동맥에서 채혈하고, 0.8% citric acid, 2.2% tri-sodium citrate 및 2% dextrose 함유 항응고제인 anticoagulant citrate dextrose 용액에 희석하였다(9:1, V/V). Rat의 혈액은 230 × g에서 10분간 원심분리 하여 상층액 platelet-rich plasma(PRP)를 얻었다. PRP를 800 × g에서 15분 동안 원심분리 하여 혈소판을 침전시키고 0.3% bovine serum albumin을 함유하는 HEPES 완충액(137 mM-NaCl, 2.7 mM-KCl, 1 mM-MgCl₂, 5.6 mM-glucose, 3.8 mM-HEPES; pH 6.5)으로 2회 세정하였다. 혈소판은 0.4 mM의 EGTA를 함유하는 HEPES 완충액(pH 7.4)에 재 현탁하고, 혈소판 부유액은 3×10^8 /mL로 조정하였다.

혈소판 응집능 검사

혈소판 응집 억제 효과는 aggregometer(Model 490-2D; Chrono-log, USA)를 사용하여 측정하였다. 준비한 혈소판(3×10^8 /mL) 부유액(400 μL)을 37°C로 맞춘 aggregometer에 5분간 pre-incubation 한 후에 CaCl₂ 용액(1.0 mM)을 첨가하

여 2분간 반응시키고, 쌀겨발효추출물을 각 농도 별로 첨가하여 2분 동안 반응시켰다. 혈소판 응집반응 유도물질인 콜라겐 용액(2.5 µg/mL)을 넣어 5분간 반응시킨 후 transmittance를 측정하여 억제능을 계산하였다.

세포 내 칼슘이온 농도 측정

세포 내 칼슘이온 농도($[Ca^{2+}]_i$)는 Fura-2/AM을 사용하여 측정하였다. 혈소판 부유액은 37°C에서 30분 동안 Fura-2/AM(5 mM)을 첨가하여 함께 배양하였다. Fura-2로 처리된 혈소판에 1 mM-CaCl₂을 넣은 후 37°C에서 2분 동안 시료와 함께 배양하고, 이어서 콜라겐으로 5분간 자극하였다. Hitachi F-2500(Hitachi, Japan) 형광분광기를 사용하여 형광강도를 기록하였다. 빛 방출은 340에서 380 nm로 0.5초 마다 바뀌 가면서 510 nm에서 측정하였다. 세포 내 칼슘이온 농도를 Schaeffer와 Blaustein [30]이 기술한 바와 같이 $[Ca^{2+}]_i = 224 \text{ nM} \times (F - F_{min}) / (F_{max} - F)$ 을 이용하여 계산하였다. F_{max} 는 Fura-2/AM에 칼슘이온이 최대로 결합했을 때의 형광 강도로서 혈소판을 Triton X-100(0.1%)으로 완전 용해했을 때의 값이다. F_{min} 은 Fura-2/AM에 최소로 칼슘이온이 결합했을 때의 형광 강도로 혈소판 부유액에 1 mM의 EGTA를 첨가하고 Triton X-100(0.1%)으로 용해한 후 측정하였다.

Adenosine triphosphate(ATP) 분비 반응 분석법

세척된 혈소판(5×10^8 /mL)에 다양한 농도의 쌀겨발효추출물을 투여한 후 37°C에서 2분 동안 배양한 다음, 콜라겐을 첨가하여 혈소판 응집반응을 유도하였으며, 5분 후 반응을 종료하였다. 자극 반응물 시료를 원심분리 하고, 상층액을 모아 분석에 사용하였다. 혈소판의 과립에서 분비된 ATP양은 ATP 분석 키트(Biomedical Research Service Center, USA)를 사용하였으며 luminometer(GloMax 20/20; Promega, USA)로 측정하였다.

섬유소원 결합력 측정법

혈소판에 결합한 Alexa Fluor 488 피브리노겐 중합체는 유세포 분석기를 사용하여 정량하였다. 세척된 혈소판에 1 mM CaCl₂과 함께 다양한 농도의 쌀겨발효추출물을 투여하고 실온에서 2분간 배양하였다. 그리고서 혈소판은 5분간 콜라겐으로 자극 후 즉시 Alexa Fluor 488(20 µg/mL; Thermo Fisher Scientific, USA)을 첨가하여 5분간 배양하였으며, 0.5% paraformaldehyde로 4°C에서 30분간 고정하였다. 고정된 혈소판은 원심분리 후 PBS에 재 부유하였다. 각 혈소판 시료의 형광 강도는 FACS Calibur cytometer(BD Biosciences, USA)로 측정하였고 데이터는 CellQuest software(BD Immunocytometry Systems, USA)를 사용하여 분석하였다.

동정맥단락술을 이용한 혈전 형성 측정

쌀겨발효추출물의 생체 내 항혈전 효과는 rat 동정맥단락술(arterio-venous shunt thrombosis model)을 사용하여 평가

하였다 [34]. 쌀겨발효추출물을 0.25% carboxymethylcellulose (CMC; Sigma, USA)에 용해하였으며, rat에 경구로 500 mg/kg, 250 mg/kg을 3일간 연속 투여하였다. 마지막 투여 2 시간 후 단락술을 이용한 혈전증 실험을 수행하였다. Urethane (1.25 g/kg i.p; Sigma)을 이용해 마취 후, 8 cm polyethylene 관을 왼쪽 경정맥과 오른쪽 경동맥 사이에 삽입하였다. 생리 식염수로 채워진 두 개의 polyethylene 관을 5 cm 길이의 무명실(직경 0.25 mm)이 포함된 6 cm 길이의 tygon tube에 연결하였다. 체외 순환은 혈전이 무명실에 부착하는 15분 동안 유지 하였다. 실험 종료 후 tube 내의 무명실에 부착된 혈전을 꺼내어 즉시 무게를 측정하였다.

Western blotting

혈소판 응집반응 후 세포로부터 PRO-PREP solution (iNtRON Biotechnology, Korea)을 이용하여 단백질을 분리 하였다. 단백질 농도는 BCA assay법(PRO-MEASURE; iNtRON Biotechnology)을 이용하여 측정하였으며, 10% SDS-PAGE gel에 단백질(40 µg)을 85 V에서 전기영동 한 후 transfer buffer(25 mM Tris, pH 8.5; 0.2 M glycine in 20% methanol)을 이용하여 nitrocellulose membrane으로 단백질을 옮겼다. 10% blocking solution(skim milk, 실온)에 2시간 동안 membrane을 담근 뒤 18시간 동안 1차 항체를 (1:1,000) 반응시켰다. 1차 항체는 extracellular stimulis-responsive kinase(ERK 1/2), mitogen-activated protein kinases (MAPK), p38, c-Jun N-terminal kinase(JNK)를 사용하였다 (Cell Signaling Technology, USA). 계속하여 2시간 동안 2차 항체(horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody; Cell Signaling Technology)를 붙인 뒤 enhanced chemiluminescence(ECL; iNtRON Biotechnology)을 이용하여 필름에 감광하였다.

통계처리

모든 실험자료는 평균 ± 표준편차(SD) 또는 표준오차(SE)로 표시하였다. 통계적인 유의성은 post-hoc Dunnett's test에 의해 측정하였다(SAS Institute, USA). 유의성 한계는 통계 표식을 이용해 각각 표시하였다.

결 과

쌀겨발효추출물의 GC-MS와 HPLC의 분석

쌀겨발효추출물의 생리활성 성분과 지표성분을 분석하기 위해 GC-MS와 HPLC를 이용하여 각각 분석하였다. GC-MS 분석 결과 중요성분으로 9,12-octadecadienoic acid와 hexadecanoic acid였으며 미량성분으로 ethyl linoleate, caffeine, adenine 등이 검출되었다(Table 1). HPLC 분석 결과 쌀겨발효추출물의 지표 성분은 caffeine(0.22 mg/g)과 decursin(0.34 mg/g) 그리고 decursinol angelate(0.24 mg/g)로 각각 확인되었다(Fig. 1).

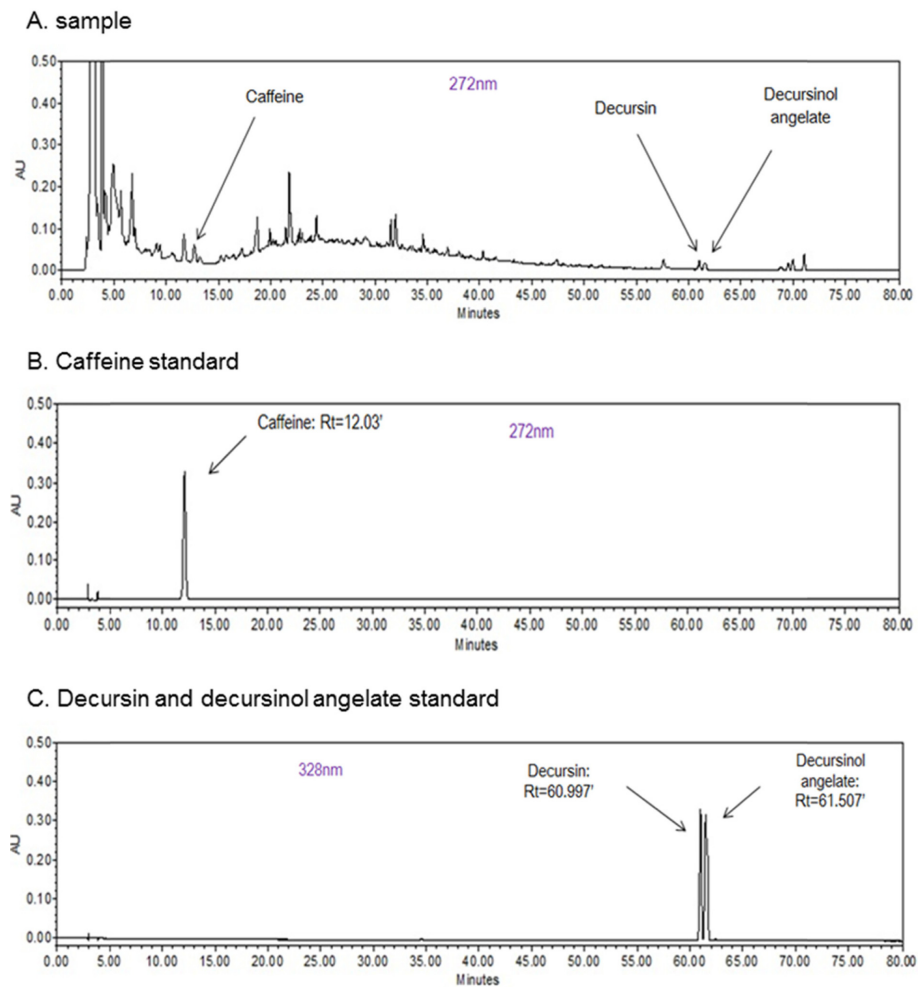


Fig. 1. High performance liquid chromatographic (HPLC) analysis of fermented rice bran extract including caffeine, decursin and decursinolangelate. The fermented rice bran extract contained 0.22 mg/g of caffeine and 0.34 mg/g of decursin and 0.24 mg/g of decursinol, identified at a retention time of approximately 12.03 min (caffeine) and 60.997 min (decursin) and 61.507 min (decursinol angelate) respectively.

Table 1. Chemical composition of fermented rice bran extract by gas chromatography analysis

Chemical name	Percentage (%)
9,12-Octadecadienoic acid	35.07
Octadec-9-enoic acid	30.83
Hexadecanoic acid	20.77
Ethyl linoleate	1.74
Caffeine	1.68
Adenine	0.89
9-Octadecenoic acid	0.86
8-Octadecenoic acid	0.77
Tetradecanoic acid	0.75
1-(2,6,6-Trimethylcyclohex-1-enyl)	0.66
Butyl 9,12-octadecadienoate	0.63
2-Methoxy-4-vinylphenol	0.51

혈소판 응집반응

이전 연구에서 우리는 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 콜라겐이 강한 혈소판 응집반응을 유도한다고 보고하였다 [15]. 이를 근거로 콜라겐에 의해 유도되는 혈소판 응집반응을 쌀겨발효추출물이 억제하는지 실험을 진행하였다. 실험 결과 쌀겨발효추출물은 콜라겐(2.5 $\mu\text{g/mL}$)에 의해 유도된 혈소판 응집반응을 농도 의존적으로 억제하였다(Fig. 2).

쌀겨발효추출물의 세포 내 칼슘 이온 농도

혈관 내피세포가 손상되어 혈소판이 자극을 받으면 세포 질 내의 dense 과립에 저장된 칼슘이 세포 내로 분비된다 [24]. 세포 내로 분비된 칼슘은 혈소판 활성화의 지표 역할을 한다. 따라서 쌀겨발효추출물이 콜라겐 자극으로 인해 rat의 혈소판에서 세포질 내 칼슘 동원에 미치는 영향을 조사하였고, 쌀겨발효추출물을 혈소판에 전처리하고 콜라겐으로 혈소판 응집을 유도하였을 때 세포 내의 칼슘의 분비 정도를 측정하였다. 그 결과 200 $\mu\text{g/mL}$ 에서 콜라겐으로 활성화하지 않

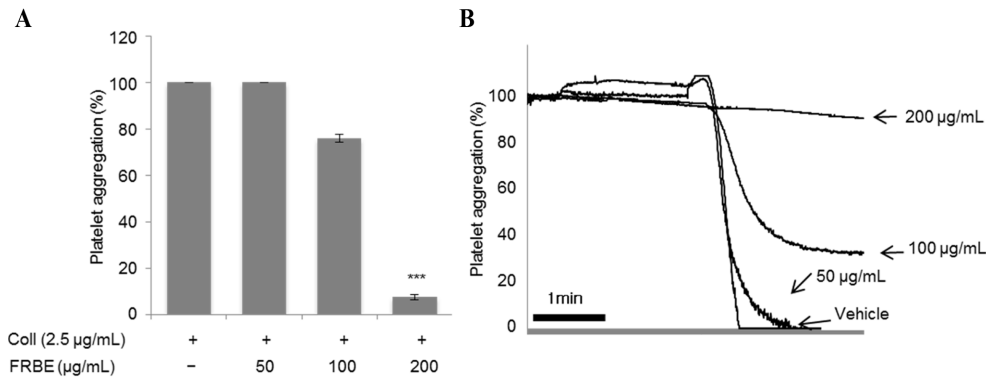


Fig. 2. The inhibitory effect of fermented rice bran extract (FRBE) fraction on platelet aggregation induced by collagen. Platelets (3×10^8 /mL) were pre-incubated with or without fermented rice bran extract (50–200 µg/mL) in the presence of 1 mM CaCl_2 for 2 min at 37°C. The platelet aggregation was then induced by 2.5 µg/mL of collagen, and the extent of aggregation was measured with a chronology aggregometer. The aggregation reaction was terminated after 5 min, and the percent aggregation rate was calculated. Each graph shows the mean \pm SE of at least four independent experiments. *** $p < 0.001$ compared to the agonist control.

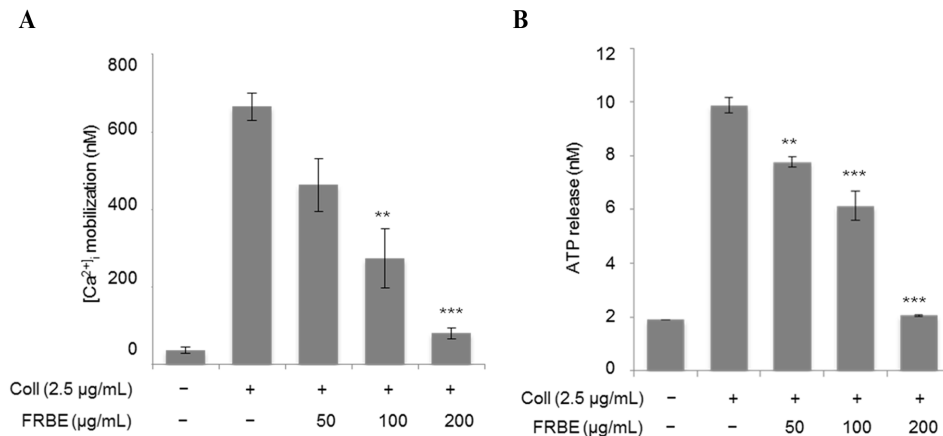


Fig. 3. (A) The inhibitory effect of FRBE on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increased by collagen. Washed platelets (3×10^8 /mL) were incubated with a calcium fluorophore (5 µM, Fura-2/AM) and stimulated with collagen (2.5 µg/mL). $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was then measured as described in the “Materials and Methods” section. (B) Effects of FRBE on granule secretion from the collagen-stimulated platelets. Washed platelets (3×10^8 /mL) were pre-incubated with FRBE at the indicated concentrations and stirred in an aggregometer for 2 min prior to stimulation with 2.5 µg/mL collagen for 5 min. ATP release was then measured as described in the “Materials and Methods” section. Bar graphs show the mean \pm SE of at least four independent experiments. ** $p < 0.005$ and *** $p < 0.001$ compared to the agonist control.

있을 때와 유사하게 칼슘 농도가 측정되어 쌀겨발효추출물이 칼슘 분비를 억제하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3A).

Dense granule의 분비 반응

혈소판이 활성화하면 dense granule은 ATP, serotonin 등을 분비하고 분비된 ATP는 P2X1 수용체와 반응하여 혈소판의 형태를 변화시키고 혈소판 응집을 촉진한다. 그러므로 본 실험에서는 쌀겨발효추출물이 콜라겐에 의해 유도되는 혈소판의 활성화 즉, dense granule의 분비 반응에 미치는 효과를 확인하였다. 실험 결과, 쌀겨발효추출물은 dense granule이 함유한 ATP분비를 농도 의존적으로 억제하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3B). 이 결과로부터 혈소판 활성화 초기 단계를 차단함으로써 혈소판 응집반응을 억제하는 것을 확인할 수 있었다.

Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ 의 활성화

Fibrinogen은 세포 표면에 존재하는 세포 외 기질에 부착할 때 작용하는 수용체 분자인 integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ 와 결합하여 활성화하고, 혈전 형성을 촉진 시키는 역할을 한다. 쌀겨발효추출물을 농도별로 콜라겐으로 혈소판을 활성화해 fibrinogen 결합 정도를 측정한 결과, 200 µg/mL에서 fibrinogen 결합이 온전한 혈소판과 비슷하게 나타났으며, 100 µg/mL, 50 µg/mL 농도에서도 농도 의존적으로 억제하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

혈전형성 억제 효과

Rat의 동정맥단락술은 생체 내 항혈전 효과를 평가하는 데 유용한 동물모델로 사용된다 [34]. Figure 5에서 제시된 바와 같이, 대조군과 비교하였을 때 쌀겨발효추출물을 섭취한

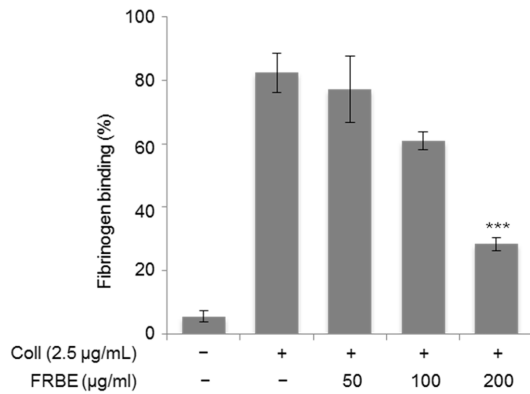


Fig. 4. The inhibitory effects of FRBE on fibrinogen binding to integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ in collagen-activated platelets. Washed platelets (3×10^8 /mL) were pre-treated with vehicle (DMSO) or FRBE at concentrations ranging from 50 μ g/mL to 400 μ g/mL. Collagen was then incubated with human fibrinogen labeled with Alexa Fluor® 488 (20 μ g/mL) for 5 min. The cells were subsequently fixed with 0.5% paraformaldehyde at 4°C for 30 min. Graphs showing fluorescent intensity present the data from one experiment but are representative of four independent trials. Data are expressed as the mean fluorescence intensity (MFI) of fibrinogen-positive platelets. Each graph presents the results expressed as percent of gated. *** $p < 0.001$ compared to the agonist control.

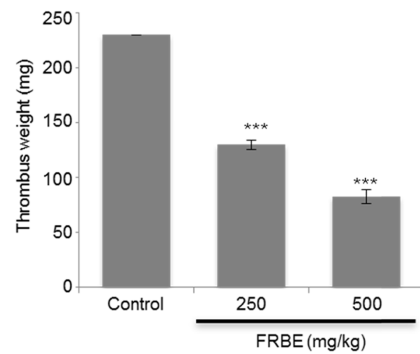


Fig. 5. Effect of FRBE on thrombus formation in rats. The procedures for AV Shunt model are described in the “Materials and Methods” section. Thrombus weight in an arteriovenous shunt was measured at 2 h after 3 days treatments with 0.25% carboxymethylcellulose solution (control) and ethanol extracts of FRBE (250 and 500 mg/kg/day). Data are shown as the mean \pm SD. *** $p < 0.001$ vs. vehicle control.

rat는 혈전 형성이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다(228.2 \pm 4.5 mg, 132.5 \pm 2.2 mg, 78.6 \pm 2.9 mg; Fig. 5).

쫄겨발효추출물의 MAPK 단백질 인산화 반응

MAPK는 효현제(agonist)에 의해 자극이 된 혈소판을 활성화시키고 인산화하여 혈소판 과립의 분비를 자극하는 데 중요한 역할을 한다 [15]. 그러므로 우리는 콜라겐 유도 MAPK의 인산화에 미치는 쫄겨발효추출물의 효과를 조사하였다.

실험 결과 콜라겐에 의한 MAPKs의 인산화는 쫄겨발효추출물에 의해 억제되는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 ERK 1/2에서 인산화는 더 강력하게 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6).

고 찰

쫄겨는 벼를 탈곡, 도정하는 과정에서 생성되는 부산물 중 하나이며 착유의 재료로 이용된다. 쫄겨에는 주로 vitamin B₁, B₂, 지질, 탄수화물 및 무기질 등의 영양성분을 함유하고 있다 [8]. 미생물이 가지고 있는 효소를 이용해 유기물을 분해하는 과정을 발효라고 한다. 쫄겨를 발효하면 일반 쫄겨보다 수분, 단백질, 회분은 증가하고, 지방과 탄수화물은 감소하여 소화 흡수에도 도움이 되는 등 여러 가지로 영양학적

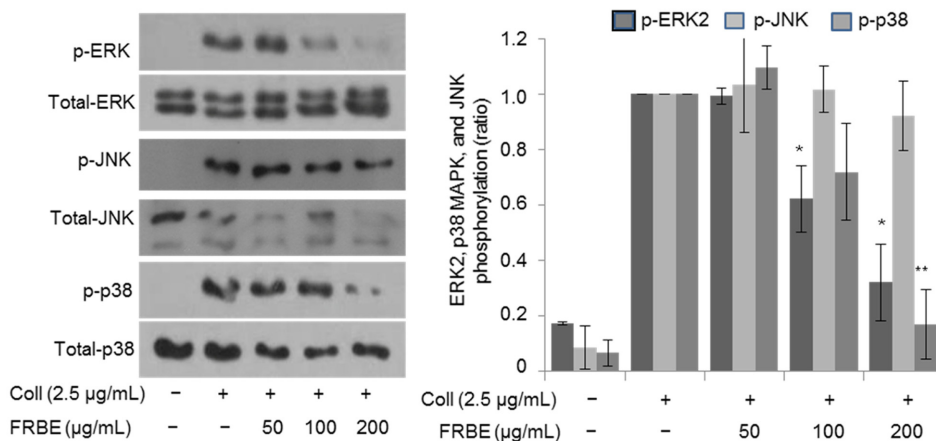


Fig. 6. Effects of FRBE on collagen-induced phosphorylation of MAPKs. Washed platelets (3×10^8 /mL) were pre-incubated for 2 min with vehicle or FRBE at the indicated concentration. The platelets were then stimulated with 2.5 μ g/mL collagen for 5 min at 37°C. After terminating the reactions, total cell proteins were extracted. The proteins were separated by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were then probed with antibodies against phospho-p44/42, p44/42, phospho-p38, p38, phosphor-SAPK/JNK. Antibody binding was visualized by chemiluminescence. All immunoblots are representative of three or four independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ vs. vehicle control.

인 면에서 일반 쌀겨보다 더 좋아진다 [7]. 그래서 우리는 일반 쌀겨보다 영양성분이 더 좋은 쌀겨발효추출물이 생리학적으로 혈소판 응집을 억제하는지 알아보고 그 작용기전을 조사하였다. 쌀겨발효추출물이 *in vitro* 실험에서 콜라겐을 유도하여 혈소판 응집을 농도 의존적으로 억제하였다. 또한 쌀겨발효 추출물의 억제 활성 메커니즘을 밝혀내기 위하여 하류 신호분자인 세포 내 Ca^{2+} 이온농도, dense granule 분비, 단백질 인산화(e.g., MAPKs), 그리고 integrin signaling 과 동정맥단락술 등을 이용하여 분석하였다. 실험 결과 쌀겨발효추출물이 혈소판 응집을 억제하는 것으로 보아 쌀겨발효추출물이 혈소판의 과 활성을 억제하는 약리적 효과가 있는 것으로 생각했다. 쌀겨발효추출물의 항혈소판 작용 기전을 규명하기 위하여 혈소판 과립 내용물 분비작용, 혈소판 단백질 인산화 작용 및 integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ 활성화에 미치는 효과를 조사하였다. Dense granule은 한 개의 혈소판에 2~7개 정도 함유하며 granule 중에는 ATP, ADP, Ca^{2+} 등이 많이 함유되어 있다 [12, 35]. 일단 혈소판이 활성화하면 과립 내용물(ATP, ADP, Ca^{2+} 등)이 분비되어 혈소판을 응집시킨다 [7, 18]. 그래서 Ca^{2+} 이온 동원과 ATP 분비 실험을 통하여 dense granule의 분비를 확인하였고, 이 두 가지 실험에서 쌀겨발효추출물이 dense granule을 함유한 ATP 분비와 세포 내 Ca^{2+} 이온 동원으로 혈소판 응집을 농도 의존적으로 억제하였기 때문에 혈소판 응집을 억제할 수 있음이 입증되었다. 혈소판 응집반응의 다양한 신호전달 경로에서 MAPK의 인산화 반응은 중요한 단계이며 [1], 콜라겐 수용체인 P2X1과 인지질 분해효소(PLC) 경로에 의해 혈소판의 형태를 변화시켜 혈소판이 활성화된다 [25]. 그래서 본 실험에서는 콜라겐 유도 혈소판에서 MAPKs의 인산화 반응에 미치는 영향을 조사하였고, 실험 결과 콜라겐 유도 MAPKs의 인산화는 쌀겨발효추출물에 의해 차단되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 쌀겨발효추출물은 이러한 혈소판 응집반응의 경로를 차단하고, 특히 ERK 1/2의 인산화는 더 강하게 차단하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 동물실험에서 쌀겨발효추출물은 생체 내 혈전 형성을 억제하였다. 즉, rat에서 동정맥단락술을 이용하여 항혈전 효과를 평가한 결과, 대조군보다 3일간 쌀겨발효추출물을 섭취한 rat에서 혈전 무게를 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. 다시 말해 대조군과 비교하였을 때 쌀겨발효추출물을 섭취한 rat의 동맥 혈전이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. GC-MS와 HPLC의 분석 결과 쌀겨발효추출물의 주요 생리활성 성분은 다양한 불포화 지방산과 caffeine, decursin, decursinol angelate로 확인되었다. caffeine은 혈소판 응집 억제작용 [30]과 항혈전 그리고 심장병 발생 억제효과 [11]가 보고되었으며, 특히 decursin과 decursin alanglelate은 arachidonic acid의 대사활성의 증가로 인해 강력한 혈소판 응집제인 thromboxane A_2 (TXA₂)의 생성을 억제하는 효과도 나타낸다 [19]. 이러한 결과를 종합해 볼 때 쌀겨발효추출물은 과도한 혈소판 활성화에 기인한 심혈관 질환에 대한 기능성 식품으로 개발할 수 있을 것으로 생각된다.

References

1. Adam F, Kauskot A, Rosa JP, Bryckaert M. Mitogen-activated protein kinases in hemostasis and thrombosis. *J Thromb Haemost* 2008, **6**, 2007-2016.
2. Berridge MJ, Irvine RF. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 1984, **312**, 315-321.
3. Bhatt DL, Topol EJ. Scientific and therapeutic advances in antiplatelet therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2003, **2**, 15-28.
4. Cho JI, Jung HJ, Ha SD, Kim KS. Growth patterns of lactic acid bacteria during fermentation of radish with rice water and rice bran. *Korean J Food Sci Technol* 2004, **36**, 837-841.
5. Cho SK, Kwon OI, Kim CJ. Anti-inflammatory and analgesic activities of the extracts and fractions of *Cnidium rhizoma*. *Korean J Pharmacogn* 1996, **27**, 282-288.
6. Cho SY, Park JY, Oh YJ, Jang JY, Park EM, Kim MJ, Kim KS. Effect of dandelion leaf extracts on lipid metabolism in rats fed high cholesterol diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2000, **29**, 676-682.
7. Choi HI, Lee BK, Kim SJ. Study on the nutritional components of non-fermented rice bran and fermented rice bran. *Korean J Food Nutr* 2010, **23**, 1-7.
8. Choi HI, Ye EJ, Kim SJ, Bae MJ, Yee ST, Park EJ, Park EM. Anticancer (*in vitro*) and anti-allergy effects of rice bran extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2006, **35**, 1297-1303.
9. Gum PA, Kottke-Marchant K, Welsh PA, White J, Topol EJ. A prospective, blinded determination of the natural history of aspirin resistance among stable patients with cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol*. 2003, **41**, 961-965.
10. Hu FB. Plant-based foods and prevention of cardiovascular disease: an overview. *Am J Clin Nutr* 2003, **78** (Suppl), 544S-551S.
11. Ishikawa T, Suzukawa M, Ito T, Yoshida H, Ayaori M, Nishiwaki M, Yonemura A, Hara Y, Nakamura H. Effect of tea flavonoid supplementation on the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidative modification. *Am J Clin Nutr* 1997, **66**, 261-266.
12. Israels SJ, Gerrard JM, Jacques YV, McNicol A, Cham B, Nishibori M, Bainton DF. Platelet dense granule membranes contain both granulophysin and P-selectin (GMP-140). *Blood* 1992, **80**, 143-152.
13. Jennings LK. Role of platelets in atherothrombosis. *Am J Cardiol* 2009, **103** (Suppl), 4A-10A.
14. Kang S, Han J, Jang K. DPPH radical scavenger activity and antioxidant effects of Cham-Dang-Gui (*Angelica gigas*). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2004, **33**, 1112-1118.
15. Kim SD, Lee IK, Lee WM, Cho JY, Park HJ, Oh JW, Park SC, Kim SK, Kwak YS, Yun BS, Rhee MH. The mechanism of anti-platelet activity of davallialactone: involvement of intracellular calcium ions, extracellular signal-regulated kinase 2 and p38 mitogen-activated protein kinase. *Eur J Pharmacol* 2008, **584**, 361-367.
16. Kuk YI, Shin JS, Kwon OD, Guh JO. Effect of aqueous extracts of rice bran on inhibition of germination and early growth of weeds. *Korean J Environ Agric* 2001, **20**, 108-111.
17. Lee JH, Choi HS, Chung MS, Lee MS. Volatile flavor components and free radical scavenging activity of *Cnidium officinale*. *Korean J Food Sci Technol* 2002, **34**, 330-338.
18. Lee SS, Lee MJ, Kim BJ, Hong SB. Growth, yield and grain

- quality of rice affected by application of crab shell, sericite ore, and charcoal powders. Korean J Environ Agric 2005, **24**, 185-190.
19. **Lee YY, Lee S, Jin JL, Yun-Choi HS.** Platelet anti-aggregatory effects of coumarins from the roots of *Angelica genuflexa* and *A. gigas*. Arch Pharm Res 2003, **26**, 723-726.
 20. **Lim SS, Lee JH.** Biological activity of the soluble extracts from *Artemisia princeps* var *orientalis* acted on cardiovascular system. Korean J Nutr 1997, **30**, 634-638.
 21. **Mohan KVP, Gunasekaran P, Varalakshmi E, Hara Y, Nagini S.** In vitro evaluation of the anticancer effect of lactoferrin and tea polyphenol combination on oral carcinoma cells. Cell Biol Int 2007, **31**, 599-608.
 22. **Most MM, Tulley R, Morales S, Lefevre M.** Rice bran oil, not fiber, lowers cholesterol in humans. Am J Clin Nutr 2005, **81**, 64-68.
 23. **Nishikawa M, Tanaka T, Hidaka H.** Ca²⁺-calmodulin-dependent phosphorylation and platelet secretion. Nature 1980, **287**, 863-865.
 24. **Oh WJ, Endale M, Park SC, Cho JY, Rhee MH.** Dual roles of quercetin in platelets: phosphoinositide-3-kinase and MAP kinases inhibition, and cAMP-dependent vasodilator-stimulated phosphoprotein stimulation. Evid Based Complement Alternat Med 2012, **2012**, 485262.
 25. **Oury C, Toth-Zsamboki E, Vermeylen J, Hoylaerts MF.** P2X₁-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase 2 contributes to platelet secretion and aggregation induced by collagen. Blood 2002, **100**, 2499-2505.
 26. **Park JH, Ha AW, Cho JS.** Effects of green tea-soybean paste on weights and serum lipid profiles in rats fed high fat diet. Korean J Food Sci Technol 2005, **37**, 806-811.
 27. **Park KW, Choi SR, Shon MY, Jeong IY, Kang KS, Lee ST, Shim KH, Seo KI.** Cytotoxic effects of decursin from *Angelica gigas* Nakai in human cancer cells. J Korean Soc Food Sci Nutr 2007, **36**, 1385-1390.
 28. **Pasqui AL, Capecchi PL, Ceccatelli L, Mazza S, Gistri A, Laghi Pasini F, Di Perri T.** Nitroprusside in vitro inhibits platelet aggregation and intracellular calcium translocation. Effect of haemoglobin. Thromb Res 1991, **61**, 113-122.
 29. **Patrono C, Collier B, FitzGerald GA, Hirsh J, Roth G.** Platelet-active drugs: the relationships among dose, effectiveness, and side effects: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. Chest 2004, **126** (3 Suppl), 234S-264S.
 30. **Schaeffer J, Blaustein MP.** Platelet free calcium concentrations measured with fura-2 are influenced by the transmembrane sodium gradient. Cell Calcium 1989, **10**, 101-113.
 31. **Schwartz SM, Heimark RL, Majesky MW.** Developmental mechanisms underlying pathology of arteries. Physiol Rev 1990, **70**, 1177-1209.
 32. **Shin S, Jeon JH, Park D, Jang JY, Joo SS, Hwang BY, Choe SY, Kim YB.** Anti-inflammatory effects of an ethanol extract of *Angelica gigas* in a Carrageenan-air pouch inflammation model. Exp Anim 2009, **58**, 431-436.
 33. **Sohn HY, Kwon CS, Son KH, Kwon GS, Kwon YS, Ryu HY, Kum EJ.** Antithrombosis and antioxidant activity of methanol extract from different brands of rice. J Korean Soc Food Sci Nutr 2005, **34**, 593-598.
 34. **Umetsu T, Sanai K.** Effect of 1-methyl-2-mercapto-5-(3-pyridyl)-imidazole (KC-6141), an anti-aggregating compound, on experimental thrombosis in rats. Thromb Haemost 1978, **39**, 74-83.
 35. **Unsworth AJ, Smith H, Gissen P, Watson SP, Pears CJ.** Submaximal inhibition of protein kinase C restores ADP-induced dense granule secretion in platelets in the presence of Ca²⁺. J Biol Chem 2011, **286**, 21073-21082.
 36. **Wang Y, Li Q, Wang Q, Li Y, Ling J, Liu L, Chen X, Bi K.** Simultaneous determination of seven bioactive components in Oolong tea *Camellia sinensis*: quality control by chemical composition and HPLC fingerprints. J Agric Food Chem 2012, **60**, 256-260.
 37. **Yang KS, Jeon CM.** Effect of *Taraxacum coreanum* Nakai on low density lipoprotein oxidation. Korean J Pharmacogn 1996, **27**, 267-273.
 38. **Zhang L, Du JR, Wang J, Yu DK, Chen YS, He Y, Wang CY.** Z-ligustilide extracted from *Radix Angelica Sinensis* decreased platelet aggregation induced by ADP *ex vivo* and arterio-venous shunt thrombosis *in vivo* in rats. Yakugaku Zasshi 2009, **129**, 855-859.