

# The Inhibitory Effects of Cordycepin on Phosphoproteins including PI3K, Akt, and p38

Hyuk-Woo Kwon<sup>1</sup>, Dong-Ha Lee<sup>2</sup><sup>1</sup>College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu, Korea<sup>2</sup>Department of Biomedical Laboratory Science, Korea Nazarene University, Cheonan, Korea

## PI3K, Akt, p38을 포함한 인산화단백질에 대한 Cordycepin의 억제효과

권혁우<sup>1</sup>, 이동하<sup>2</sup><sup>1</sup>경북대학교 수의학대학, <sup>2</sup>나사렛대학교 임상병리학과

A species of *Cordyceps*, an ingredient in Chinese traditional medicine well-known for its major component, cordycepin (3'-deoxyadenosine), has been known to have antiplatelet effects; however, its effects on regulation of phosphoprotein have not been fully elucidated. In this study, we investigated how cordycepin regulates the phosphoprotein, including phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt and p38, to inhibit platelet aggregation, which are concerned with fibrinogen binding to glycoprotein IIb/IIIa ( $\alpha$ IIb/ $\beta$ <sub>3</sub>) and granule secretion in platelets. Our finding suggests that cordycepin inhibits collagen-induced platelet aggregation with 261.1  $\mu$ M of IC<sub>50</sub> and also inhibits fibrinogen binding to  $\alpha$ IIb/ $\beta$ <sub>3</sub> by a suppression of PI3K/Akt phosphorylation in a dose dependent manner. In addition, cordycepin further showed to inhibit collagen-induced p38 phosphorylation, reducing granule secretion (i.e. ATP- and serotonin-release) and thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) production without regulating cyclooxygenase-1 (COX-1) and thromboxane A synthase (TXAS) activities, as well as phospholipase C- $\gamma$ <sub>2</sub> (PLC- $\gamma$ <sub>2</sub>) phosphorylation. In conclusion, these results demonstrate that cordycepin-mediated antiplatelet effects were due to the inhibition of fibrinogen binding to  $\alpha$ IIb/ $\beta$ <sub>3</sub> via the suppression of PI3K/Akt phosphorylation and inhibition of granule secretion & TXA<sub>2</sub> production by suppressing p38 phosphorylation. These results strongly indicate that cordycepin might have therapeutic or preventive potential for platelet aggregation-mediated disorders, regulating the phosphoprotein, including PI3K/Akt and p38.

**Key words:** Cordycepin, Platelets, PI3K, Akt, p38

Corresponding author: Dong-Ha Lee  
Department of Biomedical laboratory Science,  
Korea Nazarene University, 48 Wolbong-ro,  
Seobuk-gu, Cheonan 31172, Korea  
Tel: 82-41-570-1680  
Fax: 82-41-570-4258  
E-mail: sec38@hanmail.net

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://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.

Copyright © 2017 The Korean Society for Clinical Laboratory Science. All rights reserved.

Received: April 7, 2017  
Revised 1<sup>st</sup>: April 21, 2017  
Revised 2<sup>nd</sup>: April 29, 2017  
Accepted: May 1, 2017

### 서론

혈관벽의 손상 시 야기되는 혈소판 응집은 지혈을 위한 필수적인 과정이지만, 과도한 경우에 고지혈증과 함께 혈전증, 동맥경화증, 뇌졸중, 심근경색과 같은 심혈관계 질환을 유발하는 요인이 되기도 한다[1]. 그러므로, 혈소판 응집을 저해하는 물질에

대한 탐색 및 기전연구는 심혈관계 질환에 대한 예방 및 치료로 이어질 수 있다[2]. 다양한 agonists (collagen, thrombin, ADP)은 혈소판 막의 integrin인 glycoprotein IIb/IIIa ( $\alpha$ IIb/ $\beta$ <sub>3</sub>)를 활성화시킴으로써 fibrinogen과의 결합을 유도하고, 이러한 “inside-out signaling”은 결과적으로 “outside-in signaling”을 야기하여 혈소판의 응집과 혈소판 내 과립방출

을 촉진한다[3,4].  $\alpha$ IIb/ $\beta$ <sub>3</sub> 활성화는 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)와 Akt같은 phosphoprotein의 인산화에 관련이 있으며[5], 이들 phosphoprotein의 인산화에 의해 혈소판 내 세포골격의 재조직화와 과립방출이 일어난다고 알려져 있다[6]. 그러므로, PI3K/Akt 인산화의 억제는 항혈소판 효과를 보이는 물질 또는 성분을 평가하는데 유용하다. 그 예로, Abciximab, etifibatide, lamifiban, 그리고 tirofiban과 같은  $\alpha$ IIb/ $\beta$ <sub>3</sub> antagonist들이 항혈소판 물질로 이용되고 있다[7].

또한, Collagen은 혈관 손상 시에 혈관벽에서 노출되는 물질로서, 혈소판 막의 collagen 수용체인 glycoprotein (GP)VI를 통해 phospholipase C- $\gamma$ <sub>2</sub> (PLC- $\gamma$ <sub>2</sub>)의 인산화 반응을 촉진함으로써 혈소판을 활성화시킨다[8]. 활성화된 PLC- $\gamma$ <sub>2</sub>가 phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>)를 inositol 1, 4, 5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>)와 diacylglycerol (DG)로 가수분해하고, 생성된 IP<sub>3</sub>는 혈소판 내 DTS (Dense Tubular System)의 IP<sub>3</sub> 수용체와 결합하여 Ca<sup>2+</sup> channel을 열어 free Ca<sup>2+</sup> ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)의 동원을 야기한다[9]. 혈소판 내 증가된 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>은 calmodulin과 결합하여 myosin light chain kinase를 활성화시켜 세포골격을 이루는 단백질인 myosin light chain을 인산화 함으로써 혈소판의 형태변화를 일으켜 응집을 유도한다[10,11]. 한편, DG는 DG-와 monoacylglycerol (MG)-lipase에 의해 분해되며 arachidonic acid (AA)를 생성시키는데, AA가 cyclooxygenase-1 (COX-1)과 thromboxane A synthase (TXAS)의 효소작용에 의해 TXA<sub>2</sub>로 바뀐다. 이 때 생성된 TXA<sub>2</sub>는 주변의 다른 혈소판 막 수용체에 결합하여 혈소판 응집을 촉진하는 강력한 agonist로 작용한다고 알려져 있다[12]. 뿐만 아니라, 과립방출을 통해 방출되는 ATP 및 serotonin 등의 물질이 혈소판 응집에 있어서 중요하며, 이들은 MAPK (p38, ERK, 그리고 JNK) phosphoprotein의 인산화와 관련되어 있다고 알려져 있다. 특히, MAPK 중에 p38는 혈소판 내 과립방출 및 myosin light chain의 활성화를 자극함으로써 clot retraction을 유도하는데 중요하게 작용한다[13]. 그러므로, 이들을 어떻게 조절하는지 확인하는 것이 항혈소판 효과를 가지는 물질과 성분을 평가하는데 있어서 매우 유용하다.

*Cordyceps*는 진균 속에 속하는 종으로서 중국의 전통약제로 알려져 있으며, 염증과 암에 있어서 유용하게 처방되어오고 있다[14]. 혈소판의 활성화에 관해서는, *Cordyceps militaris*의 유효성분으로 알려진 cordycepin (3'-deoxyadenosine, Figure 1)이 cAMP와 cGMP에 의존적으로 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>을 억제함으로써 혈소판 활성을 저해한다고 보고된 바 있다[15]. 또한, 우리의 앞선 연구에서는, *Cordyceps militaris*를 n-butanol로 추출한

extracts (WIB801C)가 혈소판 막의  $\alpha$ IIb/ $\beta$ <sub>3</sub>에 fibrinogen이 결합하는 것을 억제한다고 보고된 바 있다[16]. 본 연구에서는, cordycepin이 fibrinogen binding에 관여한다고 알려진 PI3K/Akt와 TXA<sub>2</sub> 생성 및 과립방출에 관여한다고 알려진 p38와 같은 phosphoprotein의 인산화를 어떻게 조절하며 혈소판 응집을 억제에 관여하는지 규명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

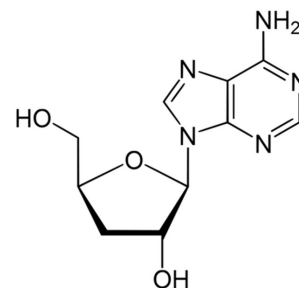
### 1. 실험재료

Collagen은 Chrono-Log 사(Havertown, PA, USA)에서, TXB<sub>2</sub> enzyme immunoassay (EIA) kits와 COX fluorescent activity assay kit는 Cayman Chemical 사(Ann Arbor, MI, USA)로부터 구입하였다. Cordycepin 및 그 밖의 시약들은 Sigma Aldrich 사(Saint Louis, MO, USA)에서 구입하였고, Serotonin EIA kit는 Labor Diagnostika Nord 사(Nordhorn, Germany)에서 ATP assay kit는 Biomedical Research Service Center (Buffalo, NY, USA)에서 구입하였다. Western blotting 용 antibody들과 lysis buffer는 Cell Signaling (Beverly, MA, USA)에서 구입하였고, Polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane와 Enhanced chemiluminescence solution (ECL)는 GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)에서, 그리고 Fibrinogen Alexa Fluor 488 conjugate는 Invitrogen Molecular Probes (Eugene, OR, USA)에서 구입하였다.

### 2. 실험방법

#### 1) 세척혈소판 준비

Acid-citrate-dextrose solution (0.8% citric acid, 2.2% sodium citrate, 2.45% glucose)로 항응고처리된 human platelet-rich plasma (PRP)를 한국적십자 혈액원(Changwon,



**Cordycepin (3'-deoxyadenosine)**

**Figure 1.** Chemical structure of cordycepin (3'-deoxyadenosine).

Korea)으로부터 제공받았다. 미량의 적혈구를 제거하기 위해 PRP를 125 ×g에서 10분간 원심분리 한 후, 1,300 ×g에서 10분간 원심분리하여 platelet pellets을 얻었다. 이것을 washing buffer (138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.36 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.5 mM glucose, and 1 mM EDTA, pH 6.5)로 두 번 세척하고, 세척된 혈소판을 suspension buffer (138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.36 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.49 mM MgCl<sub>2</sub>, 5.5 mM glucose, 0.25% gelatin, pH 6.9)로 재구성하여 최종 10<sup>8</sup>/mL 농도가 되게 하였다. 위에 있는 모든 과정은 낮은 온도에서 일어날 수 있는 혈소판 응집을 피하기 위하여 25°C에서 수행하였다. 이 실험은 The Korea National Institute for Bioethics Policy Public Institutional Review Board (Seoul, Korea)의 승인을 받아 수행되었다(PIRB12-072).

#### 2) 혈소판 응집반응의 측정

세척 혈소판(10<sup>8</sup>/mL)에 여러 농도의 cordycepin을 첨가하여 37°C에서 3분간 전처리 한 후, 10 µg/mL collagen으로 응집을 유도하고 5분간 측정하였다. 응집은 1,000 rpm stirring speed에서 560CA aggregometer (Chrono-Log, Havertown, PA, USA)로 측정하였고, 응집능은 빛 투과도의 증가된 정도로 산출하였다. Suspension buffer를 투과도 0%의 기준 값으로 사용하였고, cordycepin는 suspension buffer (pH 6.9)에 녹여서 사용하였다.

#### 3) Western blot법을 이용한 phosphoprotein의 인산화 측정

세척 혈소판(10<sup>8</sup>/mL)에 여러 농도의 cordycepin을 첨가하여 37°C에서 3분간 전처리 한 후, 10 µg/mL collagen으로 응집을 유도하고 5분간 반응시켰다. 동량의 lysis buffer를 첨가함으로써 반응을 정지시켰다. 혈소판 용해물을 bicinchoninic acid protein assay kit (Pierce Biotechnology, IL, USA)를 사용하여 단백질 정량하였고 동량의 단백질(15 µg)을 분석에 사용하였다. Cordycepin이 phosphoprotein (PI3K, Akt, p38, PLC-γ<sub>2</sub>)의 인산화에 미치는 효과를 western blot법으로 측정하였다. 전기영동에 6-8% SDS-PAGE를 사용하였고 PVDF membrane에 단백질을 transfer하였으며, transfer한 membrane은 ECL 시약을 반응시켜 발색하였다. Quantity One, Version 4.5 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 band의 밀도를 분석하였다.

#### 4) 혈소판에 대한 fibrinogen결합능 측정

세척 혈소판(10<sup>8</sup>/mL)에 여러 농도의 cordycepin을 첨가하

여 37°C에서 3분간 전처리 한 후, 30 µg/mL Alexa Flour 488-human fibrinogen을 첨가하여 10 µg/mL collagen으로 응집을 유도하고 5분간 반응시켰다. 0.5% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline으로 반응을 정지시키고, 혈소판에 결합한 Alexa Fluor 488-fibrinogen의 형광을 FACSCalibur flow cytometry (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)로 측정하였고 결과값을 cellQuest software로 분석하였다.

#### 5) ATP 방출의 측정

세척 혈소판(10<sup>8</sup>/mL)에 여러 농도의 cordycepin을 첨가하여 37°C에서 3분간 전처리 한 후, 10 µg/mL collagen으로 응집을 유도하고 5분간 반응시켰다. Ice-cold 1 mM EDTA으로 반응을 정지한 후, 원심분리하여 상층으로 방출된 ATP를 ATP assay kit를 사용하여 Synergy HT multi-model microplate reader (BioTek Instruments, USA)로 측정하였다.

#### 6) Serotonin 방출의 측정

세척 혈소판(10<sup>8</sup>/mL)에 여러 농도의 cordycepin을 첨가하여 37°C에서 3분간 전처리 한 후, 10 µg/mL collagen으로 응집을 유도하고 5분간 반응시켰다. Ice-cold 1 mM EDTA으로 반응을 정지한 후, 원심분리하여 상층으로 방출된 serotonin을 serotonin EIA kit를 사용하여 synergy HT multi-model microplate reader (BioTek Instruments, USA)로 측정하였다.

#### 7) TXB<sub>2</sub> 생성량의 측정

세척 혈소판(10<sup>8</sup>/mL)에 여러 농도의 cordycepin을 첨가하여 37°C에서 3분간 전처리 한 후, 10 µg/mL collagen으로 응집을 유도하고 5분간 반응시켰다. Ice-cold 1 mM EDTA와 0.2 mM indomethacin을 첨가하여 반응을 정지시켰다. TXA<sub>2</sub>의 안정한 대사체인 TXB<sub>2</sub>의 양을 TXB<sub>2</sub> EIA kit 를 사용하여 synergy HT multi-model microplate reader (BioTek Instruments, USA)로 측정하였다.

#### 8) Cyclooxygenase-1 (COX-1)의 활성 측정

세척 혈소판(10<sup>8</sup>/mL)에 1% protease inhibitor cocktail (Sigma Aldrich, USA)를 첨가하여 sonicator (Bandelin Electronic, Bandelin, Germany)로 100% 감도에서 20초 동안 10번 sonication하여 혈소판 용해물을 만들었다. 이를 4°C에서 12,000 ×g로 15분간 원심분리하여 세포 debris를 제거한 상층에 cordycepin을 첨가하여 37°C에서 30분간 전처리 한 후, COX-1 활성을 COX activity assay kit를 사용하여 synergy

HT multi-model microplate reader (BioTek Instruments, USA)로 측정하였다.

9) Thromboxane A Synthase (TXAS)의 활성 측정

세척 혈소판( $10^8$ /mL)에 1% protease inhibitor cocktail (Sigma Aldrich, USA)를 첨가하여 sonicator (Bandelin Electronic, Bandelin, Germany)로 100% 감도에서 20초 동안 10번 sonication하여 혈소판 용해물을 만들었다. 이를 4°C에서  $12,000 \times g$ 로 15분간 원심분리하여 세포 debris를 제거한 상층에 cordycepin을 첨가하여 37°C에서 30분간 전처리 한 후, prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>)를 첨가하여 37°C에서 1분간 효소반응을 일으키고 1 M citric acid로 정지시켰다. 1 N NaOH를 첨가하여 중화시킨 후, TXA<sub>2</sub>의 안정한 대사체인 TXB<sub>2</sub>의 양을 TXB<sub>2</sub> EIA kit를 사용하여 synergy HT multi-model microplate reader (BioTek Instruments, USA)로 측정하였다.

10) 통계분석

측정된 모든 실험결과들은 mean±SEM로 처리하여 analysis of variance (ANOVA)로 분석하였다. 그룹간의 평균에 유의적인 차이가 있을 경우, Newman-Keuls method로 비교하여 각 그룹간에 표기하였다.  $p < 0.05$  일 때 유의적인 의미가 있는 것으로 판단하였다.

결 과

1. Cordycepin이 collagen유도 혈소판 응집에 미치는 효과

혈소판을 최대치로 응집시키는 collagen의 농도가 약 10 µg/mL이었기에, 본 실험에서는 10 µg/mL collagen으로 응집을 유도하였다[17]. 혈소판에 collagen을 첨가하여 응집을 유도하였을 때, 응집율이  $72.4 \pm 2.2\%$ 로 나타났고, cordycepin을 여러 농도 (50~500 µM)로 첨가하였을 때에 농도의존적으로 강하게 응집이 억제되는 결과를 확인하였다(Figure 2A). 이 때, cordycepin의 the half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>)값은 261.1 µM (Figure 2B)로 산출되었다. 이는 cordycepin이 강력한 항혈소판 효과를 가지고 있는 물질임을 보여주는 결과이다.

2. Cordycepin이 PI3K- 및 Akt-인산화와 fibrinogen 결합에 미치는 효과

Figure 3A의 lane 1, 2에서 보여지는 바와 같이, collagen은 intact cell에 비하여 PI3K의 인산화를 강하게 증가시켰다. 그

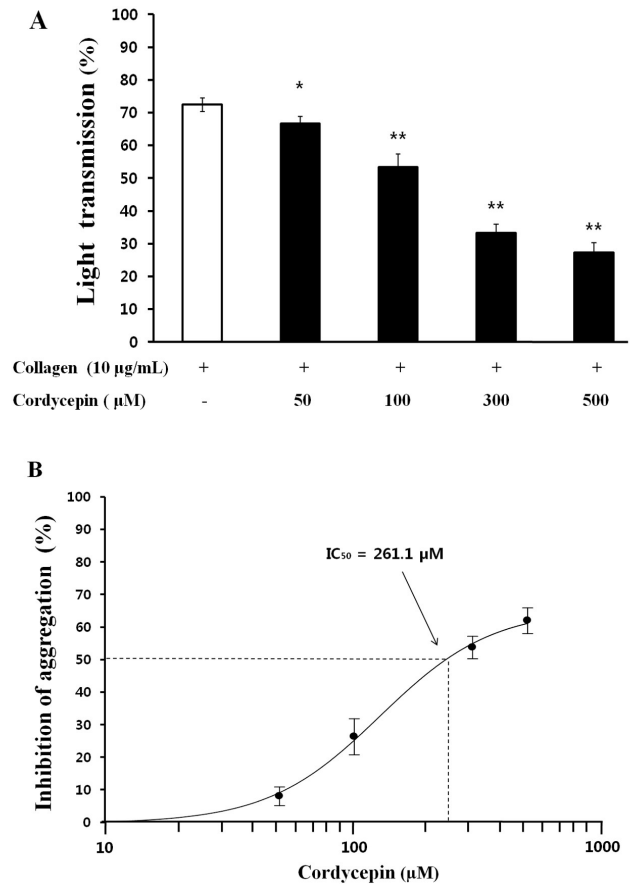
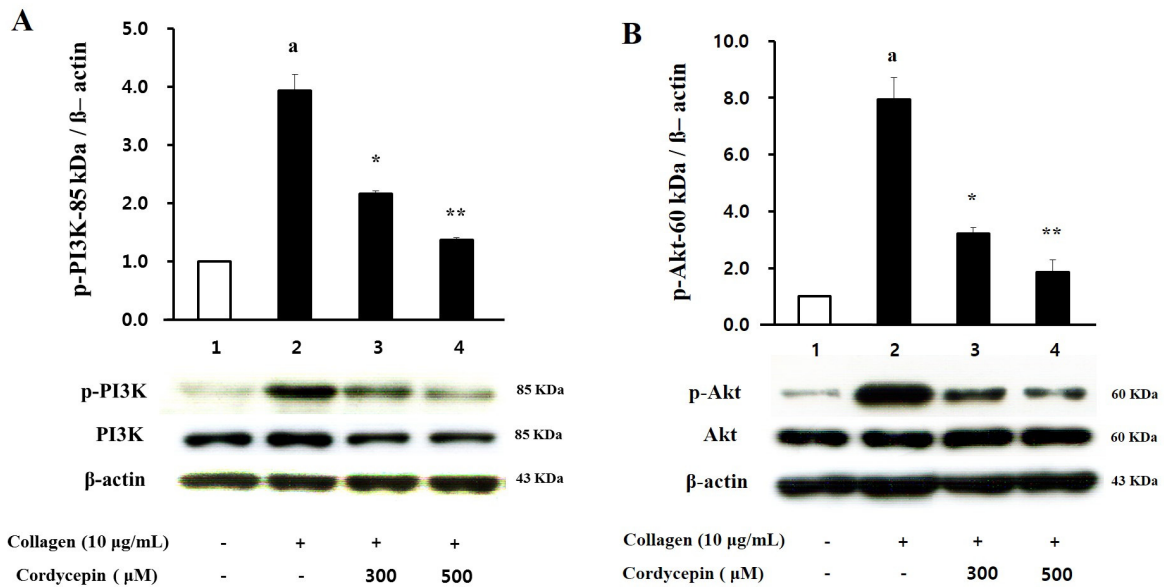


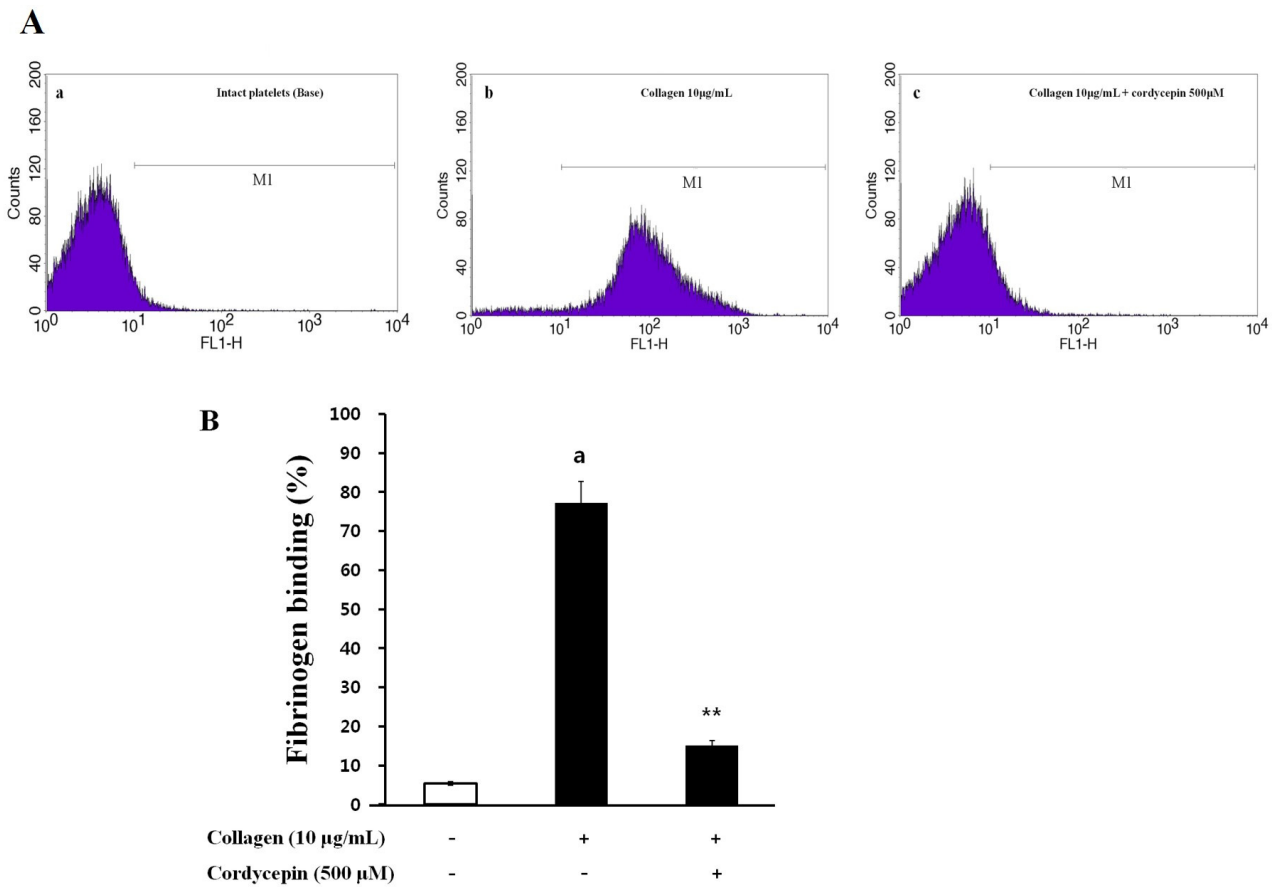
Figure 2. Effect of cordycepin on collagen-induced platelet aggregation, and its IC<sub>50</sub> value (A) Effect of cordycepin on collagen-induced platelet aggregation. (B) IC<sub>50</sub> value of cordycepin on collagen-induced platelet aggregation. The data are expressed as the mean±SEM (N=4). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$  versus the collagen-stimulated platelets.

리고, collagen에 의해 증가된 PI3K의 인산화가 cordycepin에 의해 농도의존적으로 감소되었다(Figure 3A lane 3,4). 또한, collagen은 PI3K 표적분자인 Akt의 인산화를 증가시켰지만 (Figure 3B lane 1,2), 이 또한, cordycepin을 첨가하였을 경우에 농도의존적으로 감소되었다(Figure 3B lane 3,4). 이는 collagen에 의해 촉진되는 phosphoprotein (PI3K, Akt)의 인산화를 cordycepin이 억제한다는 것을 보여주는 결과이다.

이에 더하여, cordycepin이 αIIb/β<sub>3</sub>에 대한 fibrinogen의 결합에 미치는 효과를 확인하였을 때, collagen이 intact cell에 비해  $77.2 \pm 5.5\%$ 로 증가시킨 것을(Figure 4A-a,b and 4B), cordycepin이  $15.1 \pm 0.6\%$ 까지 억제하는 결과도 확인하였다 (Figure 4A-c and 4B).



**Figure 3.** Effects of cordycepin on PI3K- and Akt-phosphorylation. (A) Effects of cordycepin on PI3K phosphorylation. (B) Effects of cordycepin on Akt phosphorylation. The phosphorylation was determined as described in “Methods”. These data were expressed as the mean±SEM (N=4). <sup>a</sup>*p*<0.05 versus the non-stimulated platelets, \**p*<0.05 versus the collagen-stimulated platelets, \*\**p*<0.001 versus the collagen-stimulated platelets.



**Figure 4.** Effects of cordycepin on collagen-induced fibrinogen binding. (A) The flow cytometry histograms on collagen-induced fibrinogen binding. (a) Intact platelets (base); (b) Collagen (10 μg/mL); (c) Collagen (10 μg/mL) + cordycepin (500 μM). (B) Effects of cordycepin on collagen-induced fibrinogen binding (%). The reactions were determined as described in “Methods”. The data are expressed as the mean±SEM (N=4). <sup>a</sup>*p*<0.05 versus non-stimulated platelets, \*\**p*<0.001 versus the collagen-stimulated platelets.

### 3. Cordycepin이 p38의 인산화와 ATP, serotonin의 방출에 미치는 효과

혈소판 내 과립방출의 유도체로 알려진 MAPK의 하나인 p38 phosphoprotein의 인산화가 cordycepin에 의해 어떻게 조절되는지 확인한 결과, collagen에 의해 촉진된 p38의 인산화가 cordycepin에 의해 농도의존적으로 강하게 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Figure 5A).

또한, 혈소판 내 과립방출 정도를 확인하는데 이용되는 지표로서 ATP와 serotonin 방출 결과를 확인한 결과, collagen은  $3.91 \pm 0.21 \mu\text{M}$  로 intact cell에 비해 43.4배 정도 ATP 방출을 촉진하였고, cordycepin이 이를 58.1% ( $1.64 \pm 0.06 \mu\text{M}$ )로 강하게 감소시켰다(Figure 5B). Serotonin 방출에 있어서는, intact cell에서  $11.53 \pm 1.58 \text{ ng}/10^8$  platelets 정도였던 serotonin 양을 collagen이  $84.67 \pm 6.51 \text{ ng}/10^8$  platelets까지 강하게 방출하게 하였고, cordycepin에 의해 62.9% ( $31.38 \pm 1.97 \text{ ng}/10^8$  platelets)로 억제되었다(Figure 5C).

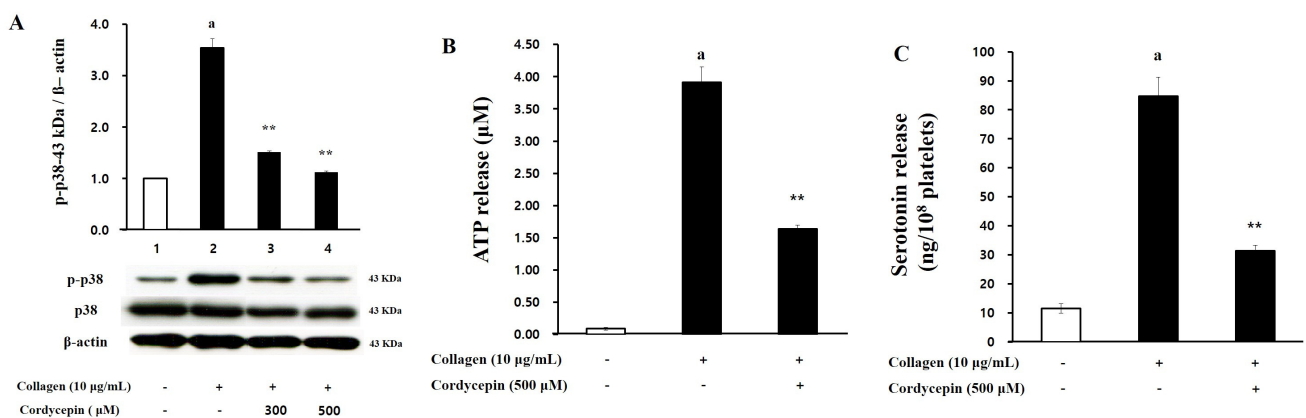
### 4. Cordycepin이 TXA<sub>2</sub> 생성과 COX-1와 TXAS 활성화 및 PLC-γ<sub>2</sub>의 인산화에 미치는 효과

ATP, serotonin와 함께 p38의 인산화에 영향을 받는다고 알려진 TXA<sub>2</sub> 생성에 있어 cordycepin이 어떤 영향을 미치는지도 확인하였다. 그 결과, Figure 6A에서 보여지는 바와 같이, intact cell에서  $0.6 \pm 0.1 \text{ ng}/10^8$  platelets였던 TXA<sub>2</sub> 양이 collagen에 의해  $60.1 \pm 1.0 \text{ ng}/10^8$  platelets로 강하게 증가하였고, cordycepin은 collagen에 의해 증가한 TXA<sub>2</sub>를  $17.7 \pm 0.7 \text{ ng}/10^8$  platelets로 70.5% 억제하였다. TXA<sub>2</sub> 생성은 혈소판 막

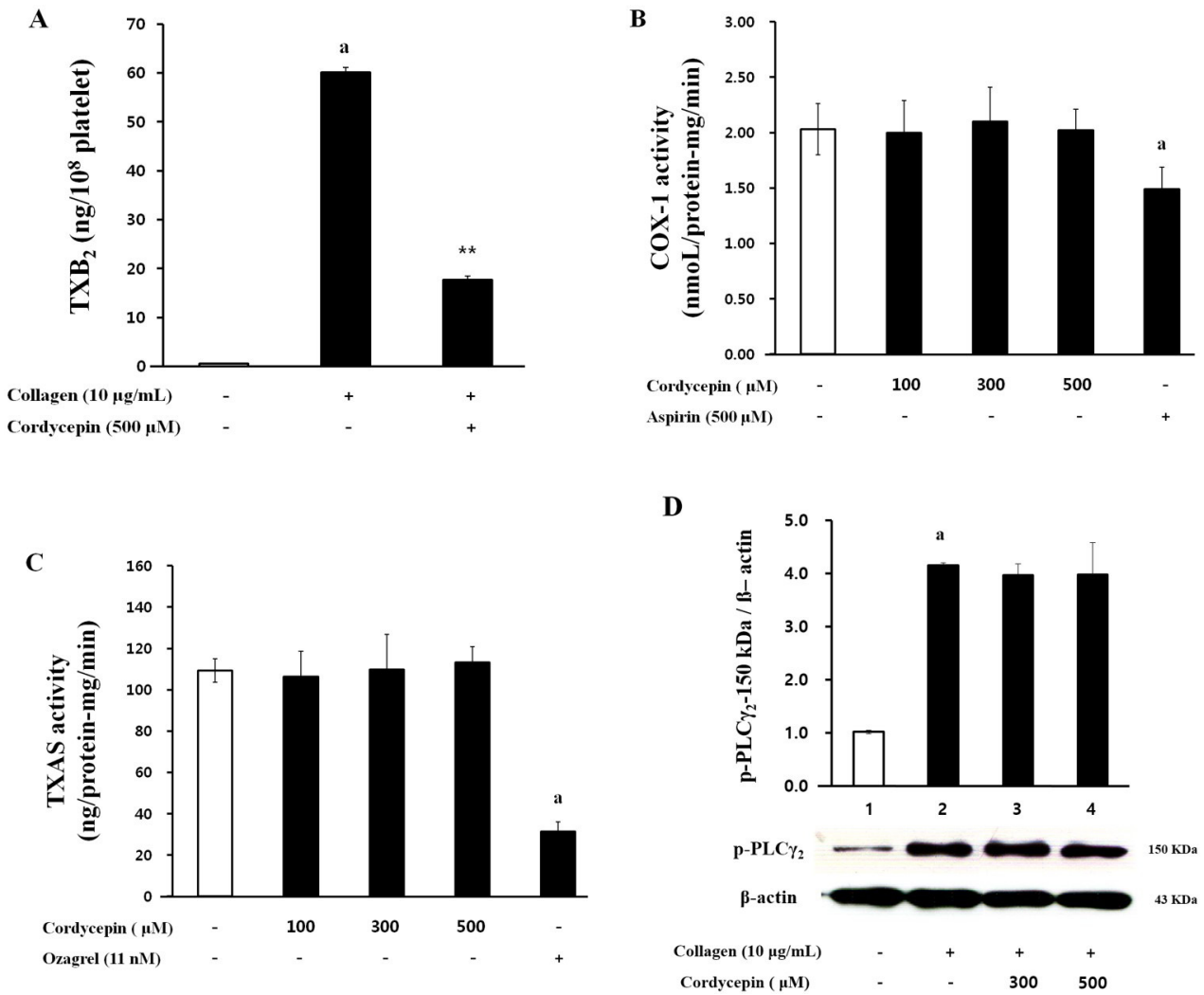
에 있는 PIP<sub>2</sub>가 PLC-γ<sub>2</sub>에 의해 분해되어 나오는 AA로부터 COX-1과 TXAS의 효소작용에 의해 만들어진다[17,18]. 따라서, 이들에 미치는 cordycepin의 효과를 함께 살펴보았다. 그 결과, Figure 6B 및 6C에서 보여주는 바와 같이, cordycepin이 COX-1과 TXAS 활성화에 유의적인 영향을 미치지 못한다는 것을 알 수 있었다. 또한, PLC-γ<sub>2</sub> 인산화에 있어서도, collagen이 강하게 증가시킨 PLC-γ<sub>2</sub> 인산화에 cordycepin이 유의적인 영향을 미치지 못하였음을 확인하였다(Figure 6D lane 2,3,4).

### 고찰

혈소판의 활성화에 있어서, cordycepin (3'-deoxyadenosine, Figure 1)에 관련된 작용들이 보고된 바가 있지만[15,16], phosphoprotein의 인산화에 미치는 효과에 대한 연구가 미흡하였기에, 본 연구에서는 이를 확실히 규명하고자 하였다. 그 결과, collagen이 유도한 혈소판 응집에 있어서 cordycepin이 261.1 μM의 IC<sub>50</sub>으로 농도의존적으로 강력하게 응집을 억제하고 있음을 보여주었고(Figure 2), 이는 몇 가지 중요한 phosphoprotein (PI3K, Akt, p38)의 인산화에 의한 것임을 확인할 수 있었다. 우선, cordycepin은 collagen에 의해 증가된 PI3K와 Akt의 인산화를 농도의존적으로 감소시켰고(Figure 3), 또한 αIIb/β<sub>3</sub>에 대한 fibrinogen 결합을 농도의존적으로 억제하였다. PI3K와 Akt의 인산화는 αIIb/β<sub>3</sub>를 활성화하여 fibrinogen 결합을 증가시킴으로써 혈소판 응집을 유도한다는 연구들이 보고된 바 있다[5,20]. 따라서, cordycepin에 의한 혈소판 응집의 억제는 cordycepin에 의해 PI3K/Akt phosphoprotein의 인산화가 억제됨으로써 αIIb/β<sub>3</sub>의 비활성화에 의한 fibrinogen 결



**Figure 5.** Effects of cordycepin on p38 phosphorylation, and ATP-and serotonin-release. (A) Effects of cordycepin on p38 phosphorylation in collagen-induced platelets. The phosphorylation was determined as described in "Methods". (B) Effects of cordycepin on ATP release in collagen-induced platelets. (C) Effects of cordycepin on serotonin release in collagen-induced platelets. ATP and serotonin release were measured using EIA kits. These data were expressed as the mean ± SEM (N=4). <sup>a</sup>*p*<0.001 versus the non-stimulated platelets, <sup>\*\*</sup>*p*<0.001 versus the collagen-stimulated platelets.



**Figure 6.** Effects of cordycepin on collagen-induced TXA<sub>2</sub> production, COX-1 and TXAS activities, and PLC-γ<sub>2</sub> phosphorylation (A) Effects of cordycepin on collagen-induced TXA<sub>2</sub> production. TXA<sub>2</sub> was determined by TXB<sub>2</sub> EIA kit as described in "Methods". (B) Effects of cordycepin on COX-1 activity in platelet lysates. (C) Effects of cordycepin on TXAS activity in platelet lysates. COX-1 and TXAS activity was determined by COX activity assay and TXB<sub>2</sub> EIA kit as described in "Methods". (D) Effect of PLC-γ<sub>2</sub> phosphorylation. The phosphorylation was determined as described in "Methods". These data were expressed as the mean±SEM (N=4). <sup>a</sup>*p*<0.05 versus the non-stimulated platelets, <sup>\*\*</sup>*p*<0.001 versus the collagen-stimulated platelets.

합이 감소한 결과로 보여진다.

또한, 혈소판 억제작용에 대한 물질이나 성분을 평가할 때, 중요한 지표로 확인하는 것이 강력한 autacoid로 알려진 TXA<sub>2</sub>의 생성량이다. Collagen이 유도하는 혈소판의 활성화 과정에서, collagen이 혈소판 막에 있는 collagen 수용체인 glycoprotein (GP) VI에 결합하면 tyrosine kinase가 활성화됨으로써 phospholipase C-γ<sub>2</sub> (PLC-γ<sub>2</sub>)이 인산화를 일으킨다[8]. 이는 막에 위치한 phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>)를 분해하여 diacylglycerol (DG)를 방출시키고, DG와 monoacylglycerol (MG)-lipase의 효소작용으로 arachidonic acid (AA)가 되는데, 이AA가 cyclooxygenase-1 (COX-1)과

thromboxane A synthase (TXAS)의 효소작용에 의해 TXA<sub>2</sub>로 전환되어 다른 혈소판을 응집하는 강력한 agonist로 작용한다 [9,12]. 따라서, TXA<sub>2</sub>의 생성을 저해하는 물질들이 항혈소판 물질로서 유용하게 이용되고 있다. 그 예로, COX-1의 활성을 저해하는 aspirin, TXAS의 활성을 억제하는 ozagrel과 같은 물질들이 있다[18,19]. 또한, 우리의 앞선 연구에서, 항혈소판 효과를 나타내는 물질들 (caffeic acid, EGCG, chlorogenic acid, total saponin form Korea Red Ginseng)에서도 TXA<sub>2</sub>의 생성이 억제되는 것을 확인할 수 있다[17,21-23]. 그러나, cordycepin이 어떤 과정을 통해 TXA<sub>2</sub>의 생성을 억제하였는지에 대한 연구 결과는 불명확하다. Mei-Chi등의 연구에 의하면[24], MAPK

중 하나인 p38의 인산화가 AA방출과 TXA<sub>2</sub>의 생성에 있어서 결정적으로 작용하여 혈소판 응집을 일으키는 것으로 알려져 있다. 뿐만 아니라, p38의 인산화가 ATP 및 serotonin 방출과 같은 혈소판 과립방출을 유도하고, myosin light chain의 활성화를 자극하여 clot retraction을 유도하는데 중요하게 작용한다고 보고되어있다[13]. 본 연구에서는, cordycepin이 p38의 인산화에 어떻게 관여하고 있는지 규명하고, 이를 통한 과립방출(ATP, secretion)의 정도와 TXA<sub>2</sub>의 생성에 미치는 영향을 살펴 보았다. 아울러, TXA<sub>2</sub>의 생성에 관여하는 COX-1 및 TXAS의 활성과 PLC- $\gamma_2$ 의 인산화에 cordycepin이 관여하는지 확인함으로써 그 상관관계를 분명히 하고자 하였다. 그 결과, collagen이 촉진시킨 p38의 인산화가 cordycepin에 의하여 농도의존적으로 강하게 감소되었고(Figure 4A), 이와 함께 과립방출의 지표인 ATP 및 serotonin의 방출이 강하게 억제되었고(Figure 4B, 4C), TXA<sub>2</sub>의 생성량도 cordycepin에 의해 감소되는 것을 확인할 수 있었다(Figure 5A). 그러나, TXA<sub>2</sub> 생성에 관여하는 효소인 COX-1과 TXAS의 활성은 cordycepin에 의해 영향을 받지 않았고, PLC- $\gamma_2$ 의 인산화도 cordycepin에 의한 변화를 확인하지 못하였다. 이는, cordycepin에 의한 TXA<sub>2</sub> 생성량 감소가 COX-1 및 TXAS의 활성과 PLC- $\gamma_2$ 의 인산화의 조절에 의한 것이 아님을 의미하며, cordycepin가 p38의 인산화를 억제하여 과립방출(ATP 및 serotonin 방출)과 함께 TXA<sub>2</sub> 생성량을 감소시킴으로써 혈소판응집을 저해한 것을 의미한다.

결론적으로, cordycepin은 PI3K/Akt, p38과 같은 phosphoprotein의 인산화를 억제시킴으로써,  $\alpha$ IIB/ $\beta_3$ 에 대한 fibrinogen 결합 및 과립방출과 TXA<sub>2</sub> 생성량을 감소시켜 혈소판 응집을 저해하였음이 규명되었다. 따라서, cordycepin은 혈소판 응집으로 인한 심혈관계 질환에 있어서 치료 및 예방약물로 유용한 가치가 있다고 여겨진다.

## 요 약

진균 속에 속하는 종인 *Cordyceps*는 중국의 전통약제로서, 그 유효성분인 cordycepin이 혈소판 응집에 관여한다는 보고가 있지만 phosphoprotein 조절에 관련된 연구는 미흡하다. 본 연구에서는, cordycepin이 fibrinogen binding에 관여한다고 알려진 PI3k/Akt와 TXA<sub>2</sub> 분비 및 과립방출에 관여한다고 알려진 p38와 같은 phosphoprotein의 인산화를 어떻게 조절하며 혈소판응집을 억제시키는지 규명하고자 하였다. 그 결과, cordycepin가 261.1  $\mu$ M의 IC<sub>50</sub>으로 collagen이 유도한 혈소판 응집을 강력하게 억제하였고, PI3K와 Akt의 인산화를 감소

시키며  $\alpha$ IIB/ $\beta_3$ 에 대한 fibrinogen 결합을 농도의존적으로 억제하였다. 또한, cordycepin은 collagen이 촉진시킨 p38의 인산화를 억제함으로써, 과립방출의 지표인 ATP 과 serotonin의 방출을 억제하였고 COX-1과 TXAS의 활성 및 PLC- $\gamma_2$  인산화에 대한 영향없이 TXA<sub>2</sub> 생성량을 감소시켰다. 따라서, cordycepin은 PI3K/Akt, p38와 같은 phosphoprotein의 인산화를 억제함으로써 혈소판 응집억제를 나타내는 항혈전 치료 및 예방약물로서 유용한 가치가 있다고 여겨진다.

**Acknowledgements:** This Research was supported by the Korea Nazarene University Research Grants 2017 and a grant (NRF-2011-0012143 to Hwa-Jin Park) from Basic Science Research Program *via* the National Research Foundation of Korea funded by the Ministry of Education (Science and Technology, Korea).

**Funding:** Korea Nazarene University Research Grants 2017.

**Conflict of interest:** None

## REFERENCES

1. Lee MR, Choi JH, Yang Y, Oh KS, Jeong TS, Lee CH, et al. Attenuation of Atherosclerosis by 3,4-Dihydroxy-Hydrocinnamic Acid in Rabbits by Partial Inhibition of ACAT. Korean J Clin Lab Sci. 2016;48(4):280-286.
2. Schwartz SM, Heinmark RL, Majesky MW. Developmental mechanisms underlying pathology of arteries. Physiol Rev. 1990;70(4):1177-1209.
3. Payraastre B, Missy K, Trumel C, Bodin S, Plantavid M, Chap H. The integrin alpha IIB/beta 3 in human platelet signal transduction. Biochem Pharmacol. 2000;60(8):1069-1074.
4. Phillips DR, Nannizzi-Alaimo L, Prasad KS. Beta3 tyrosine phosphorylation in alphaIIbbeta3 (platelet membrane GP IIB-IIIa) outside-in integrin signaling. Thromb Haemost. 2001;86(1):246-258.
5. Morello F, Perino A, Hirsch E. Phosphoinositide 3-kinase signalling in the vascular system. Cardiovasc Res. 2009;82(2):261-271.
6. Jennings LK. Role of platelets in atherothrombosis. Am J Cardiol. 2009;103(3 Suppl):4-10.
7. Sabatine MS, Jang IK. The use of glycoprotein IIB/IIIa inhibitors in patients with coronary artery disease. Am J Med. 2000;109(3):224-237.
8. Wonerow P, Oberfell A, Wilde JI, Bobe R, Asazuma N, Brdicka T, et al. Differential role of glycolipid-enriched membrane domains in glycoprotein VI- and integrin-mediated phospholipase Cgamma2 regulation in platelets. Biochem J. 2002;364(3):755-765.
9. Quinton TM, Dean WL. Cyclic AMP-dependent phosphorylation of the inositol-1,4,5-trisphosphate receptor inhibits



- Ca<sup>2+</sup> release from platelet membranes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;184(2):893-899.
10. Nishikawa M, Tanaka T, Hidaka H. Ca<sup>2+</sup>-calmodulin dependent phosphorylation and platelet secretion. *Nature.* 1980;287(5785):863-865.
  11. Kaibuchi K, Sano K, Hoshijima M, Takai Y, Nishizuka Y. Phosphatidylinositol turnover in platelet activation; calcium mobilization and protein phosphorylation. *Cell Calcium.* 1982;3(4-5):323-335.
  12. Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B. Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1975;72(8):2994-2998.
  13. 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(4):893-901.
  14. Cunningham KG, Manson W, Spring FS, Hutchinson SA. Cordycepin: A metabolic product from cultures *Cordyceps militaris* Link. Part I. Isolation and characterization. *Nature.* 1950;166(4231):949
  15. Cho HJ, Cho JY, Rhee MH, Park HJ. Cordycepin (3'-deoxyadenosine) inhibits human platelet aggregation in a cyclic AMP- and cyclic GMP-dependent manner. *Eur J Pharmacol.* 2007;558(1-3):43-51.
  16. Lee DH, Kim HH, Lim DH, Kim JL, Park HJ. Effect of Cordycepin-Enriched WIB801C from *Cordyceps militaris* Suppressing Fibrinogen Binding to Glycoprotein IIb/IIIa. *Biomol Ther (Seoul).* 2015;23(1):60-70.
  17. Lee DH, Kim HH, Cho HJ, Bae JS, Yu YB, Park HJ. Antiplatelet effects of caffeic acid due to Ca(2+) mobilization inhibition via cAMP-dependent inositol-1, 4, 5-trisphosphate receptor phosphorylation. *J Atheroscler Thromb.* 2014;21(1):23-37.
  18. Patrono C. Aspirin: new cardiovascular uses for an old drug. *Am J Med.* 2001;110(1A):62-65.
  19. 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.
  20. Kwon HW, Shin JH, Cho HJ, Rhee MH, Park HJ. Total saponin from Korean Red Ginseng inhibits binding of adhesive proteins to glycoprotein IIb/IIIa via phosphorylation of VASP (Ser(157)) and dephosphorylation of PI3K and Akt. *J Ginseng Res.* 2016;40(1):76-85.
  21. Lee DH, Kim YJ, Kim HH, Cho HJ, Ryu JH, Rhee MH, et al. Inhibitory effects of epigallocatechin-3-gallate on microsomal cyclooxygenase-1 activity in platelets. *Biomol Ther (Seoul).* 2013;21(1):54-59.
  22. Cho HJ, Kang HJ, Kim YJ, Lee DH, Kwon HW, Kim YY, et al. Inhibition of platelet aggregation by chlorogenic acid via cAMP and cGMP-dependent manner. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2012;23(7):629-635.
  23. Lee DH, Cho HJ, Kim HH, Rhee MH, Ryu JH, Park HJ. Inhibitory effects of total saponin from Korean red ginseng via vasodilator-stimulated phosphoprotein-Ser(157) phosphorylation on thrombin-induced platelet aggregation. *J Ginseng Res.* 2013;37(2):176-186.
  24. 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(2):559-565.