

Clofibrate의 유도체가 토끼의 혈소판 응집에 미치는 영향

홍충만* · 장동덕 · 신동환 · 조재천 · 조명행¹

국립보건안전연구원 병리부, ¹서울대학교 수의과대학

The Effects of Congeners of Clofibrate on Inhibition of Rabbit Platelet Aggregation

Choong Man HONG*, Dong Deuk JANG, Dong Hwan SHIN,
Jae Chon CHO and Myung Haeng CHO¹

Department of Pathology, National Institute of Safety Research, Seoul 122-020, Korea

¹College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

(Received June 3, 1995; accepted June 16, 1995)

Abstract—Several clofibrate congeners (bezafibrate, gemfibrozil and fenofibrate) were investigated the relationship between effects on the aggregation induced by aggregating agents (thrombin, arachidonic acid, ADP and collagen) and arachidonic acid metabolism in rabbit homogenized platelet. In platelet aggregation study, all drugs produced no significant inhibition (data not shown) in arachidonic acid and thrombin. Also platelet aggregation by ADP was not changed in bezafibrate and inhibited dose dependently in fenofibrate and gemfibrozil. Platelet aggregation by collagen was inhibited dose dependently and significantly (from $p < 0.5$ to $p < 0.001$) by gemfibrozil and fenofibrate at concentrations between 20 and 400 μM . In arachidonic acid metabolism study, synthesis of thromboxane B₂ was not changed in rabbit platelet membranes and that of prostaglandin E₂ and F_{2 α} was slightly increased by all drugs. It was concluded that clofibrate congeners inhibited ADP and collagen induced rabbit platelet aggregation and inhibition of collagen induced aggregation was probably mediated through some mechanism (pathway) other than arachidonic acid metabolism, judging from arachidonic acid metabolites (thromboxane B₂, prostaglandin E₂ and F_{2 α}) synthesis in rabbit homogenized platelet.

Keywords □ platelet aggregation, clofibrate congeners, prostaglandins, thromboxane

적혈구, 백혈구 및 혈소판 등의 혈액세포들은 각기 체내의 항상성 유지에 매우 중요한 역할을 하며 약물이나 독성물질(환경오염물질)이 체내로 들어왔을 때 가장 먼저 영향을 받는 부분이다. 그 중에서 특히 혈소판의 기능은 동맥경화, 심장질환 및 혈전의 형성과 매우 밀접한 관련성이 있다. 혈소판이 응집하기 위해서는 혈소판 사이에 adhesion이 일어나거나 혈소판 내에 존재하는 효소의 작용으로 혈소판의 세포막을 구성하는 인지질이 대사되어 생성되는 여러 가지 중간 대사산물과 혈소판에 존재하는 이것들의 수용체와 상호작용이 있어야 한다. 그래서 약물 중 지방대사에 영향을 줄 수 있는 것은 혈소판의 기능유지에 매우 중요한 역할을 할 수 있기 때문에 이와

관련한 다양한 지표를 이용하여 혈소판의 작용변화를 알아보는 것은 매우 의미있는 연구가 된다. 고지혈증(hyperlipidemia) 치료약물로 과거에 이용하였으나 현재는 발암성 문제로 사용하지 않는 clofibrate는 사람의 혈소판의 응집을 억제시키며(Goodman 등, 1985), coumarin의 수용체에 대한 친화성을 증가시켜 경구로 투여한 항응고제의 반응성을 증가시키고(Zimmermann 등, 1978) 이 약물과 moroxydine의 반응으로 얻어진 moroxybrate 역시 *in vitro*에서 혈소판의 응집을 억제시킨다(Pierre 등, 1987). 현재는 고지혈증치료약물로 clofibrate congeners(bezafibrate, gemfibrozil, fenofibrate)를 사용하고 있다. 그 중 bezafibrate로 동맥경화 환자의 hyperfibrinogenemia를 장기간 치료하면 혈중 fibrinogen의 농도를 낮추어 fibrin의 생성을 줄여 주기때문에 이들 환자에서

*To whom correspondence should be addressed.

나타나는 혈액응고 pathway의 활성을 감소시키므로 매우 가치가 있고(Nihort 등, 1988) 사람 혈소판의 응집억제 작용도 있으며(Almer 및 Kjellstrom, 1986), thromboxane B₂의 형성에는 아무런 영향없이 collagen에 의한 혈소판의 응집효과를 감소시킨다(Pazzuccone 등, 1992). 그리고 gemfibrozil도 coumarin과 같은 항응고제의 작용을 증가시키므로 동일한 효과를 얻으려면 항응고제의 양을 적당히 조절해야 한다(Kazung, 1987).

본 연구에서는 고지혈증치료약물인 clofibrate congeners(bezafibrate, gemfibrozil, fenofibrate)가 현재까지 주로 고지혈증 환자의 치료적인 측면에서 연구가 이루어져 왔고 대부분의 연구에서 혈소판의 응집에 영향을 주는 것으로 보고하고 있으나 그 상세한 작용기전에 대한 연구는 매우 부족하여 이에 대한 연구와 함께 혈소판을 이용한 여러 가지 화학물질의 직접적인 작용기전의 연구 방법을 확립하기 위한 시도를 토끼의 혈소판을 이용하여 수행하고자 한다.

실험방법

실험동물 및 시험물질

실험동물은 토끼(New Zealand white, 2~3 kg)로 고형사료 및 물을 자유급식시키면서 채혈에 이용하였다.

시험물질은 고지혈증(hyperlipidemia) 치료약물로 사용하고 있는 bezafibrate, gemfibrozil과 fenofibrate를 Sigma사에서 구입하여 실험하였다.

시험군의 설정

시험군은 각각의 시험물질별로 3개(20, 200 그리고 400 μ M)의 처리군과 혈소판 응집시험에서 용매로 많이 사용하고 있는 dimethyl sulfoxide(Sigma)를 용매 대조군으로 정하여 처리군과 응집정도를 비교하였다. 이때의 농도는 최종농도이다.

혈소판의 준비

토끼의 이동맥(ear artery)에 정맥세트(21G)를 연결하고 항응고제(sodium citrate, 3.8%)를 채운 주사기로 채혈(혈액 : 항응고제=9 : 1)하였다. 이것을 1,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액(PRP, platelet rich plasma)층만을 얻은 후, 나머지를 다시 3,000 rpm에서 10분간 재원심하여 상층액을 PPP(platelet poor plasma)로 이용하였다. 최종적으로 PRP는 자동혈액세포 분석기(H1 system, Technicon, USA)로 측정하여 그 수가 500,000/ μ 되도록 PPP로 희석하여 혈소판 응집실험에 이용하였다.

혈소판 응집시험

혈소판 응집시험에서 응집인자는 ADP(10 μ M)와 collagen(20 μ g/ml) 이외에도 혈소판 응집시험에서 흔히 사용하는 arachidonic acid(1 mM)를 Chrono-log corp.(Havertown, PA, USA)에서 구입하여 사용하였고, 응집정도의 측정에는 Lumi-aggregometer(Chrono-log corp., Haver-

town, PA, USA)를 이용하였다. 시험방법은 PRP(240 μ)와 시험약물(5 μ)을 37°C, 1,000 rpm의 반응용기에서 약 2분간 반응시킨 후 각각의 응집인자(5 μ)를 넣어 약 3분간 응집곡선을 관찰하여 응집에 미치는 영향을 알아 보았다.

Arachidonic acid 대사산물의 측정

Arachidonic acid 대사산물인 PGF_{2 α} , PGE₂와 thromboxane B₂의 정량은 방사선 동위원소가 표지된 ³H-arachidonic acid를 이용하여 박층크로마토그래피 한 후 β -counter로 약 3분간 정량하였다.

방법은 토끼의 이동맥에서 채혈한 혈액을 응집시험과 동일한 방법으로 PRP를 얻은 후, 이것을 약 1,750 g에서 20분간 원심분리 한다. 그리고 상층액은 버리고 남은 혈소판 pellet을 1 ml의 완충액(100 mM Tris-HCl, 1 mM NaEDTA, pH 7.5)을 섞어 피펫으로 잘 균질화시킨다. 각각의 반응 시험관에는 arachidonic acid 100 μ M, 50 μ (방사선 동위원소가 표지된 ³H-arachidonic acid가 포함된다), epinephrine 50 μ (10 mM), reduced glutathione 1 mM(50 μ), PRP 50 μ 와 DDW가 200 μ 가 포함되게 한다. 이 반응을 37°C water bath에서 30분 동안 실시한 후, formic acid(1 mM) 30 μ 를 첨가하여 반응을 종료시킨다. 이 반응의 생성물을 2 ml의 diethyl ether로 3회 격렬하게 섞어 추출한 후, 질소가스로 건조시킨다. 이것을 50 μ 의 ethyl acetate로 2회 녹여 실리콘 코팅된 박층크로마토그래피 판(GF₂₅₄, 20×20 cm, Sigma)에 점적한다. 이 판을 전개액(180 ml diethyl ether, 4 ml acetic acid, 3 ml methanol)통에서 약 1시간 동안 전개시킨다. 이때 PGF_{2 α} , PGE₂와 thromboxane B₂의 표준물질을 함께 점적한다. 전개가 끝난 후 요오드액을 판에 뿌려 표준물질의 발색위치로부터 각각의 시료위치를 확인한다. 이 위치에 있는 겔을 잘 끊어내어 scintillation vial에 넣고 β -counter로 약 3분간 측정하여 arachidonic acid 대사산물인 PGF_{2 α} , PGE₂와 thromboxane B₂량을 측정하였다.

통계처리

결과의 통계처리는 용매 대조군과 약물처리군 사이의 혈소판 응집정도와 arachidonic acid의 대사산물 합성 결과의 차이를 student t-test로 분석하였다.

실험결과

Table I은 ADP에 의한 혈소판 응집에서 약물의 효과를 나타낸 것이다. Bezafibrate는 용매대조군(46.6±11.4)에 비해 20, 200 그리고 400 μ M에서 각각 49.9±5.6, 48.3±2.5 그리고 51.2±2.8로 응집을 증가시키는 경향을 보였고, gemfibrozil과 fenofibrate는 농도 의존적으로 감소시켰지만 대조군의 실험의 편차가 심하여 통계학적으로 유의성은 관찰할 수 없었다. 본 내용에서 제시하지는 않았지만 arachidonic acid와 thrombin에 의한 혈소판 응집반응은 모든 약물에서 용매대조군과 비교하여 차이

Table I. Effects of bezafibrate, gemfibrozil and fenofibrate on platelet aggregation induced by ADP

Inducer	Drugs	Conc. (μ M)	Aggregation (%)	Inhibition (%)
	Vehicle		46.6 \pm 11.4	
ADP	Bezafibrate	20	49.9 \pm 5.6	(-)7.1
		200	48.3 \pm 2.5	(-)3.7
		400	52.1 \pm 2.8	(-)9.9
	Gemfibrozil	20	45.3 \pm 6.1	2.8
		200	44.1 \pm 5.9	5.4
		400	39.0 \pm 7.9	16.3
	Fenofibrate	20	42.7 \pm 3.0	8.4
		200	38.0 \pm 4.4	18.5
		400	36.3 \pm 8.2	22.1

(-) : Promotion.

Table II. Effects of bezafibrate, gemfibrozil and fenofibrate on platelet aggregation induced by collagen

Inducer	Drugs	Conc. (μ M)	Aggregation (%)	Inhibition (%)
	Vehicle		64.8 \pm 3.8	
Collagen	Bezafibrate	20	65.0 \pm 2.7	(-)0.3
		200	59.7 \pm 5.8	7.9
		400	59.7 \pm 2.3	7.9
	Gemfibrozil	20	64.3 \pm 2.9	0.7
		200	55.3 \pm 2.9**	14.7
		400	55.0 \pm 1.7**	15.1
	Fenofibrate	20	57.0 \pm 1.7*	12.0
		200	45.7 \pm 2.3***	29.5
		400	40.3 \pm 4.6***	37.8

Significance level : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

(-) : Promotion.

가 없었다. Table II는 collagen에 의한 혈소판 응집에서 약물의 효과를 나타낸 것이다. Bezafibrate는 용매대조군(64.8 \pm 3.8)에 비해 20, 200 그리고 400 μ M에서 각각 65.0 \pm 2.7, 59.7 \pm 5.8 그리고 51.2 \pm 2.3으로 응집을 감소시키는 경향을 보였고, gemfibrozil은 200과 400 μ M에서 각각 55.3 \pm 2.9와 55.0 \pm 1.7로 통계학적으로 유의성있게($p < 0.01$) 감소시켰다. 그리고 fenofibrate에서도 20, 200과 400 μ M에서 각각 57.0 \pm 1.7($p < 0.05$), 45.7 \pm 2.3($p < 0.001$) 그리고 40.3 \pm 4.6($p < 0.001$)로 통계학적으로 유의성있게 농도 의존적으로 감소시켰다. Table III은 토끼의 혈소판에서 시험약물이 arachidonic acid 대사산물인 PGF_{2 α} , PGE₂와 thromboxane B₂의 형성에 미치는 영향을 알아본 결과이다. 박층크로마토그래피한 결과 PGF_{2 α} , PGE₂와 thromboxane B₂의 R_f치는 각각 0.20, 0.33 그리고 0.44 이었고, PGF_{2 α} 의 생성량($\times 1,000$ dpm)은 대조군(3.72 \pm 0.2)과 비교하여 bezafibrate(4.44 \pm 1.1), gemfibrozil(4.86 \pm 1.3) 그리고 fenofibrate(4.30 \pm 1.1)에서 증가하였고, PGE₂

Table III. The effects of bezafibrate, gemfibrozil and fenofibrate on rabbit platelet arachidonic acid metabolites synthesis

Metabolite	Drugs*	DPM $\times 10^{-3}$
Thromboxane B ₂	Control	5.89 \pm 3.2
	Bezafibrate	6.17 \pm 1.8
	Gemfibrozil	5.62 \pm 1.7
	Fenofibrate	5.12 \pm 1.7
Prostaglandin E ₂	Control	4.93 \pm 0.3
	Bezafibrate	5.69 \pm 2.7
	Gemfibrozil	5.88 \pm 2.1
	Fenofibrate	5.14 \pm 0.9
Prostaglandin F _{2α}	Control	3.72 \pm 0.2
	Bezafibrate	4.44 \pm 1.1
	Gemfibrozil	4.86 \pm 1.3
	Fenofibrate	4.30 \pm 1.1

*Final concentrations of all drugs are 200 μ M.

($\times 1,000$ dpm)의 생성량은 대조군(4.93 \pm 0.3)에 비해 bezafibrate(5.69 \pm 2.7 dpm), gemfibrozil(5.88 \pm 2.1) 그리고 fenofibrate(5.14 \pm 0.9)로 증가하였다. 그러나 thromboxane B₂의 생성량($\times 1,000$ dpm)은 대조군(5.89 \pm 3.2)에 비해 bezafibrate(6.17 \pm 1.8 dpm)에서 증가한 반면 gemfibrozil(5.62 \pm 1.7)과 fenofibrate(5.12 \pm 1.7)에서는 감소하였다.

고 찰

혈소판의 응집은 다양한 자극이나 기전에 의해서 일어난다. 기본적인 혈소판 응집기전을 연구하기위해 토끼의 대퇴정맥에 cannula를 연결하여 luciferin-luciferase (이것은 혈소판이 응집할 때 밖으로 유리되는 ATP와 반응하여 생기는 빛을 측정)를 이용하여 *in vivo*에서 직접 혈소판에서 유리되는 ATP를 측정하는 방법이 있다 (Smith, 1984). 많은 혈소판 응집인자 중 특히 epinephrine과 ADP는 phospholipase A₂를 활성화 한 후 thromboxane A₂를 형성시켜 혈소판을 응집시킨다. 그리고 실험동물에 응집인자인 collagen과 epinephrine을 투여하여 혈소판의 응집을 연구하는 것은 항 혈전후보 약물의 평가와 혈전연구에 빠르고 유용한 생체내 모델로 이미 널리 알려져 있다. 그러나 응집인자의 종류에 관계없이 혈소판이 응집하기 위해서는 혈소판의 막에 존재하는 glycoprotein IIb/IIIa수용체에 fibrinogen이 결합해야 하며 칼슘이온의 방출이 증가하면 이 결합이 증가하여 응집 역시 증가한다(Loscalzo, 1992). 토끼의 혈소판을 이용한 본 실험에서는 epinephrine을 사용한 결과 거의 응집을 관찰할 수 없어 응집인자로 사용할 수가 없었는데 이것은 토끼의 혈장에서 ADP를 AMP로 빨리 변화시키기 때문이다. Epinephrine은 사람과 고양이 이외의 동물에서 혈소판 응집을 유발하지 못하지만 혈장을 제거한 토끼의

washed platelet suspension에서는 응집을 유발하는데 이것으로 보아 토끼의 혈소판에 epinephrine의 수용체가 존재함을 입증하는 것이다. 한편 실험에 사용한 응집인자 중 arachidonic acid와 thrombin에 대해서는 모든 약물에서 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았다(결과는 제시하지 않았음). ADP는 gemfibrozil과 fenofibrate에서 응집을 억제시켰지만 대조군내의 응집편차가 심하여 통계학적 유의성은 관찰할 수 없었고 collagen에 의한 토끼의 혈소판 응집반응에서는 gemfibrozil과 fenofibrate처리군의 모든 농도에서 용매 대조군과 비교하여 통계학적으로 매우 유의성있게 억제하였는데 이 결과는 bezafibrate가 혈장의 TG와 VLDL을 감소시키고 HDL은 증가시키며 thromboxane A₂의 형성에는 변화없이 collagen에 의한 혈소판의 응집효과를 감소시킨다는 결과(Pazzuccone 등, 1992)로 일부 설명할 수 있다. 한편 사람의 혈소판에서 ¹⁴C-arachidonic acid의 대사 연구(Thomas 등, 1976)와 *in vivo*와 *in vitro* 실험을 통해 thromboxane 수용체 길항제의 효과를 실험하였는데 그 지표로 arachidonic acid에 의한 혈소판의 응집과 thromboxane의 형성을 박종크로마토그래피로 정량한 결과 arachidonic acid의 대사산물은 혈소판의 응집에 직접적인 영향을 준다고 하였다(Harald 등, 1985). 특히 대사산물 중에서 thromboxane B₂는 흰쥐의 혈전형성에 중요한 역할을 할 수 있으며(Takiguchi 등, 1992) 혈소판의 반응성이 증가하는 것은 동맥경화증과 밀접하게 관련이 있지만 혈소판의 응집과 혈압은 관련성이 없다고 보고하였다(Pravene 등, 1992). Arachidonic acid의 많은 대사산물 중에서 PGE₁와 PGE₂는 thromboxane B₂와는 달리 혈소판의 응집을 억제하는 것으로 알려져 있다. 그래서 본 실험에서는 ³H-arachidonic acid의 대사산물인 PGF₂α, PGE₂와 thromboxane B₂를 정량하여 ADP와 collagen에 의한 gemfibrozil과 fenofibrate의 응집억제와 arachidonic acid 대사산물 생성과의 관련성을 알아보았다. 그 결과 thromboxane B₂의 합성은 대조군에 비해 큰 차이가 없었고, 혈소판에서 응집억제 작용을 하는 대사산물인 prostaglandin E₂와 F_{2α}의 합성은 다른 약물에 비해 gemfibrozil 처리군에서 약간 증가하였다. 이와같은 실험결과를 종합해보면 ADP와 collagen을 이용한 토끼의 혈소판 응집반응 실험에서 gemfibrozil과 fenofibrate의 응집억제 작용은 arachidonic acid의 주요 대사산물인 prostaglandin F_{2α}와 E₂ 합성 pathway 이외의 기전을 통해 일어나는 것 같다. 향후 이 방법은 혈소판의 반응성에 영향을 미칠 수 있는 약물의 기전연구, 특히 응집억제 효과가 있는 새로운 약물을 검색하는데 한가지 방법으로 제시할 수 있으며, *in vitro* 및 *ex vivo*에서 혈소판의 응집 및 약물과 환경오염물질(수은 화합물이나 납 등과 같은 중금속류)에 의한 혈소판 세포내에서 방출되는 ATP 및 Ca²⁺을 지

표로 사용하여 화학물질에 의한 혈소판의 반응(기능이상)을 정확하고 간단하게 평가할 수 있는 방법으로 이용할 수 있다.

참고문헌

- Almer, L. O. and Kjellstrom, T. (1986) The fibrinolytic system and coagulation during bezafibrate treatment of hyperglyceridemia. *Atherosclerosis* **61**(1), 81-85.
- Goodman, G. A., Goodman, L. S., Rall, T. W. and Murad, F. (1985) *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 7th ed., Macmillan Publishing Company, New York, pp. 1338-1359.
- Harald, D., Smith, J. B. and Lefer, A. M. (1985) Beneficial effects of a new potent and specific thromboxane receptor antagonist (SQ-29,548) *in vitro* and *in vivo*. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **235**(2), 274-281.
- Kazung, B. G. (1987) Basal and clinical pharmacology, 3rd ed., Appleton and Lange, California, p. 392.
- Loscalzo, J. (1992) Antiplatelet and antithrombotic effects of organic nitrates. *Am. J. Cardiol.* **70**(8), B18-B22.
- Nihort, G., Bulgarelli, A., Cassader, M. and Pagano, G. (1988) Effect of short-term treatment with bezafibrate on plasma fibrinogen, fibrinopeptide A, platelet activation and blood filterability in atherosclerotic hyperfibrinogenemic patients. *Atherosclerosis* **71**(2-3), 113-119.
- Pazzuccone, F., Mannucci, L., Mussoni, L., Gianfranceschi, G., Maderna, P., Werba, P., Franceschini, G., Sirtori, C. R. and Tremdi, E. (1992). Bezafibrate lowers plasma lipids, fibrinogen and platelet aggregability in hypertriglyceridaemia. *European J. Clin. Pharmacol.* **43**(3), 219-223.
- Pierre, M., Bernard, J. and Jean, D. T. (1987) Experimental pharmacological study of moroxybrate, a hypolipidaemic, antithrombotic, antiatheromatous agent. *J. Pharm. Pharmacol.* **39**, 35-38.
- Pravene, M., Kunes, J., Zicha, J., Kren, V. and Klir, P. (1992) Platelet aggregation in spontaneous hypertension-genetic determination and correlation analysis. *J. Hypertension* **10** (12), 1453-1456.
- Smith, J. B., Burk, S. E., Lefer, A. M. and Freilich, A. (1984) Continuous measurement of ATP secretion *in vivo*. *Pharmaceutical Research* **20**, 40-43.
- Takiguchi, Y., Wada, K. and Nakashima, M. (1992) Comparison of the inhibitory effects of the TXA₂ receptor antagonist, Vapiprost and other antiplatelet drugs on arterial thrombosis in rats-Possible role of TXA₂. *Thrombosis and Haemostasis* **68**(4), 460-463.
- Thomas, K. B., Smith, J. B. and Silver, M. J. (1976) Metabolism of (¹⁴C)arachidonic acid by human platelets. *Biochimica et Biophysica Acta* **424**, 303-314.
- Zimmermann, R., Ehlers, W., Walter, E., Hoffrichter, A., Lang, P. D., Andrassy, K. and Schlierf, G. (1978) The effect of bezafibrate the fibrinolytic enzyme system and the drug interaction with racemic phenprocoumon. *Atherosclerosis* **29** (4), 477-485.