



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

약학박사학위논문

약물대사체학을 이용한 진세노사이드 Rk₁의 항혈소판

작용 기전 관련 대사체 규명

Metabolomic Investigation of the Anti-Platelet Aggregation

Activity of Ginsenoside Rk₁ Reveals Attenuated 12-HETE

Production

2013년 2월

서울대학교 대학원

약학과 약품분석전공

주 현 경

국 문 초 록

혈소판은 혈관 손상 및 출혈이 생기는 경우 활성화 되어 지혈작용에 중요한 역할을 하는 세포로서, 과도한 지혈 작용에 의해 생긴 혈전(thrombus)으로부터 혈액 순환 장애 및 심근 경색증, 뇌졸중 등 다양한 질환을 유발한다. 최근 심혈관질환 발병율이 증가하고 있으며, 혈소판의 응고기전을 억제시키는 약물의 개발 및 기전연구는 심혈관계 질환 치료제 개발에 매우 유용하다고 할 수 있다.

약물대사체학(Pharmacometabolomics)은 세포, 조직, 혹은 생체액 속에 포함되어 있는 저분자량 물질인 대사체 (metabolite)를 그 대상으로 하는 대사체학 중 하나로서, 약물에 의해 변화된 많은 대사체를 동시에 관찰하고, 대사체들 간의 관계를 설명하는 학문이라 할 수 있다. 동시에 관찰되는 많은 대사체의 변화는 통계적 기법을 이용하여 해석할 수 있으며, 변화된 대사체를 통하여 약물기전 연구에 중용한 정보를 제공하고, 판별 분석 모델링을 통하여 질병상태의 예측 또는 약물 반응의 예후 예측에 대한 가능성을 제시하고 있다.

이에 본 연구에서는, arachidonic acid에 의하여 유도되는 혈소판 응집작용에 대한 진세노사이드 Rk_1 의 작용기전 연구를 약물대사체학을 통해 수행하고자 하였다. 혈소판 내의 metabolites profiling은 UPLC/Q-TOF를 이용하여 실시하였으며, 수집된 데이터는 Profile analysis software에 의해 버킷팅 (Bucketing) 되었다. 주성분분석 (Principal component analysis PCA) 및 판별 분석 (Partial least square discriminant analysis, PLS-DA)은 SIMCA-P (v 12.0)를 이용하여 수행되었으며, 판별 분석을 통해 그룹간의 차이를 규명할 수 있는 대사체를 효과적으로 판별 할 수 있었다. 혈소판이 응집된 샘플과 진세노사이드

드 Rk_1 이 처리된 샘플 군에서 12(S)-Hydroxyeicosatetraenoic acid (12(S)-HETE) 가 유의성 있게 감소된 것을 확인 할 수 있었으며, 이는 positive control로 사용했던 아스피린 처리군 과도 구별되는 대사체임을 확인 하였다. 반면, Thromboxane B_2 의 경우 아스피린 처리 군과 구별되지 않음을 확인 할 수 있었다. 이에, 진세노사이드 Rk_1 의 항혈소판 작용은 TXB_2 의 생성을 억제 하는 아스피린의 작용기전에도 관여하며, 12(S)-HETE의 생성기전이 항혈소판 응집작용에 기여하는 것으로 확인 하였다. 또한, 본 실험에서는 진세노사이드 Rk_1 이 세포 내 칼슘 유리 및 외부로부터의 칼슘 유입을 효과적으로 억제 하는 것을 확인하였다. 이에, 칼슘 농도변화와 12-LOX의 연계성을 확인하였고, 12-HETE의 생성은 칼슘의 농도변화가 12-LOX의 translocation에 영향을 미침으로써 나타내는 현상으로 판단하였다.

주요어: 인삼 (Panax ginseng), 진세노사이드(Ginsenoside), 항혈소판 응집(Anti-platelet aggregation), 약물대사체학 (Pharmacometabolomics) Arachidonic acid, 12-Hydroxyeicosatetraenoic acid

학 번: 2006-21995

목 차

국문초록	i
목차	iii
List of Figures	vi
List of Tables	viii
List of Abbreviations	ix
I. 서 론	1
1. 약물대사체학	1
1-1. 약물대사체학의 의의 및 목적.....	1
1-2. 주성분 분석 및 판별 분석	3
2. 혈소판의 생리 및 활성화	5
3. Ginsenoside Rk ₁ 의 항혈소판 작용	8
II. 실험 방법	11
1. 실험 재료, 시약 및 기기	11
1-1. 재료 및 시약	11
1-2. 실험 동물	11

1-3. 실험 기기.....	12
2. Ginsenoside Rk ₁ 의 분리	13
2-1. 가공인삼 (Sun ginseng, SG)의 제조	13
2-2. Ginsenoside Rk ₁ 의 분리	13
3. Ginsenoside Rk ₁ 의 혈소판응집억제 활성	14
3-1. Washed platelets (WP)의 제조	14
3-2. 혈소판응집억제활성	14
4. UPLC/Q-TOF MS 분석방법의 검증	17
4-1. 분석조건	17
4-2. 분석법 검증 (Method validation).....	18
5. 혈소판 내의 대사체 분석	19
5-1. 분석조건	19
5-2. 분석샘플 제조	19
6. 데이터 수집 및 처리	21
7. 다변량 분석	22
8. Cyclooxygenase (COX) 활성.....	23
8-1. COX 활성의 검정	23
8-2. 통계적 처리법	23

9. 혈소판 내 calcium 변화 측정	24
10. Western blot analysis	25
III. 결과 및 고찰	27
1. Ginsenoside Rk ₁ 의 항혈소판 응집작용	27
2. 시스템 불순물 분석 및 제거	28
3. UPLC/Q-TOFMS 분석법 검증	30
4. UPLC/Q-TOFMS 를 이용한 대사체 분석	34
5. 주성분 분석 및 판별분석	41
6. Eicosanoids 및 TXB ₂ 생성억제 효과	46
7. Cyclooxygenase (COX) 저해 활성화	48
8. 혈소판 내 calcium 농도 측정	51
9. 12-Lipoxygenase (12-LOX)의 translocation	53
VI. 결 론	54
V. 참 고 문 헌	57
Abstract	62

List of Figures

Figure 1: Workflow of pharmacometabolomics	4
Figure 2: Structural modification of dammarane glycosides by heat processing	6
Figure 3: Schematic procedure for sample preparation for washed platelets and metabolomics	16
Figure 4: Anti-platelet aggregation activity of ginsenoside Rk ₁ and aspirin (ASA)	27
Figure 5: Identification of system impurities	29
Figure 6: Validation of the LC method; Precision test for mass to charge	31
Figure 7: Validation of the LC method; Precision test for retention time	32
Figure 8: Validation of the LC method; Linearity	33
Figure 9: The confirmation of carry-over effect in analysis.....	34
Figure 10: Base peak chromatograms of platelets samples using UPLC/microTOF MS	35
Figure 11: Calibration using calibrant injected before every sample run.	36
Figure 12: Correlations of m/z signals and the dilution factor	37
Figure 13: The calibration effect of measured m/z on database search	38
Figure 14: Multivariate analysis using metabolomes data.....	43
Figure 15: Validation plot of the statistical PLS-DA model	44
Figure 16: OPLS-DA score plots	45
Figure 17: Alteration of (S)-hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs) and thromboxane B ₂ (TXB ₂)	47

Figure 18: Metabolite pathway of arachidonic acid	49
Figure 19: Cyclooxygenase (COX) inhibitory activities	50
Figure 20: Effects of ginsenoside Rk ₁ on the arachidonic acid (AA) -induced changes in platelet cytoplasmic calcium concentration.	52
Figure 21: Effects of ginsenoside Rk ₁ on 12-lipoxygenase translocation from cytosol to membrane.	53
Figure 22: Biological behavior of aspirin and ginsenoside Rk ₁ on anti-platelet aggregatory activity.	56

List of Tables

Table 1. The list of metabolites observed in washed rat platelet, analyzed by UPLC/microTOF MS in negative mode

Table 2. The list of metabolites observed in washed rat platelet, analyzed by UPLC/microTOF MS in positive mode.

List of Abbreviation

AA	: arachidonic acid
ADP	: adenosine diphosphate
ANOVA	: analysis of variance
ASA	: acetylsalicylic acid
cAMP	: cyclic adenosine monophosphate
BPC	: Base peak chromatography
COX	: cyclooxygenase
C.V.	: coefficient of variation
DMSO	: dimethyl sulfoxide
EGTA	: Ethylene glycol-bis(b-aminoethylether)-N'-N'-N'-N'-tetraacetic acid
GP	: glycoprotein
GPCRs	: G protein-coupled receptors
HETE	:hydroxyeicosatetraeic acid
HpETE	:hydroperoxyeicosatetraeic acid
LOD	: limit of detection
LOX	: lipoxygenase
PCA	: principal component analysis
PLS-DA	: partial least square-discriminant analysis
PG	: prostaglandin
RT	: retention time
PRP	: platelet-rich plasma
PGH ₂	: prostaglandin H ₂
Q-TOF	: quadruple time of flight

RG : red ginseng
RGUG : red ginseng unique ginsenosides
RP-HPLC : reversed phase-high performance liquid chromatography
S.D. : standard deviation
SG : Sun ginseng
TXA₂ : thromboxane A₂
TXB₂ : thromboxane B₂
U46619 : thromboxane A₂ mimetic drug
UPLC : ultra performance liquid chromatography
vWF : von Willebrand factor
WP : washed platelet
WG : white ginseng

I. 서 론

1. 약물대사체학 (Pharmacometabolomics)

1.1. 약물대사체학의 의의 및 목적

최근 진행되고 있는 Genomics, Proteomics, Metabolomics 등의 '-omics'는 생명체에서 합성하는 유전자, 단백질, 대사물질의 발현 및 조절, 변화로부터 얻어지는 다양한 정보를 획득하고 처리하는 학문으로써, 생명체에 대한 총체적 이해를 기반으로 한다.

유전체학 (Genomics), 단백질체학 (Proteomics) 등과 더불어 “-omic”의 한 분야인 대사체학(metabolomics)은 세포, 조직, 혹은 생체액 속에 포함되어 있는 저분자량 물질인 대사체 (metabolite)를 그 대상으로 하며, GC-MS, LC-MS 및 NMR 등과 같은 고감도 분석기기를 통해 얻어진 데이터를 해석 (metabolites profiling) 함으로써,¹ 식물 또는 동물의 질병 및 생물학적 메커니즘의 이해를 돕는 것을 비롯하여 질병에 대한 하나의 진단 마커를 제시하는 학문이라고 할 수 있다.²⁻⁵

최근의 분석기술의 발전과 더불어 metabolomics가 지닌 생물정보상의 장점들을 바탕으로, metabolomics가 결국 생명현상을 이해하는데 가장 포괄적이며 강력한 수단이 될 것으로 기대되고 있으며, 한 생명체가 먹고, 마시고, 소화하고, 배설하는 모든 대사과정에서 만들어지는 대사체(메타볼라이트)는,

현재, 오줌, 혈액, 혈장, 혹은 침 등의 시료로부터 아미노산, 탄수화물, 당류, 지방 같은 저분자 물질을 분석하거나 혹은 대사체 전체의 패턴을 분석함으로써, 질병이나 약물대사 같은 과정에서 실마리를 찾고 있다.

대사체학 중 약물에 의한 대사체의 변화를 관찰하고, 이를 설명하는 학문인 약물대사체학(Pharmacometabolomics)은 개발된 약물의 기전 연구 및 질병상태의 예측 등에 대해 많은 정보를 제공해 줄 수 있으며, Figure 1과 같은 과정을 통해 연구를 수행한다. 또한, 약물대사체학은 통계적 기법을 통한 판별 분석 모델링에 의한 새로운 후보물질의 발굴에도 가능성을 제시하고 있다.

1.2. 주성분 분석 및 판별 분석

오믹스를 기반으로 하는 학문은 기존의 분석방법에 비해 상당히 크고 복잡한 양의 데이터 정보를 수집하여 분석을 수행하고 있다. 이 때문에 변수들 간의 인과 관계 및 상관관계를 통하여 축약하고 개체를 분류하는 다변량 분석이 필수적이라고 할 수 있다. 본 연구에서는 다변량 분석 중 변수를 축약하는 방법으로 사용되는 변수 유도 기법 (variable directed technique) 중 오믹스 연구에서 주로 사용하고 있는 주성분 분석 (Principal component analysis, PCA)를 수행하고자 한다.

주성분 분석은 다변량 자료에 존재하는 비정규성(abnormality)이나 이상치(outlier)를 발견하기 위하여 공분산 혹은 상관행렬을 이용하여 상관관계가 존재하지 않는 새로운 변수를 (주성분)을 구하는 방법으로 주로, p개의 변수들로부터 서로 독립인 k개의 주성분을 구해 원 변수의 차원을 줄이기 위해 사용된다. 오믹스 연구에서는 PCA를 통해 outlier를 발견하고, biological diversity 및 toxicity trends하려는 목적으로 주로 사용된다.

또한 본 연구에서는 partial least square-discriminant analysis (PLS-DA) 및 orthogonal partial least square-discriminant analysis (OPLS-DA) 분석법을 이용하여 판별분석을 수행하였는데, 이는 2개이상으로 나누어진 개체들에 대해 분류에 영향을 미칠 것 같은 특성을 측정하고 이를 이용하여 판별식을 구해 새로운 개체를 분류하는 방법인 판별분석의 특성을 이용, 약물 처리 그룹과 처리하지 않은 그룹 사이에서 차이가 나는 대사체를 규명하기 위함이었다.

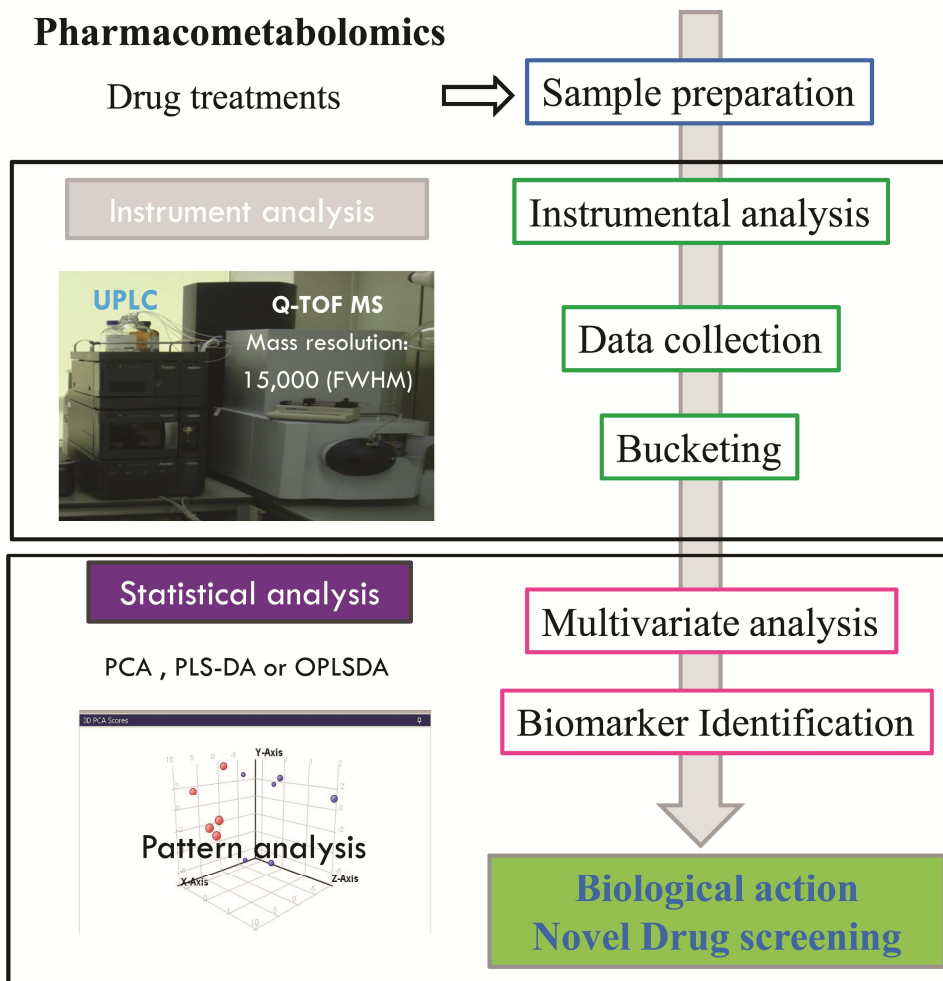


Figure 1. Workflow of Pharmacometabolomics

2. 혈소판의 생리 및 활성화

혈액의 한 구성성분인 혈소판은 골수의 거대세포(megakaryocyte)가 수명을 다해 세포질이 혈액 속으로 떨어져 나갈 때 생성되며, 약 7-10일간 혈액을 따라 순환한다.⁶

혈소판은 혈관 손상 및 출혈이 생기는 경우 활성화 되어 지혈작용에 중요한 역할을 하는 세포이다.^{7, 8} 혈소판의 활성화는 혈관 손상 혹은 여러 자극에 의해 수용성 활성화 물질들이 증가 함으로서 유발되며, subendothelium (내피세포)에 collagen이 노출되면, von Willerbrand factor(VWF)를 매개로 한 내피세포로의 부착(adhesion) 및 확장(spreading)이 이루어 짐으로서 1차 응집 반응이 유도된다. 혈소판이 1차 응집반응을 할 때, GP Ia/IIa 및 GP Ib/IX/V 등이 주요한 수용체로 작용하게 되며, 이러한 특이적 GP 결합 반응은 세포 내 신호 전달체계를 활성화 시키게 된다. 신호전달 체계의 촉발은 세포 내 칼슘의 유입을 증가시키고, 이에 따라 cytoskeleton들의 재조합이 유발된다. Cytoskeleton의 작용에 의해 혈소판의 shape change 및 spreading이 일어나게 되며, 이는 일차적인 혈소판의 활성을 유발하게 된다.⁹⁻¹¹ 이로부터 granule에 함유되어 있던 혈소판 활성물질들 (ADP, TXA₂ 등)이 분비되고, 견고한 혈소판 응집체를 형성하게 되는 이차적인 혈소판 활성화를 유발하게 된다 (Figure 2).¹²⁻¹⁴

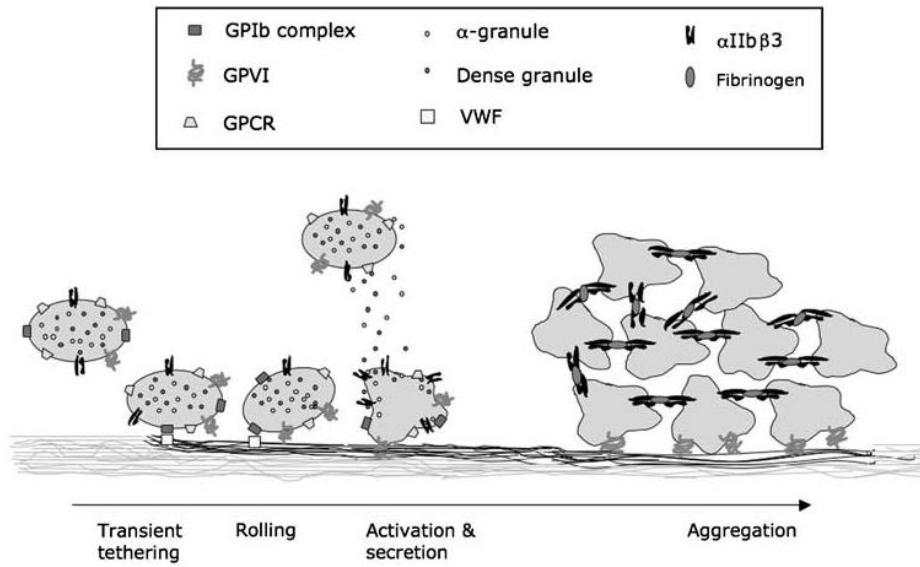


Figure 2. Platelet thrombus formation

(Ref. Barrett N.E. et al., Future innovations in anti-platelet therapies, British Journal of Pharmacology, 154, 918-939, 2008)

지혈작용은 손상된 부위에 혈괴 (clot)를 생성함으로써 혈액의 손실을 최소화하고 혈액의 정상적인 순환을 유지하기 위한 방어기전이라 할 수 있으나, 과도한 지혈 작용 또는 비정상적인 혈소판 응집은 혈전(thrombus)을 초래하여 혈액 순환 장애 및 심근 경색증, 뇌졸중 등 다양한 질환을 유발한다.¹⁵⁻¹⁸ 선진화 및 국민 생활수준이 높아짐에 따라, 식습관이나 생활방식에 의한 뇌혈관질환 및 혈행 등의 심혈관질환 발병율이 증가하고 있으며, 그로 인한 사망률이 높아지고 있는 추세로 혈소판의 응고기전을 억제시키는 약물의 개발은 심혈관계 질환 치료제로 매우 유용하다고 할 수 있다. 또한 개발된 약물의 기전연구는 그 약물이 주는 부작용의 예방 및 다른 약물과의 상호작용의 연구에 중요하게 연계될 것으로 여겨진다.

3. Ginsenoside Rk₁의 혈소판응집억제 활성

인삼은 오가피나무과 (Araliaceae)에 속하는 다년생 초본인 *Panax ginseng* C.A. MEYER의 뿌리를 이용한 생약으로 강장, 진통, 진정, 건위, 항종양 등의 약리작용을 가진다고 알려져 있으며, 현재까지도 인삼에 함유된 다양한 성분들에 대한 연구가 지속되고 있다.

인삼의 대표적인 물질인 진세노사이드(ginsenoside)는 인삼 유래 배당체 사포닌으로서, 가공하는 조건에 따라 성분의 화학적 변화가 나타나게 된다. 이에, 수증기로 찌서 말린 홍삼 (red ginseng, RG)에는 RG 특이 진세노사이드 (red ginseng unique ginsenoside, RGUG)의 분리가 보고 되었으며, 이는 물리화학적 가공과정에서, 열과 압력에 의해 deglycosylation이 일어나게 되면, 극성이 적은 진세노사이드가 생성되는 것으로 알려져 있다.¹⁹ 이렇게 생성된 진세노사이드에 대한 강한 생리활성은 많은 연구를 통해 보고되었다.^{20, 21} 또한, 이 성분들에 대한 혈소판 응집억제 활성에 관한 연구도 끊임없이 이루어져 왔다.²²⁻²⁴

한편, 본 연구실에서 RGUG의 함량을 극대화 하는 방법을 연구하던 중 개발된 ‘선삼(Sun ginseng, SG)’에는 RG에서 발견되지 않은 새로운 진세노사이드가 존재하고 있음을 알게 되었고, 이 물질들에 대한 활성 탐구 노력 역시 이루어져 왔다.

혈소판 응집억제 활성을 가지는 화합물의 탐색 결과로는, 진세노사이드 Rg_3 및 Rg_2 에 대한 항혈소판 작용이 보고된바 있다.^{25, 26} 또한, 선행연구를 통해, 진세노사이드 중 Rk_1 이 arachidonic acid 에 의하여 유도되는 혈소판 응집작용을 억제함을 알 수 있었으며, 이는 ASA 를 대조약물로 사용하여 실험 하였을 때, 기존의 알려진 항혈소판 작용 진세노사이드 및 ASA 에 비해, 강력한 항혈소판 응집작용을 가지는 것으로 확인되었다.^{27, 28} 하지만, 이들 진세노사이드의 작용기전에 대한 추가적인 연구는 아직 수행되지 않았다. 이에, 본 연구에서는 ginsenoside Rk_1 을 이용하여 약물대사체학을 수행 함으로서, 이를 통해 진세노사이드 Rk_1 의 항혈소판 작용 기전 이해 및 고찰을 실시하였다.

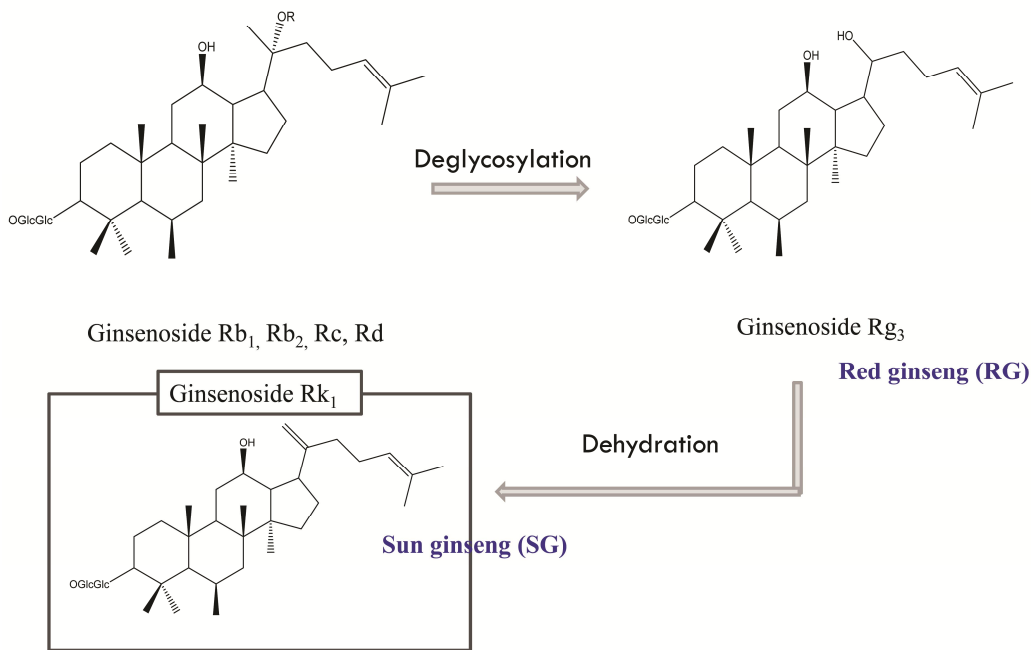


Figure 2. Structural modification of dammarane glycosides by heat processing

II. 실험 방법

1. 실험 재료, 시약 및 기기

1-1. 재료 및 시약

Acetylsalicylic acid (aspirin, ASA), arachidonic acid (AA), collagen, apyrase 및 formic acid (85%)는 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) 로부터 구입하였다. HPLC-grade methanol은 Duksan (Kyungki-Do, South Korea)으로부터, Fluo-3 acetoxymethyl (AM)은 Invitrogen (Molecular Probes, Eugene, USA) 으로부터 구입하였으며, 5(S)-HETE, 8(S)-HETE, 11(S)-HETE, 12(S)-HETE, and 15(S)-HETE, 및 water는 Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)로부터 구입하였다.

1-2. 실험 동물

Sprague-Dawley (SD) 계열 웅성 (male) 흰쥐 (OrientBio, Seoul, Korea)를 실험 동물로 사용하였으며, 구입 후 $23 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, 60% 상대습도가 유지되는 동물실에서 48시간 이상 순화과정을 거친 뒤 실험에 사용하였다. 사료는 소동물용 고형사료 (삼양유지, Seoul, Korea)를 사용하였으며, 실험동물의 취급은 서울대학교 동물실험자원관리원의 실험동물자원관리규정에 따라 시행되었다.

1-3. 실험 기기

- Ultra performance liquid chromatograph (Waters, Milford, MA, USA)
- Hystar chromatography software (Bruker Daltonik)
- ESI-micrOTOF mass spectrometer (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany)
- Reverse-phase C18 column (Acquity BEH 50 mm x 2.1 mm i.d.1.7 μ m, Waters)
- FP-777 fluorometer (Jasco, Tokyo, Japan)
- 5415R, 5810 R Centrifuge (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- Optima TLX bench-top ultracentrifuge (Beckman Coulter, Brea, CA)

2. Ginsenoside Rk₁의 분리

2-1. 가공인삼 (Sun ginseng, SG)의 제조

White ginseng (WG)을 120℃에서 3시간 autoclave안에서 감압 증숙한 후, 건조기에서 24시간 이상 건조시켜, SG를 제조하였다.²⁹

2-2. Ginsenoside Rk₁의 분리

SG 2 kg을 MeOH 3 L로 70℃에서 2시간 동안 3회 reflux 추출한 뒤, 추출액을 하나로 합쳐 감압 농축하여 SG 추출물 380 g을 얻었다. 농축된 SG 추출물에 H₂O 1.5 L를 가하여 현탁한 뒤, n-BuOH 1.5 L로 3회 용매 추출하여 n-BuOH 가용분획 약 85 g을 얻었다. n-BuOH 가용분획 중 30 g을 취하여 600 g의 silica-gel을 사용하여 silica-gel column chromatography를 시행하였다. CHCl₃: MeOH 으로 구성된 이동상을 사용하였으며, 극성 순차적인 stepwise gradient (40:1 → 30:1 → 20:1 → 10:1 → 5:1)를 시행하여 총 10개의 세부 분획을 (Fr. 1 ~ Fr. 10) 얻었다. 얻어진 세부 분획 중 Fr. 7을 10 mg/mL의 농도로 MeOH에 녹인 뒤, semi-preparative RP-HPLC에 주입하였다. 55% ACN aqueous solution (유속: 5.0 mL/min)을 이동상으로 하고 UV 203 nm에서 검출하였을 때, 약 13분에 검출되는 피크를 대상으로 하여 해당 시간대의 용리액을 반복적으로 받았다. 얻어진 물질의 순도는 기율기 용리한 55% aqueous ACN을 이동상으로 하여 HPLC/ELSD를 통하여 확인하였으며, 이미 분리되었던 해당 표준품 (authentic sample)과의 ESI-MS spectral data 및 머무름 시간을 비교하여 물질을 동정하였다.

3. Ginsenoside Rk₁의 혈소판 응집억제 활성

3-1. Washed platelets의 조제

Male SD rat (250 ± 20 g)을 디에칠에테르로 흡입 마취시킨 후, 복강을 절개하여 심장으로부터 전혈 (whole blood)을 채취하였다. 2.2% sodium citrate를 항응고제로 사용하였으며, 항응고제와 전혈을 1:6의 비율로 하여 전혈을 채취하였다. 채혈액을 200 × g에서 10 분간 원심 분리하여 혈소판 풍부 혈장 (platelet-rich plasma, PRP)을 얻었으며, 얻어진 PRP는 washed platelet을 조제하기 위하여 200 unit/mL apyrase를 첨가한 후, 1900 rpm에서 10 분간 원심분리하였다. Apyrase를 첨가하는 과정은 총 세 번에 걸쳐 반복되었으며, 원심분리 후 얻어진 platelet pellet은 tyrode buffer로 현탁 시킨 후, 혈소판 측정기 (platelet analyzer)로 혈소판의 개수를 확인하였다. 실험에 사용될 washed platelets은 600 ~ 700 × 10⁶개/mL로 맞추어 제조되었다.

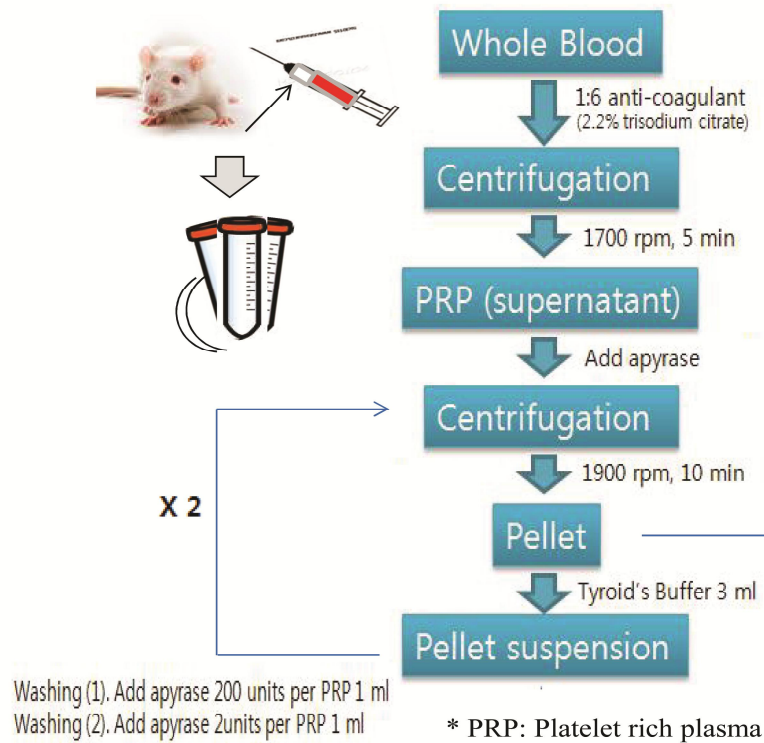
3-2. 혈소판응집억제활성

Ginsenoside Rk₁의 혈소판 응집 억제활성은 turbidimetric method에 기초한 방법으로 optical aggregometer를 이용하여 검정하였다. WP 500 μL를 37 °C에서 3 분간 배양한 후, 1100 rpm으로 교반하면서 DMSO에 용해시킨

ginsenoside Rk₁ solution 5 μ L을 넣고 30 초간 추가 배양하였다. 여기에 collagen (최종 농도 1.0 μ g/mL) AA (최종농도 3 μ M)을 각각 5 μ L씩 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 1100 rpm으로 교반 배양하였다. optical transmittance의 변화를 관찰하여 혈소판의 응집도에 따라 변화되는 혼탁도 (turbidity)로 혈소판 응집 정도를 판단하였다. 본 실험에서는 혈소판의 1차 응집에 따른 모양의 변화 (shape change)를 유도할 수 있도록 AA를 가하기 전에 Collagen을 넣어주었으며, 같은 농도의 Ginsenoside Rk₁과 ASA를 혈소판에 처리하여, 두 물질의 응집 억제 활성도를 비교 하였다.

Sampling Procedure for washed platelets

Sprague Dawley 300 g, 2.2% sodium citrate solution



Sampling Procedure for metabolomics

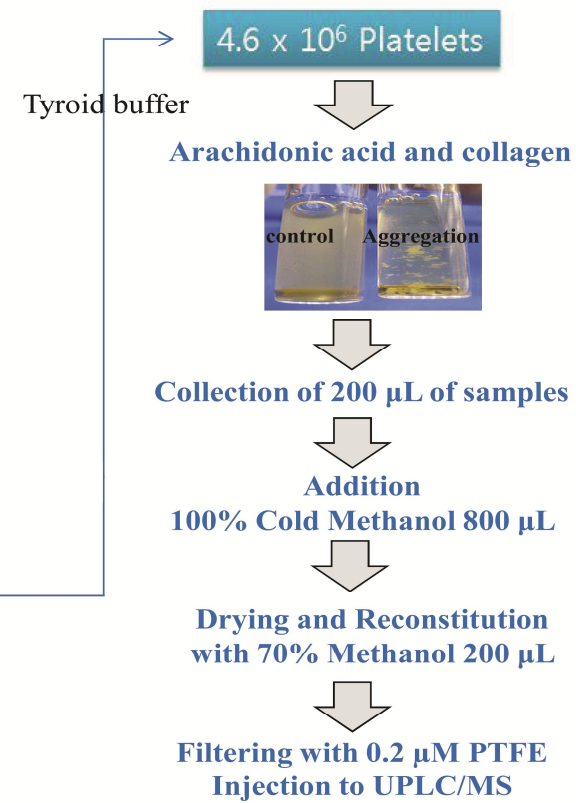


Figure 3. Schematic procedure for sample preparation for washed platelets (left) and metabolomics (right)

4. UPLC/Q-TOFMS 분석방법의 검증

혈소판 내 대사체를 분석하기에 앞서, global metabolites profiling에 적합한 분석법을 결정하고 판단하기 위하여 15개의 amino acids (alanine, arginine, aspartic acid, methionine, phenylalanine, glutamic acid, asparagine, glutamine, histidine, leucine, tryptophan, proline, serine, tyrosine, and valine) 및 TXB₂를 이용하여 정밀성 (Precision), 직선성 (Linearity), 검출한계 (Limit of detection)의 항목을 이용해 분석방법을 검증하였다.

4.1. 분석 조건

Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC)

- Gradient elution programs; 0–30% B (10 min), 80% B (25 min), 100% B (27 min).
Solvent A: Water (0.1% formic acid), Solvent B: Acetonitrile (0.1% formic acid)
- Flow rate: 0.2 mL/min

Quadruple Time of Flight Mass Spectrometry (Q-TOF)

- Capillary voltage: -4.5 kV (positive ion mode), 4.5 kV (negative ion mode)
- Temperature dry gas (He, 99.9%): 200 °C (4 L/min)
- Calibrant: Lithium solution (Isopropanol, methanol and water)
- Mass scan range: 50–1000 m/z

4.2. 분석법 검증 (Method validation)

4.2.1. 정밀성 (Precision)

분석방법의 정밀성 (Precision)은 검출된 15개의 아미노산과 TXB₂의 머무름 시간 및 mass to charge ratio (m/z)을 이용하여 검증하였다. Intra precision은 60 µg/mL의 농도에서 하루 동안 세 번 시스템에 반복 주입 함으로서 실시하였으며, Inter precision은 10 - 80 µg/mL의 농도 범위 안에서 삼 일 동안 시스템에 주입 하여 분석 함으로서 수행되었다. 결과는 mean ± S.D.로 표시하였다.

4.2.2. 직선성 (Linearity)

분석방법의 직선성 (Linearity)은 15개의 아미노산 및 TXB₂의 intensity를 이용하여 검증하였다. 검체 농도의 직선성은 y-절편, 회귀직선의 기울기로부터 positive ion 및 negative ion mode에서 각각 평가되었다.

4.2.3. 검출한계 (Limit of detection)

분석대상물질을 확실히 검출할 수 있는 최저의 농도를 확인하기 위하여 검출한계를 평가하였으며, 검출한계(LOD)는 표준편차와 검량선의 기울기에 근거하는 방법으로 결정하였으며, 다음 식에 의해 계산되었다.

$$\text{LOD} = 3.3 * \sigma / S$$

여기서 σ 는 반응의 표준편차를, S는 검량선의 기울기를 말한다.

5. 혈소판내의 대사체 분석

5.1. 분석 조건

Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC)

- Gradient elution programs; 0–30% B (10 min), 80% B (25 min), 100% B (27 min).
Solvent A: Water (0.1% formic acid), Solvent B: Acetonitrile (0.1% formic acid)
- Flow rate: 0.2 mL/min

Quadruple Time of Flight Mass Spectrometry (Q-TOF)

- Capillary voltage: -4.5 kV (positive ion mode), 4.5 kV (negative ion mode)
- Temperature dry gas (He, 99.9%): 200 °C (4 L/min)
- Calibrant: Lithium solution (Isopropanol, methanol and water)
- Mass scan range: 50–1000 m/z

5.2. 분석 샘플 제조

혈소판 응집 샘플 및 물질을 처리한 샘플들은 반응이 끝난 후, 샘플 200 μL 를 취해 새로운 eppendorf tube 에 옮긴 후, 바로 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 100% MeOH 800 μL 를 가하였다. 약 10 분간 vortexing 시킨 후, 14,000 rpm 에서 20 분간 원심 분리하여 상정액 500 μL 을 취한 후, 얻어진 샘플을 질소 기류 하에 용매를 건조 하였다.

건조된 샘플에 200 μ L 의 70% MeOH 를 넣어 3 분간 vortexing 한 후, 0.2 μ M PTFE syringe membrane filter 를 이용해 filtration 하여 LC/MS 로 주입하여 대사체 분석을 실시하였다. (Figure 3)

6. 데이터 수집 및 처리 (Data processing)

UPLC/Q-TOF으로부터 얻어진 데이터는 Profile Analysis software를 이용하여 데이터 버킷팅(Bucketing)을 수행하였다. UPLC/MS의 데이터는 mass to charge ratio, retention time 및 intensity등으로 이루어져 있어, 통계학적 분석을 위해 2차원적인 데이터로 변환해야 할 필요성을 가지고 있다. 이에 본 연구에서는 버킷팅이라는 기능을 이용하여 데이터를 3차원에서 2차원으로 만들어 주었다.

버킷팅은 두 가지 방법으로 접근할 수 있는데, 첫 번째 방법은 얻어진 데이터를 일정한 시간 간격으로 나눈 뒤, 이를 버킷으로 지정하고 지정된 버킷 안에 검출된 m/z를 일정한 간격으로 다시 나눈 후, 이에 대한 intensity를 측정, 2차원 테이블화하는 방식이다. 두 번째 방법은 일정한 시간 간격으로 나눈 버킷에서 검출된 m/z를 대상으로 peak cluster 방법을 이용, compound로 지정되는 m/z만의 intensity를 이용하여 데이터를 수집하는 방식이다. Peak cluster 방법은 related isotope intensity 및 charge states를 이용하여 compound를 지정하는 방법으로 find all compounds이라는 기능을 이용하여 수행이 가능하다. 본 연구에서는 두 번째 방법을 사용하여 테이블을 얻었으며, find all compounds 기능으로 ΔRT 0.1 min, $\Delta m/z$ 0.1 da 조건 하에 실시되었다. 버킷팅 과정을 통하여 얻어진 각 compounds에 대하여 breakdown and a one-way analysis of variance (Tukey's HSD test p-values < 0.05)를 실시하여 그룹간의 차이를 보고자 하였다.

7. 다변량 분석 (Multivariate analysis)

버켓팅을 통하여 얻어진 피크 테이블은 SIMCA-P+ (v12.0)로 추출된 후, Principal component analysis (PCA) 및 partial least-squares discriminant analysis (PLS-DA) 분석을 수행하였다. PLS-DA는 500-permutations 방법에 의하여 cross-validation을 수행하였으며, 모델의 적합성과 예측성을 확인하기 위해서 R^2 및 Q^2 을 계산하였다. 모델 수행 시의 missing data 값은 60%로 설정하였으며, 버켓테이블 내에 있는 모든 변수들은 "Pareto Variance"에 의해 scaling되었다. 그룹 간의 outlier를 평가하기 위해서, Student's t -distribution의 multivariate generalization을 한 Hotelling's T^2 방법을 사용하였다. 또한, 본 연구에서는 PLS-DA 분석 수행 후 얻어진 variables important in the projection (VIP)를 이용하여 그룹간의 차이를 규명하여 주는 대사체를 선택하였다.

-

8. Cyclooxygenase (COX) 활성화

8-1. COX 활성화의 검정

AA에 의한 혈소판 응집을 강하게 저해하는 ginsenoside Rk₁의 TXA₂ 생성 억제 정도를 평가하기 위하여 colorimetric COX inhibitor screening assay kit를 이용하여 COX-1 및 COX-2에 대한 억제효과를 검정하였다. 또한 ASA를 positive control로 사용함으로써, 두 약물간의 COX 억제 정도를 비교하였다. COX 활성화 실험은, Kit에 첨부된 실험 절차에 따라 실시하였으며, 96-well plate에 assay buffer 160 µL 및 heme 용액 10 µL을 넣고, COX-1 시약 (또는 COX-2 시약) 10 µL 및 시료 10 µL를 가한 후, 25 °C에서 5 분간 pre-incubation 하였다. 여기에 colorimetric reagent 20 µL와 기질용액을 20 µL를 가한 뒤 25 °C에서 5분간 incubation 하여 590 nm에서 흡광도를 읽었다. COX-1 (또는 COX-2)가 들어가지 않은 background와 DMSO만 첨가한 vehicle control을 측정하여 각각의 흡광도를 100% inhibition, 0% inhibition으로 하여 시료의 활성억제도 (%)를 계산하였다.

8-2. 통계적 처리법

모든 실험은 3회 반복 실시되었으며, 결과는 각 시료의 처리 농도에 대한 저해활성도 (inhibition %)의 mean ± S.D.로 표시하였다. 또한, 실험군의 통계적 유의성은 Duncan's multiple-range test를 이용한 one-way ANOVA (Analysis of Variance)를 통해 검정하였다.

9. 혈소판 내 calcium 변화 측정

Fluorescent Ca^{2+} indicator를 세포 안으로 loading 하기 위하여 준비된 washed platelets ($1 \times 10^9/\text{mL}$)에 5 mM Fluo-3 AM 및 2% pluonic-F127을 첨가 한 후, 60 분간 실온에서 반응 시켰다. 이 현탁액을 $500 \times g$ 에서 10 min간 원심 분리 시켜, platelet pellet을 얻은 후, 생리식염수 (physiological saline)로 재현탁 시켜 $1.0 \times 10^8/\text{mL}$ 의 혈소판을 얻었다. Fluorometer cuvette에 2 mL의 WP 혈소판을 넣고 37°C 에서 교반 시키면 1분간 pre-incubation 시키고, FP-777 fluorometer (Jasco, Tokyo, Japan)에서 excitation at 488 nm, emission at 535 nm 조건에서 형광을 측정하였다. Rk_1 또는 용매(DMSO)를 넣고 30초간 반응 시킨 후, collagen 0.5 mM 및 arachidonic acid 50 μM 을 첨가하여 증가하는 fluorescence intensity를 측정하여 세포 내 저장소에서 유리된 칼슘 농도로 환산하였다.

1분 후, CaCl_2 1 mM을 첨가하여 증가한 fluorescence intensity를 측정하여 세포 외부에서 유입된 칼슘 농도로 환산하였다. 칼슘의 농도는 다음 식에 의하여 계산하였다.

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d \frac{F - F_m \cdot n}{F_m \cdot ax - F}$$

10. Western blot analysis

PRP로부터 얻어진 washed platelet pellet은 HEPES tyrode buffer (pH =7.4) 로 현탁 시킨 후, 혈소판 측정기 (platelet analyzer)로 혈소판의 개수를 확인하였다. 실험에 사용될 washed platelets은 1.0×10^8 개/mL로 맞추어 제조되었다. WP 500 μ L를 37 $^{\circ}$ C에서 3 분간 배양한 후, 1100 rpm으로 교반하면서 DMSO에 용해시킨 ginsenoside Rk₁ solution 5 μ L 및 vehicle을 넣고 2 분간 추가 배양하였다. 여기에 collagen (1.0 μ g/mL) 및 AA (3 μ M) 을 각각 5 μ L씩 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 1100 rpm으로 5분간 교반 배양하였다. Cuvette을 ice-bath에 넣음으로써 반응을 종결시켰고, 샘플들은 liquid nitrogen을 이용 freeze-thawed를 세 번 반복함으로써, homogenation 시켰다. 4 $^{\circ}$ C, 100,000g에서 60분간 원심분리 한 후, supernatant는 cytosolic, pellet은 membrane 분획으로 각각 사용되었다. 각 분획은 50 mM Tris-Cl (pH 7.5), 150 ml NaCl, 1% Triton X-100, 1% Sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 2mM EDTA, sterile solution 및 protease inhibitors (Gendepot, Barker, TX, USA)를 이용하여 lysis한 후, 얻어진 protein lysates는 Precast 4% ~12% polyacrylamide gradient gel (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 위에 loading 되었다. SDS-PAGE를 이용하여 단백질을 분리하였으며, polyvinylidene difluoride membrane (Pall, Pensacola, FL, USA)로 옮긴 후, membrane을 3% nonfat milk로 blocking하였다. Anti-12 LO (1:1000, Abcam, Cambridge, MA, USA) 및 β -actin (1:1000, Santa Cruz, CA, USA) 을 이용하여 탐침하였으며, incubation 후, membranes은 TBS + 0.1% Tween 20을 이용하여 세척하였다. 다시 peroxidase-conjugated secondary antibody (1:5000, Santa Cruz, CA, USA) 와 함께, 60분간 실

온에서 유지시킨 후, Immunoactive proteins는 WEST chemiluminescence substrate (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, USA)에 의해 검출하였으며, Chemi Doc XRS (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)에 의해 영상화 되었다.

III. 결과 및 고찰

1. Ginsenoside Rk₁의 항혈소판 응집작용

Arachidonic acid (AA)로 유도된 혈소판 응집작용에 대하여 진세노 사이드 Rk₁은 용량의존적인 억제 효과를 보였으며 (Figure 4(a)), 항혈소판 응집작용을 가지는 아스피린을 대조약물로 하여 실험하여 본 결과, 20 μ M 에서 Rk₁이 아스피린에 비해 강력한 응집억제 효과를 나타냈다. (Figure 4(b))

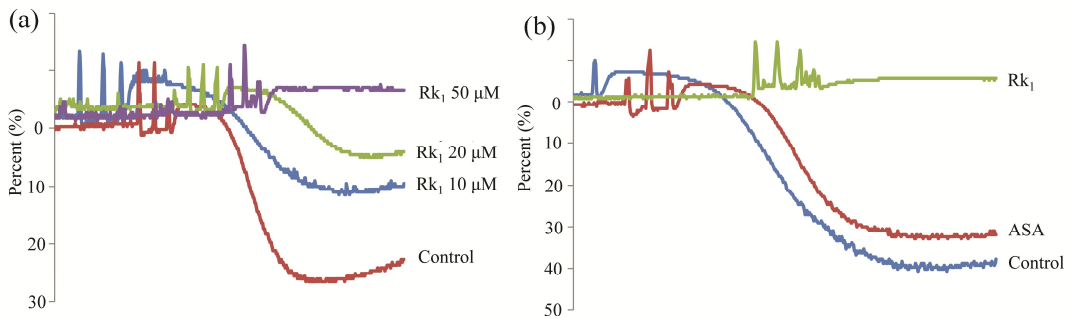


Figure 4. Anti-platelet aggregation activity of ginsenoside Rk₁ and aspirin (ASA)

(a) The anti-platelet aggregatory activity by ginsenosides Rk₁ was dose-dependent manner on arachidonic acid -induced platelet aggregation. (b) The inhibitory activity of Rk₁ and aspirin were compared at the same concentration (50 μ M) and the Rk₁ strongly inhibited the platelet aggregation.

2. 시스템 불순물 분석 및 제거

오믹스를 기반으로 하는 분석을 수행할 시에는 많은 양의 데이터를 이용하여 분석을 실시하기 때문에 효과적인 불순물 제거는 필수적이라고 할 수 있다. 이에 본 실험에서는 UPLC/MS 분석에 수행하기 전에, 시스템으로부터 나오는 불순물을 확인하고, 이를 효과적으로 제거하였다.

우선 syringe membrane filtration으로부터 생성된 두 개의 불순물을 발견하였으며(Figure 5(a)), 이 두 물질은 각각 palmitic amide (Peak #1) 및 oleamide (Peak #2)로 확인 되었다 (Figure 5(c)). 이들은 각각 plastic syringe의 slip agent로서 syringe의 원활한 up-down을 위해 syringe 제조 시에 묻혀 나오는 물질임을 알 수 있었다. 이는 glass syringe의 사용 또는 MeOH washing에 의하여 효과적으로 제거 할 수 있었다 (Figure 5(b)).

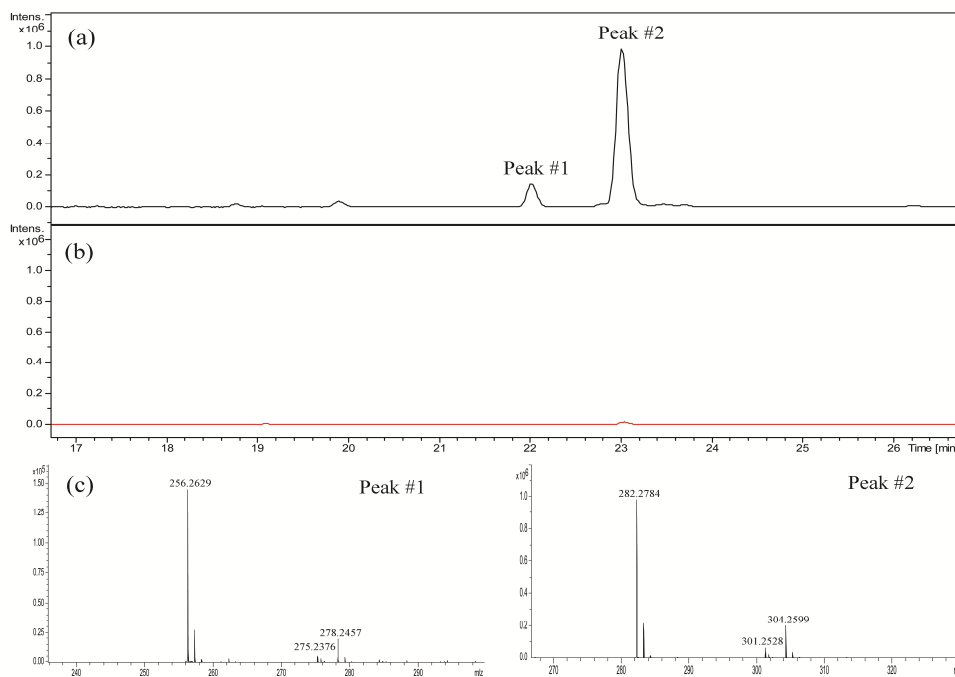


Figure 5. Identification of system impurities.

Base peak chromatograms of methanol filtered using (a) a plastic syringe, (b) the washed plastic syringe; (c) Mass spectrum of impurity produced by syringe filtering ; The peaks were identified as palmitic amide (peak #1, $[M+H]^+ = 256.2629$) and oleamide (peak #2, $[M+H]^+ = 282.2780$).The measured error were < 1 mda

3. UPLC/Q-TOFMS 분석법 검증

본 연구에서 사용된 분석방법은 정밀성, 직선성 및 검출한계 등의 항목을 통하여 검증되었으며, 각 항목은 15개의 아미노산 및 TXB₂를 이용하여 평가되었다. 정밀성은 m/z 및 머무름 시간을 이용하여 평가되었으며, (Figure 6 및 Figure 7) mass to charge ratio의 tolerance는 ± 4 mDa 내에서 정밀성을, 머무름 시간의 coefficient of variation (C.V.)는 4% 이내에서 정밀성을 나타냈다. 직선성의 경우 10 $\mu\text{g/mL}$ ~ 80 $\mu\text{g/mL}$ 의 범위에서 수행되었다. 직선성 및 검출한계의 결과로서, chemical 성질에 따라 positive 및 negative mode에서의 결과가 다르게 나옴을 확인할 수 있었다. (Figure 8) 예를 들어, 트립토판의 경우 검출한계가 positive, negative ion mode에서 각각 0.12 $\mu\text{g}/1.0 \times 10^6$ platelets 및 0.36 $\mu\text{g}/1.0 \times 10^6$ platelets 이었으며, ion mode에 따라 약 3배정도의 검출한계가 차이 나는 것을 알 수 있었다.

또한, TXB₂의 검출한계는 positive, negative ion mode에서 각각 6 ng/ 1.0×10^6 platelets 및 30 ng/ 1.0×10^6 platelets로써, 낮은 농도의 TXB₂를 분석하기에는 negative ion mode 가 더 적합함을 제시해 주었다.

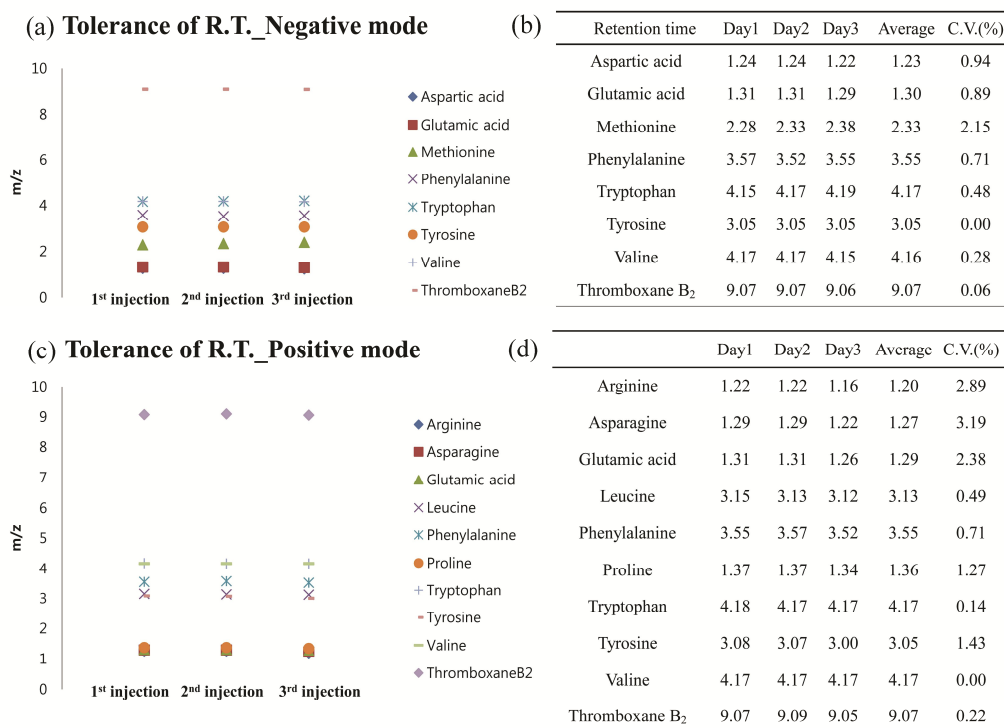


Figure 6. Validation of the LC method

Precision test for mass to charge (a) intra-precision of m/z in positive mode, (b) intra-precision of m/z in negative mode, (c) inter-precision of m/z in positive mode, (d) inter-precision of m/z in negative mode

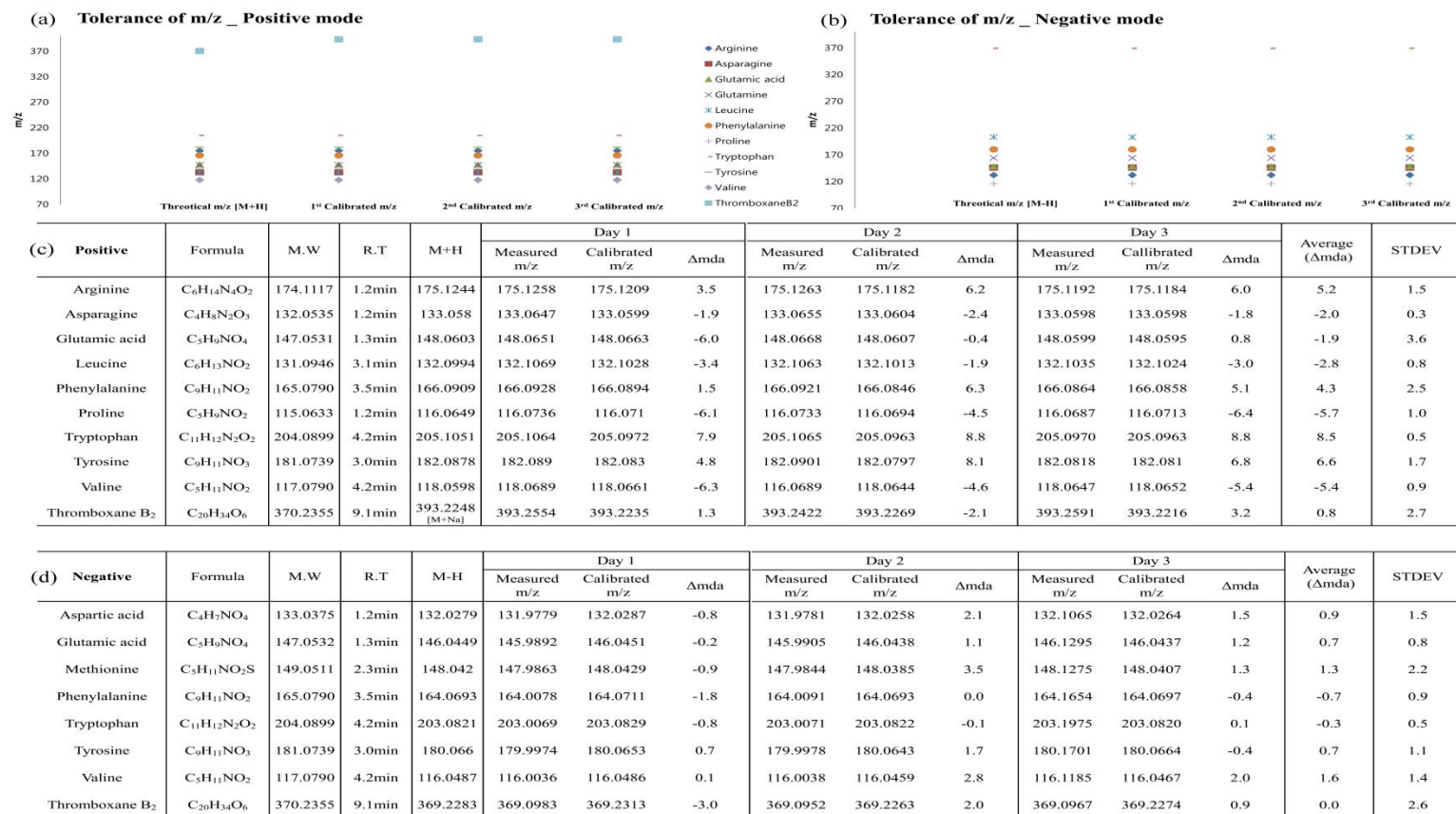


Figure 7. Validation of the LC method; Precision test for retention time (a) intra-precision of m/z in positive mode, (b) intra-precision of m/z in negative mode, (c) inter-precision of m/z in positive mode, (d) inter-precision of m/z in negative mode

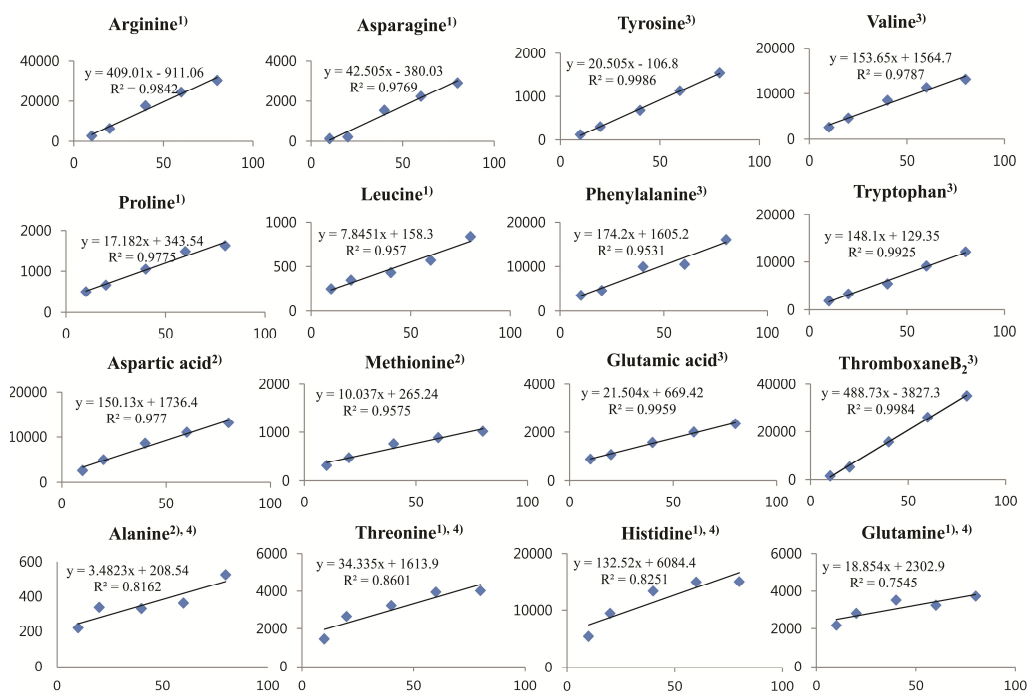


Figure 8. Validation of the LC method; Linearity

The calibration curves were obtained using thromboxane B₂ (TXB₂) and 15 amino acids; the good linearity shown depends on their molecular characters in positive and negative ion mode, respectively, ¹⁾ positive mode, ²⁾ negative mode, ³⁾ both ion modes, ⁴⁾ $r^2 < 0.9$

4. UPLC/Q-TOF MS를 이용한 대사체 분석

샘플 분석 사이에 영향을 미칠 수 있는 샘플 carry over 효과를 고려하기 위하여, 본 연구에서는 샘플의 주입 순서는 random sequence를 이용하여 결정하였으며, 매 8번의 샘플의 주입 후 MeOH 주입을 수행하였다. Random sequence는 <http://www.randomsequences.org>를 통해 생성하였다. 8번의 샘플 주입 후 잔존 하는 불순물들은 negative ion mode에서는 발견되지 않았으며 (Figure 9 (d)), positive ion mode에서는 약간 잔존하는 것으로 확인 되었다 (Figure 9 (b)). 하지만 잔존하는 피크들에 대한 규명은 이루어지지 못하였으며, 이에 meta-analysis 수행 시, 이들 피크들을 제외하여 분석을 수행하였다.

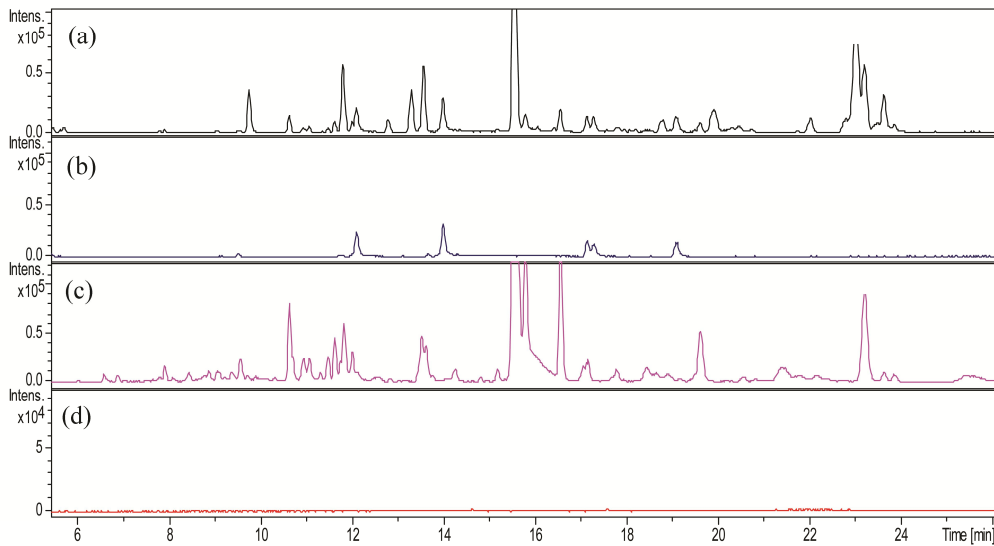


Figure 9. The confirmation of carry-over effect in analysis.

Base peak chromatograms of (a) seventh injected sample, (b) post-blank run applied at eight measurements in positive mode; In negative mode, (c) 7th injected, (d) 8th post-blank run.

혈소판 내의 대사체 분석은 UPLC/Q-TOF MS를 이용하여 수행되었으며, 대조군, 혈소판 응집, Rk₁, 아스피린 샘플에 대하여 각각 positive ion mode 및 negative ion mode에서 base peak chromatogram을 얻었다 (Figure 10).

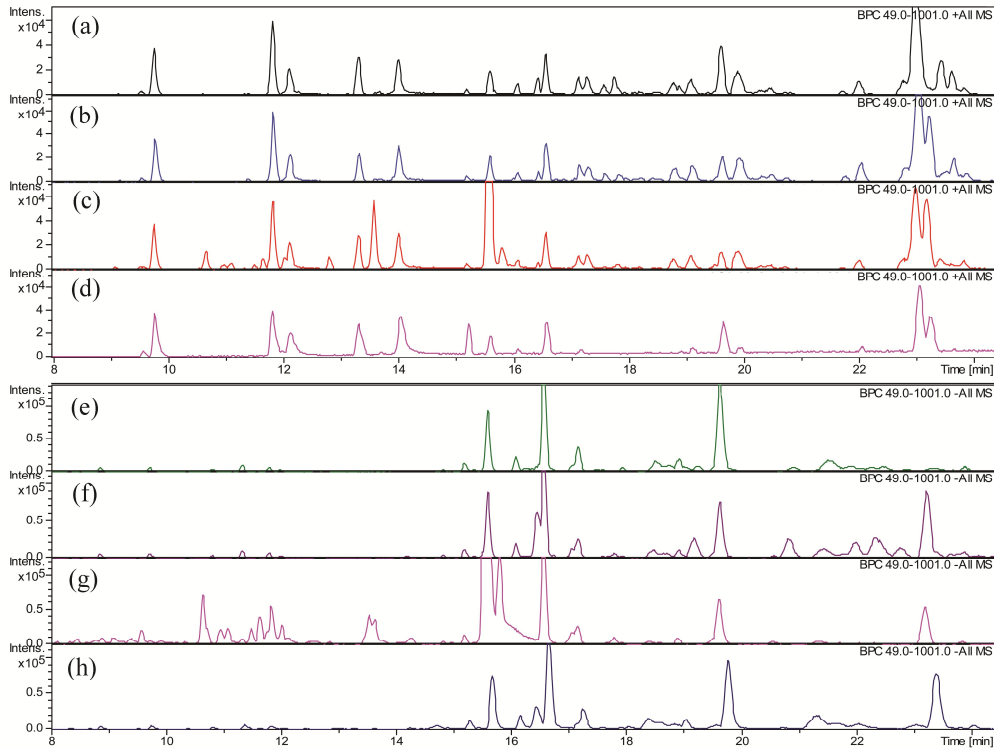


Figure 10. Base peak chromatograms of platelets samples

Positive ion mode (a) 대조군 (b) 혈소판 응집 (c) Ginsenoside Rk₁ (d) 아스피린, Negative ion mode (e) 대조군 (f) 혈소판 응집 (g) Ginsenoside Rk₁ (h) 아스피린

UPLC/Q-TOF MS로부터 얻어진 데이터는 profile analysis software로 추출된 후, 버켓팅을 실시 하여, 버켓테이블을 얻었다. 결과적으로, find all compounds에 의해 positive 및 negative ion mode에서 각각 10,717개 및 12,087개의 피크로 이루어진 버켓테이블을 얻을 수 있었다. 본 연구에서는 meta-analysis에 방해 요소로 작용할 수 있는 chromatographic traces 및 peaks을 제거하기 위하여, dilution factor를 이용한 correlation test를 수행하였다.³⁰ Correlation 값이 0.5이하인 변수를 제거한 후, 버켓테이블에 나열된 m/z들은 UPLC/Q-TOF 분석 시 사용된 calibrant를 이용하여 calibration을 실시하였다 (Figure 11).

15개의 아미노산 혼합용액을 이용하여 dilution factor를 이용한 correlation test를 수행한 결과는 Figure 12와 같으며, 약 65% 변수가 노이즈로 간주되었다.

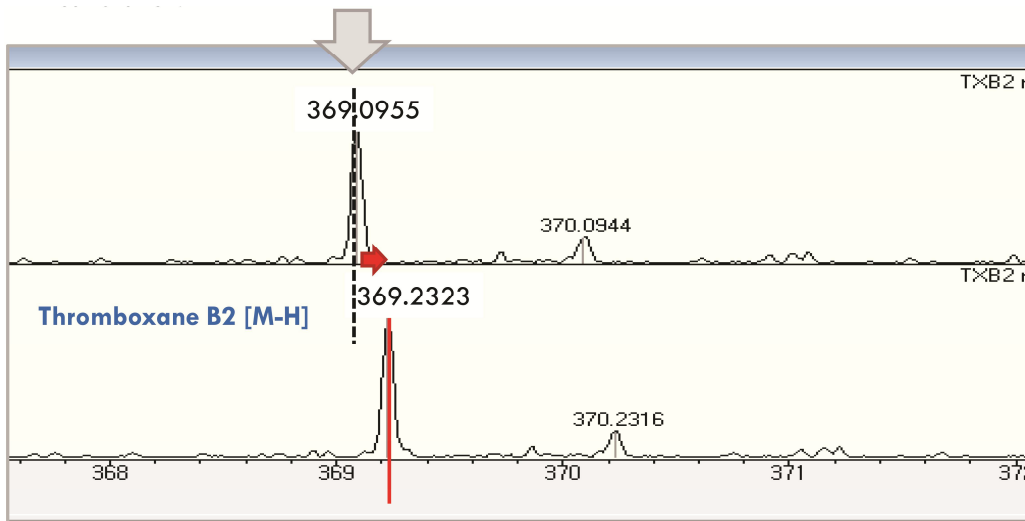


Figure 11. Calibration using calibrant injected before every sample run.

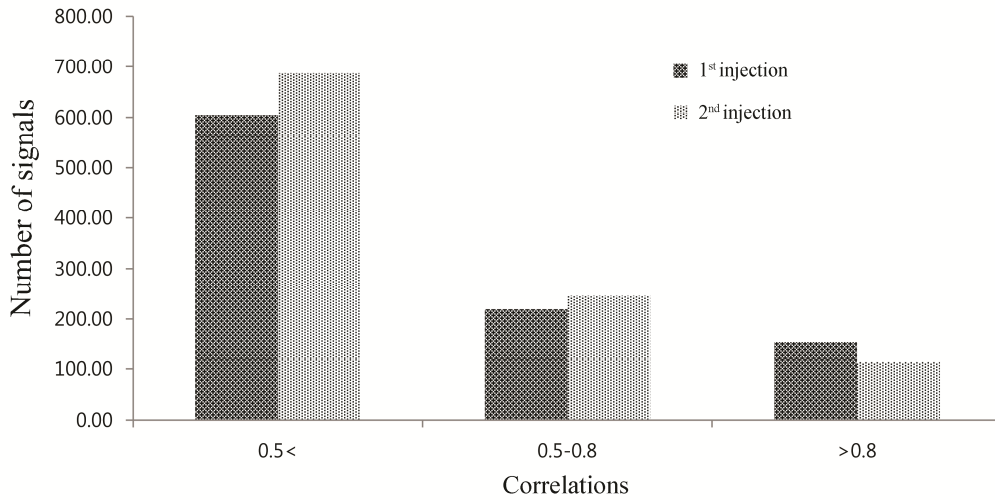


Figure 12. Correlations of m/z signals and the dilution factor

The standard mixture including 15 amino acids were diluted as 5 points and the total number of signals was obtained from each peak list generated by Bruker Profile Analysis Software. The correlations were calculated statistically and the signals did not correlated (correlation values <0.5) with the dilution factor were about 65%.

Calibration된 m/z는 Human metabolome database (<http://hmbd.ca>)등의 데이터베이스를 기반으로 대사체를 확인하였다 (Figure 13, Table 1 및 2). Calibration 수행 전에 얻어진 m/z으로 대사체를 이용하여 대사체를 확인한 결과, 정확한 대사체를 찾을 수 없었으며 (Figure 13 (a)), calibration후에 얻어진 m/z를 이용하여 검색한 결과, 정확하게 찾을 수 있음을 확인 할 수 있었다 (Figure 13 (b)). 이는 정확한 대사체의 검색을 위하여 calibration이 반드시 필요함을 제시하여 주었다.

Thromboxane B₂ [M-H] <http://www.hmdb.ca>

(a) Before calibration; 369.0955 m/z

HMDB ID	Common Name	Chemical Formula	Adduct MW (Da) [Matching HMDB MW]	MW Difference (Da)	Adduct
HMDB11648	1-(beta-D-Ribofuranosyl)-1,4-dihydropyridin-2(1H)-one	C11H16N2O5	369.091522 [256.105927]	0.003967	M+TFA-H [1-]
HMDB11655	2-(3-Carboxy-3-aminopropyl)-L-histidine	C10H16N4O4	369.102753 [256.117157]	0.007263	M+TFA-H [1-]
HMDB00640	Glucosan	C6H10O5	369.103851 [162.052826]	0.008362	2M+FA-H [1-]
HMDB00368	2(R)-Hydroxyadipic acid	C6H10O5	369.103851 [162.052826]	0.008362	2M+FA-H [1-]
HMDB00355	3-Hydroxymethylglutaric acid	C6H10O5	369.103851 [162.052826]	0.008362	2M+FA-H [1-]
HMDB00345	3-Hydroxyadipic acid	C6H10O5	369.103851 [162.052826]	0.008362	2M+FA-H [1-]
HMDB00321	2-Hydroxyadipic acid	C6H10O5	369.103851 [162.052826]	0.008362	2M+FA-H [1-]

(b) After calibration; 369.2323 m/z

HMDB ID	Common Name	Chemical Formula	Adduct MW (Da) [Matching HMDB MW]	MW Difference (Da)	Adduct
HMDB03252	Thromboxane B₂	C ₂₀ H ₃₄ O ₆	369.228271 [370.235535]	0.004028	M-H [1-]
HMDB02886	6-Keto-prostaglandin F1a	C ₂₀ H ₃₄ O ₆	369.228271 [370.235535]	0.004028	M-H [1-]
HMDB04049	20-Hydroxy-PGF2a	C ₂₀ H ₃₄ O ₆	369.228271 [370.235535]	0.004028	M-H [1-]
HMDB01934	L(-)-Nicotine pestanal	C ₁₀ H ₁₄ N ₂	369.229584 [162.115692]	0.002716	2M+FA-H [1-]
HMDB04350	Anabasine	C ₁₀ H ₁₄ N ₂	369.229584 [162.115692]	0.002716	2M+FA-H [1-]
HMDB13623	12(13)Ep-9-KODE	C ₁₈ H ₃₀ O ₄	369.228271 [310.214417]	0.004028	M+Hac-H [1-]
HMDB12109	5,6-Dihydroxyprostaglandin F1a	C ₂₀ H ₃₆ O ₇	369.227692 [388.246094]	0.004608	M-H2O-H [1-]

Figure 13. The calibration effect of measured m/z on database search.

The m/z of thromboxane B₂ (TXB₂) was measured by UPLC/microTOF MS using authentic standard. It was calibrated by a calibrant prepared with lithium formate. The measured value (369.0955 m/z) was searched using human database and (a) identification could not performed properly, (b) the accurate identification was performed by calibrated m/z.

TABLE 1. The list of metabolites observed in washed rat platelet, analyzed by UPLC/microTOF MS in negative mode

Retention time	m/z ^a	Metabolite ID ^b	Chemical formula ^d	Adduct forms
1.4	328.0444	cycle adenosine monophosphate ^c	C ₁₀ H ₁₂ N ₅ O ₆ P	M-H
1.4	505.9965	Adenosine triphosphate ^c	C ₁₀ H ₁₆ N ₅ O ₁₃ P ₃	M-H
3.2	175.0805	Serotonin ^c	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O	M-H
8.8	514.2790	Taurohydrocholate	C ₂₆ H ₄₅ NO ₇ S	M-H
9.1	369.2291	Thromboxane B ₂ ^c	C ₂₀ H ₃₄ O ₆	M-H
10.8	498.2861	Taurochenodesoxycholic acid	C ₂₆ H ₄₅ NO ₆ S	M-H
11.3	407.2757	Hyochoic acid	C ₂₄ H ₄₀ O ₅	M-H
11.8	371.1720	Biocytin	C ₁₆ H ₂₈ N ₄ O ₄ S	M-H
12	448.3056	Glycoursodeoxycholic acid	C ₂₆ H ₄₃ NO ₅	M-H
14.2	452.2770	LysoPE ^e (16:0/0:0) ^g	C ₂₁ H ₄₄ NO ₇ P	M-H
14.3	502.2884	LysoPE(20:3(8Z,11Z,14Z)/0:0) ^g	C ₂₅ H ₄₆ NO ₇ P	M-H
14.8	478.2920	LysoPE(18:1(9Z)/0:0) ^g	C ₂₃ H ₄₆ NO ₇ P	M-H
15.3	466.2941	LysoPC ^f (14:0) ^g	C ₂₂ H ₄₆ NO ₇ P	M-H
15.5	476.2783	LysoPE(18:2(9Z,12Z)/0:0) ^g	C ₂₃ H ₄₄ NO ₇ P	M-H
15.5	500.2767	LysoPE(20:4(8Z,11Z,14Z,17Z)/0:0) ^g	C ₂₅ H ₄₄ NO ₇ P	M-H
15.6	504.3076	LysoPE(20:2(11Z,14Z)/0:0) ^g	C ₂₅ H ₄₈ NO ₇ P	M-H
15.9	492.3096	LysoPC(16:1(9Z)) ^g	C ₂₄ H ₄₈ NO ₇ P	M-H
16.2	319.2283	15(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid ^c	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	M-H
16.5	452.2772	LysoPE(16:0/0:0) ^g	C ₂₁ H ₄₄ NO ₇ P	M-H
16.5	480.3071	LysoPC(15:0) ^g	C ₂₃ H ₄₈ NO ₇ P	M-H
16.7	319.2284	12(S)- hydroxyeicosatetraenoic acid ^c	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	M-H
17.1	478.2934	LysoPE(18:1(9Z)/0:0) ^g	C ₂₃ H ₄₆ NO ₇ P	M-H
17.1	436.2823	PE(P-16:0e/0:0) ^g	C ₂₁ H ₄₄ NO ₆ P	M-H
17.2	319.2286	5(S)- hydroxyeicosatetraenoic acid ^c	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	M-H
17.3	528.3089	LysoPE(22:4(7Z,10Z,13Z,16Z)/0:0) ^g	C ₂₇ H ₄₈ NO ₇ P	M-H
17.4	494.3255	LysoPC(16:0) ^g	C ₂₄ H ₅₀ NO ₇ P	M-H
17.5	506.3242	LysoPE(20:1(11Z)/0:0) ^g	C ₂₅ H ₅₀ NO ₇ P	M-H
17.8	532.3403	LysoPE(22:2(13Z,16Z)/0:0) ^g	C ₂₇ H ₅₂ NO ₇ P	M-H
18.9	508.3393	LysoPE(20:0/0:0) ^g	C ₂₅ H ₅₂ NO ₇ P	M-H
19.5	480.3080	LysoPE(18:0/0:0) ^g	C ₂₃ H ₄₈ NO ₇ P	M-H
19.6	508.3387	LysoPE(20:0/0:0) ^g	C ₂₅ H ₅₂ NO ₇ P	M-H

^a Calibrated m/z by calibrant.

^b Observed metabolites were annotated by metabolomic public databases

^c Identification was confirmed based on retention time and m/z of authentic standards

^d Molecular formula of [M-H]

^e LysoPE is lysophosphatidyletanolamine

^f LysoPC; Lysophosphatidylcholine

^g Identification was performed using their fragments detected by LC/MS

TABLE 2. Metabolites list observed in washed rat platelet, analyzed by UPLC/microTOF MS in positive mode.

Retention time	m/z ^a	Metabolite ID ^b	Chemical formula ^d	Adduct forms
1.2	301.0414	Cinnavalininat	C ₁₄ H ₈ N ₂ O ₆	M+H
4.3	289.1823	16,17-Epiestriol	C ₁₈ H ₂₄ O ₃	M+H
4.6	333.2093	Carnosic acid	C ₂₀ H ₂₈ O ₄	M+H
11.8	237.1018	Salsoline-1-carboxylate	C ₁₂ H ₁₄ NO ₄	M+H
11.8	219.0908	Glutamylalanine	C ₈ H ₁₄ N ₂ O ₅	M+H
11.8	198.0344	3-Hydroxy-2-methylpyridine-4,5-dicarboxylate	C ₈ H ₇ NO ₅	M+H
15.6	544.3398	LysoPC ^c (20:4(8Z,11Z,14Z,17Z)) ^g	C ₂₈ H ₅₀ NO ₇ P	M+H
15.6	520.3388	LysoPC(18:2(9Z,12Z)) ^g	C ₂₆ H ₅₀ NO ₇ P	M+H
15.7	400.3402	L-Palmitoylcarnitine	C ₂₃ H ₄₅ NO ₄	M+H
16.1	496.3362	LysoPC(16:0) ^g	C ₂₄ H ₅₀ NO ₇ P	M+H
16.1	426.3571	Oleoylcarnitine	C ₂₅ H ₄₇ NO ₄	M+H
16.4	546.3550	LysoPC(20:3(8Z,11Z,14Z)) ^g	C ₂₈ H ₅₂ NO ₇ P	M+H
16.5	518.3197	LysoPC(18:3(9Z,12Z,15Z)) ^g	C ₂₆ H ₄₈ NO ₇ P	M+H
16.5	459.2467	3-Sulfodeoxycholic acid	C ₂₃ H ₃₈ O ₇ S	M+H
16.5	419.2530	CPA(18:1(9Z)/0:0)	C ₂₁ H ₃₉ O ₆ P	M+H
17.1	522.3541	LysoPC(18:1(9Z)) ^g	C ₂₆ H ₅₂ NO ₇ P	M+H
19.6	506.3558	LysoPC(P-18:1(9Z)) ^g	C ₂₆ H ₅₂ NO ₆ P	M+H
19.6	524.3668	LysoPC(18:0) ^g	C ₂₆ H ₅₄ NO ₇ P	M+H
19.6	546.3494	LysoPC(20:3(8Z,11Z,14Z)) ^g	C ₂₈ H ₅₂ NO ₇ P	M+H
23.0	647.5025	SM(d18:1/12:0)	C ₃₅ H ₇₁ N ₂ O ₆ P	M+H
23.2	305.2476	Arachidonic acid ^c	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	M+H
27.2	455.3351	27-Norcholestanhexol	C ₂₆ H ₄₆ O ₆	M+H
28.2	431.3475	4alpha-carboxy-5alpha-cholesta-8-en-3beta-ol	C ₂₈ H ₄₆ O ₃	M+H
28.3	381.2978	MG(20:3(8Z,11Z,14Z)/0:0/0:0)	C ₂₃ H ₄₀ O ₄	M+H
29.2	439.3414	27-Nor-5b-cholestane-3a,7a,12a,24,25-pentol	C ₂₆ H ₄₆ O ₅	M+H

^a Calibrated m/z by calibrant

^b Observed metabolites were annotated by metabolomic public databases

^c Identification was confirmed based on retention time and m/z of authentic standards

^d Molecular formula of [M]

^e LysoPC; Lysophosphatidylcholine^g Identification was performed using their fragments detected by LC/MS with databases of lipidmaps (<http://www.lipidmap.org>)

5. 주성분 분석 및 판별 분석

Profile analysis software를 이용하여 버켓팅 수행 후 얻어진 버켓테이블을 이용하여 주성분 분석 (Principal component analysis, PCA)를 실시하였다. Positive 및 negative로부터 얻어진 PCA 결과는 Figure 14 (a), (b)에 각각 나타났다. R_k 및 아스피린 샘플은 다른 그룹군과 차이가 있음을 보였으나, 혈소판이 응집된 샘플과 대조군은 크게 차이를 나타내지 못하였다. 이에, 판별 분석인 partial least-squares discriminant analysis (PLS-DA)을 실시하였고, 서로 다른 네 개의 그룹이 주성분 1과 3에 의해 구별될 수 있었다 (Figure 14(c), (d)). 성립된 PLS-DA models로부터 R^2 및 Q^2 값을 계산할 수 있으며, R^2 값은 모델에 의해 데이터변수가 얼마만큼 설명되고 있는지를 알려주는 지표이며, Q^2 의 값은 새로운 변수를 모델에 적용시켰을 때, 모델의 예측도를 알려주는 지표이다. 본 실험에서 얻어진 PLS-DA models의 타당성은 R^2 및 Q^2 의 값에 의하여 결정하였으며, positive 및 negative ion mode에서 R^2 값은 각각 0.98 and 0.99을 가졌으며, Q^2 값은 각각 0.82 and 0.83 값을 가졌다. 이 결과는 성립된 PLS-DA가 현재 모델링에 사용된 변수들을 높은 비율로 잘 설명해주고, 새로운 변수에 대해서도 높은 예측도를 가질 수 있음을 의미한다.

얻어진 PLS-DA 결과는 500 permutations 방법에 의해 cross validation 을 실시하였고, Figure 15에 보여진 바와 같이 왼쪽에 표시된 값들이 오른쪽에 표시된 original point값 보다 낮고, Q^2 값의 y-intercept값이 0보다 낮음으로써, positive ion mode(Figure 15(a)) 및 negative ion mode (Figure 15(b))에서 수행된 PLS-DA 모델들의 validation을 확인 할 수 있었다.

본 연구에서는 각 그룹간의 분리 효과를 극대화하기 위해 ortho-partial least-squares discriminant analysis (OPLS-DA)를 실시하였고 (Figure 16), 주성분 1과 3에 의해 PLS-DA 결과에 비해 분리의 극대화를 확인 할 수 있었다.

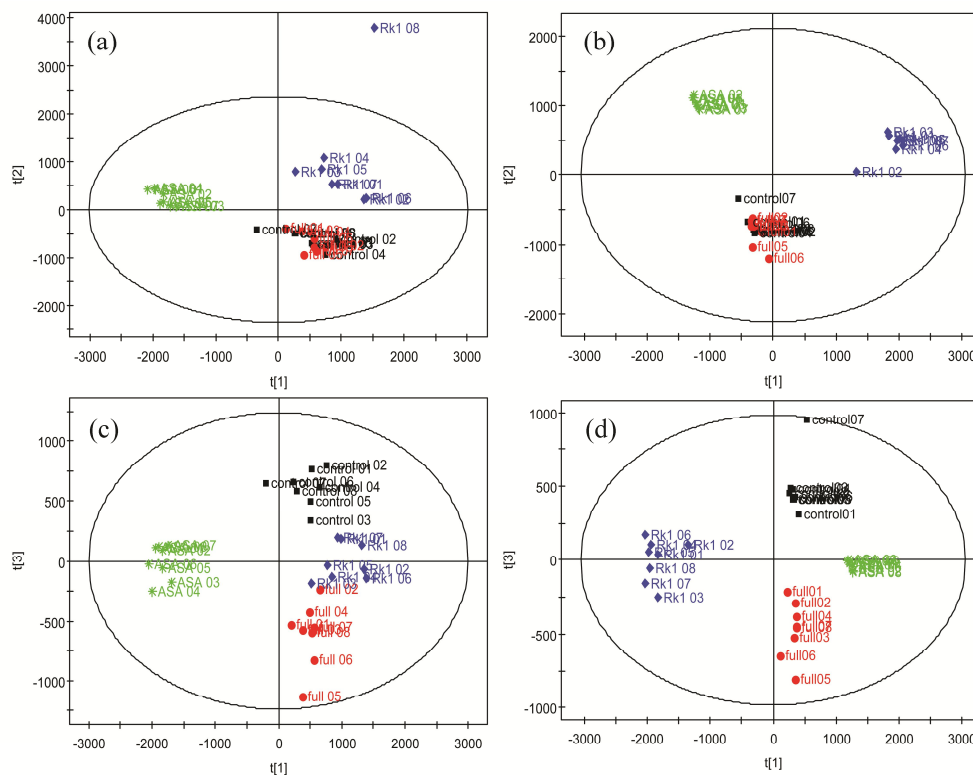


Figure 14. Multivariate analysis using metabolomes data

Negative ion mode Principal component analysis (PCA) score plots were plotted by PC1 (1st component) and PC2 (2nd component) in (a) positive and (b) negative ion mode. The control, full aggregation, ginsenoside Rk₁ and aspirin groups were colored as black, red, blue and green, respectively. The score plots of partial least squares - discriminant analysis (PLS-DA) were plotted by PC1 (1st component) and PC3 (3rd component) in (c) positive ion mode and (d) negative ion mode.

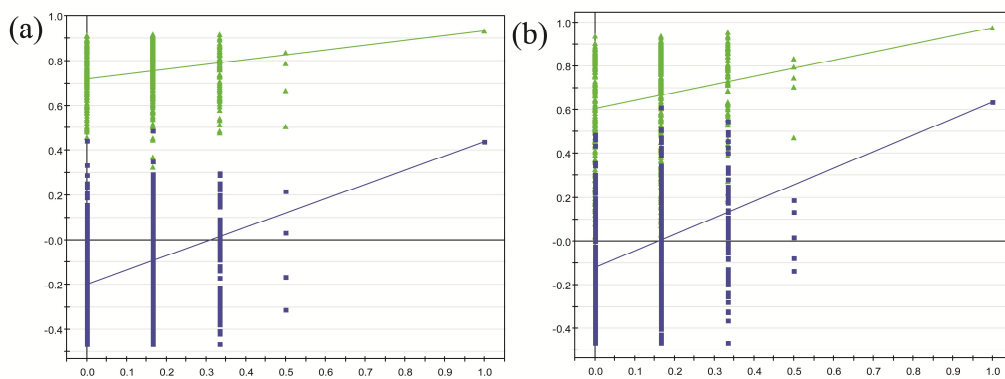


Figure 15. Validation plot of statistical PLS-DA model.

The PLS-DA were established from meta-data files analyzed by LC/MS and the validity of the PLS-DA models was evaluated by 500 permutation tests in (a) positive and (b) negative ion modes, respectively. The horizontal axis represents correlation between the permuted- and original y-vector and the criteria for validity were satisfied in both ion modes, an indication the PLS-DA models were valid.

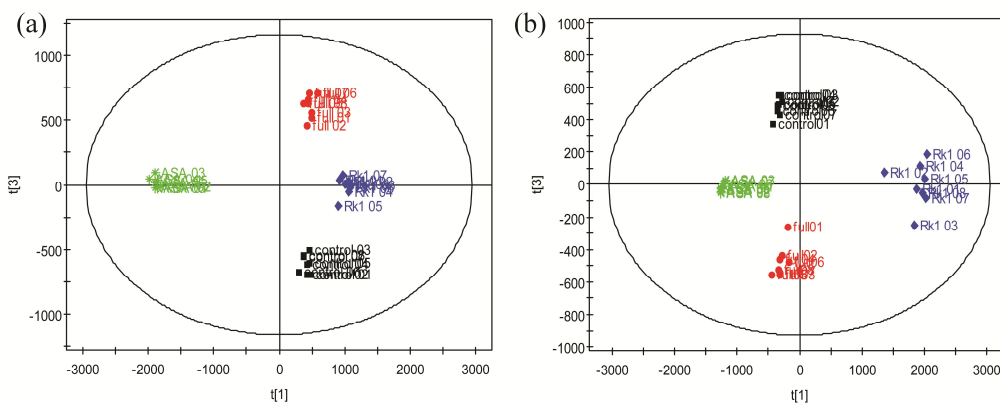


Figure 16. OPLS-DA score plots

The ortho-partial least-squares discriminant analysis was performed to maximize the segregation between groups and the clearer discrimination was observed in (a) positive mode and (b) negative ion mode. The y-axis represents the scores that summarizes the X variation orthogonal to Y.

6. Eicosanoids 및 TXB₂ 생성억제 효과

PLS-DA 판별 분석을 통해 얻어진 variable importance in the projection (VIP)로부터 각 그룹을 나누는 m/z 가 선택되었으며, 이들 m/z 은 breakdown and a one-way analysis of variance (Tukey' s HSD test p-values < 0.05)를 수행하여 유의성 있는 대사체를 확인하였다.

Eicosanoids 중에서는 15(S)-Hydroeicosatetradecaenoic acid (15(S)-HETE), 및 12(S)-HETE 가 확인 되었으며, 또한 혈소판 응집에 중요한 역할을 하는 Thromboxane A₂의 생성지표인 Thromboxane B₂ (TXB₂)를 검출 할 수 있었다.

TXB₂는 Rk₁ 및 아스피린 처리 모두에 의해서 유의성 있게 감소하는 것을 확인 할 수 있었으며, 100 μM ASA 및 10 μM Rk₁에 의해 감소된 TXB₂ level 은 각각 66% 및 77%이었다.

12(S)-HETE 의 경우, Rk₁에 의해 항혈소판 응집 작용을 나타낸 샘플에서 유의성 있게 감소하는 한편, 아스피린이 처리된 샘플에서는 오히려 증가하는 것을 확인 할 수 있었다 (Figure 17). 이와 같은 결과로서, Rk₁에 의한 항혈소판 응집 작용은 TXA₂ 및 12(S)-HETE 생성 기전에 영향을 미치고 있음을 알 수 있었다. 아스피린의 항 혈소판 응집작용은 cyclooxygenase 억제작용으로 인한 TXA₂ 생성 억제로 알려져 있다. 이에, 본 연구에서는 Rk₁이 TXA₂ 생성작용 기전뿐만 아니라, 12(S)-HETE 생성 기전도 효과적으로 억제 함으로서 아스피린보다 arachidonic acid 에 의한 혈소판 응집작용에 강력한 억제효과를 나타낸 것으로 생각되었다.

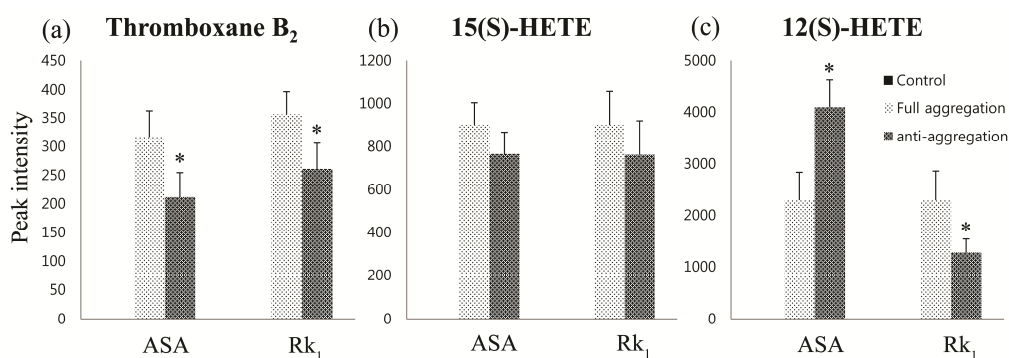


Figure 17. Alteration of (S)-hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs) and thromboxane B₂ (TXB₂)

(a) Thromboxane B₂, (b) 12(S)-HETE and (c) 15(S)-HETE; The (S)-HETEs and TXB₂ were determined using UPLC/Q-TOF system. Thromboxane B₂ decreased both Rk₁ and ASA. The increase in (S)-HETEs was observed in AA-induced platelet aggregation. In particular, 12(S)-HETE was significantly decreased by Rk₁ treatment, whereas it increased when aspirin was treated. Data were expressed as mean ± standard deviation and the y-axis of plot expressed as intensity of mass to charge ratio. Statistical analysis was performed by one-way anova. (* p<0.05)

7. Cyclooxygenase(COX)저해 활성

약물대사체학을 통해, 그룹간의 차이를 규명하는 대사체로 TXB₂로 확인 하였으며, 아스피린 및 ginsenoside Rk₁에 의해 TXB₂ 생성을 억제하는 작용을 분자수준에서 규명하기 위하여 COX에 대한 직접적 길항 효과를 검증하였다.

COX는 AA의 대사과정에 작용하는 효소로서, 여러 염증성 인자 및 혈소판 응집에 중요한 역할을 담당하고 있는 TXA₂ 생산을 담당하고 있다.³¹ AA는 COX에 의해 prostaglandin H₂로 대사된 후, thromboxane synthase에 의해 TXA₂로 대사되고, 이는 더 안정한 대사체인 TXB₂를 생성하게 된다.³² 그렇기 때문에 TXB₂의 생성 억제는 COX에 대한 저해효과를 간접적으로 예측할 수 있도록 한다. COX는 두 가지의 isoform인 COX-1과 COX-2로 존재하며, ASA의 경우, COX-1에 대한 억제 효과가 COX-2에 비해 뛰어나 TXB₂ 생성을 억제하는 것으로 알려져 있다.³³

본 실험에서는 COX의 활성에 대한 억제도를 COX의 peroxidase 효과에 의한 oxidized N,N,N',N'-tetramethyl-*p*-phenylenediamine (TMPD)의 생성으로, 확인 하였으며, 생성된 TMPD는 590 nm에서 검출하였다

실험 결과, ASA는 알려진 대로 COX-2에 비해 COX-1에 대하여 억제효과가 강함을 알 수 있었고, 농도 의존적으로 길항함을 확인하였다. Ginsenoside Rk₁의 경우, COX-1 및 COX-2에 대해 모두 저해 효과를 나타냈다. COX-1에 대한 저해효과가 COX-2에 비해 강한 것을 확인 할 수 있었지만, ASA에 비하

여 낮음을 확인 할 수 있었다. 이 결과로 미루어 볼 때, ginsenoside Rk₁의 AA 의해 유도된 혈소판 응집 억제활성은 부분적으로 COX를 억제하여 나타나는 것임을 알 수 있었다.

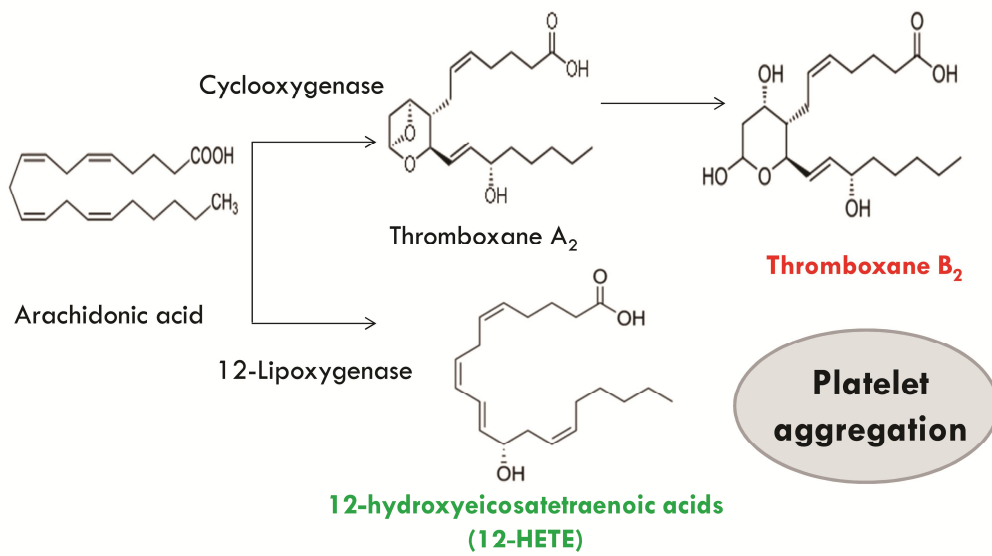


Figure 18. Metabolic pathway of arachidonic acid

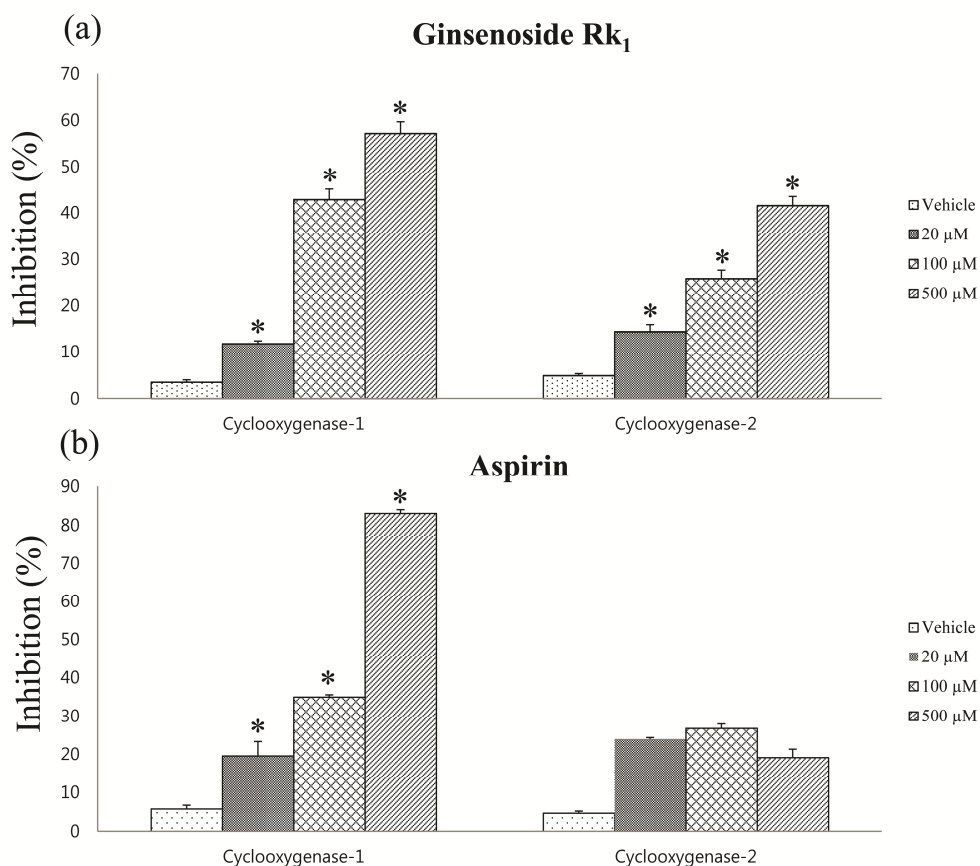


Figure 19: Cyclooxygenase (COX) inhibitory activities

The inhibitory effects of ginsenoside Rk₁ and aspirin on (a) COX-1 and (b) COX-2 were measured by colorimetric inhibitor screening assay. Data were expressed as mean ± standard deviation. Statistical analysis was performed by one-way anova. (* p<0.005)

8. 혈소판 내 $[Ca^{2+}]$ 농도 측정

약물대사체학을 기반으로 하여 얻어진 대사체의 변화를 살펴본 결과, 진세노사이드 Rk_1 과 아스피린 처리 샘플을 구분 짓는 대사체로서 12(S)-HETE가 확인되었다. 12-HETE는 AA 대사체 중 하나로서, AA가 12-LOX에 의하여 12-HpETE로 대사되고, 이는 곧 안정한 대사체인 12-HETE로 대사된다 (Figure 18). 12(S)-HETE가 혈소판 응집작용에 미치는 작용에 대하여 1960년부터 연구가 진행되어 왔으며,³⁴⁻³⁶ 최근 연구에서는 천연물로부터 분리된 성분들 중 항혈소판 작용을 나타내는 물질들이 12(S)-HETE 생성기전에도 영향을 미치는 것으로 보고되었다.

본 연구에서는 세포 내 저장소로부터 Ca^{2+} 유리 및 유입이 12(S)-HETE 생성에 영향을 미칠 수 있는 가능성에 초점을 두고³⁷ Rk_1 에 의한 세포 내 저장소로부터 Ca^{2+} 유리 및 외부로부터의 Ca^{2+} 유입을 측정하였다. 10 μ M Rk_1 에 의하여 세포 내 저장소로부터 Ca^{2+} 유리가 $54.8 \pm 2.5\%$ 감소하는 것을 확인 할 수 있었으며, 1 mM $CaCl_2$ 의 첨가 후, 외부로부터 Ca^{2+} 유입 또한 $48.8 \pm 7.9\%$ 억제하는 것을 확인하였다. (Figure 20)

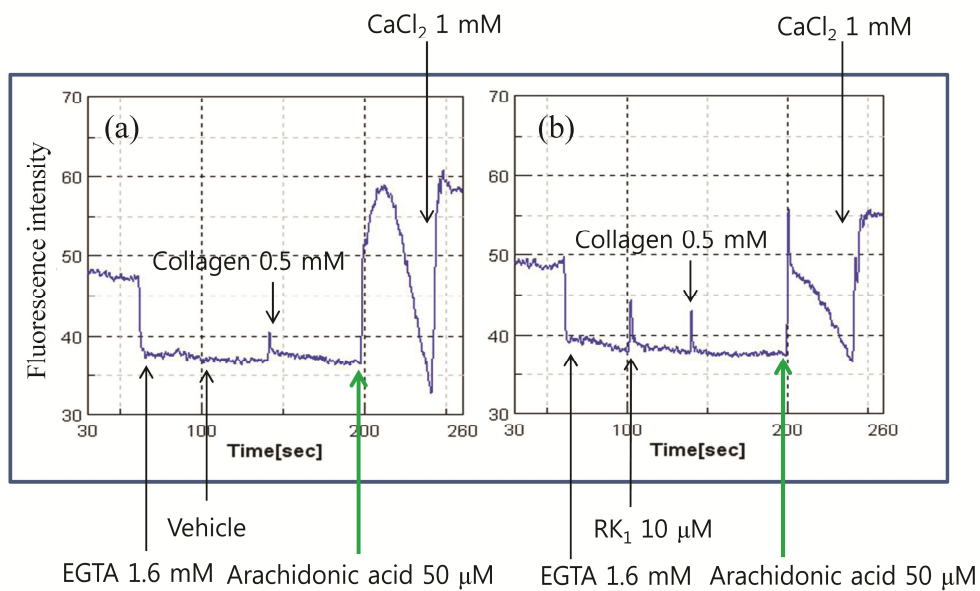


Figure 20. Effects of ginsenoside Rk₁ on arachidonic acid (AA) -induced changes in platelet cytoplasmic calcium concentration.

Fluorescence was measured in fluo-3 AM loaded washed platelets. The y- axis expressed as fluorescence intensity. Compared to (a) vehicle, the inhibition of AA-induced calcium influx and release by (b) Rk₁ could be observed. The effect of extracellular calcium was measured by addition of 1mM CaCl₂.

9. 12-Lipoxygenase(12-LOX)의 translocation

세포 내 저장소로부터 Ca^{2+} 유리 및 유입의 결과로부터 12-HETE 생성이 Ca^{2+} 유리 및 유입과 밀접한 관계를 나타냄을 확인 할 수 있었다. 이에 12-HETE를 생성하는데 중요한 역할을 하는 12-LOX와 Ca^{2+} 농도와의 관계를 연구하였다. ³⁸ 본 연구에서는, western blot analysis을 통해 혈소판 응집 및 항혈소판응집작용이 일어날 때, 12-LOX가 cytosol에서 membrane으로 translocation되는 것을 확인해보았다. (Figure 21) 실험의 결과, AA에 의해 혈소판 응집이 유도될 때, 12-LOX가 cytosol에서 membrane으로 translocation되는 것을 확인할 수 있었고, ginsenoside Rk_1 의 처리 시, translocation이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 결과적으로, ginsenoside Rk_1 의 처리 시 12-LOX이 membrane으로 translocation이 억제됨으로써, 12-HETE의 생성에 영향을 미치는 것으로 확인 할 수 있었다.

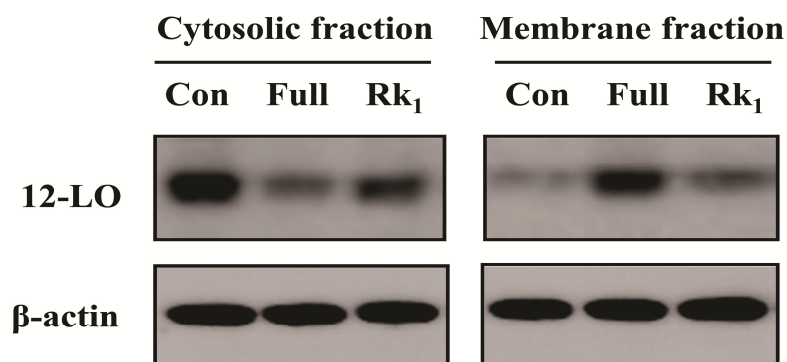


Figure 21. Effects of ginsenoside Rk_1 on 12-lipoxygenase translocation from cytosol to membrane.

IV. 결 론

본 연구는 약물 대사체학을 이용하여 arachidonic acid에 의한 혈소판 응집작용에 대한 진세노사이드 Rk_1 의 항혈소판 작용의 기전 연구를 수행하였으며, 아스피린을 대조군으로 아스피린과의 항혈소판 작용기전의 차이를 규명하고자 하였다.

UPLC/Q-TOF 분석으로부터 얻어진 데이터는 버킷팅을 통하여 패턴 분석 및 판별 분석에 이용되었으며, 약물대사체학 연구를 통해, 아스피린과 진세노사이드 Rk_1 의 처리에 의해 TXB_2 이 모두 감소하는 것을 확인 할 수 있었다. 또한, 진세노사이드 Rk_1 가 처리된 그룹에서 12(S)-HETE가 현저히 감소하는 것을 확인 할 수 있었다.

그룹간의 차이를 규명해주는 TXB_2 및 12(S)-HETE 모두 AA의 대사체로서 각각 COX 및 LOX에 의해 대사되어 생성될 수 있으며, TXB_2 는 혈소판 응집 작용에 중요한 역할을 하는 대사체로 알려져 있다. 이에, TXB_2 의 감소에 관련된 작용기전을 살펴보고자 하였으며, TXB_2 생성기전 중 COX의 활성화 기전에 초점을 맞춰, 아스피린 및 진세노사이드 Rk_1 의 COX의 활성화 억제도를 평가하였다. 이미 알려진 대로 아스피린은 COX-1에 대한 강한 억제도를 가지고 있음을 확인 할 수 있었으며, 진세노사이드 Rk_1 에 의한 COX-1에 대한 억제도 또한 확인 할 수 있었다.

또 다른 대사체인 12(S)-HETE 역시, AA대사체로서 12-LOX에 의해 대사되어 생성되며, 본 연구에서는 12(S)-HETE의 감소 작용 기전과 관련해서 calcium

농도로부터 기인된 12-LOX의 translocation에 초점을 맞추어 실험을 진행하였다.³⁸ 진세노사이드 Rk₁은 세포 내 저장소로부터 Ca²⁺ 유리 및 외부로부터의 Ca²⁺ 유입을 억제하는 효과를 나타내었으며, 진세노사이드 Rk₁에 의한 12(S)-HETE의 생성 감소는 이러한 Ca²⁺ 농도 변화에 의한 12-lipoxygenase의 translocation에 의한 12-LOX의 억제작용으로부터 기인하는 것으로 확인되었다.

이로부터 진세노사이드 Rk₁가 COX 및 LOX의 작용을 효과적으로 억제 함으로서 AA에 의해 유도된 혈소판 응집작용에 대해 항혈소판 응집작용을 나타내는 것을 확인 할 수 있었다.

이러한 결과들을 기반으로, 본 연구는 항혈소판 작용을 나타내는 후보 약물 선정 및 항혈소판 작용의 기전 연구에 대한 약물 대사체학의 접근 가능성을 제시하였다고 할 수 있다.

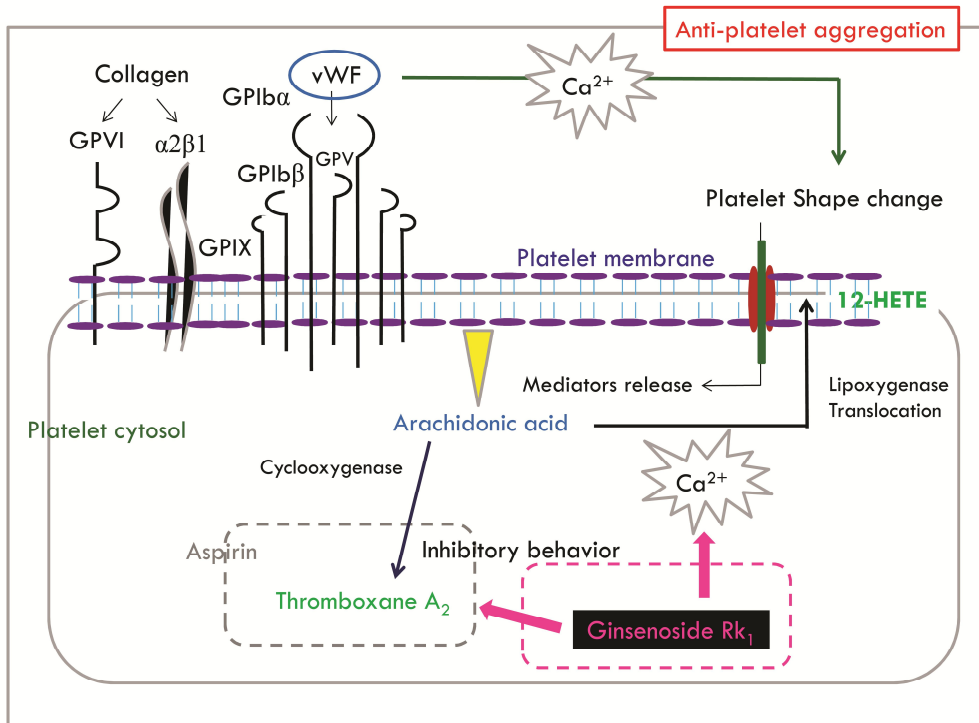


Figure 22. Biological behavior of aspirin and ginsenoside Rk₁ on anti-platelet aggregatory activity

V. 참고 문헌

1. Kell, D. B., Metabolomics and systems biology: making sense of the soup. *Curr Opin Microbiol* **2004**, 7, (3), 296-307.
2. Sabatine, M. S.; Liu, E.; Morrow, D. A.; Heller, E.; McCarroll, R.; Wiegand, R.; Berriz, G. F.; Roth, F. P.; Gerszten, R. E., Metabolomic identification of novel biomarkers of myocardial ischemia. *Circulation* **2005**, 112, (25), 3868-75.
3. Lewis, G. D.; Wei, R.; Liu, E.; Yang, E.; Shi, X.; Martinovic, M.; Farrell, L.; Asnani, A.; Cyrille, M.; Ramanathan, A.; Shaham, O.; Berriz, G.; Lowry, P. A.; Palacios, I. F.; Tasan, M.; Roth, F. P.; Min, J.; Baumgartner, C.; Keshishian, H.; Addona, T.; Mootha, V. K.; Rosenzweig, A.; Carr, S. A.; Fifer, M. A.; Sabatine, M. S.; Gerszten, R. E., Metabolite profiling of blood from individuals undergoing planned myocardial infarction reveals early markers of myocardial injury. *J Clin Invest* **2008**, 118, (10), 3503-12.
4. Sreekumar, A.; Poisson, L. M.; Rajendiran, T. M.; Khan, A. P.; Cao, Q.; Yu, J.; Laxman, B.; Mehra, R.; Lonigro, R. J.; Li, Y.; Nyati, M. K.; Ahsan, A.; Kalyana-Sundaram, S.; Han, B.; Cao, X.; Byun, J.; Omenn, G. S.; Ghosh, D.; Pennathur, S.; Alexander, D. C.; Berger, A.; Shuster, J. R.; Wei, J. T.; Varambally, S.; Beecher, C.; Chinnaiyan, A. M., Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. *Nature* **2009**, 457, (7231), 910-4.
5. Shaham, O.; Slate, N. G.; Goldberger, O.; Xu, Q.; Ramanathan, A.; Souza, A. L.; Clish, C. B.; Sims, K. B.; Mootha, V. K., A plasma signature of human mitochondrial disease revealed through metabolic profiling of spent media from cultured muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, 107, (4), 1571-5.
6. Hartwig, J.; Italiano, J., Jr., The birth of the platelet. *J Thromb Haemost* **2003**, 1, (7), 1580-6.
7. Andrews, R. K.; Berndt, M. C., Platelet physiology and thrombosis. *Thromb*

Res **2004**, 114, (5-6), 447-53.

8. Jurk, K.; Kehrel, B. E., Platelets: physiology and biochemistry. *Semin Thromb Hemost* **2005**, 31, (4), 381-92.

9. Yip, J.; Shen, Y.; Berndt, M. C.; Andrews, R. K., Primary platelet adhesion receptors. *Jubmb Life* **2005**, 57, (2), 103-8.

10. Clemetson, K. J., Platelet activation: signal transduction via membrane receptors. *Thromb Haemost* **1995**, 74, (1), 111-6.

11. Ikeda, Y.; Handa, M.; Kamata, T.; Kawano, K.; Kawai, Y.; Watanabe, K.; Kawakami, K.; Sakai, K.; Fukuyama, M.; Itagaki, I.; et al., Transmembrane calcium influx associated with von Willebrand factor binding to GP Ib in the initiation of shear-induced platelet aggregation. *Thromb Haemost* **1993**, 69, (5), 496-502.

12. Murugappan, S.; Shankar, H.; Kunapuli, S. P., Platelet receptors for adenine nucleotides and thromboxane A₂. *Semin Thromb Hemost* **2004**, 30, (4), 411-8.

13. Kroll, M. H.; Schafer, A. I., Biochemical mechanisms of platelet activation. *Blood* **1989**, 74, (4), 1181-95.

14. Barrett, N. E.; Holbrook, L.; Jones, S.; Kaiser, W. J.; Moraes, L. A.; Rana, R.; Sage, T.; Stanley, R. G.; Tucker, K. L.; Wright, B.; Gibbins, J. M., Future innovations in anti-platelet therapies. *Br J Pharmacol* **2008**, 154, (5), 918-39.

15. Ruggeri, Z. M., Platelets in atherothrombosis. *Nat Med* **2002**, 8, (11), 1227-34.

16. Gawaz, M., Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. *Cardiovasc Res* **2004**, 61, (3), 498-511.

17. Abumiya, T.; Fittridge, R.; Mazur, C.; Copeland, B. R.; Koziol, J. A.; Tschopp, J. F.; Pierschbacher, M. D.; del Zoppo, G. J., Integrin alpha(IIb)beta(3) inhibitor preserves microvascular patency in experimental acute focal cerebral ischemia. *Stroke* **2000**, 31, (6), 1402-09; discussion 1409-10.
18. Vivekananthan, D. P.; Patel, V. B.; Moliterno, D. J., Glycoprotein IIb/IIIa antagonism and fibrinolytic therapy for acute myocardial infarction. *J Interv Cardiol* **2002**, 15, (2), 131-9.
19. Park, I. H.; Kim, N. Y.; Han, S. B.; Kim, J. M.; Kwon, S. W.; Kim, H. J.; Park, M. K.; Park, J. H., Three new dammarane glycosides from heat processed ginseng. *Arch Pharm Res* **2002**, 25, (4), 428-32.
20. Kim, W. Y.; Kim, J. M.; Han, S. B.; Lee, S. K.; Kim, N. D.; Park, M. K.; Kim, C. K.; Park, J. H., Steaming of ginseng at high temperature enhances biological activity. *J Nat Prod* **2000**, 63, (12), 1702-4.
21. Park, I. H.; Piao, L. Z.; Kwon, S. W.; Lee, Y. J.; Cho, S. Y.; Park, M. K.; Park, J. H., Cytotoxic dammarane glycosides from processed ginseng. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **2002**, 50, (4), 538-40.
22. Jung, K. Y.; Kim, D. S.; Oh, S. R.; Lee, I. S.; Lee, J. J.; Park, J. D.; Kim, S. I.; Lee, H. K., Platelet activating factor antagonist activity of ginsenosides. *Biol Pharm Bull* **1998**, 21, (1), 79-80.
23. Teng, C. M.; Kuo, S. C.; Ko, F. N.; Lee, J. C.; Lee, L. G.; Chen, S. C.; Huang, T. F., Antiplatelet actions of panaxynol and ginsenosides isolated from ginseng. *Biochim Biophys Acta* **1989**, 990, (3), 315-20.
24. Yu, J. Y.; Jin, Y. R.; Lee, J. J.; Chung, J. H.; Noh, J. Y.; You, S. H.; Kim, K. N.; Im, J. H.; Lee, J. H.; Seo, J. M.; Han, H. J.; Lim, Y.; Park, E. S.; Kim, T. J.; Shin, K. S.; Wee, J. J.; Park, J. D.; Yun, Y. P., Antiplatelet and antithrombotic activities of Korean Red Ginseng. *Arch Pharm Res* **2006**, 29, (10), 898-903.

25. Lee, W. M.; Kim, S. D.; Park, M. H.; Cho, J. Y.; Park, H. J.; Seo, G. S.; Rhee, M. H., Inhibitory mechanisms of dihydroginsenoside Rg3 in platelet aggregation: critical roles of ERK2 and cAMP. *J Pharm Pharmacol* **2008**, 60, (11), 1531-6.
26. Kimura, Y.; Okuda, H.; Arichi, S., Effects of various ginseng saponins on 5-hydroxytryptamine release and aggregation in human platelets. *J Pharm Pharmacol* **1988**, 40, (12), 838-43.
27. Lee, J. G.; Lee, Y. Y.; Kim, S. Y.; Pyo, J. S.; Yun-Choi, H. S.; Park, J. H., Platelet antiaggregating activity of ginsenosides isolated from processed ginseng. *Pharmazie* **2009**, 64, (9), 602-4.
28. Lee, J. G.; Lee, Y. Y.; Wu, B.; Kim, S. Y.; Lee, Y. J.; Yun-Choi, H. S.; Park, J. H., Inhibitory activity of ginsenosides isolated from processed ginseng on platelet aggregation. *Pharmazie* **2010**, 65, (7), 520-2.
29. Kwon, S. W.; Han, S. B.; Park, I. H.; Kim, J. M.; Park, M. K.; Park, J. H., Liquid chromatographic determination of less polar ginsenosides in processed ginseng. *J Chromatogr A* **2001**, 921, (2), 335-9.
30. Croixmarie, V.; Umbdenstock, T.; Cloarec, O.; Moreau, A. I.; Pascussi, J.-M.; Boursier-Neyret, C.; Walther, B., Integrated Comparison of Drug-Related and Drug-Induced Ultra Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Metabonomic Profiles Using Human Hepatocyte Cultures. *Analytical Chemistry* **2009**, 81, (15), 6061-6069.
31. 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), 2994-8.
32. Needleman, P.; Turk, J.; Jakschik, B. A.; Morrison, A. R.; Lefkowitz, J. B., Arachidonic acid metabolism. *Annu Rev Biochem* **1986**, 55, 69-102.

33. Kulmacz, R. J.; Lands, W. E., Requirements for hydroperoxide by the cyclooxygenase and peroxidase activities of prostaglandin H synthase. *Prostaglandins* **1983**, 25, (4), 531-40.
34. Sekiya, F.; Takagi, J.; Usui, T.; Kawajiri, K.; Kobayashi, Y.; Sato, F.; Saito, Y., 12S-hydroxyeicosatetraenoic acid plays a central role in the regulation of platelet activation. *Biochem Biophys Res Commun* **1991**, 179, (1), 345-51.
35. Coffey, M. J.; Jarvis, G. E.; Gibbins, J. M.; Coles, B.; Barrett, N. E.; Wylie, O. R.; O'Donnell, V. B., Platelet 12-lipoxygenase activation via glycoprotein VI: involvement of multiple signaling pathways in agonist control of H(P)ETE synthesis. *Circ Res* **2004**, 94, (12), 1598-605.
36. Chang, W. C.; Nakao, J.; Orimo, H.; Murota, S., Effects of reduced glutathione on the 12-lipoxygenase pathways in rat platelets. *Biochem J* **1982**, 202, (3), 771-6.
37. Nyby, M. D.; Sasaki, M.; Ideguchi, Y.; Wynne, H. E.; Hori, M. T.; Berger, M. E.; Golub, M. S.; Brickman, A. S.; Tuck, M. L., Platelet lipoxygenase inhibitors attenuate thrombin- and thromboxane mimetic-induced intracellular calcium mobilization and platelet aggregation. *J Pharmacol Exp Ther* **1996**, 278, (2), 503-9.
38. Baba, A.; Sakuma, S.; Okamoto, H.; Inoue, T.; Iwata, H., Calcium induces membrane translocation of 12-lipoxygenase in rat platelets. *J Biol Chem* **1989**, 264, (27), 15790-5.

Abstract

Analysis of the metabolome in a living organism or cell lines is important for understanding of the biological system. In the past, only individual preselected substances were measured and there was no ability to handle large amounts of data. Recently, advanced biotechnology with information technology has generated the “-omics” and the dynamic behavior of metabolism can be evaluated.

Ginsenosides isolated from white- or red ginseng have various biological activities and their effects on anti-platelets aggregation have been evaluated over the years. According to our previous reports, ginsenosides isolated from processed white ginseng also exhibited anti-platelet aggregatory activity on ADP, collagen, arachidonic acid (AA) and U46619- induced aggregation. In particular, Rk₁ exhibited strong inhibitory activity in a dose-dependent manner against AA-induced aggregation and the activity was 8 to 22 fold higher than acetylsalicylic acid (ASA) which was used as positive control. ASA is a well-known inhibitor for the production of prostaglandin H₂ (PGH₂) by acetylation of cyclooxygenase; this is followed by decreased levels of thromboxane A₂ and results in anti-platelet aggregatory activity. However, the action of Rk₁ in platelets has not been studied yet. Thus, the aim of this study was to evaluate metabolome of washed-platelets induced by the ginsenoside Rk₁ to further understand Rk₁ behavior on AA-induced platelets aggregation.

A solvent extraction method was used for metabolomics study and the extracts were subjected to UPLC/Q-TOFMS. Data files were processed with peak clustering and were evaluated by partial least squares and orthogonal projections to latent structures discriminant analyses. As the multivariate results, meaningful endogenous metabolites

eicosanoids and thromboxane B₂ (TBX₂) were identified. The TBX₂ acting as the key element in platelet aggregation was decreased in both aspirin and Rk₁ groups and the decreased level of TBX₂ was demonstrated as inhibition of cyclooxygenase activity based on the COX inhibition results. Meanwhile, the 12(S)-hydroxy-5, 8, 10, 14-eicosatetraenoic acid (12(S)-HETE) decreased significantly in Rk₁- treated platelets compared to those in the AA-induced group, but an increase was observed in aspirin group. To understand the biological action of anti-platelet aggregation related to 12(S)-HETE, we focused on calcium-dependent 12-LOX translocation from cytosol to membranes and it was determined by western blot analysis. Therefore, this metabolomics study elucidates that the anti-platelet aggregation of ginsenoside Rk₁ resulted from two key metabolites, TXB₂ and 12-HETE, through their biological behaviors.

This study shows that metabolomic analysis of metabolome in platelets is a possible approach to understand anti-platelet aggregation action and we expect that this metabolomics study will provide crucial information that can be used to discover other novel drugs by measuring metabolites and it may be useful to monitor the metabolic activation or inactivation that is triggered by the drug.

Keywords: Ginsenosides Rk₁, Anti-platelet aggregation activity, Metabolomics, 12(S)-hydroxy-5, 8, 10, 14-eicosatetraenoic acid, arachidonic acid, Thromboxane B₂

Student Number: 2006-21995