

2-Bromo-3-(3,5-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,4-naphthalenedione (TPN2)의 항혈소판 작용

최소연 · 김민화 · 이수환 · 정이숙 · 백은주 · 유충규¹ · 문창현*
아주대학교 의과대학 생리학교실, ¹이화여자대학교 약학대학

Antiplatelet Actions of 2-Bromo-3-(3,5-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,4-naphthalenedione (TPN2)

So Yeon CHOI, Min Hwa KIM, Soo Hwan LEE, Yi-Sook JUNG, Eun Joo BAIK,
Chung-Kyu RYU¹ and Chang-Hyun MOON*

Department of Physiology, School of Medicine, Ajou University, Suwon 442-749, Korea

¹College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

(Received July 7, 1999; accepted August 13, 1999)

Abstract—The effects of 2-bromo-3-(3,5-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,4-naphthalenedione(TPN2), a synthetic vitamin K derivative, on platelet aggregation and its action mechanisms were investigated in rat platelet. TPN2 inhibited the platelet aggregation induced by collagen(10 µg/ml), thrombin(0.1 U/ml), A23187(10 µM) and arachidonic acid(100 µM) in concentration-dependent manner with IC₅₀ values of 6.5 ± 1.3, 59.3 ± 4.5, 13.0 ± 2.37 and 2.9 ± 1.0 µM, respectively. Collagen-induced serotonin release was significantly reduced by TPN2. The elevation of intracellular free Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_i) by collagen stimulation was greatly decreased by the pretreatment of TPN2, which was due to the inhibition of calcium release from intracellular store and influx from outside of the cell. TPN2 also significantly reduced the thromboxane A₂(TXA₂) formation in a concentration-dependent manner. The collagen-induced arachidonic acid (AA) release in [³H]-AA incorporated platelet, an indicative of the phospholipase A₂ activity, was decreased by TPN2 pretreatment. TPN2 significantly inhibited the activity of thromboxane synthase, but did not affect the cyclooxygenase activity. From these results, it is suggested that TPN2 exert its antiplatelet activity through the inhibition of the intracellular Ca²⁺ mobilization and the decrease of the TXA₂ synthesis.

Keywords □ 2-bromo-3-(3,5-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,4-naphthalenedione (TPN2), antiplatelet activity, serotonin release, calcium release, TXA₂ synthesis, phospholipase A₂, thromboxane synthase

혈소판 응집현상은 손상된 혈관부위에서 정상적으로 일어나는 지혈과정중의 하나이다. 그러나 혈소판이 비정상적으로 과도하게 활성화되어 혈관내 응집이 일어나 생성되는 혈전은 동맥경화증을 비롯한 심근경색, 협심증 그리고 당뇨병의 합병증인 미소순환장애 등을 유발시키는 주요한 원인으로 인식되고 있다(Packham, 1978; 1994; Winocour, 1994).

혈소판은 collagen, thrombin, epinephrine 등의 여러 인자들에 의해 활성화되며(Blockmans 등, 1995), 활성화된 혈소판에서는 세포내 Ca²⁺ 농도가 급격히 증가하게 되고, 이는 혈소판 과립분비 및 응집현상에 관여하는 효소들의 활성화와 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다(Johnson

과 Dufault, 1993; Peterson과 Lapetina, 1978). 활성화 초기 혈소판의 과립에서 분비되는 ADP, serotonin 등과 arachidonic pathway를 통해 생성, 유리되는 prostaglandin G₂(PGG₂), PGH₂, TXA₂ 등은 다시 인접한 혈소판의 수용체와 결합하여 응집반응을 증폭시키게 되며(Meanwell과 Seiler, 1990; Hourani와 Cusack, 1991; FitzGerald, 1991), 이러한 2차적인 비가역적 혈소판 응집반응을 통해 안정한 혈소판 응집괴가 형성된다.

항혈소판 약물을 개발하기 위한 연구는 혈소판 응집 반응과정을 저해하는 작용기전에 따라 arachidonic acid 대사 저해제, thromboxane A₂(TXA₂) 길항제, prostaglandin 유도체, fibrinogen 수용체 길항제, 5-HT₂ 길항제, cAMP phosphodiesterase 저해제 및 기타의 약물군으로 구분되어 활발히 진행되고 있다(Meanwell과 Seiler, 1990; The year's

*To whom correspondence should be addressed.

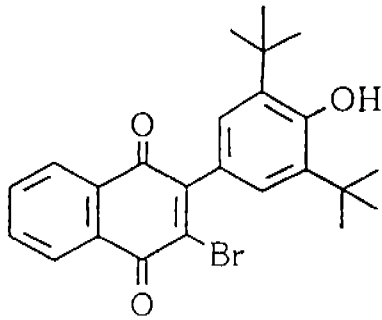


Fig. 1. Chemical structure of 2-bromo-3-(3,5-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,4-naphthalenedione (TPN2).

drug news, 1994). 현재 임상에서 사용되고 있는 aspirin, ticlopidine, sulfipyrazol 등이나, 개발중에 있는 OKY-046, OKY-1581, U-63567과 같은 항혈소판 작용 약물들은 심근경색증이나 뇌졸중 등의 혈전성 질환의 일차 발병 후 재발방지나 진행 차단 또는 예방을 위한 용도로 유용하지만, 이러한 저해제들은 고용량에서 부작용과 독성 등의 문제로 만족할 만한 임상 약물로 사용하기에는 아직 미흡한 점이 많아 기존의 약물보다 좀 더 효과적이고 안전한 항혈소판 약물의 개발이 크게 요구되어 지고 있는 상황이다.

Vitamin-K는 출혈시 항혈액응고 작용과 비출혈시 완화된 항혈전 작용을 나타내는 것으로 알려져 있으며(Blackwell 등, 1985), vitamin-K의 모핵을 수식한 1,4-naphthalenedione 화합물들 역시 항 혈소판 응집활성이 보고되어 있다(Huang 등 1998; Liao 등, 1998; Chang 등 1997; Ko 등, 1990). 본 논문에서는 1,4-naphthalenedione 모핵을 바탕으로 좀더 효과적이고 안전한 약물을 개발하고자 수행된 일련의 연구를 통해 그 약효가 검색된 2-bromo-3-(3,5-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,4-naphthalenedione(TPN2, Fig. 1)의 항 혈소판 작용과 그 작용기전에 관한 연구결과를 보고하고자 한다.

실험방법

실험동물

Sprague-Dawley 흰쥐(350-450 g)를 대한실험동물센터(충북 음성, 한국)에서 공급받아 $20 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 50-60%, 12 시간 명암 주기의 사육조건에서 1주 이상 적응시킨 후 사용하였으며, 고형사료(Purina Korea)와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다.

Washed Platelet 조제

흰쥐를 ether로 마취시킨 후 개복하여 18 guage needle로 복대동맥으로부터 채혈하였고 sodium citrate(최종 농도 : 0.38%)를 가해 혈액응고를 방지하였다(Lee 등, 1998). 혈액을 770 rpm에서 12분간 원심분리하여 상층인 platelet-

rich plasma(PRP)를 얻었다. PRP를 다시 2,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 pellet을 취한 뒤 washing buffer(modified Tyrode's buffer: 134 mM NaCl, 3 mM KCl, 0.3 mM NaH_2PO_4 , 2 mM MgCl_2 , 5 mM glucose, 12 mM NaHCO_3 , 1 mM EDTA, 3.5 mg/ml bovine serum albumin at pH 7.4)로 pellet을 재현탁시킨 후 다시 원심분리하는 과정을 2회 반복하였다. 최종 pellet을 EDTA가 들어 있지 않은 suspension buffer로 3×10^8 cells/ml의 농도가 되도록 재현탁 시켰다.

Platelet Aggregation 측정

Aggregometer(Chronolog Corp. Harvertown, PA)를 사용하여 suspension buffer에 의한 흡광도를 100%로, washed platelet의 흡광도를 0%로 설정한 후 혈소판 응집에 따른 흡광도의 변화를 측정하였다. 1 mM CaCl_2 존재하에 washed platelet(3×10^8 cells/ml)을 cuvette에 담아 37°C 1,200 rpm으로 교반하면서 TPN2를 5분간 전처리 한 뒤, agonist를 가하여 흡광도 변화를 측정하였다. Ca^{2+} 유도 혈소판 응집 억제능은 TPN2를 5분간 전처리 한 뒤 thapsigargin 또는 과량의 CaCl_2 를 가한 후 8분에 나타나는 값의 % aggregation으로 하였으며 용매 대조군의 % aggregation 값에 대한 % inhibition을 구하였다.

Serotonin Secretion 측정

$[^{14}\text{C}]$ -serotonin이 부하된 혈소판을 이용하여 측정하였다(Murphy 등, 1991). Washed platelet(8×10^8 cells/ml)에 $[^{14}\text{C}]$ -serotonin(200 nCi/ml)을 가하여 37°C , 30분간 배양한 후 원심분리하여 pellet을 얻었다. Washing buffer로 세척한 후 suspension buffer로 다시 현탁(3×10^8 cells/ml)하였다. 1 mM CaCl_2 존재하에 imipramine 2 μM 을 가해 serotonin의 재흡수를 차단시킨 조건에서 TPN2를 5분간 전처리 하였다. Collagen 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 가하여 혈소판 과립분비를 촉진시킨 후 8분에 EDTA(4 mM)과 formaldehyde(10 mM)의 혼합액을 가하여 반응을 중지시켰다. 14,000 rpm에서 3분간 원심분리한 후 상등액을 취해 유리된 $[^{14}\text{C}]$ -serotonin의 양을 측정하였다. 분비정도는 혈소판에 0.1% Triton X-100을 처리했을 때 나타나는 방사능에 대한 백분율로 나타내었다.

세포내 free Ca^{2+} 농도 측정

Free Ca^{2+} 과 특이적으로 결합하여 형광을 발산하는 fura-2를 이용하여 측정하였다(Stewart, 1996). Washed platelet(8×10^8 cells/ml)에 apyrase(0.05 U/ml)와 fura-2 acetoxymethylester(fura-2 AM, 5 μM)를 가하고 37°C 에서 45분간 배양한 후 3×10^8 cells/ml의 세포현탁액으로 만들어 CaCl_2 1 mM을 가한 다음 약물을 가하여 5분간 전처리 한 뒤 agonist를 넣었을 때 증가되는 fluorescence intensity를 측정하여 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 로 환산하였다. 세포내 Ca^{2+} 농도 계산을 위한 calibration은 Sage 등의 방법(Sage 등, 1993)에 따

라 수행하였다.

TXA₂ 생성에 미치는 영향

Washed platelet를 1 mM CaCl₂ 존재 하에 37°C에서 교반하면서 5분간 약물을 전처리하고 agonist로서 collagen (최종농도: 10 µg/ml)을 가한 후 6분간 반응시켰다. 4°C 하에서 EGTA(2 mM)와 indomethacin(50 µM)을 가하여 반응을 중단시킨 후 14,000 rpm, 3분간 원심분리하고 상등액을 취하여 TXA₂의 대사물인 TXB₂를 radioimmunoassay(RIA)로 정량하였다.

Arachidonic Acid Release

Washed platelet에 [³H]-arachidonic acid(4 µCi)를 가하여 37°C에서 90분간 배양한 뒤 BSA(30 mg/150 µl)를 가하여 37°C, 10분간 배양하고 3회 세척하였다(Bartoli 등, 1994). 세포현탁액(4×10⁸ cells/ml)에 10 µM의 indomethacin을 가한 후 37°C에서 30분간 배양한 뒤 1 mM CaCl₂ 존재 하에 37°C에서 교반하면서 5분간 약물을 전처리하였다. Agonist로서 collagen(최종농도: 10 µg/ml)을 가한 5분 후 4°C하에서 EGTA 2 mM을 가하여 반응을 정지시키고 14,000 rpm에서 3분간 원심분리하여 얻은 상등액 중의 방사능을 측정하였다. 혈소판에 0.1% Triton X-100을 처리했을 때 나타나는 방사능을 세포 내로 들어간 총 [³H]-arachidonic acid 값으로 하였다.

Thromboxane Synthase Assay

Thromboxane synthase assay kit(BIOMOL®)을 사용하여 실험하였다. Silicon(Sigma coat)으로 코팅한 시험관에 약물과 platelet으로부터 분리한 microsome을 가한 다음 25 °C의 수욕 상에서 3분간 미리 가온하였다. PGH₂를 반응액에 가한 다음 잘 교반하고 3분간 반응시켰다. FeCl₂를 가해 반응을 중지시키고 실온에서 15분간 방치한 후 4 °C, 4,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액 중의 TXB₂의 양을 RIA에 의해 정량하였다.

통계처리

모든 실험결과는 mean±S.E.M.으로 나타내었으며 Student's *t-test*로 분석하여 각 군의 차이가 P<0.05의 경우 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결과 및 고찰

Vitamin-K는 출혈시 항혈액응고 작용과 비출혈시 완화된 항혈전 작용을 나타내는 것으로 알려져 있으며, vitamin-K의 모핵을 수식한 1,4-naphthalenedione 화합물들 역시 항혈소판 활성이 보고되어 있다(Huang 등 1998; Liao 등, 1998; Chang 등 1997; Ko 등, 1990; Black-well 등, 1985). 본 연구에서는 항혈소판 작용이 기대되는 halogenated-1,4-naphthalenedione 유도체인 TPN2(Fig. 1)의 항혈소판 작용을 밝히고자 혈소판 응집 억제능과 혈소판 응

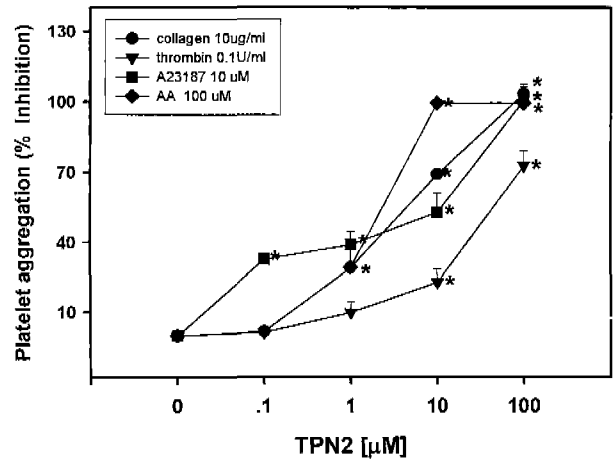


Fig. 2. Effects of TPN2 on agonist-induced platelet aggregation : Platelets were incubated with TPN2 for 5 min followed by the addition of collagen(10 µg/ml), thrombin(0.1 U/ml), A23187(10 µM) or arachidonic acid(AA, 100 µM). The peak level of aggregation was measured at 8 min after the addition of agonists. Data are expressed as mean ± SEM(n=4).

집반응을 조절하는 주요 과정들인 혈소판 과립분비반응 및 TXA₂생성에 미치는 영향 등을 검토하였다.

TPN2의 혈소판 응집 저해활성을 검색하기 위해, 본 연구에서는 생리적 환경에서 혈소판 응집을 일으키는 collagen(10 µg/ml), thrombin(0.1 U/ml)과 calcium ionophore인 A23187(10 µM) 및 TXA₂의 전구체인 arachidonic acid(100 µM)로 유도한 혈소판 응집반응에 미치는 영향을 검토하였다. 그 결과 TPN2는 이들 각각에 의한 응집반응을 농도 의존적으로 억제하였으며(Fig. 2), 계산된 IC₅₀는 각각 6.5±1.3, 59.3±4.5, 13.0±2.37, 2.9±1.0 µM 이었다. 일반적으로 혈소판 응집 반응은 혈소판 과립의 분비 정도와 세포막으로부터 세포내로의 arachidonic acid의 유리 및 대사과정에 의해 크게 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 따라서, TPN2의 혈소판 응집 저해 작용이 혈소판 과립 분비 저해 작용에 기인하는지의 여부를 확인하기 위해 혈소판 dense granule내의 성분인 serotonin의 분비에 미치는 영향을 검토한 결과, 용매 대조군(DMSO 0.1%)의 경우는 collagen(10 µg/ml) 처리에 의해 총 serotonin양의 21.5%가 분비되는데 반하여 TPN2는 농도 의존적으로 serotonin 분비를 억제하였고 특히 10, 100 µM 농도에서 통계적으로 유의적인 억제 효과를 나타내었다(14.4, 5.1%, p<0.01, Fig. 3).

혈소판 과립성분의 분비는 cytoskeleton인 actin-myosin의 수축에 의해 과립들간이나 과립과 혈소판 표면으로 연결된 통로인 surface connected canalicular system(SCCS)이 융합되면서 일어나게 된다(Feinman 등, 1985). 이러한 과립 분비현상이 일어나기 위해서는 세포 내 Ca²⁺ 농도의

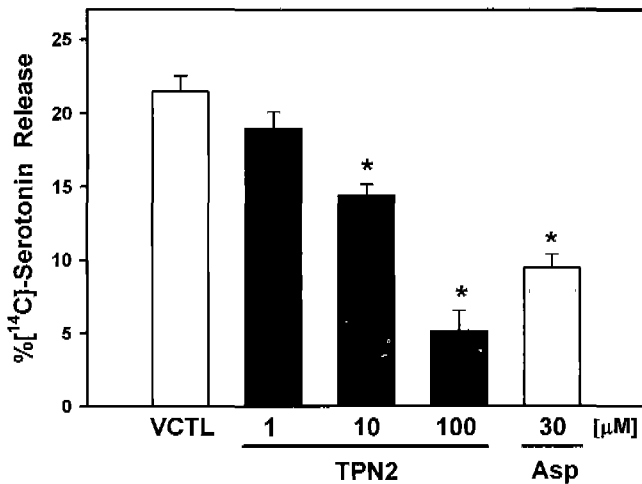


Fig. 3. Effect of TPN2 on collagen-induced granule release in rat platelet: [¹⁴C]-serotonin labeled washed platelets were pretreated with TPN2 for 5 min and further incubated with collagen(10 μg/ml) for 6 minutes. Radioactivity of released [¹⁴C]-serotonin was measured and results were depicted as % of total [¹⁴C]-serotonin. Aspirin(30 μM) was used as a positive inhibitor. Data are expressed as mean ± SEM(n=4) *p<0.01 vs compared to vehicle control.

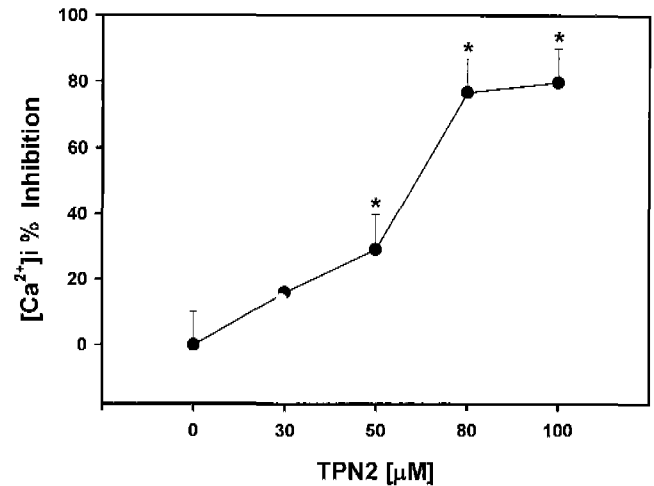


Fig. 4. Effect of TPN2 on collagen-induced intracellular Ca²⁺ increase in fura-2 loaded platelet: Fura-2 loaded platelets were suspended in a buffer containing 1 mM CaCl₂. Platelet were preincubated with TPN2 at 37°C for 5 min, followed by the addition of collagen(10 μg/ml). Fluorescence intensity was measured at 8 min after addition of collagen and the value of [Ca²⁺]_i was calculated as described in material and methods. Data are expressed as means ± SEM (n=4). *p<0.01 vs vehicle control.

상승이 필요조건이며, [Ca²⁺]_i가 상승하면 혈소판 응집과 과립분비에 관여하는 효소인 phospholipase C, myosin light chain kinase(MLCK), PLA₂ 등이 활성화되는 것으로 알려져 있다. 그러므로 세포내 Ca²⁺ 농도 증가는 혈소판 활성화의 중요한 신호가 된다고 할 수 있다. 이와 같은 사실들로부터 TPN2에 의한 혈소판 응집 억제 및 혈소판 과립분비 저해작용은 세포내 Ca²⁺ 농도상승 억제와 관련이 있을 것으로 추론하고 collagen 자극에 의한 세포내 Ca²⁺ 농도 변화를 측정하였다. 즉, TPN2의 농도를 달리하여 전처리한 뒤 fura-2 결합에 의한 형광강도 변화를 측정한 결과, collagen으로 유도된 혈소판내 Ca²⁺ 농도 증가는 30 μM 이상의 TPN2 전처리에 의해 유의적으로 억제되었으며(Fig. 4), 이 때 TPN2에 의한 직접적인 형광 간섭효과는 관찰되지 않았다. 이러한 TPN2의 작용이 세포내 저장소로부터의 Ca²⁺ 유리억제에 기인하는 것인지, 혹은 외부 Ca²⁺의 유입차단에 기인하는 것인지를 여부를 확인코자 우선, 혈소판내의 Ca²⁺ 저장소인 dense tubular system의 Ca²⁺-ATPase를 억제시킴으로써 저장소로의 Ca²⁺ uptake를 차단하여 [Ca²⁺]_i를 증가시키는 것으로 알려진 thapsigargin(0.1 μM)으로 유도된 혈소판 응집에 대한 TPN2의 영향을 검토하였으며, 그 결과, TPN2에 의한 유의적인 억제 효과를 확인할 수 있었다(Fig. 5(A)). 또한, 세포외부로부터의 Ca²⁺유입에 미치는 TPN2의 영향을 확인하고자 과량의 EGTA(0.1 mM) 처리로 세포외 Ca²⁺를 제거하고 저농도의 collagen(2 μg/ml)을 가해 세포내 저장소의 Ca²⁺도 유리시

켜 제거한 후 세포외액에 과량의 CaCl₂(4.0 mM)를 가함으로써 유도되는 유입에 의한 혈소판 응집 반응을 검토한 결과 TPN2 전처리에 의한 유의적인 억제효과가 관찰되었다(Fig. 5(B)). 이상의 결과로부터 TPN2는 세포내 Ca²⁺ 농도를 증가시키는 내부 저장소로부터의 유리와 외부로부터의 유입 양쪽을 모두 저해함으로써 과립분비 반응 및 혈소판 응집을 억제하는 것으로 추론할 수 있었다. 1,4-naphthoquinone 유도체는 일반적으로 혈소판 응집 유발에 의한 세포내 Ca²⁺ 농도상승을 억제하는 것으로 보고되고 있으나 세포내 저장소로부터의 유리 또는 외부로부터의 유입에 미치는 영향에 대해서는 연구자 또는 물질마다 상이한 연구결과가 보고되어 있다(Liao 등, 1998; Chang 등 1997; Ko 등 1995; Ko 등, 1990; Blackwell 등, 1985). 일부 1,4-naphthoquinone 유도체들은 phosphoinositide turnover의 저해를 통해 세포내 Ca²⁺ 농도 상승을 억제하는 것으로 알려져 있으며(Liao 등, 1998; Ko 등 1995; Ko 등, 1990), 따라서, TPN2에 의한 세포내 Ca²⁺ 농도 상승저해 작용도 유사한 기전에 의한 것으로 추정되나, 이에 관해서는 향후 진전된 연구를 통하여 확인하고자 한다.

한편, 활성화된 혈소판에서 활성이 증가된 PLA₂는 세포질막으로부터 arachidonic acid 유리를 증가시키게 되며(Purdon 등, 1987), 유리된 arachidonic acid는 cyclooxygenase 및 thromboxane synthase에 의해 강력한 혈소판 응집 유발 물질인 TXA₂로 변화한다. 또 혈소판이 활성화

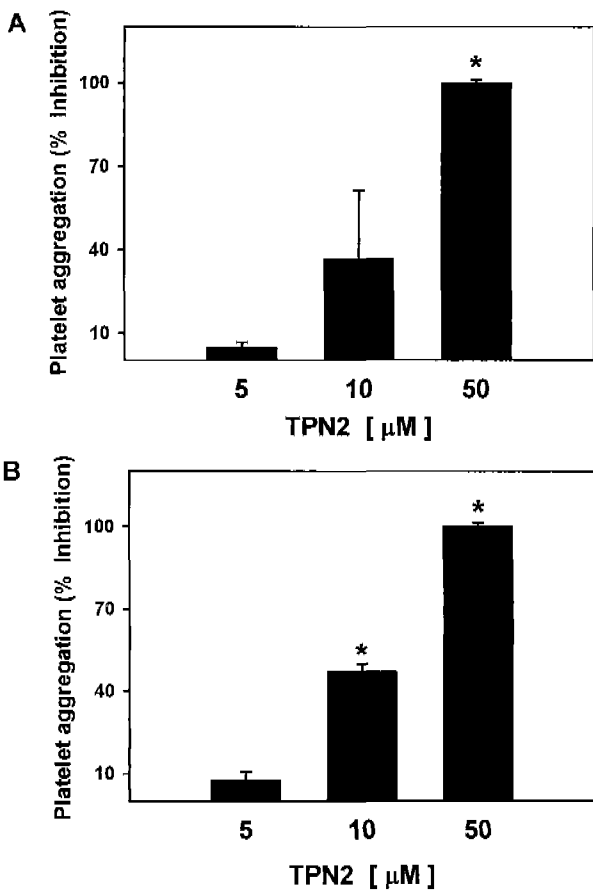


Fig. 5. Effects of TPN2 on calcium-induced platelet aggregation : (A) Effects of TPN2 on thapsigargin-induced platelet aggregation: Platelets were incubated with TPN2 for 5 min followed by the addition of thapsigargin (0.1 μM); (B) Effect of TPN2 on extracellular calcium-mediated aggregation induced by collagen : Platelets in the buffer containing EGTA(0.1 μM) were incubated with TPN2 at 37 °C for 5 min, followed by the addition of collagen (2 μg/ml). After 1 minute, CaCl₂(4.0 mM) was added to trigger aggregation. Data are expressed as mean ± SEM(n=4). *p<0.01 vs vehicle control.

되는 초기 응집과정에서 ADP 및 serotonin 등이 분비되고 이들에 의해서도 TXA₂ 생성이 촉진되는데 이렇게 생성된 TXA₂에 의하여 비가역적인 2차 응집반응으로 증폭되는 현상이 일어나게 된다(Meanwell과 Seiler, 1990; Hourani와 Cusack, 1991). TXA₂는 0.1 μM농도 이하에서도 혈소판의 혈관벽에 대한 부착능의 증가(Bennet 등, 1981), 혈소판 형태 변화 유발, adenylate cyclase 억제를 통한 c-AMP 생성의 감소(Gorman 등, 1978; Avdonin 등, 1985), 혈소판 내 칼슘 농도의 증가(Moriyama 등, 1988), fibrinogen 수용체의 노출 증가 등의 작용으로 혈소판의 응집반응을 증폭시켜 대규모의 혈괴를 형성시키는 것으로 알려져 있다(Pollock et al., 1984). 이와 같이, TXA₂는 혈소판 응집 반응에 있어 중심적인 조절자로서 작용하며, 따라서 이의

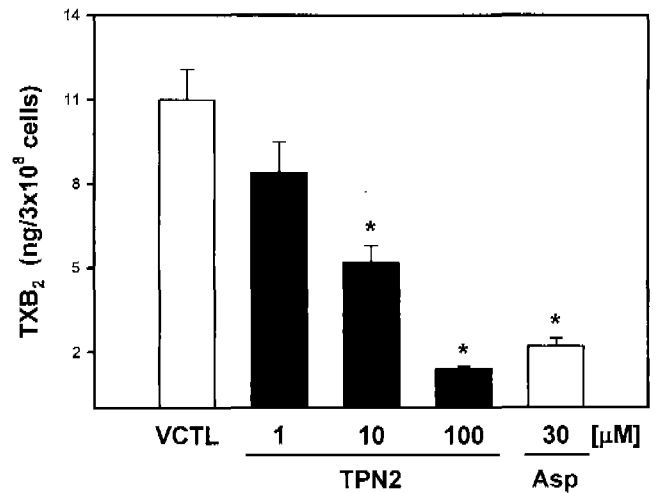


Fig. 6. Effect of TPN2 on agonist-induced TXB₂ formation in rat platelet : TPN2 was incubated with platelets at 37°C for 5 min, followed by the addition of arachidonic acid (30 μM). After 6 minutes, TXB₂ formation was terminated by the addition of EDTA (2 mM) and indomethacin (50 μM). Aspirin (30 μM) was used as positive inhibitor. Data are expressed as mean ± SEM(n=5). * p<0.01 vs vehicle control.

생성을 차단함으로써 효과적인 혈소판 응집 저해작용을 기대할 수 있다. 실제로 이는 현재 혈소판 응집 저해제 개발에 있어 주된 연구방향이기도 하다(Meanwell과 Seiler, 1990; The year's drug news, 1994). 1,4-naphthoquinone 유도체들은 혈소판 응집 유발제 처리에 의한 TXA₂ 생성을 억제하는 것으로 보고된 바 있으며(Chang 등 1997; Ko 등 1995; Ko 등, 1990), 본 연구에서도 TPN2는 TXA₂ 생성을 억제하는 것이 관찰되었다. 즉, collagen(10 μg/ml) 처리에 의해 생성되는 TXA₂량을 안정한 대사체인 TXB₂로 정량한 결과, 대조군의 경우 6분간 16.94±0.588 ng/well의 TXB₂가 생성되었으나 TPN2 전처리에 의해 농도 의존적으로 감소되었으며 (TPN2 100 μM:5.617±0.480 ng/well; 10 μM:10.68±1.267 ng/well), 사용된 모든 농도에서 대조군과 비교하여 통계적으로 유의적인 차이가 관찰되었다(Fig. 6).

이와 같이 TPN2는 TXA₂의 전구체인 arachidonic acid로 유도한 혈소판 응집을 억제하였고(Fig. 2). 혈소판 응집 과정에서 생산되어 응집반응을 증폭시키는 TXA₂ 생성량도 감소시키는 것으로 확인되어(Fig. 6), TPN2에 의한 혈소판 응집 저해작용은 혈소판에서 TXA₂ 생성에 관련되어 있는 효소들에 대한 저해작용과 관련되어 있을 것으로 추론되었으며, 따라서 PLA₂, cyclooxygenase, thromboxane synthase의 활성화에 대한 TPN2의 영향을 살펴보았다. Collagen으로 유도한 혈소판 내 PLA₂의 활성화에 대한 TPN2의 영향을 [³H]-arachidonic acid가 부하된 혈소판으로부터 유

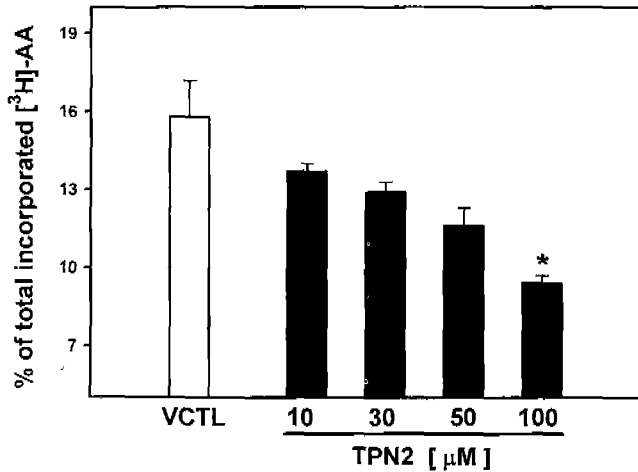


Fig. 7. Effect of TPN2 on arachidonic acid (AA) release in [³H]-AA incorporated platelet: [³H]-AA incorporated platelet were incubated with TPN2 at 37 °C for 5 min, followed by the addition of collagen (10 μg/ml). After 5 minutes, AA release was terminated by the addition of EGTA (25 mM). Data are expressed as mean ± SEM(n=4). *p<0.05 vs vehicle control.

리되는 [³H]-arachidonic acid의 양을 측정하는 방법으로 살펴본 결과, 용매 대조군의 경우 세포막의 총 [³H]-arachidonic acid중 15.80±1.40%가 유리되었으나 100 μM의 TPN2 전처리에 의해 9.4±0.3%로 arachidonic acid 유리가 감소되었으며(p<0.01), 농도 의존적인 억제 작용도 관찰되었다(Fig. 7). 더욱이 혈소판으로부터 분리한 microsome에서 측정된 thromboxane synthase의 활성 또한 TPN2에

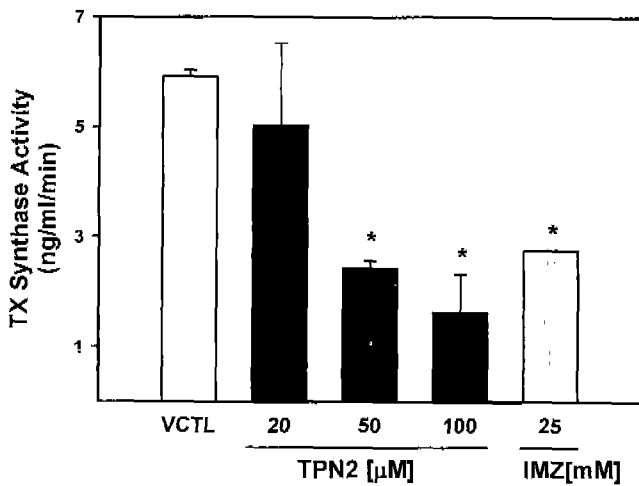


Fig. 8. Effect of TPN2 on thromboxane synthase: Human platelet microsome was pretreated with TPN2 at 25 °C for 3 minutes and further incubated with prostaglandin H₂ for another 3 minutes. TXB₂ production was terminated by FeCl₂ and supernatant was subjected to RIA for TXB₂ determination. Imidazole (25 mM) was used as a positive inhibitor. Data are expressed as mean ± SEM(n=4). *p<0.05 vs vehicle control.

의해 농도 의존적으로 억제되었다(Fig. 8). 그러나 U937 cell에서 측정된 cyclooxygenase 활성도에는 TPN2가 영향을 주지 않는 것으로 나타났다(결과는 제시하지 않음). 1,4-naphthoquinone 유도체가 TXA₂ 생성 효소들에 미치는 영향은 논문에 따라 상이한 결과들이 보고되어 있는데, vitamin K₃의 경우 arachidonic acid 유리에는 영향을 주지 않으나(Blackwell 등, 1985), 2-chloro-vitamin K₃ 또는 acetylshikonin 등은 arachidonic acid 유리를 억제함으로써 TXA₂ 생성을 저해하는 것으로 알려져 있다 (Ko 등, 1995, 1990). 또한, 2-arylamino-3-chloro-1,4-naphthalenedione 유도체인 NQ-Y15는 PLA₂ 및 cyclooxygenase의 활성에는 영향을 주지 않으나 thromboxane synthase 활성을 강하게 억제하는 것으로 보고된 바 있어(Chang 등, 1997) TPN2의 작용과는 약간의 차이를 보이고 있다. 1,4-naphthoquinone 유도체들의 이러한 작용상의 차이점들은 그 구조적 상이성에 기인하는 것으로 추정되나 이는 향후 진전된 연구를 통해 규명되어야 할 것이다.

이상의 결과들을 종합해 볼 때 TPN2는 혈소판 내 Ca²⁺ 농도 상승을 억제하여 과립분비를 차단하는 것과 더불어 PLA₂와 thromboxane synthase 활성을 저해함으로써 TXA₂ 생성을 감소시켜 혈소판 응집을 억제하는 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 보건복지부 보건의료기술연구개발사업 연구비 지원(HMP-96-D-1-0018)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Avdonin, P. V., Svitina-Ulltina, I. V., Leytin, V. L. and Tkachuk, V. A. (1985). Interaction of stable prostaglandin endoperoxide analogs U46619 and U44069 with human platelet membranes :coupling of receptors with high-affinity GTPase and adenylate cyclase. *Thromb. Res.*, **40**, 101-112.
- Bartoli, F., Lin, H. K., Ghomashchi, F., Gelb, M. H., Jain, M. K. and Apitz-Castro, R. (1994). Tight binding inhibitors of 85-kDa phospholipase A₂ but not 14-kDa phospholipase A₂ inhibit release of free arachidonate in thrombin-stimulated human platelets. *J. Biol. Chem.* **269**, 15625-15630.
- Bennett, J. S., Vilaire, G. and Burch, J. W. (1981). A role for prostaglandins and thromboxanes in the exposure of platelet fibrinogen receptors. *J. Clin. Invest.* **68**, 981-987.
- Blackwell, G. J., Radomski, M. and Moncada, S. (1985). Inhibition of human platelet aggregation by vitamin K. *Thromb. Res.* **37**, 103-114.
- Blockmans, D., Deckmyn, H. and Vermylen, J. (1995). Platelet activation. *Blood Rev.* **9**, 143-156.
- Chang, T. S., Ryu, C. K. and Moon, C. K. (1997). Thromboxane A₂ synthase inhibition and thromboxane A₂ receptor

- blockade by 2-[(4-cyanophenyl)amino]-3-chloro-1,4-naphthalenedione (NQY-15) in rat platelets. *Biochem. Pharmacol.* **54**, 259-268.
- Clark, J. D., Lin, L. L., Kriz, R. W., Ramesha, C. S., Sultzman, L. A., Lin, A. Y., Milona, N. and Knopf, J. L. (1991). A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA₂ contains a Ca²⁺-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. *Cell* **65**, 1043-1051.
- Feinman, R. D., Detwiler, T. C. and Ingerman-Wojewski, C. (1985). The lumiaggregometer as a research and tool. In: *The platelets: physiology and pharmacology*. (Longenecker, G. L., Ed.) pp. 429-440, Academic Press, New York.
- FitzGerald, G. A. (1991). Mechanism of platelet activation: thromboxane A₂ as an amplifying signal for other agonists. *Am. J. Cardiol.*, 11B-15B.
- Gorman, R. R., Fitzpatrick, F. A. and Miller, O. V. (1978). Reciprocal regulation of human platelet cAMP levels by thromboxane A₂ and protaclycin. *Adv. Cyclic. Nucleotide Res.*, **9**, 597-609.
- Hourani, S. M. O., Cusack, N. J. (1991). Pharmacological receptors on blood platelets. *Pharmacological Reviews*, **43**(3), 243-252.
- Huang, L. J., Chang, F. C., Lee, K. H., Wang, J. P., Teng, C. M. and Kuo, S. C. (1998). Synthesis and antiplatelet, antiinflammatory, and antiallergic activities of substituted 3-chloro-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone and related compounds. *Bioorg. Med. Chem.* **6**(12), 2261-2269.
- Johnson, W. T., Dufault, S. N. (1993). Intracellular calcium mobilization in rat platelets is adversely affected by copper deficiency. *Biochim. Biophys. Acta*, **1175**, 263-268.
- Ko, F. N., Sheu, S. J., Lin, Y. M., Huang, T. F. and Teng, C. M. (1990). Inhibition of rabbit platelet aggregation by 1,4-naphthoquinones *Thromb. Res.* **57**, 453-463.
- Lee, S. H., Jung, Y. S., Hong, J., Kim, M. H., Lee, H. J., Baik, E. J., Wang, H. J., Kim, M. W. and Moon, C. H. (1998). Effect of MCT (medium-chain triglyceride) and LCT (long-chain triglyceride) on myocardial ischemia/reperfusion injury and platelet aggregation in rat. *J. Appl. Pharmacol.*, **6**, 358-363.
- Liao, C. H., Ko, F. N., Kuo, S. C. and Teng, C. M. (1998). Effect of PPID-1, a synthetic antiplatelet compound, on rabbit platelets. *Jpn. J. Pharmacol.* **76**(2), 141-148.
- Meanwell, N. A., Seiler, S. M. (1990). *Platelet activation and drugs that modify platelet function in drugs and the delivery of oxygen to tissue*. (Fleming, J.S., Ed.), CRC Press, 135-214.
- Moriyama, T., Takamura, H., Narita, H., Tanaka, K., Matsuura, T. and Kito, M. (1988). Elevation of cytosolic free Ca²⁺ is directly evoked by thromboxane A₂ in human platelets during activation with collagen. *J. Biochem.*, **103**, 901-902.
- Murphy, C. T., Elmore, M., Kellie, S. and Westwick, J. (1991). Comparison of the role of protein kinase C in platelet functional responses induced by three different mechanisms, PAF, ionomycin and arachidonic acid. *Biochem. Biophys. Acta*, **1133**, 46-54.
- Nalefski, E. A., Sultzman, L. A., Martin, D. M., Kriz, R. W., Towler, P. S., Knopf, J. L. and Clark, J. D. (1994). Delineation of two functionally distinct domains of cytosolic phospholipase A₂, a regulatory Ca²⁺-dependent lipid-binding domain and a Ca²⁺-independent catalytic domain. *J. Biol. Chem.*, **269**, 18239-18249.
- Packham, M. A. (1978). Methods for detection of hypersensitive platelets. *Thromb. Haemost.*, **40**, 175-195.
- Packham M. A. (1994). The role of platelets in thrombosis and hemostasis. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **72**, 278-284.
- Peterson, S. N. and Lapetina, E. G. (1978). Platelet activation and inhibition, *Annals NewYork Academy of Science*, 53-63.
- Pollock, W. K., Armstrong, R. A., Brydon, L. J., Jones, R. L. and MacIntyre, D. E. (1984). Thromboxane-induced phosphatidate formation in human platelets. Relationship to receptor occupancy and to changed in cytosolic free calcium. *Biochem. J.* **219**, 833-842.
- Purdon, A. D., Patelunas, D. and Smith, J. B. (1987). Evidence for the release of arachidonic acid through the selective action of phospholipase A₂ in thrombin-stimulated human platelets. *Biochim. Biophys. Acta*, **920**, 205-214.
- Sage, S. O., Heemskerk, J. W. M., Mahaut-Smith, M. P. (1993). Calcium influx mechanism and signal organization in human platelets. In: *Mechanism of platelet activation and control*, (Authi et al., Ed.), Plenum Press, pp. 69-82.
- Stewart, O. S. (1996). Use of fluorescent indicators to measure intracellular Ca²⁺ and other ions. In: *Platelet-A Practical Approach* (Steve, P. Watson and Kalwant, S. Authi, Ed.), IRL Press, Oxford, pp. 67-90.
- The year's drug news-Therapeutic targets (1994). 'Agents affecting blood coagulation', Prous Science, pp. 193-212.
- Winocour, P. D. (1994). Platelets, vascular disease and diabetes mellitus. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **72**, 295-303.