



저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 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

**Adenosine 의 cAMP 신호경로 활성화를 통한
검은콩의 항혈소판 작용**

**Antiplatelet Effect of Black Soybean Mediated by
Adenosine-cAMP Signaling Pathway**

2013년 2월

서울대학교 대학원
약학과 예방약학전공
김근영

초 록

많은 임상연구들을 통해서 콩 (*Glycine max*)이 심혈관계에 유익한 영향을 준다는 사실이 알려져 있다. 다양한 콩들 중에서 검은콩은 항산화, 항염증, 항암작용 등에 있어서 다른 콩들에 비해 강한 생리활성을 보인다는 보고들이 있었다. 그러나 검은콩이 심혈관계에 미치는 영향에 대한 연구는 심도 있게 이루어지지 않았다. 본 연구에서는 검은콩 추출물이 혈전질환에 있어서 주요한 역할을 하는 혈소판 활성화에 미치는 영향에 대해 연구하였다. 검은콩 추출물은 collagen에 의한 혈소판 응집에 대해 강한 억제효과를 보인 반면, 노란콩 추출물은 억제효과를 보이지 않았다. 또한 검은콩 추출물은 혈소판과 다른 혈구 세포 및 혈관조직과의 상호작용에 관여하는 serotonin 분비, P-selectin 발현, thromboxane A₂ 생성도 억제하였다. 이러한 *in vitro* 실험 결과들은 *ex vivo* 혈소판 응집 실험과 *in vivo* 혈전 생성 시험계를 통해 검증되었다. 검은콩 추출물을 경구 투여한 경우 collagen에 의한 혈소판 응집을 억제하였으며, FeCl₃로 유도된 정맥 혈전 생성 또한 저해하였다. 반면, 검은콩 추출물은 항혈소판 작용의 대표적인 부작용인 혈액응고이상 및 출혈에는 영향을 주지 않았다. 이러한 결과는 심혈관계 질환의 예방 및 혈행 개선에 있어서 검은콩의 활용 가능성을 뒷받침한다. 검은콩 추출물의 항혈소판 작용에 대한 활성성분의 분리는 collagen에 의한 혈소판 응집 억제 효과를 토대로 bioassay-directed fractionation을 통해 이루어졌다. 단일 활성성분으로 분리된 분획은 NMR 분석과 ESI-MS 분석을 통해 adenosine으로 확인되었으며, HPLC-UV 분석과 혈소판 응집 억제 활성을 비교하여 검증하였다. 이를 토대로 검은콩 추출물의 항혈소판 작용에 대한 작용기전 및 adenosine의 역할에 대한 연구를 진행하였다. 검은콩 추출물은 cAMP 신호경로를 매개로 세

포 내 calcium 증가, GP IIb/IIIa 발현, fibrinogen 부착을 저해하였으며, 최종적으로 혈소판의 부착 및 응집을 억제하였다. 또한 adenosine에 의해 활성화되어 cAMP를 생성하는 adenylyl cyclase에 대한 길항제들을 전처리한 결과, adenosine 및 검은콩 추출물에 의한 혈소판 활성화 억제 효과들이 저해되었다. 이러한 결과들은 검은콩 추출물에 의한 항혈소판 작용에 있어서 활성화 성분인 adenosine의 cAMP 신호경로 활성화가 주요한 역할을 한다는 것을 보여주었다. 본 연구를 통하여 검은콩 추출물에 의한 항혈소판 작용의 기전을 규명하였으며, 콩에서 adenosine의 생리적 활성화효과에 대한 활성화성분으로서의 역할을 제시하였다.

주요어: 검은콩, 혈소판, 혈소판 응집, adenosine, cAMP, 혈전 생성

학 번: 2008-30995

목 차

초	록	i		
목	차	iii		
List of Figures			v		
List of Abbreviations			vii		
서	론	1		
I. 심혈관계질환과 혈소판					
	심혈관계 질환과 혈전질환	1		
	혈전 생성에서의 혈소판의 역할	2		
	심혈관계 질환에서의 항혈소판제 적용	3		
II. 콩과 검은콩					
	콩의 생리활성	6		
	검은콩의 생리활성	6		
	콩의 활성성분	7		
III. 연구 목적					
		8		
실	험	방	법	10
I. 시약 및 시료 준비					
	시약	10		
	콩의 추출 및 분리	11		
	혈액 및 혈소판 준비	11		
II. 혈소판의 활성화 측정					
	혈소판 응집 측정 및 관찰	12		

P-selectin의 발현 측정	13
Serotonin의 분비 측정	13
Thromboxane A ₂ 생성 측정	14
II. 동물 실험	14
In vivo 정맥 혈전 생성 측정 및 관찰	14
Clotting time 측정	15
Bleeding time 측정	16
III. 활성성분 분리 및 분석	16
활성성분 분리	16
활성성분 분석	17
혈중 adenosine 분석	17
Adenosine의 혈중 안정성 측정	18
IV. 작용기전 연구	18
혈소판-collagen 부착 측정	18
세포 내 Ca ²⁺ 농도 측정	19
GP IIb/IIIa 발현 측정	19
cAMP 측정	20
Fibrinogen binding 측정	20
V. 통계처리	21
실험 결과	22
I. 콩 추출물의 항혈소판 및 항혈전 작용	22
II. 검은콩 추출물의 활성성분 분리 및 분석	34
III. 검은콩 추출물의 작용 기전 연구	44
고찰	58
참고 문헌	66
Abstract	79

List of Figures

- Figure 1. Collagen-induced platelet activation mediated thrombosis**
- Figure 2. Effects of black soybean extracts on collagen-induced platelet aggregation**
- Figure 3. Effects of soybean extracts on collagen-induced platelet aggregation**
- Figure 4. Effects of BB on collagen-induced platelet aggregation**
- Figure 5. Inhibitory effects BB on collagen-induced platelet aggregation**
- Figure 6. Effects of black soybean inner layer and seed coat on collagen-induced platelet aggregation**
- Figure 7. Effects of BB on collagen-induced P-selectin expression**
- Figure 8. Effects of BB on collagen-induced serotonin secretion and thromboxane A₂ formation**
- Figure 9. Effects of BB on rat platelet aggregation**
- Figure 10. Effects of BB on FeCl₃-induced venous thrombosis**
- Figure 11. Effects of BB on coagulation and bleeding**
- Figure 12. Bioassay-directed fractionation of BB**
- Figure 13. Isolation of active ingredient of BB (I)**
- Figure 14. Isolation of active ingredient of BB (II)**
- Figure 15. Isolation of active ingredient of BB (III)**

- Figure 16. Identification of active ingredient of BB**
- Figure 17. Confirmation of active ingredient of BB**
- Figure 18. Plasma adenosine concentration in rat pharmacokinetic study**
- Figure 19. The change of plasma adenosine concentration in whole blood**
- Figure 20. Effects of BB on adhesion and aggregation in human washed platelets**
- Figure 21. Effects of BB on intracellular cAMP and calcium level**
- Figure 22. Effects of BB on collagen-induced GP IIb/IIIa expression and fibrinogen binding**
- Figure 23. Role of adenosine in inhibitory effects of BB on collagen-induced platelet aggregation**
- Figure 24. Effects of adenosine on collagen-induced platelet aggregation**
- Figure 25. Effects of adenosine on collagen-induced calcium mobilization and GP IIb/IIIa expression**
- Figure 26. Effects of adenosine on intracellular cAMP level**
- Figure 27. Role of adenosine-cAMP signaling on collagen-induced platelet activation**
- Figure 28. Elucidation of the inhibitory mechanism of BB on platelet activation**
- Figure 29. Elucidation of the inhibitory mechanism of BB on platelet adhesion and aggregation**
- Figure 30. Effects of adenosine and soy isoflavones on platelet activation**
- Figure 31. Suggested mechanism for the inhibitory effect of Black soybean on collagen-stimulated platelet activation**

List of Abbreviations

AC	: adenylyl cyclase
ACD	: acid citrate dextrose
aPTT	: activated partial thromboplastin time
BB	: black soybean
BSA	: bovine serum albumin
CSC	: 8-(3-chlorostyryl)caffeine
COX-1	: cyclooxygenase-1
DDA	: 2',5'-dideoxyadenosine
DMSO	: dimethyl sulfoxide
EDTA	: ethylene diaminetetraacetic acid
FITC	: fluorescein isothiocyanate
GP	: glycoprotein
PBS	: phosphate buffered saline
PDE	: phosphodiesterase
PE	: phycoerythrin
PGE₁	: prostaglandin E ₁
PPP	: platelet poor plasma
PRP	: platelet rich plasma
PS	: phosphatidylserine
PT	: prothrombin time
TxA₂	: thromboxane A ₂
TxB₂	: thromboxane B ₂
WP	: washed platelets
YB	: yellow soybean

서 론

I. 심혈관계 질환과 혈소판

심혈관계 질환과 혈전질환

동맥경화 (atherosclerosis), 관상동맥 및 허혈성 심질환 (coronary artery and ischemic heart disease), 고혈압 (hypertension), 뇌졸중 (stroke), 혈전증 (thrombosis) 등을 포함하는 심혈관계 질환 (cardiovascular disease)은 전세계적으로 주요한 사망원인이 되고 있다. 세계보건기구의 보고에 따르면 2008년에 1730만여 명이 심혈관계 질환으로 사망하였으며, 이는 전세계 사망인구의 30%에 해당한다 (Elmarakby, 2012). 또한 미국심장협회 (American heart association)의 보고에 의하면 미국인의 3분의 1에 해당하는 8000만여 명이 심혈관계 질환을 가지고 있으며, 매일 2200 여명 이상이 심혈관계 질환으로 사망하는 것으로 보고되었다 (Roger et al., 2011).

혈전증은 혈관 내에 혈전 (thrombus) 또는 혈병 (blood clot)이 생성되어 혈류를 방해하는 상태로 심혈관계 질환의 주요한 증상 중 하나이다 (Hooper and Evatt, 1998). 혈전증은 뇌졸중과 뇌경색(cerebral ischemia) (De Meyer et al., 2012), 심근경색 (myocardial infarction)과 협심증 (angina pectoris) (Renda and de Caterina, 2012), 폐색전 (pulmonary embolism) 등의 주요 원인이 되며, 암 (Agnelli and Verso, 2011; Garcia and Quintana, 2011), 당뇨 (Morel et al., 2010; Vazzana et al., 2012), 이상지질혈증 (Poredos and Jezovnik, 2011) 등의 질환에서 치명적인 합병증으로 나타나기도 한다. 이러한 이유로 혈전증은 많은 환자들에게 있어 주요한 위험요인으로 여겨지고 있다. 유럽을 대상으로 이루어진 혈전질환의 발병률 및 사망률에 관한 연구에 따르면 매년 100만여

건의 혈전질환이 발생하며, 50만여 명이 혈전질환으로 인해 사망하는 것으로 추산되었다 (Cohen et al., 2007). 미국의 경우에는 매년 60만여 건의 혈전질환이 발생하고 30만여 명이 혈전질환으로 인해 사망하는 것으로 추산되었다 (Amin et al., 2007).

혈전 생성에서의 혈소판의 역할

혈소판은 생체 내 주요 방어기전인 지혈 작용 (haemostasis)에 있어서 주요한 역할을 한다 (Jurk and Kehrel, 2005; Furie and Furie, 2008). 그러나 혈소판이 과도하게 활성화되는 경우 혈전 생성 (thrombosis)을 발전시켜 심혈관계 질환으로 발전할 수 있다. 따라서 다양한 항혈소판제들이 혈전질환 및 심혈관계 질환의 치료 및 예방을 위해 연구 개발 및 이용되어져 왔다 (Bhatt and Topol, 2003; Meadows and Bhatt, 2007; Michelson, 2010).

혈소판은 생리적인 agonist들인 collagen, thrombin, ADP, arachidonic acid 등과 혈류에 의한 물리적인 shear stress 의해 활성화된다 (Jackson, 2007). 다른 agonist들과 달리 collagen은 혈관 내의 extracellular matrix 상에 존재하며, soluble한 형태가 아닌 고정된 형태로 작용을 한다 (Farndale et al., 2004; Heemskerk et al., 2005). 또한 혈관손상으로 인해 노출된 collagen에 혈소판이 부착되는 과정은 혈소판을 매개로 한 혈전 생성에 있어서 주요한 초기 단계로 알려져 있다 (Auger et al., 2005; Ruggeri and Mendolicchio, 2007). 따라서 collagen에 의한 혈소판의 활성화 및 응집을 억제하는 것이 항혈소판제의 연구 개발에 있어서 주요한 target으로 여겨지고 있다 (Jackson and Schoenwaelder, 2003; Surin et al., 2008; Rivera et al., 2009).

Collagen에 의한 혈소판 활성화 과정은 다음과 같다 (Fig. 1). 혈소판은 세포막에 존재하는 collagen 수용체인 glycoprotein (GP) VI를 통하여

collagen과 결합하며, Collagen과의 결합으로 세포 내 신호 전달 체계가 활성화되어 세포 내 calcium이 증가됨으로써 혈소판의 활성화가 유발된다 (Abrams, 2005; Varga-Szabo et al., 2008; Rivera et al., 2009). 혈소판이 활성화되는 과정에서 혈소판에 세포 내에 존재하던 과립 (granule)이 유리되면서 과립 내에 함유되어 있던 serotonin, ADP 등이 분비되며, P-selectin이 발현되며, thromboxane A₂ (TxA₂)와 같은 활성 물질들이 생성된다 (Jurk and Kehrel, 2005; Rivera et al., 2009). 이들 물질들은 혈소판의 이차적인 활성화를 유도하여, 혈소판의 응집 및 혈전의 생성을 더 견고하게 하는데 큰 역할을 한다 (Offermanns, 2006; Jackson et al., 2009). 이와 더불어 혈관내피세포, 백혈구 등의 다른 혈관 조직 및 세포들과의 상호작용을 유발하여 혈전 생성을 촉진시킬 수 있다 (Pakala et al., 1997; Cirillo et al., 1999; Vandendries et al., 2004; Nemmar et al., 2007). 마지막으로 부착 단백질 GP IIb/IIIa (integrin α IIb β 3)가 발현되면서 혈소판 응집 및 다른 인접 조직과의 상호작용을 매개하게 된다 (Li et al., 2003; Calderwood, 2004; Abrams, 2005).

심혈관계 질환에서의 항혈소판제 적용

심혈관계 질환에 있어서 혈소판의 역할에 착안하여, 다양한 항혈소판제들이 심혈관계 질환의 치료에 활용되어 왔다 (Bhatt and Topol, 2003; Meadows and Bhatt, 2007; Michelson, 2010). 기존에 이용되어온 항혈소판제는 cyclooxygenase-1 (COX-1) 억제제, ADP 수용체 길항제, glycoprotein (GP) IIb/IIIa 길항제, phosphodiesterase (PDE) 억제제 크게 네 가지로 나뉘어질 수 있다 (Meadows and Bhatt, 2007; Barrett et al., 2008; Michelson, 2010)

COX-1 억제제인 aspirin은 가장 우선적으로 사용되는 항혈소판제이며 COX-1을 비가역적으로 저해하여 TxA₂의 생성을 억제함으로써 항혈소판

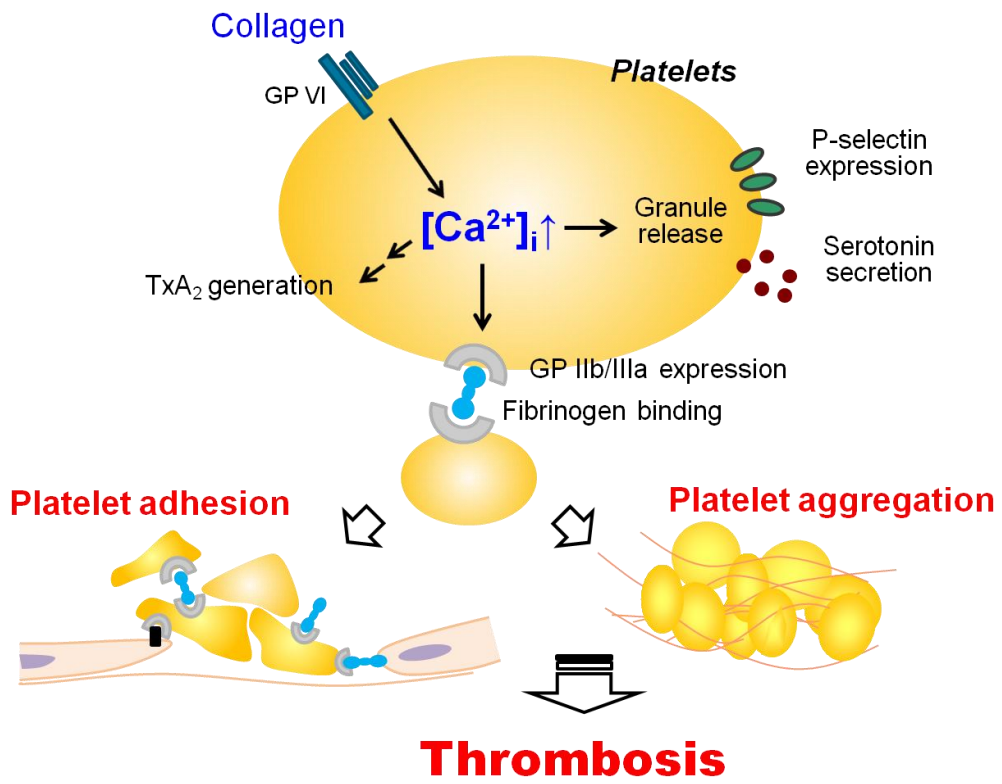


Figure 1. Collagen-induced platelet activation mediated thrombosis

작용을 갖는다 (Vane and Botting, 2003). 다양한 임상연구들을 통해 aspirin의 심혈관계 질환에 대한 치료 및 예방 효과가 입증되었으나 (Antithrombotic Trialists, 2002; Ridker et al., 2005; Berger et al., 2006), 동시에 출혈 부작용도 동반하는 것으로 알려져 있다 (Serebruany et al., 2005; McQuaid and Laine, 2006; Antithrombotic Trialists et al., 2009). ADP 수용체 길항제로는 clopidogrel, ticlopidine이 있으며, ADP 수용체인 P2Y₁₂를 비가역적으로 저해하여 항혈소판 작용을 갖는다 (Michelson, 2008). Clopidogrel은 aspirin에 비해 효과가 우수하지만 (Committee, 1996; Bhatt et al., 2000), aspirin과 유사한 정도의 출혈 부작용을 가진다 (Serebruany et al., 2004; McQuaid and Laine, 2006). GP IIb/IIIa 길항제로는 abciximab, tirofiban, eptifibatide이 있으며, 항혈소판 효과는 뛰어나지만 정맥주사제로서 그 이용에 제한이 있으며 출혈부작용도 심하다 (Serebruany et al., 2004; Meadows and Bhatt, 2007; Barrett et al., 2008). PDE 억제제에는 dipyridamole과 cilostazol이 있으며 혈소판 내 cAMP level을 상승시켜 항혈소판 작용을 갖는다 (Feijge et al., 2004; Sim et al., 2004). PDE 억제제들은 다른 항혈소판제와 달리 상대적으로 출혈 부작용이 적은 것으로 알려져 있다 (Goto, 2005; Booze and Serebruany, 2006).

기존에 사용되어온 항혈소판제들은 화학적으로 합성되거나 생물학적으로 재조합된 형태인데, 내출혈 (internal bleeding), 위장관계 출혈 (gastrointestinal bleeding), 두개 내 출혈 (intracranial bleeding) 등의 출혈 부작용을 가지고 있어 심혈관계 질환의 예방을 위해 사용하는데 있어 문제가 되어왔다 (Jackson and Schoenwaelder, 2003; Barrett et al., 2008). 이러한 이유로 심혈관계 질환의 예방을 목적으로 한 기존의 항혈소판제들의 대안으로서 보다 안전한 천연물 및 식품들에 대한 관심이 증가하고 있다 (Craig, 1999; Hu, 2003).

II. 콩과 검은콩

콩의 생리활성

콩 (*Glycine max*)은 예전부터 널리 이용되어 온 식품이다. 아시아 지역의 경우 매일 20-80 g의 콩 식품들을 섭취하며 (Omoni and Aluko, 2005), 미국에서는 7-9 g을 섭취하는데 불과하지만 (USDA, 2011) 두부, 간장 등 콩 식품에 대한 관심이 높아지는 추세이다. 콩은 단백질 (38%), 탄수화물 (15%), 섬유질 (15%), 지방 (18%) 그리고 비타민 무기질 등으로 구성된다 (Omoni and Aluko, 2005; van Ee, 2009). 특히 콩에는 isoflavone, saponin, 불포화지방산과 같은 건강에 유익한 생리활성을 가지는 성분들을 다량 함유하고 있으며 glycinin, β -sitosterol 등 다양한 식물유래 활성성분들을 함유하고 있다. 이러한 다양한 활성성분을 함유한 콩은 암 (Lee et al., 2009; Yan and Spitznagel, 2009; Yang et al., 2009), 당뇨 (Bhathena and Velasquez, 2002; Mezei et al., 2003), 비만 (Bhathena and Velasquez, 2002; Jang et al., 2008), 그리고 골다공증 (Setchell and Lydeking-Olsen, 2003) 등의 개선에 효과가 있다고 알려졌다. 또한 임상연구를 통해 고혈압 (Rivas et al., 2002; He et al., 2005)과 고지혈증 (Baum et al., 1998; Wangen et al., 2001; Jenkins et al., 2002) 등의 심혈관계 질환에 있어서 유익한 효과를 보인다고 알려져 많은 관심을 받고 있다.

검은콩의 생리활성

콩은 껍질의 색에 따라 노란콩, 녹색콩, 갈색콩, 그리고 검은콩 등으로 나뉘어질 수 있다 (Choung et al., 2001). 이러한 콩은 그 종류에 따라 검은콩은 phenolic acid, anthocyanin, 그리고 isoflavone과 같은 활성성분들의 조성이 다르게 존재한다 (Xu and Chang, 2008). 이러한 조성의 차이로 인해 검은콩은 노란콩이나 녹색콩 등 다른 콩들에 비해 활성산소 제거 (Xu and Chang, 2008), LDL 산화 억제 (Takahashi et al., 2005) 등에 있어서 상대적으로

강한 생리활성을 가진다고 알려져 있다. 게다가 검은콩은 항염증 (Kim et al., 2008), 항암 (Hung et al., 2007) 활성을 가진다고 알려져, 약물학적으로나 영양학적으로 많은 관심을 받고 있다. 그러나 검은콩의 항혈소판 및 항혈전 작용에 대하여는 아직 연구된 바 없다.

콩의 활성성분

임상 및 역학 연구들을 통해서 콩 식품들이 다양한 질환에 대해서 생리활성을 가진다고 알려지면서, 콩에 포함된 활성성분을 규명하고자 하는 노력들이 많이 이루어졌다. 이에 콩의 생리활성의 활성성분으로서 isoflavone, soy protein, soy saponin 등의 다양한 성분들이 밝혀진 바 있다 (Omoni and Aluko, 2005; Kang et al., 2010; Messina, 2010). 특히 genistein과 daidzein을 포함한 soy isoflavone들은 항암 (Adlercreutz, 2002; Jian, 2009), 항당뇨 (Lu et al., 2008; Pipe et al., 2009), 항골다공증 (Song et al., 2008; Ishimi, 2010) 효과와 심혈관계 개선 효과 (Anthony et al., 1998; Rivas et al., 2002; Marsh et al., 2011; Pase et al., 2011) 에 있어서 주요 활성성분으로 여겨져 왔다. 그러나 콩의 생리활성, 특히 항혈소판 효과들에 있어서 주요 활성성분이 isoflavone이라는 점에 대해서 의문들도 제기되어왔다 (Gooderham et al., 1996). Genistein과 daidzein의 혈중 농도가 높아지는 것이 항혈소판 작용들의 상승으로 이어지지 않았으며 (Gooderham et al., 1996), genistein과 daidzein이 항혈소판 효과를 보인 농도는 10-30 μM (Nakashima et al., 1991; Kondo et al., 2002; Guerrero et al., 2005; Guerrero et al., 2007) 수준으로 실제 콩에서의 함량과는 큰 차이를 보인다. 게다가 anthocyanin, soy saponin 등 콩에 함유된 다른 성분들도 혈소판의 활성화를 저해할 수 있다는 보고들이 있었다 (Choung et al., 2001; Garcia-Alonso et al., 2004; Shi et al., 2004; Xu and Chang, 2008). 따라서 isoflavone이 아닌 다른 성분들이 콩의 항혈소판 작용에 관여할 가능성이

높다.

III. 연구목적

심혈관계 질환은 전 세계적으로 주요한 사망원인이 되고 있으며, 특히 이 중 혈전 질환은 심혈관계 질환의 주요한 원인이 되며, 다양한 질환에 있어 합병증으로 동반되어 위험성을 높이는 요인이 된다. 혈소판은 혈액세포의 하나로 활성화되어 신체 내 주요 방어작용인 지혈작용 및 혈전 생성에 있어서 주요한 역할을 한다. 그러나 혈소판이 과도하게 활성화될 경우 혈전 질환 및 심혈관계 질환의 위험성을 높일 수 있다. 따라서 심혈관계 질환의 예방 및 치료에 있어서 다양한 항혈소판제들이 연구 및 개발되고 있다. 그러나 기존의 항혈소판제들은 대부분 내출혈, 장관출혈, 두개 내 출혈 등 출혈 부작용을 동반하는 경우가 많아 혈전 질환 및 심혈관계 질환의 예방에 있어서 문제점으로 제시되고 있다. 대표적인 항혈소판제이며 심혈관계 질환의 예방에도 널리 이용되고 있는 aspirin의 경우 다양한 임상시험에서 출혈 부작용이 증가함이 제시되고 있다. 이러한 이유로 혈전 질환 및 심혈관계 질환의 예방에 있어서 보다 안전하고 자연친화적인 장점을 지닌 식품에서 그 대안을 찾고자 하는 노력들이 많이 이루어지고 있다.

콩은 이전부터 많이 이용되어온 식품으로 isoflavone, saponin, 불포화지방산 등 유익한 성분들을 많이 함유하고 있어서 많은 주목을 받아왔다. 실제 암, 당뇨, 비만, 골다공증 등의 질환을 개선시킬 수 있다고 알려졌으며, 특히 심혈관계 질환과 관련되어 고혈압, 이상지질혈증에 효과적임이 밝혀진 바 있다. 콩은 겉껍질의 색에 따라 노란콩, 녹색콩, 검은콩 등으로 나누어질 수 있으며, 종류에 따라 phenolic acid, isoflavone, anthocyanin 등의 성분 조성이 상이하다. 이 중 검은콩은 LDL 산화 저해, 활성산소 제거와 같은

생리활성이 다른 콩에 비해 우월하다고 알려져 있으며, 항염증 및 항암 작용이 보고되어 많은 주목을 받고 있다. 그러나 검은콩의 항혈소판 및 항혈전 효과에 대한 연구는 많이 이루어지지 않았다.

이에 본 연구에서는 콩 추출물의 항혈소판 및 항혈전 작용을 검증하고 출혈 부작용의 가능성을 확인하고자 하였다. 또한 항혈소판 작용에 대한 활성성분을 분리 분석하고 그 작용기전을 규명하고자 하였다. 이를 토대로 혈전 질환 및 심혈관계 질환의 예방에 있어서 식품의 활용 가능성을 제시하고자 하였다.

실 험 방 법

I. 시약 및 시료 준비

시약

Trisodium citrate, citric acid, ethanol, ethyl acetate, butanol, methanol, dimethyl sulfoxide (DMSO), adenosine, 2',5'-dideoxyadenosine (DDA), SQ22536, NaCl, KCl, MgCl₂·6H₂O, HEPES, glucose, NaHCO₃, Na₂HPO₄, CaCl₂, KH₂PO₄, triton X-100, Tris-HCl, HCl, prostaglandin E₁ (PGE₁), glutaraldehyde, ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA), indomethacin, pentobarbital, urethane, ferric chloride, aspirin, clopidogrel 그리고 bovine serum albumin (BSA)은 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO) 에서 구입했고, collagen은 Chrono-log Co. (Havertown, PA) 에서 구입했다. SCH 58261, ZM 241385 그리고 8-(3-chlorostyryl)caffeine (CSC)는 Tocris Biosciences (Bristol, UK)에서 구입했다. phycoerythrin-labeled monoclonal antibody against human glycoprotein Ib (anti-GP Ib-PE Ab), fluorescein isocyanate labeled PAC-1 (PAC-1-FITC) 그리고 FITC-labeled anti-CD62P antibody (anti-CD62P-FITC Ab)은 BD bioscience (San Diego, CA)에서 구입했다. ¹⁴C-serotonin (55 mCi/mmol)과 ACSII scintillation cocktail은 GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)에서 구입했으며, thromboxane B₂ (TxB₂) ELISA kit와 cAMP ELISA kit는 Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI)에서 구입했다. Fluo-4/AM, calcein/AM 그리고 Alexa Fluor 488 conjugated fibrinogen은 Invitrogen (Eugene, OR)에서 구입했으며, protease inhibitor cocktail은 Calbiochem (San Diego, CA)에서 구입했다. Activated partial thromboplastin time (aPTT) reagent와 prothrombin time (PT) reagent는 Instrumentation Laboratory (Lexington, MA)에서 구입했다.

콩의 추출

검은콩과 노란콩은 보은과 괴산에서 생산되었다. 건조된 콩은 3-5시간 동안 50-60°C에서 20% ethanol로 추출되었으며, 추출은 3번 반복 후 12 시간 동안 상온에서 방치하였다. 감압 여과 및 농축 후에 추출물은 감압 하에 동결건조 하였다. 검은콩과 노란콩 추출물의 수율은 각각 7.6%, 8.7% 였으며, 추출물은 -20°C에서 보관하였다. 검은콩 추출물 (BB)은 단백 (1.0%), 지질 (1.2%), 탄수화물 (86.8%), 회분 (10.2%) 그리고 물 (0.8%)로 구성되었으며, 총 phenolic compound의 함량은 1.29%였다. 콩 추출물은 in vitro 실험들에서는 50% ethanol에 녹였으며, in vivo 실험들에서는 saline에 녹였다.

혈액 및 혈소판 준비

Platelet rich plasma (PRP)를 분리하기 위하여, 2 주일 이상 약물을 복용하지 않은 건강한 남성의 정맥으로부터 3.2% sodium citrate를 항응고제로 하여 혈액을 채취하였다. 실험 전 과정에 걸쳐서 유리 용기나 유리 pipette의 사용은 피하였으며, 혈소판 분리의 전 과정은 상온에서 수행하였다. 채혈 후 150 g에서 15 분간 원심 분리한 후 상층액 (PRP)을 얻었고 잔사를 2000 g에서 20 분간 원심 분리하여 platelet poor plasma (PPP)를 얻었다. 이와 같이 얻은 PRP의 혈소판 수는 hemacytometer를 이용하여 광학 현미경으로 세었으며, PRP를 PPP로 희석하여 1 ml당 3×10^8 개의 혈소판이 포함되도록 한 후 실험에 사용하였다.

Washed platelet (WP)를 분리하기 위하여, 2 주일 이상 약물을 복용하지 않은 건강한 남성의 정맥으로부터 acid-citrate-dextrose (ACD)를 항응고제로 하여 혈액을 채취하였다. 채혈 시 prostaglandin E₁ (PGE₁) 1 μM을 처리하여

혈소판의 활성화를 억제하였다. 채혈한 혈액을 150 g에서 15 분간 원심 분리하여 상층액에서 PRP를 얻고, 이를 500 g에서 10 분간 원심 분리하여 혈소판 pellet을 얻었다. 이를 washing buffer (134 mM NaCl, 2.9 mM KCl, 1.0 mM MgCl₂·6H₂O, 10.0 mM HEPES, 5.0 mM glucose, 12.0 mM NaHCO₃, 0.34 mM Na₂HPO₄, 10% ACD, 0.3% BSA, 1 μM PGE₁, pH 7.4)로 현탁하여 세척한 후, 다시 400 g에서 10 분간 원심분리하였다. 여기서 얻어진 혈소판 pellet을 suspension buffer (134 mM NaCl, 2.9 mM KCl, 1.0 mM MgCl₂·6H₂O, 10.0 mM HEPES, 5.0 mM glucose, 12.0 mM NaHCO₃, 0.34 mM Na₂HPO₄, 0.3% BSA, pH 7.4)로 현탁하였다. WP 중의 혈소판 수는 hemacytometer를 이용하여 광학 현미경으로 세었으며, Suspension buffer로 희석하여 1 ml당 3 x 10⁸ 개의 혈소판이 포함되도록 한 후 실험에 사용하였다. WP의 경우 CaCl₂를 최종 농도가 2 mM이 되도록 가한 후 실험에 사용하였다.

Rat PRP를 분리하기 위하여 체중이 250 ~ 300 g이 되는 Sprague-Dawley 수컷 흰쥐를 ether로 흡입 마취시킨 후 3.2% sodium citrate를 항응고제로 하여 복대동맥 채혈하였다. 채혈 후 PRP의 준비는 Human PRP와 동일하다.

II. 혈소판의 응집 및 활성화 측정

혈소판 응집 측정 및 관찰

혈소판의 응집 정도를 lumi-aggregometer (Chrono-Log Co., USA)를 이용하여 turbidity 변화로써 측정하였다. PRP 또는 WP의 light transmission을 0 %, PPP또는 suspension buffer의 light transmission을 100 %로 맞춘 후, 37 °C에서 혈소판의 응집 정도에 따른 light transmission을 측정하였다. 측정 시 silicon으로 코팅된 aggregometer cuvette을 사용했으며, 반응이 일어나는 동안

1,000 rpm에서 지속적으로 교반하였다. PRP 또는 WP에 vehicle 또는 시험물질을 가하고 thermomixer를 이용하여 37°C에서 10 분간 배양하였다. 배양한 PRP 또는 WP를 aggregometer cuvette에 넣고 1 분간 가온하여 37°C가 되게 한 다음 혈소판 응집 유발 시료인 collagen을 최대응집을 일으키는 최소농도를 가하였다 (human 1-4 µg/ml, rat 8-10 µg/ml) . 이후 6 분간 혈소판 응집 반응을 관찰하였다. 반응이 끝난 PRP는 0.5% glutaraldehyde로 고정시킨 후 slide glass에 loading하여 현미경 상에서 관찰하였다.

P-selectin의 발현 측정

반응이 끝난 시료의 일부를 취하여 suspension buffer로 희석시킨 후 anti-GP Ib-PE와 anti-CD62P-FITC를 미리 넣어 놓은 시험관에 가하고 차광 조건에서 20 분간 반응시켰다. 여기에 Ca²⁺ 2 mM이 포함된 suspension buffer를 500 µl 가함으로써 반응을 종결시켰다. 준비된 분석용 시료를 BD FACSCalibur flow cytometer에서 분석하였다. 분석 프로그램은 CellQuest Pro software를 이용하였다. P-selectin의 발현 정도는 collagen을 가하지 않은 basal의 형광량을 기준으로 하여, 95% 이상의 형광신호가 보이는 구간을 설정하여 분석하였다.

Serotonin의 분비 측정

혈소판으로부터 serotonin의 분비는 radioactive method를 이용하였다. 혈액으로부터 분리한 PRP에 ¹⁴C-serotonin (55.0 mCi/mmol)을 0.1 µCi/ml가 되도록 가한 후 water bath에서 37°C에서 45 분 동안 배양하였다.

시험물질과 collagen의 처리는 위와 동일하게 하였다. 50 mM EDTA 30 µl에 반응이 종료된 PRP 300 µl를 취하여 가한 다음, 12,000 g에서 2 분간 원심

분리하였다. ASC-II 10 ml가 담긴 25 ml LSC vial에 상층액 50 µl를 가하였다. 분비된 ¹⁴C-serotonin의 양은 liquid scintillation counter (Wallac 1409, Perkin Elmer, USA)를 이용하여 측정하였으며, release 정도는 다음과 같이 표현했다.

$$\text{Serotonin release (\%)} = \frac{\text{counts of sample} - \text{blank}}{\text{Total counts} - \text{blank}} \times 100$$

Total: 0.3 % Triton X-100으로 혈소판의 lysis를 유발시킨 sample

Blank: Chemical을 처리하지 않은 sample의 count

Thromboxane A₂ 생성 측정

시험물질과 collagen의 처리는 혈소판 응집 측정에서와 동일하게 하였다. 반응이 종료된 PRP에 EDTA와 indomethacin이 각각 2 mM, 50 µM이 되도록 가한 후 12,000 g에서 2 분간 원심 분리하였다. 상층액을 취하여 thromboxane A₂ (TxA₂)의 생성 정도를 측정하였으며, TxA₂의 안정적인 대사체인 TxB₂를 ELISA kit를 이용하여 측정하였다.

III. 동물 실험

In vivo 정맥 혈전 생성 측정 및 관찰

250-300 g의 Sprague-Dawley 수컷 흰쥐를 샘타코 (Korea)로부터 공급받아, 서울대학교 약학대학 동물실험 연구동에서 일주일가량 적응시킨 뒤 실험에 이용하였다. 사육실은 온도 22 ± 2 °C, 습도 55 ± 5 %의 온도 환경을 유지하였으며, 오전 7시 30분과 오후 7시 30분을 기준으로 하여 밤낮을 조절하였다. 사료 (애그니브랜드, 퓨리나코리아)와 물은 제한 없이

공급하였다.

검은콩 추출물을 한 번 또는 14일 간 경구 투여한 후 *in vivo* 정맥 혈전 생성 실험을 진행하였다. 검은콩 추출물을 투여하고 1 시간 후, 흰쥐를 pentobarbital (50 mg/kg)을 복강 주사하여 마취시키고 복강을 개방하였다. 하대정맥과 복대동맥에 15 mm 간격으로 두고 견사를 위치시키고 주변의 신정맥과 신동맥은 견사로 묶었다. 5% FeCl₃를 적신 filter paper (3 mm x 10 mm)를 하대정맥에 5분간 적용시킨 후 제거하였다. FeCl₃를 적용하고 30분 후 하대정맥과 복대동맥을 견사로 묶은 후 떼어내었다. 하대정맥으로부터 생성된 혈전을 분리한 후 무게를 측정하였다.

분리한 혈전을 mold에 올리고 OCT compound를 (Tissue-Tek Products, Sakura Finetek USA Inc., Torrance, CA)를 채운 후 -70 °C에서 얼렸다. 동결된 혈전은 Cryostat (CM1850, Leica, Wetzlar, Germany)를 이용하여 10 µm의 두께의 절편으로 만들어졌으며, 30분간 상온에서 건조한 후 hematoxylin and eosin staining을 진행하였다.

Clotting time 측정

검은콩 추출물을 경구 투여하고 1 시간 후, 3.8% sodium citrate를 항응고제로 하여 복대동맥 채혈하였다. 혈장은 혈액을 상온에서 2000 g에서 15 분간 원심분리하여 얻었다. 혈장 응고시간은 BBL[®] Fibrometer (Becton Dickinson, Cockeysville, MD)를 이용하여 aPTT, PT를 측정하였다. aPTT 측정을 위하여 혈장과 aPTT 시약을 fibrometer cup에 가한 후 3 분간 37°C에서 배양하였다. 배양 후 CaCl₂를 가하고, 즉시 혈액 응고 시간을 측정하였다. PT의 측정을 위해서 가온된 혈장에 PT 시약을 가하고 즉시 혈액응고 시간을 측정하였다.

Bleeding time 측정

20-25 g의 C57BL/6 mice를 사용하였다. 검은콩 추출물 또는 aspirin, clopidogrel을 경구 투여하고 1 시간 후, pentobarbital을 복강 주사하여 마취 시켰다. 마우스의 꼬리 끝 2 mm 부분을 자르고 매 10초마다 조심스럽게 닦아주었다. 출혈시간은 더 이상 혈액이 묻어 나오지 않을 때까지 시간으로 측정하였으며, 출혈이 15 분 이상 지속될 경우 출혈시간은 15분으로 기록하였다.

IV. 활성성분 분리 및 분석

활성성분 분리

검은콩 추출물은 물에 녹여 ethyl acetate와 butanol로 분배 추출하였다. Ethyl acetate 분획(수율: 1.2%)을 sep-pak cartridges (10 g, Waters, Milford, MA)을 이용하여 고체상 추출 (solid phase extraction)하였으며, aqueous methanol step gradient (50-100%)으로 용리하여 7개의 분획 (A-1~A-7)을 얻었다. A-1 (수율: 28%)과 A-2 (수율: 14.5%) 분획을 합한 후 Sephadex LH 20 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) column chromatography (30 mm i.d. x 800 mm)에 적용하였으며, 70% methanol로 용리하여 10개의 분획 (B-1~B-10)을 얻었다. B-1 (수율: 18%) 분획은 preparative HPLC (eluent: 10% methanol, 0.05% trifluoroacetic acid; column: ODS (20 x 150 mm); flow rate: 6 ml/min; detection: UV 260 nm)를 이용하여 7개의 분획 (C-1~C-7)으로 나뉘었다. 최종 활성 분획인 C-3는 B-1 분획으로부터 6.6%의 수율로 얻어졌다. 분획들은 50% ethanol 또는 DMSO에 녹여졌으며, -20°C에서 보관하였다.

활성성분 분석

활성성분은 NMR spectroscopy, Mass spectroscopy를 통해 분석하였다. ¹H NMR과 ¹³C NMR 측정은 JNM-ECA600 600 MHz FT-NMR spectrometer (JEOL, Tokyo, Japan)을 이용하여 tetramethylsilane을 포함한 D₂O를 internal standard로 하여 이루어졌다. ¹H-¹H COSY, HMQC 그리고 HMBC NMR 분석이 동일한 spectrometer 상에서 이루어졌다. ESI-MS spectrum은 Q-TRAP-3200 mass spectrometer (AppliedBiosystems, Foster City, CA)를 이용하여 얻어졌다. MS 조건은 다음과 같았다. ESI, positive mode with capillary voltage (kV): 3.2, cone voltage(kV): 30, source temp: 120°C, desolvation temp: 350°C, desolvation gas (L/h): 850 and collision energy: 17. HPLC system (Hitachi, Tokyo, Japan)은 autosampler, pump and photodiode array detector로 구성되었으며, Mightysil C18 (4.6 X 250 mm, 5 μm) column을 이용하여 methanol: water (90:10)을 용매로 1 ml/min의 속도로 용리하였다. Adenosine은 260 nm에서 검출하였다.

혈중 adenosine 농도 측정

200-250 g의 Sprague-Dawley 수컷 흰쥐를 오리엔트바이오 (Korea)로부터 공급받았으며, 실험에 이용하기 하루 전 절식하였으며 물은 제한 없이 공급하였다. 검은콩 추출물 또는 adenosine을 경구 투여한 후 일정 시간마다 heparin으로 코팅된 모세관을 이용하여 안와정맥총채혈을 수행하여 혈액을 얻어 즉시 4°C에서 2,000 g, 15 분간 원심분리하여 혈장을 얻었으며 분석하기 전까지 -20°C에서 보관하였다. 혈장에 존재하는 adenosine의 분석은 LC/MS/MS 방법으로 이루어졌으며 2-chloroadenosine을 내부표준물질로 하였다.

Adenosine의 혈중 안정성 측정

수컷 흰쥐 또는 사람으로부터 heparin을 항응고제로 채혈하여 얻은 전혈에 adenosine과 검은콩 추출물을 처리하여 5 분간 반응시켰다. 2-chloroadenosine은 내부표준물질로 가하였다. 반응이 끝난 후, 즉시 4°C에서 2,000 g 15 분간 원심분리하여 혈장을 얻었다. 100 μ l의 혈장에 200 μ l의 acetonitrile을 가하고, 4°C에서 14,000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 분석용 시료는 0.45- μ m syringe filter로 여과시켰으며, LC/MS/MS 방법으로 adenosine을 분석하였다.

IV. 작용 기전 연구

혈소판-collagen 부착 측정

혈소판의 부착능을 측정하고자 96 well black plate에 40 μ g/ml collagen을 각 well 마다 50 μ l씩 가하고 상온에서 1 시간 동안 coating하였다. Collagen을 제거하고 5% BSA를 포함한 phosphate-buffered saline (PBS; 1 mM KH_2PO_4 , 154 mM NaCl, 3 mM Na_2HPO_4 , pH 7.4)을 50 μ l씩 가하고 상온에서 1 시간 동안 blocking한 후 PBS로 세 번 washing해주었다.

혈액으로부터 분리된 WP에 calcein/AM을 2.5 μ M이 되도록 가한 후 37°C에서 15 분간 차광하여 배양하였다. 배양이 끝난 후 WP를 다시 300 g에서 10 분간 원심 분리한 후, 얻어진 혈소판 pellet에 suspension buffer를 가해 현탁하여 1 ml당 3×10^8 개의 혈소판이 포함되도록 희석하고 CaCl_2 를 최종 농도가 2 mM이 되도록 가한 후 실험에 사용하였다.

Calcein/AM이 loading된 혈소판에 시험물질에 10 분간 처리한 후, WP 50 μ l를 collagen-coated well에 가하고 30 분간 상온에서 방치하였다. 부착되지 않은 혈소판은 PBS로 세척하여 제거한 후, 부착된 혈소판을 lysis buffer (1 % triton X-100, 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, and protease inhibitor cocktail)를 가하여 4°C에서 10 분간 lysis 시켰다. 혈소판 부착 정도는 microplate reader (λ_{ex} = 492 nm, λ_{em} = 535 nm, TECAN Spectrafluor, Grödig, Austria)를 이용하여 형광량을 측정하였다.

세포 내 Ca^{2+} 농도 측정

Fluo-4/AM을 세포 내로 loading 시키기 위해 다음과 같이 조작하였다. 혈액으로부터 분리된 WP에 Fluo-4/AM과 PGE_1 을 최종 농도가 각각 5 μ M, 1 μ M이 되도록 WP에 가한 후 37°C에서 45 분간 차광하여 배양하였다. 배양이 끝난 후 WP를 다시 300 g에서 10 분간 원심 분리한 후, 얻어진 혈소판 pellet에 suspension buffer를 가해 현탁하여 1 ml당 1×10^7 개의 혈소판이 포함되도록 한 후 실험에 사용하였다. WP에 $CaCl_2$ 를 최종 농도가 2 mM이 되도록 가한 후 실험에 사용하였다.

시험물질과 collagen의 처리는 혈소판 응집 측정에서와 동일하게 하였다. 시료의 일부를 취하여 anti-GP IIb-PE를 미리 넣어 놓은 시험관에 가하고 차광 조건에서 20 분간 반응시켰다. 여기에 Ca^{2+} 2 mM이 포함된 suspension buffer 500 μ l를 가함으로써 반응을 종결시켰다. 준비된 분석용 시료를 BD FACSCalibur에서 분석하였다. 세포 내 Ca^{2+} 농도는 평균 형광량을 측정하였다.

GP IIb/IIIa의 발현 측정

시험물질과 collagen의 처리는 혈소판 응집 측정에서와 동일하게 하였다. 단, WP 1 ml당 1×10^7 개의 혈소판이 포함되도록 한 후 실험에 사용하였다. anti-GP IIb/IIIa-PE와 PAC-1-FITC를 미리 넣어 놓은 시험관에 가하고 차광 조건에서 20 분간 반응시켰다. 여기에 이 포함된 suspension buffer 1 ml를 가함으로써 반응을 종결시켰다. 준비된 분석용 시료를 BD FACSCalibur에서 분석하였다. GP IIb/IIIa의 발현 정도는 collagen을 가하지 않은 basal의 형광량을 기준으로 하여, 99% 이상의 형광신호가 보이는 구간을 설정하여 분석하였다.

cAMP 측정

시험물질과 collagen의 처리는 혈소판 응집 측정에서와 동일하게 하였다. 반응이 종료된 WP에 HCl을 0.1 M이 되도록 가한 후 60 초간 ultrasonic processor (Sonics and Materials Inc., Newtown, CT)를 이용하여 lysis시켰다. cAMP 농도는 ELISA kit를 이용하여 측정하였다.

Fibrinogen binding 측정

시험물질과 collagen의 처리는 혈소판 응집 측정에서와 동일하게 하였다. 단, WP 1 ml당 1×10^7 개의 혈소판이 포함되도록 한 후 실험에 사용하였다. 시료의 일부를 취하여 anti-GP IIb/IIIa-PE와 Alexa Fluor 488-fibrinogen을 미리 넣어 놓은 시험관에 가하고 차광 조건에서 20 분간 반응시켰다. 여기에 이 포함된 suspension buffer 500 μ l를 가함으로써 반응을 종결시켰다. 준비된 분석용 시료를 BD FACSCalibur에서 분석하였다. Fibrinogen binding의 정도는 평균 형광량을 측정하였다.

V. 통계 처리

3회 이상 실험한 후, 값을 means \pm SEM으로 표시하였다. 각 군 간의 차이는 student's t-test 또는 one-way ANOVA test를 실시한 후, Duncan's multiple range test를 실시하여 유의성 정도를 판정하였다. 유의적인 차이는 p value가 0.05 이하인 경우에 인정하였다.

실험 결과

I. 콩 추출물의 항혈소판 및 항혈전 작용

콩 추출물의 혈소판 응집에 대한 효과를 확인하고자 콩 추출물 100 $\mu\text{g/ml}$ 를 platelet rich plasma (PRP)에 10분간 처리 후 collagen (2-4 $\mu\text{g/ml}$)를 가해 혈소판 응집 정도를 측정하였다. 그 결과 20% ethanol로 추출한 검은콩 추출물이 가장 강한 억제효과를 보였으며, 이후 실험은 20% ethanol로 추출한 콩 추출물을 대상으로 진행하였다 (Fig. 2). 검은콩과 노란콩 추출물의 혈소판 응집에 대한 효과를 비교한 결과, 검은콩 추출물은 혈소판 응집에 대해서 강한 억제효과를 보인데 비해 노란콩 추출물은 억제효과를 보이지 않았다 (Fig. 3). 검은콩 추출물은 농도의존적으로 collagen에 의한 혈소판 응집을 억제하였으며 (Fig. 4), 현미경상으로도 검은콩 추출물에 의한 aggregate의 생성 억제를 확인할 수 있었다 (Fig. 5). 검은콩 속과 겉껍질의 혈소판 응집에 대한 효과를 비교한 결과, 검은콩 속은 collagen에 의한 혈소판 응집을 억제하는데 비해 겉껍질은 억제효과를 보이지 않았다 (Fig. 6). 혈소판 활성화 과정 중, P-selectin 발현, serotonin 유리, thromboxane A₂ (TxA₂) 생성 등이 일어나며, 이는 혈소판의 2차 응집을 비롯해 혈관조직 또는 염증세포들과 상호작용을 일으켜 혈전 생성을 촉진시킬 수 있다 (Jurk and Kehrel, 2005; Rivera et al., 2009). 검은콩 추출물이 혈소판 응집과 더불어 혈소판 활성화에 미치는 영향을 확인하고자 P-selectin의 발현 정도를 anti-CD62P-FITC Ab를 이용하여 flow cytometer상에서 측정하였다. 그 결과, collagen에 의해 P-selectin의 발현 증가가 검은콩 추출물에 의해 농도의존적으로 저해되었다 (Fig. 7). Serotonin의 유리 정도는 ¹⁴C-serotonin을

loading한 혈소판을 이용하여 측정한 결과 collagen에 의한 serotonin의 유리를 검은콩 추출물이 농도의존적으로 억제하였다 (Fig. 8A). TxA₂의 생성 정도는 안정적인 대사체인 thromboxane B₂의 양을 ELISA kit를 이용하여 측정하였으며, collagen에 의한 TxA₂의 생성이 검은콩 추출물에 의해 농도의존적으로 억제됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 8B).

사람 혈액으로 진행된 *in vitro* 실험들의 결과들을 *in vivo* 시험계에서 검증하기 전 검은콩 추출물의 혈소판 응집 억제작용이 rat의 혈소판에 대해서도 보이는지 확인하였다. 그 결과 검은콩 추출물은 사람 혈소판에서와 유사한 경향으로 rat 혈소판 응집을 억제하였다 (Fig. 9A). 검은콩 추출물의 항혈소판 작용을 검증하고자 검은콩 추출물 50, 100 mg/kg을 경구 투여하고 한 시간 후 *ex vivo* 혈소판 응집 실험을 진행한 결과, 검은콩 추출물을 투여한 군에서 collagen에 의한 혈소판 응집이 억제됨을 확인하였다 (Fig. 9B). 이러한 검은콩의 항혈소판 작용들이 혈전 생성에 미치는 영향을 확인하고자 검은콩 추출물 50, 100 mg/kg을 경구 투여하고 한 시간 후, FeCl₃로 유도된 정맥 혈전 실험을 진행하였다. 검은콩 추출물을 투여한 경우 정맥 혈전 생성이 저해됨을 확인할 수 있었으며 (Fig. 10A and 10B), 특히 추출물을 14일간 반복 투여한 경우 보다 낮은 농도 (50 mg/kg)에서도 유의적인 차이를 보였다.

혈액응고기능 저해 및 출혈은 항혈소판 작용에 따른 일반적인 부작용이다 (Serebruany et al., 2004). 검은콩 추출물이 혈액 응고기능에 미치는 영향을 평가하고자 activated partial thromboplastin time (aPTT)과 prothrombin time (PT)을 측정하였다. 검은콩추출물의 투여는 aPTT와 PT에 영향을 주지 않았다. (Fig. 11A). 또한 aspirin과 clopidogrel을 투여한 군에서는 bleeding time이 증가하는데 비해 검은콩추출물은 bleeding time에 영향을 주지 않았다 (Fig. 11B). 이러한 결과는 검은콩추출물이 출혈 부작용 없이 항혈소판 및 항혈전 작용을 보일 수 있음을 말한다.

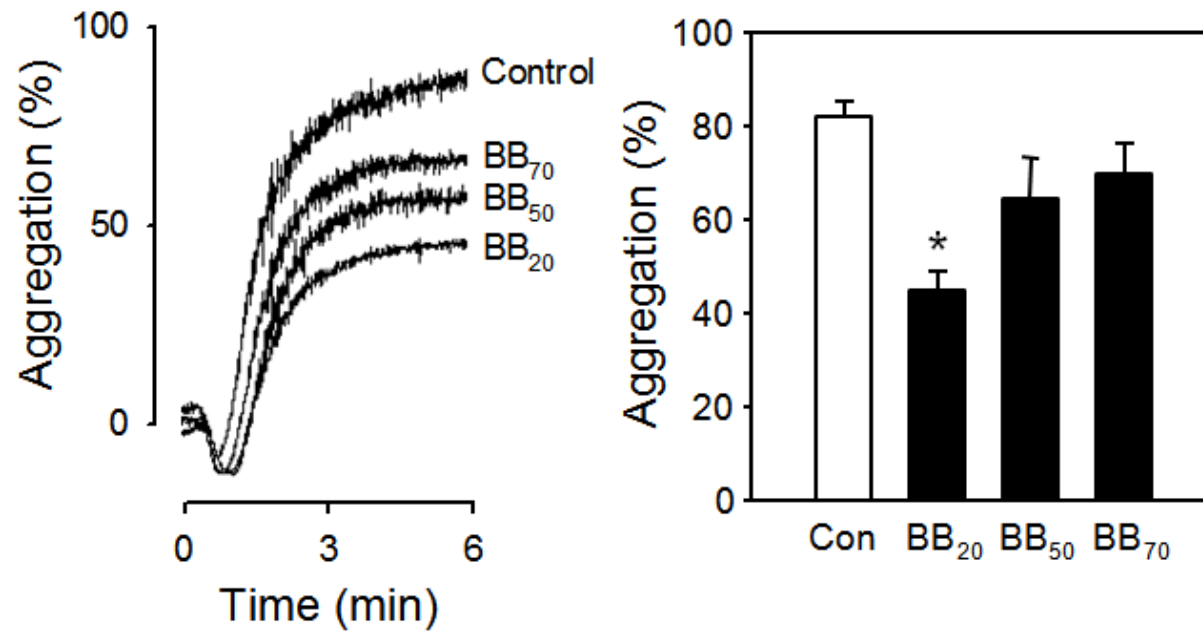


Figure 2. Effects of black soybean extracts on collagen-induced platelet aggregation

Black soybean (BB, 100 $\mu\text{g/ml}$) extracted with various concentrations of ethanol (20%, 50%, 70%) were treated for 10 min, an human platelets were stimulated with collagen (2-4 $\mu\text{g/ml}$) for 6 min. Values are means \pm SEM of 4-6 independent experiments. * represents significant differences from corresponding control ($p<0.05$).

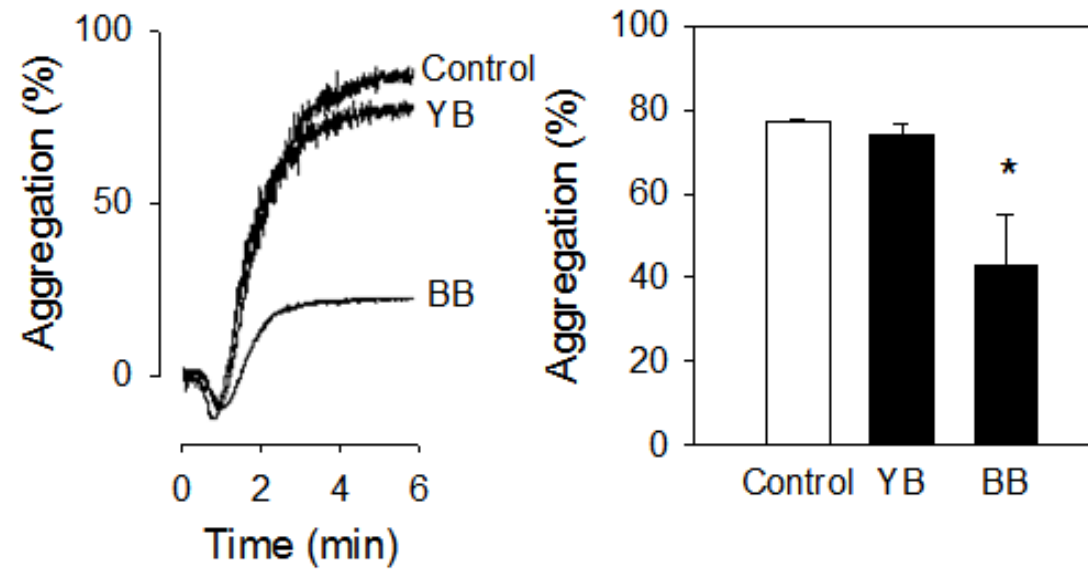


Figure 3. Effects of soybean extracts on collagen-induced platelet aggregation

100 $\mu\text{g/ml}$ of yellow soybean extract (YB) or black soybean extract (BB) were treated for 10 min and human platelets were stimulated with collagen (2-4 $\mu\text{g/ml}$) for 6 min. Values are means \pm SEM of 3 independent experiments. Representative tracing data of more than 3 independent experiments are shown. * represents significant differences from corresponding control ($p < 0.05$).

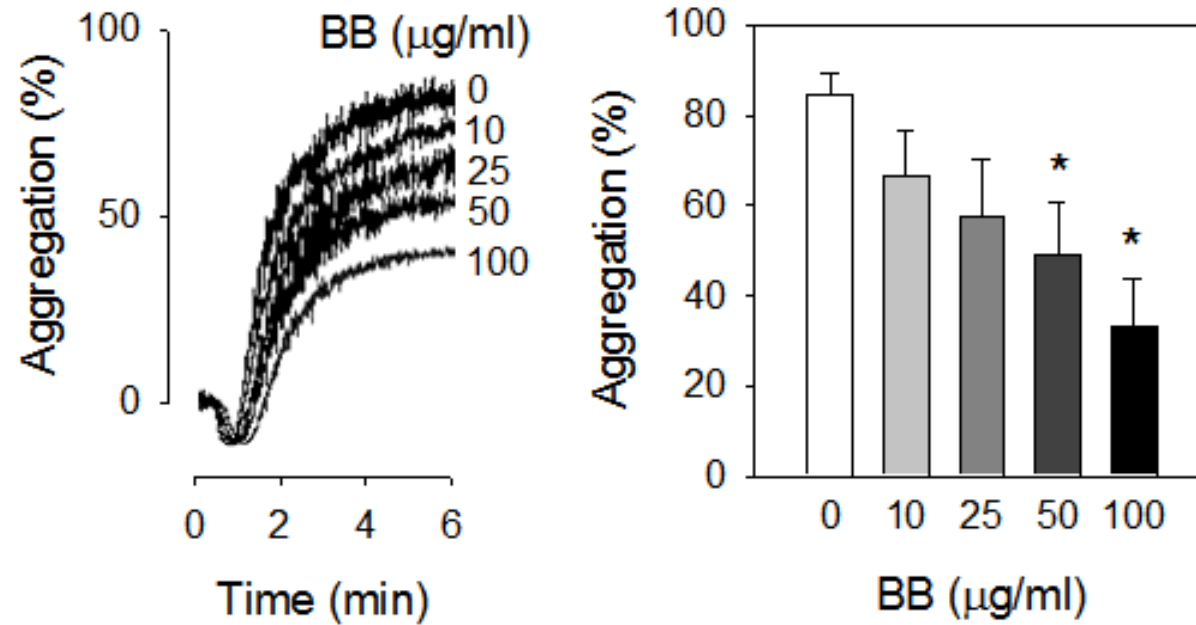
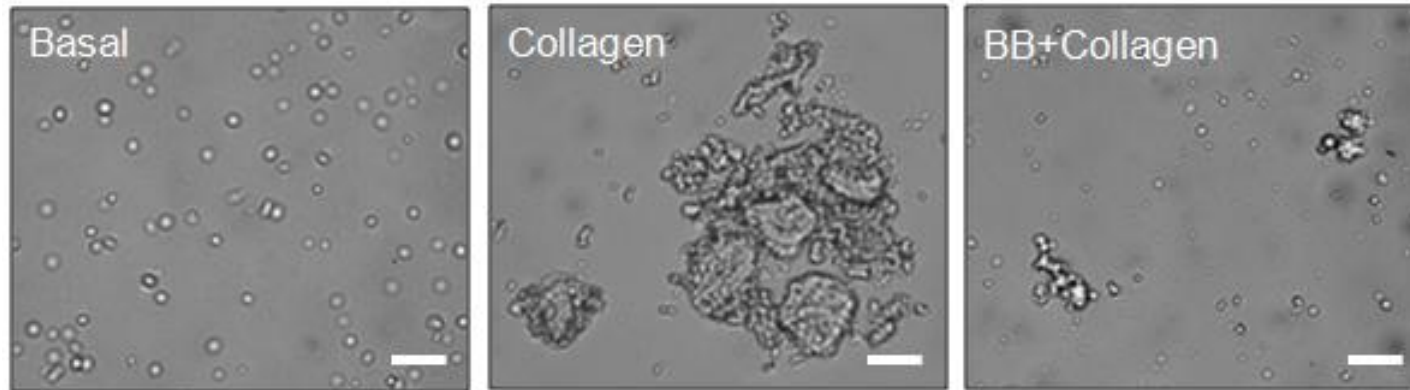


Figure 4. Effects of BB on collagen-induced platelet aggregation

Various concentration of BB was treated for 10 min and human platelets were stimulated with collagen (2-4 µg/ml) for 6 min. Values are means \pm SEM of 3 independent experiments. Representative tracing of more than 3 independent experiments are shown. * represents significant differences from corresponding control ($p < 0.05$).



27

Figure 5. Inhibitory effects BB on collagen-induced platelet aggregation

Non-treated platelets or platelets treated with vehicle or 100 $\mu\text{g/ml}$ of BB and collagen were fixed with 0.5% glutaraldehyde and observed. Representative image of more than 3 independent experiments are shown. Original magnification: $\times 40$. Scale bar = 10 μm .

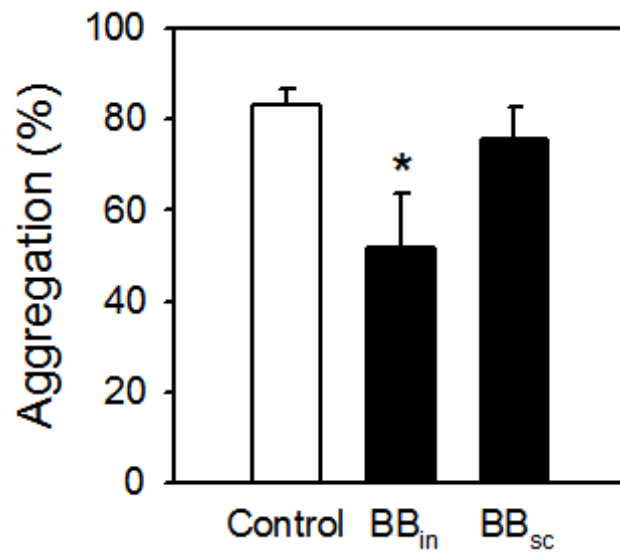


Figure 6. Effects of black soybean inner layer and seed coat on collagen-induced platelet aggregation

Extracts of BB(100 $\mu\text{g/ml}$) inner layer (BB_{in}) and seed coat (BB_{sc}) were treated for 10 min, an human platelets were stimulated with collagen (2-4 $\mu\text{g/ml}$) for 6 min. Values are means \pm SEM of 4 independent experiments. * represents significant differences from corresponding control ($p < 0.05$).

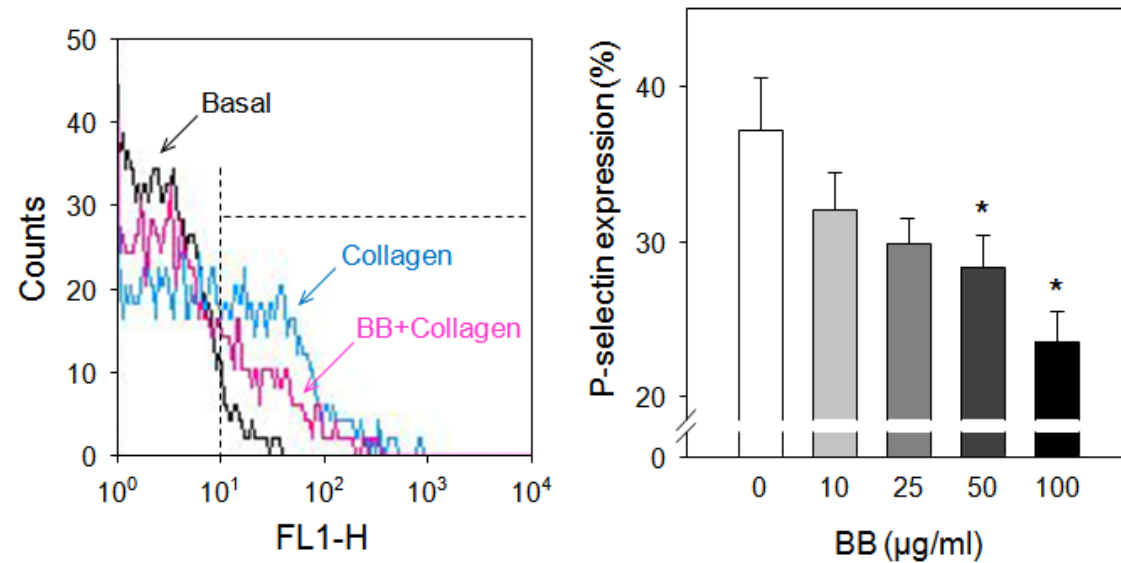


Figure 7. Effects of BB on collagen-induced P-selectin expression

Various concentration of BB was treated for 10 min and human platelets were stimulated with collagen (2-4 μg/ml) for 6 min. P-selectin exposure was measured using flow cytometric analysis. Representative histogram of non-treated platelets and platelet treated with vehicle or BB (100 μg/ml) and collagen is shown. Values are means ±SEM of 3 independent experiments. Representative histograms of 3 independent experiments are shown. * represents significant differences from corresponding control ($p < 0.05$).

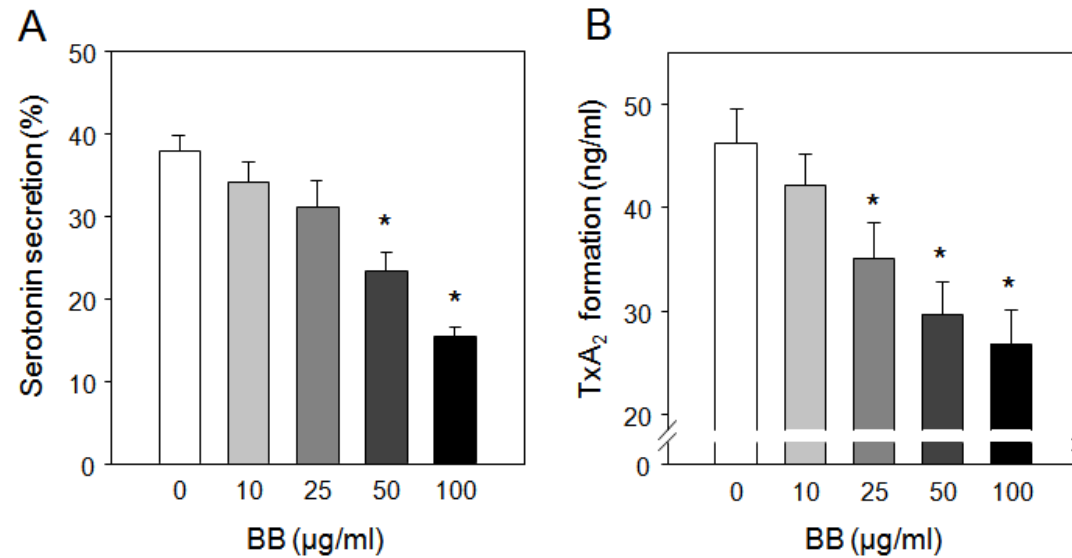


Figure 8. Effects of BB on collagen-induced serotonin secretion and thromboxane A₂ formation

Various concentration of BB was treated for 10 min and human platelets were stimulated with collagen (2-4 µg/ml) for 6 min. (A) Serotonin secretion was determined using ¹⁴C-serotonin loaded PRP and (B) thromboxane A₂ (TxA₂) formation was measured using commercial thromboxane B₂ ELISA kit. Values are means ± SEM of 3 independent experiments. Representative histograms of 3 independent experiments are shown. * represents significant differences from corresponding control (p < 0.05).

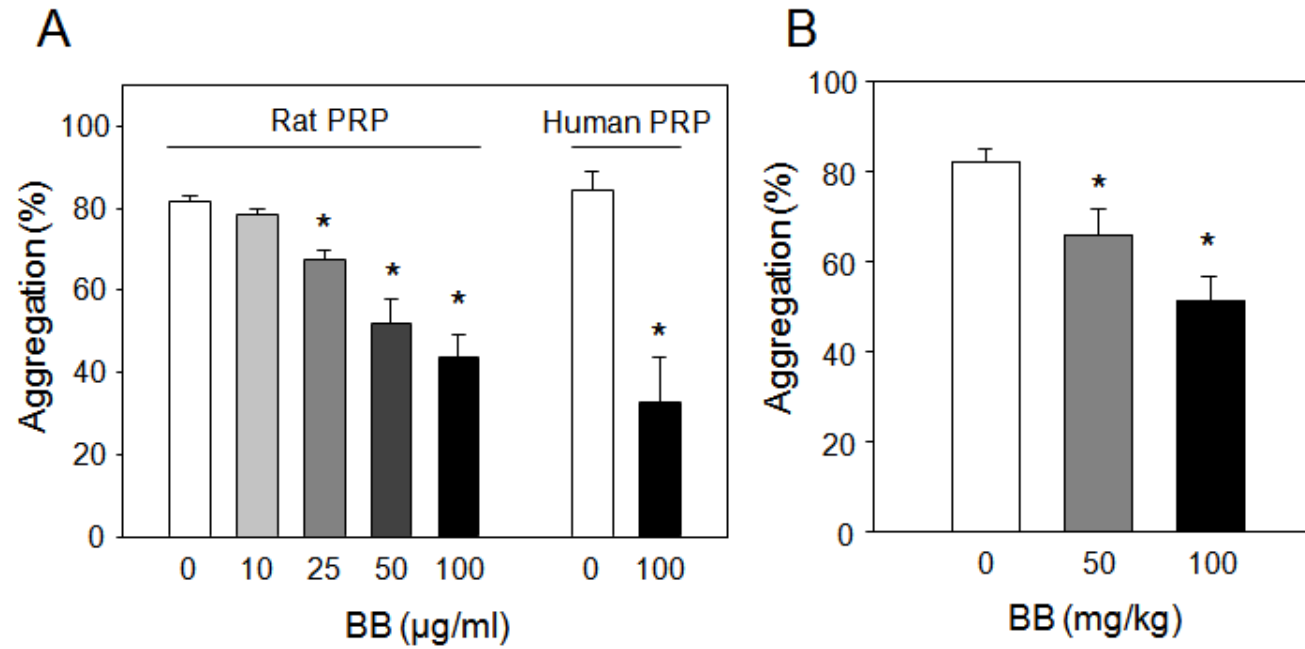


Figure 9. Effects of BB on rat platelet aggregation

(A) Various concentration of BB was treated for 10 min and rat platelets were stimulated with collagen (8-10 µg/ml) for 6 min. (B) One hour after oral administration of BB to rats, platelets were isolated and stimulated with collagen (10 µg/ml). Values are means \pm SEM of 3-4 animals. * represents significant differences from corresponding control ($p < 0.05$).

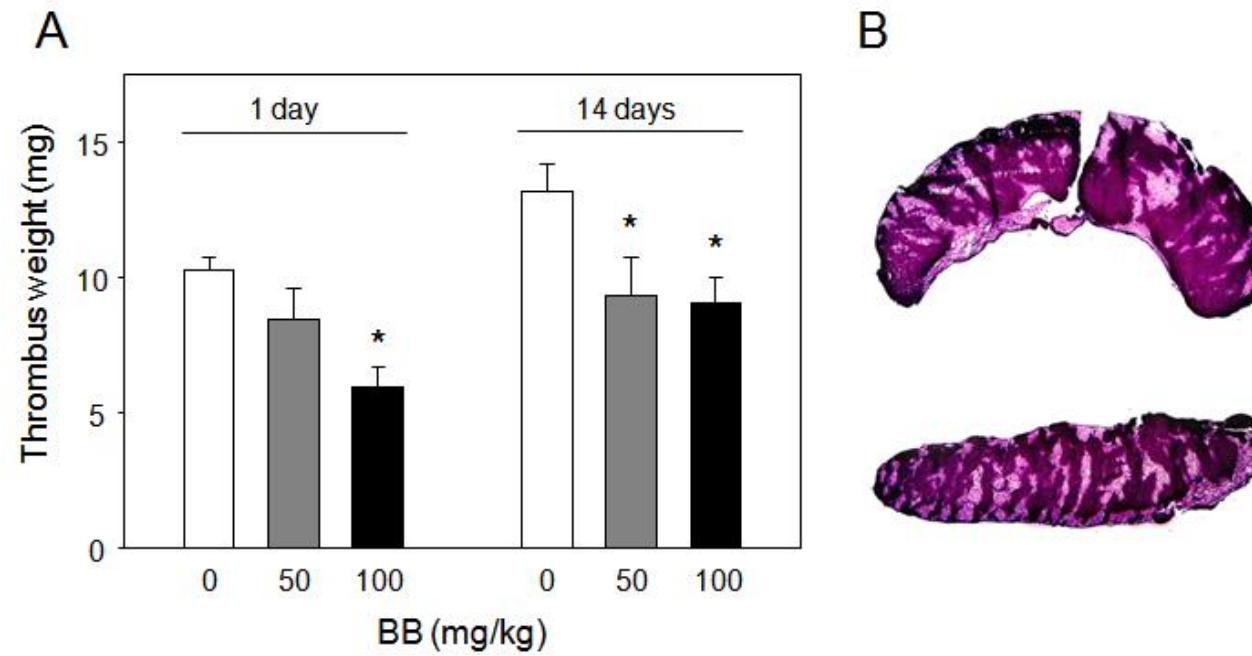


Figure 10. Effects of BB on FeCl₃-induced venous thrombosis

(A) After oral administration once or once daily for 14 days, thrombus formation was determined in FeCl₃ induced rat venous thrombosis model. (B) Isolated thrombus from vehicle or BB (100 mg/kg) administered rat were fixed and stained. Values are means \pm SEM of 4-6 animals. * represents significant differences from corresponding control (p < 0.05).

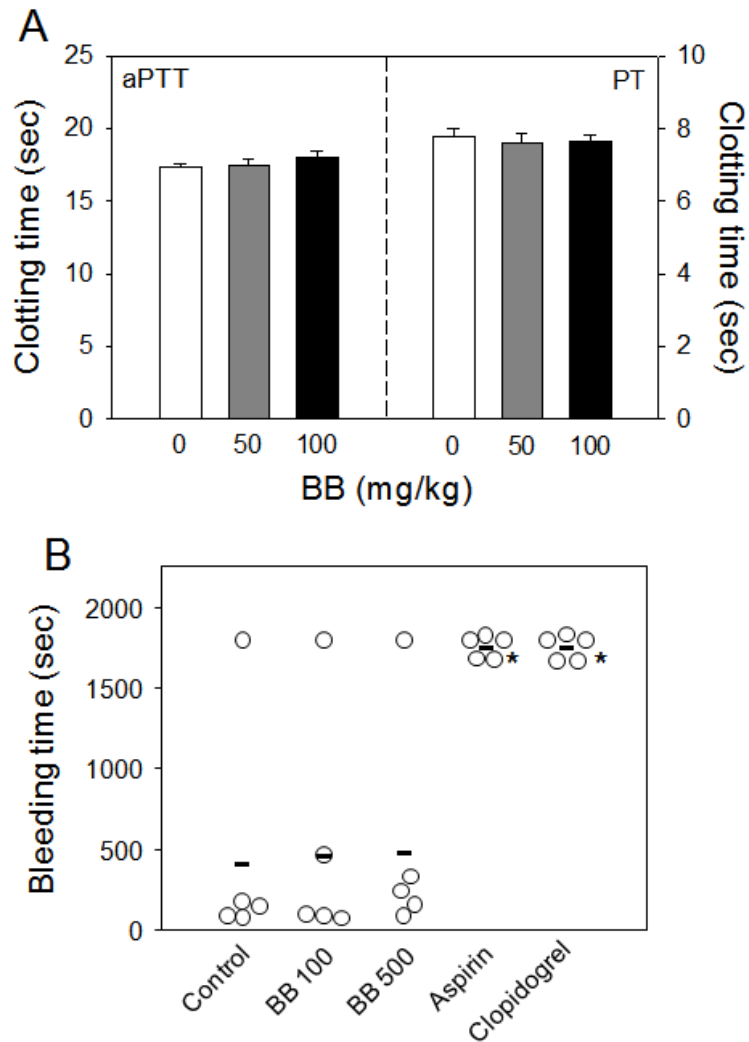


Figure 11. Effects of BB on coagulation and bleeding

(A) One hour after oral administration of BB, plasma was isolated and activated partial thromboplastin time (aPTT) or prothrombin time (PT) was determined. (B) After oral administration of BB bleeding time was measured. Values are means \pm SEM of more than 4-6 animals. * represents significant differences from corresponding control ($p < 0.05$).

II. 검은콩 추출물의 활성성분 분리 및 분석

검은콩추출물의 활성성분 분리는 혈소판 응집 억제 정도에 기반한 bioassay-directed fractionation을 통해 이루어졌다 (Fig. 12). 검은콩 추출물을 물에 현탁시키고 ethyl acetate와 butanol로 분배 추출한 후 collagen에 의한 혈소판 응집에 미치는 영향을 비교한 결과 ethyl acetate 분획이 가장 강한 억제 효과를 보였다 (Fig. 13). 따라서 ethyl acetate 분획을 solid phase extraction하여 7 개의 분획을 얻었다. 그 중 A-1과 A-2 분획이 가장 강한 억제 효과를 보였으며 (Fig. 14A), A-1과 A-2 분획을 합쳐서 column chromatography에 적용하여 10 개의 분획을 얻었다. 그 중 B-1 분획이 가장 강한 억제 효과를 보였으며 (Fig. 14B), B-1 분획을 preparative HPLC chromatography를 통해 peak 별로 나누어 7 개의 분획을 얻었다 (Fig. 13A). 결과적으로 단일 peak의 C-3 분획이 collagen에 의한 혈소판 응집에 대해서 가장 강한 억제 효과를 보였다 (Fig. 15B).

활성성분으로 추정되는 C-3 분획의 분석을 위하여 NMR과 mass spectroscopy를 적용하였다. ^1H NMR, ^{13}C NMR과 ^1H - ^1H COSY, HMQC, HMBC 등의 2D NMR에 의하여 C-3 분획이 adenosine 구조를 가진다는 것을 추정하였다 (Fig. 16A). Mass spectrum을 통해서 분자량이 267인 adenosine으로 확인되었다 (Fig. 16B). 활성성분 분석 결과를 검증하기 위해 C-3 분획과 adenosine standard의 HPLC spectrum을 비교한 결과 동일하게 나타났으며 (Fig. 17A), C-3 분획과 adenosine의 collagen에 의한 혈소판 응집을 억제 정도도 거의 동일하였다 (Fig. 17B).

Adenosine은 혈중에서 적혈구에 흡수되어 빠르게 제거되며 그 반감기가 0.6-1.5 초 정도로 매우 짧다 (Camm and Garratt, 1991; Lerman and Belardinelli, 1991). 따라서 in vivo 시험계에서도 adenosine이 검은콩의 활성성분으로 작용할 수 있는지 확인하고자 검은콩 추출물 또는 adenosine을 경구 투여한

후 혈중 adenosine 농도 변화를 확인하였다. 흰 쥐에게 검은콩 추출물을 투여한 경우와 adenosine을 투여한 경우에 adenosine의 혈중농도 변화를 비교한 결과, 검은콩 추출물을 투여한 경우에 adenosine의 혈중농도도 상대적으로 높고 제거되는 시간도 늦어지는 것을 확인하였다 (Fig. 18). 또한 흰 쥐와 사람의 전혈에서 adenosine 제거 정도를 비교한 결과 adenosine만을 처리한 경우 5 분 동안 거의 대부분 제거되었으나, 검은콩 추출물을 함께 처리한 경우 30% 정도가 잔존하였다 (Fig. 19).

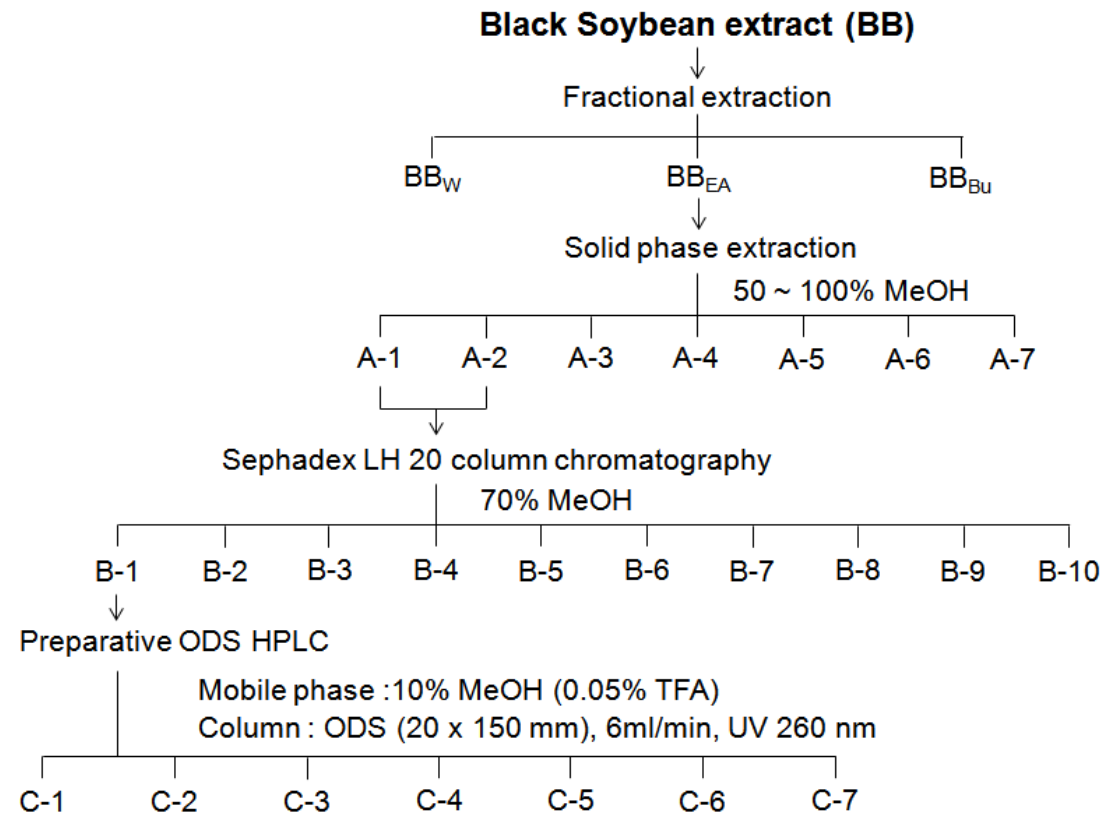


Figure 12. Bioassay-directed fractionation of BB

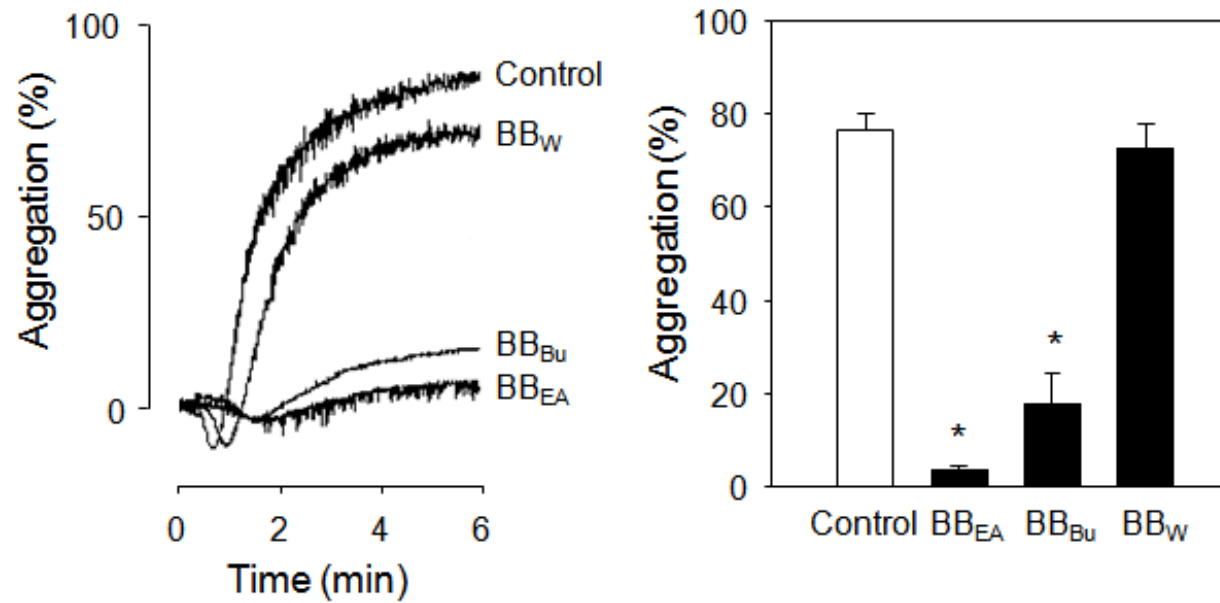


Figure 13. Isolation of active ingredient of BB (I)

100 $\mu\text{g/ml}$ of ethyl acetate (BB_{EA}), butanol (BB_{Bu}) and water (BB_w) fractions from BB were treated for 10 min and human platelets were stimulated with collagen (2-4 $\mu\text{g/ml}$) for 6 min. Values are means \pm SEM of 3 independent experiments. Representative tracing data of 3 independent experiments are shown. * represents significant differences from corresponding control ($p < 0.05$).

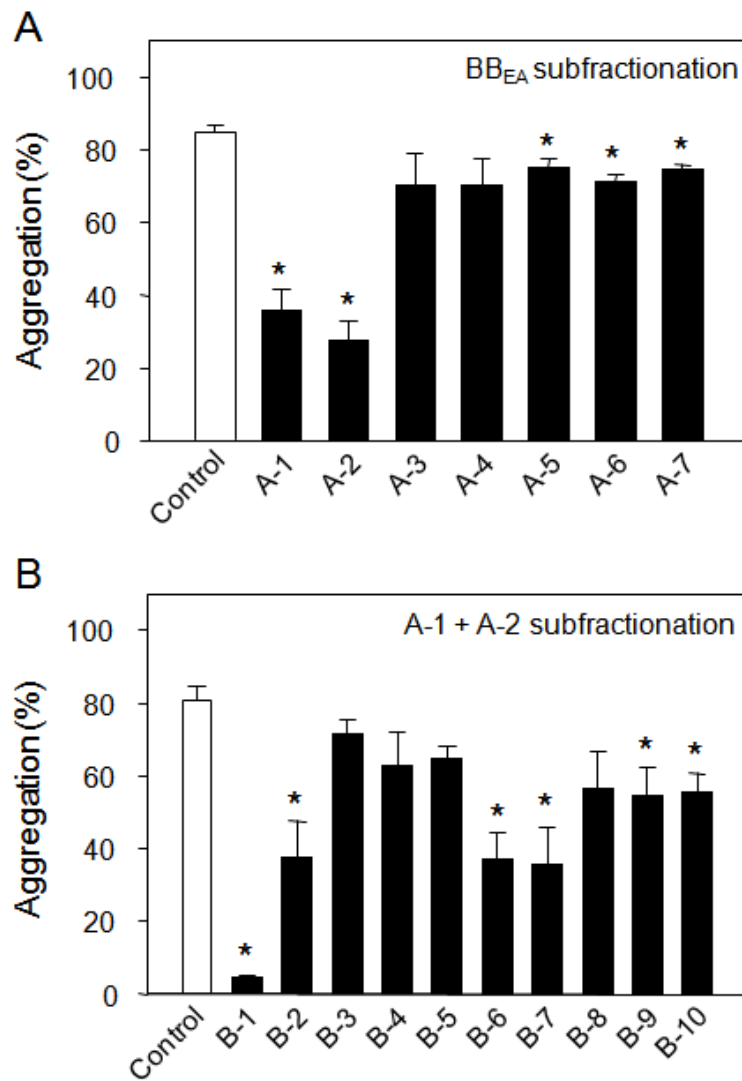


Figure 14. Isolation of active ingredient of BB (II)

25 µg/ml of subfractions from (A) ethyl acetate fraction, (B) A-1+A-2 fraction were treated for 10 min and human platelets were stimulated collagen (2-4 µg/ml) for 6 min. Values are means ± SEM of 3 independent experiments. * represents significant differences from corresponding control (p<0.05).

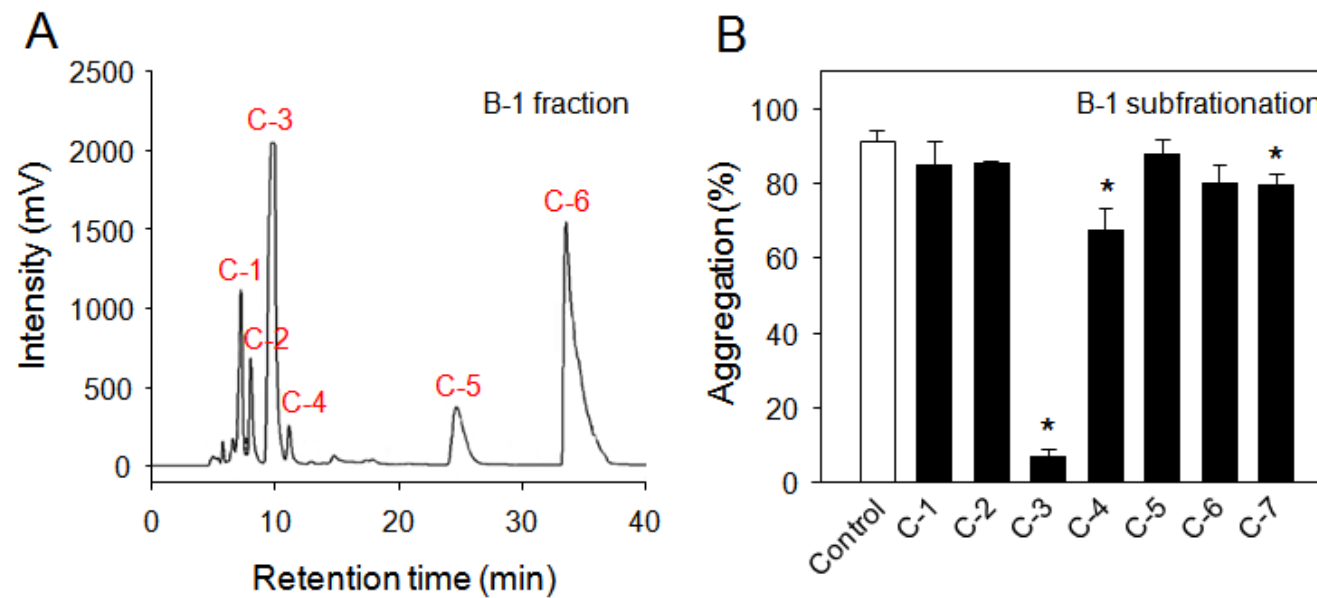


Figure 15. Isolation of active ingredient of BB (III)

(A) Preparative HPLC profile of B-1 fraction is shown. C-7 fraction is the remainder after isolation of C-1~C-6 fraction.

(B) 25 $\mu\text{g/ml}$ of subfractions from B-1 fraction were treated for 10 min and human platelets were stimulated collagen (2-4 $\mu\text{g/ml}$) for 6 min. Values are means \pm SEM of 3 independent experiments.* represents significant differences from corresponding control ($p < 0.05$).

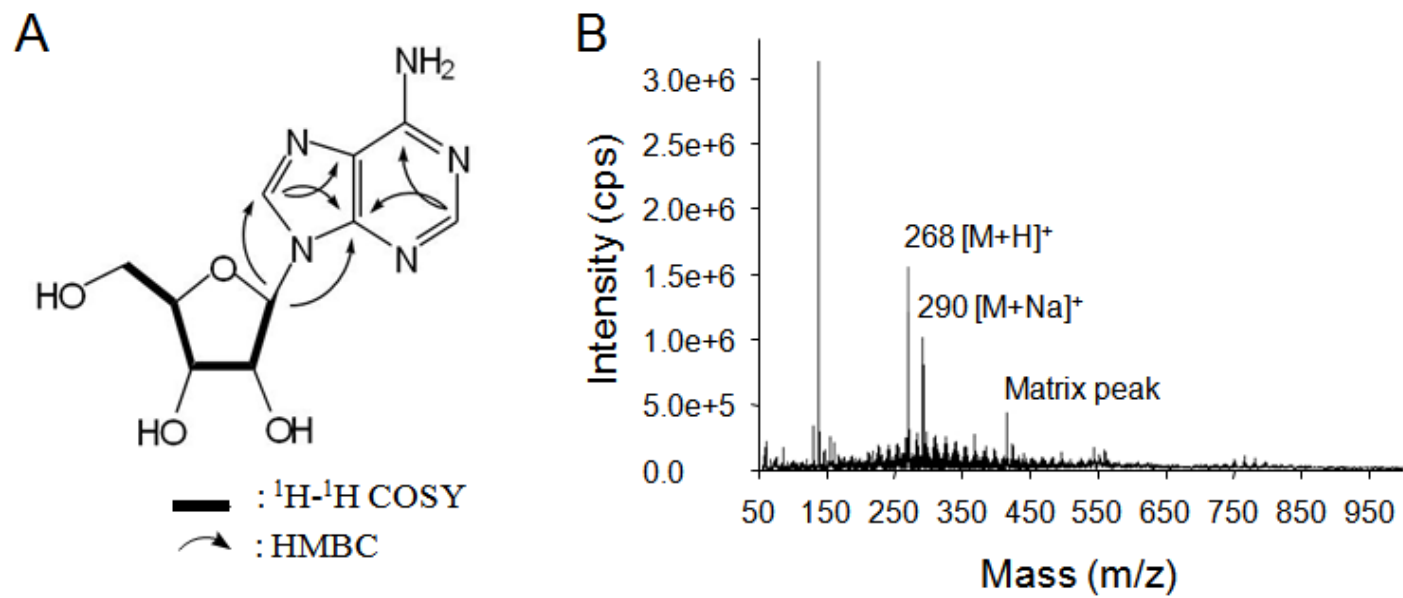


Figure 16. Identification of active ingredient of BB

(A) Critical 2D NMR data from NMR analysis and (B) the ESI-MS spectrum of C-3 fraction is shown.

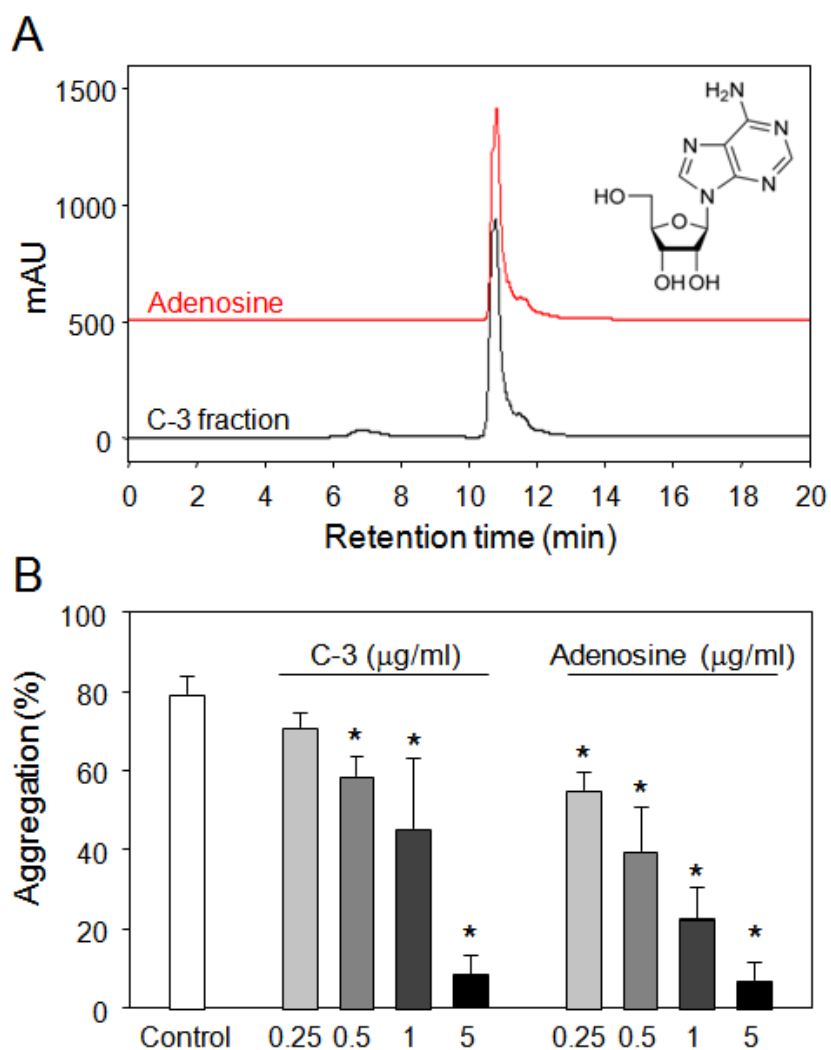


Figure 17. Confirmation of active ingredient of BB

(A) HPLC profile of C-3 fraction and adenosine is compared. (B) Various concentrations of C-3 fraction and adenosine were treated for 10 min and human platelets were stimulated with collagen (2-4 µg/ml) for 6 min. Values are means \pm SEM of 3-4 independent experiments. * represents significant differences from corresponding control ($p < 0.05$).

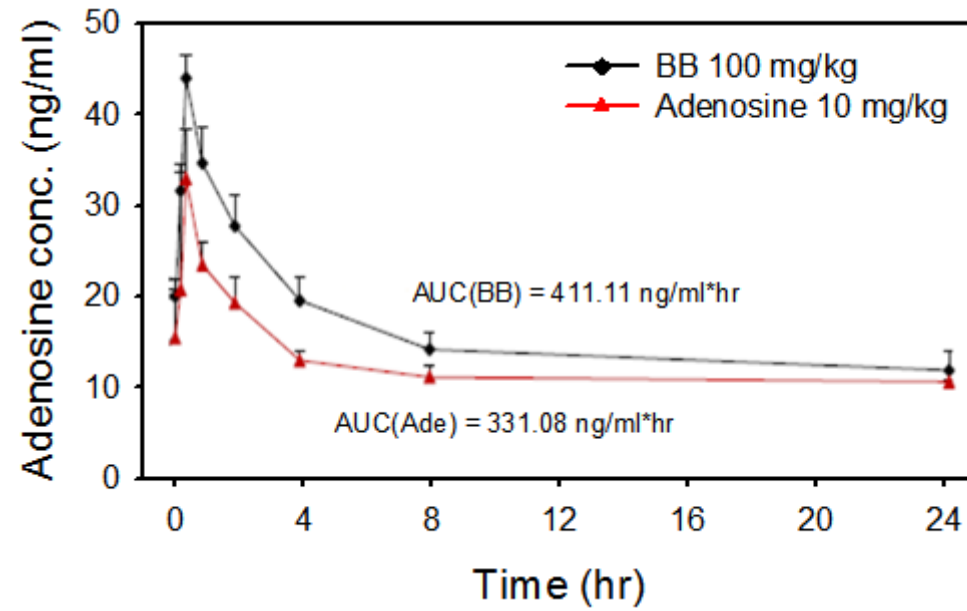


Figure 18. Plasma adenosine concentration in rat pharmacokinetic study

After oral administration of BB (100 mg/kg) and pure adenosine (10 mg/kg), blood samples were collected from the retro sinus and the adenosine concentration in plasma was measured by LC/MS/MS analysis. Values are means \pm SD of 3 animals.

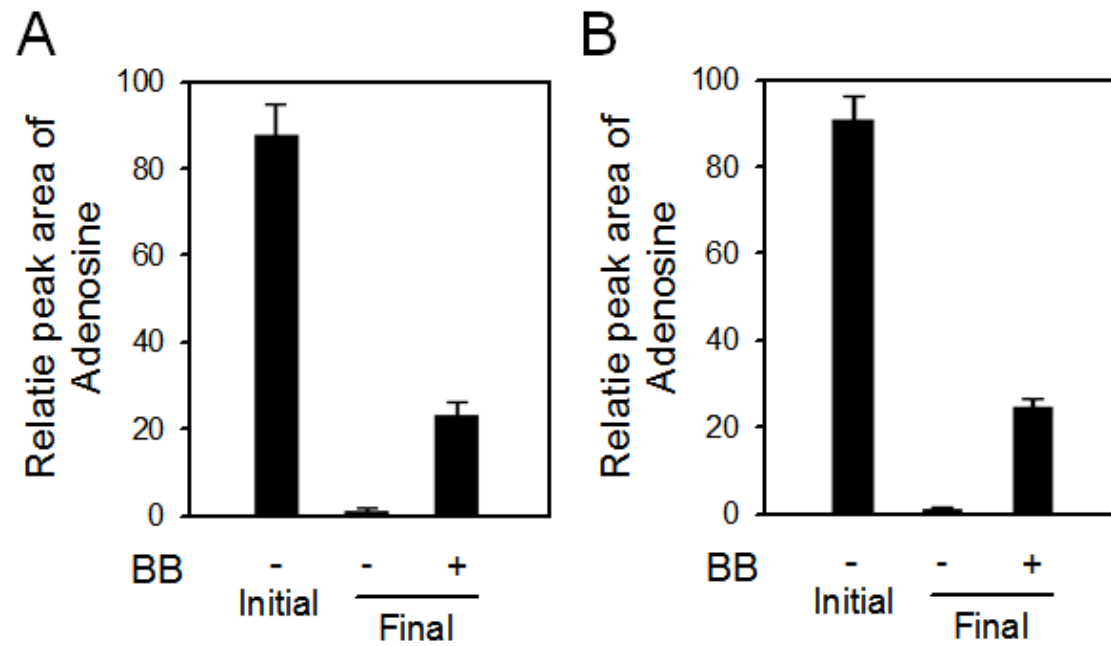


Figure 19. The change of plasma adenosine concentration in whole blood

Adenosine were added to (A) rat or (B) human whole blood with or without BB. After 5 min incubation, plasma was prepared and adenosine content in plasma was measured by LC/MS/MS analysis. Values are means \pm SD of 3 independent experiments.

III. 검은콩 추출물의 작용 기전 연구

검은콩 추출물의 작용기전 연구를 위해 plasma가 배제되고 혈소판만을 분리하여 suspension buffer에 현탁된 washed platelet (WP) system을 도입하였다. Figure 20A에서 보듯이 검은콩 추출물은 병태생리학적 환경에서 혈소판의 활성화에 있어서 주요한 단계인 collagen에 의한 혈소판 부착을 억제하였다 (Andrews and Berndt, 2004; Calderwood, 2004). 또한 검은콩 추출물은 WP system에서 collagen에 의한 혈소판 응집을 농도의존적으로 억제하였으며, 이는 PRP system에서 보인 억제 정도와 거의 동일하였다 (Fig. 20B). 또한 PRP system에서와 동일하게 WP system에서도 노란콩 추출물은 혈소판 부착 또는 응집에 영향을 주지 않았다.

Collagen은 GP VI 수용체를 결합하여 IP_3 생성을 증가시켜 세포 내 저장소로부터의 calcium 동원을 촉진시킨다 (Abrams, 2005). 또한 세포 내 cAMP는 IP_3 수용체의 저해를 통해 collagen에 의한 calcium level 증가를 억제할 수 있다 (Tertyshnikova and Fein, 1998). 검은콩 추출물은 cAMP level을 농도의존적으로 상승시켰으며 (Fig. 21A), 이어지는 calcium level의 증가 또한 억제하였다 (Fig. 21B). 반면에 노란콩 추출물은 cAMP와 calcium level에 영향을 미치지 않았으며, 이는 검은콩 추출물의 우월한 항혈소판 작용을 뒷받침한다. 혈소판 활성화 및 응집에 있어서 부착단백의 발현은 주요한 역할을 한다 (Li et al., 2003; Calderwood, 2004; Abrams, 2005). 검은콩 추출물은 collagen에 의한 GP IIb/IIIa의 발현을 유의적으로 억제하였으며 (Fig. 22A), 이어지는 fibrinogen의 부착 또한 농도의존적으로 억제하였다 (Fig. 22B). 검은콩 추출물의 항혈소판 작용이 adenosine을 매개함을 검증하고자 adenosine 수용체 길항제인 SCH 58261과 CSC를 전처리한 후 검은콩 추출물이 혈소판 활성화에 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과 검은콩 추출물의 혈소판 응집억제 작용이 저해되었으며, 이는 adenosine이 검은콩

추출물의 항혈소판 작용에 있어서 주요한 역할을 한다는 것을 의미한다 (Fig. 23).

Adenosine이 검은콩 추출물의 항혈소판 작용에 있어서 역할을 확인하고자 adenosine이 collagen에 의한 혈소판 응집에 미치는 영향을 확인하였다. Adenosine은 collagen에 의한 혈소판 응집을 농도의존적으로 억제하였다 (Fig. 24). Collagen에 의해 calcium level은 증가하였으며 adenosine은 이 증가를 억제하였다 (Fig. 25A). 또한 adenosine은 collagen에 의한 GP IIb/IIIa 발현을 억제하였으며 (Fig. 25B), 이는 adenosine이 calcium 증가와 그 이후의 단계들을 저해할 수 있음을 의미한다. Collagen에 의한 cAMP level의 감소는 adenosine⁵에 의해 회복되었으며, 이는 cAMP level의 상승이 adenosine에 의한 항혈소판 작용에 기여할 수 있음을 의미한다 (Fig. 26A). Adenosine에 의한 cAMP level의 회복 및 상승은 adenylyl cyclase (AC)를 통한 cAMP 생성에 기인하며, 이는 AC 억제제인 DDA와 SQ22536를 전처리한 경우 adenosine에 의한 cAMP 상승 효과가 저해됨을 통해 검증되었다 (Fig. 26B). cAMP 신호경로가 adenosine의 항혈소판 작용에 기여하는지 확인하고자 AC 억제제들이 세포 내 calcium level과 혈소판 응집에 미치는 영향을 확인하였다. 예상과 같이 AC 억제제들은 adenosine에 의한 calcium 동원 억제 효과를 저해하였으며 (Fig. 27A), adenosine의 혈소판 응집 억제작용도 AC 억제제를 전처리한 경우 사라진 것을 확인하였다 (Fig. 27B). 이는 cAMP 신호경로가 adenosine이 매개한 항혈소판 작용에 있어서 주요한 역할을 한다는 것을 의미한다.

adenosine의 cAMP 신호경로 활성화가 검은콩 추출물에 의한 항혈소판 작용에 기여하는지 확인하고자 AC 억제제들의 영향을 확인하였다. 검은콩 추출물에 의한 cAMP level 상승과 calcium 동원 억제효과는 AC 억제제에 의해 억제되었으며 (Fig. 28A and B), 이는 cAMP 신호경로가 검은콩 추출물에 의한 항혈소판 작용에 관여함을 있음을 의미한다. 또한 검은콩

추출물의 혈소판 응집 및 부착 억제 작용은 cAMP 생성을 저해한 경우 억제되었으며 (Fig. 29A and B), 이는 검은콩 추출물의 항혈소판 작용이 adenosine의 cAMP 신호경로 활성화에 의해 매개됨을 제시한다.

이전의 연구들에서 콩에 함유된 soy isoflavone들은 다양한 활성을 가지고 있으며 혈소판 응집도 억제할 수 있다는 보고들이 있었다 (Nakashima et al., 1991; Kondo et al., 2002; Guerrero et al., 2005; Guerrero et al., 2007). 따라서 검은콩에 의한 항혈소판 작용들이 soy isoflavone (genistein, daidzein)들이 아닌 adenosine에 기인함을 확인하고자 검은콩 추출물 100 µg/ml에서의 함량을 고려하여 adenosine (1 µM), genistein (0.3 µM), daidzein (0.3 µM)가 혈소판 활성화에 미치는 영향을 비교하였다. 그 결과 adenosine은 혈소판 응집을 억제하는데 비해 주요 soy isoflavone인 genistein과 daidzein은 영향을 미치지 않았다 (Fig. 30A). Genistein과 daidzein을 동시에 처리한 경우에도 collagen에 의한 혈소판 응집을 억제하지 못하였으며, 이는 isoflavone 보다는 adenosine이 검은콩 추출물의 혈소판 응집억제 작용에 관여함을 의미한다. 또한 이러한 경향은 collagen에 의한 GPIIb/IIIa 발현 (Fig. 30B)과 혈소판 부착 (Fig. 30C)에 대해서도 동일하게 나타났으며, 이는 adenosine이 검은콩 추출물에 의한 항혈소판 작용에 있어서 주요 활성성분임을 의미한다.

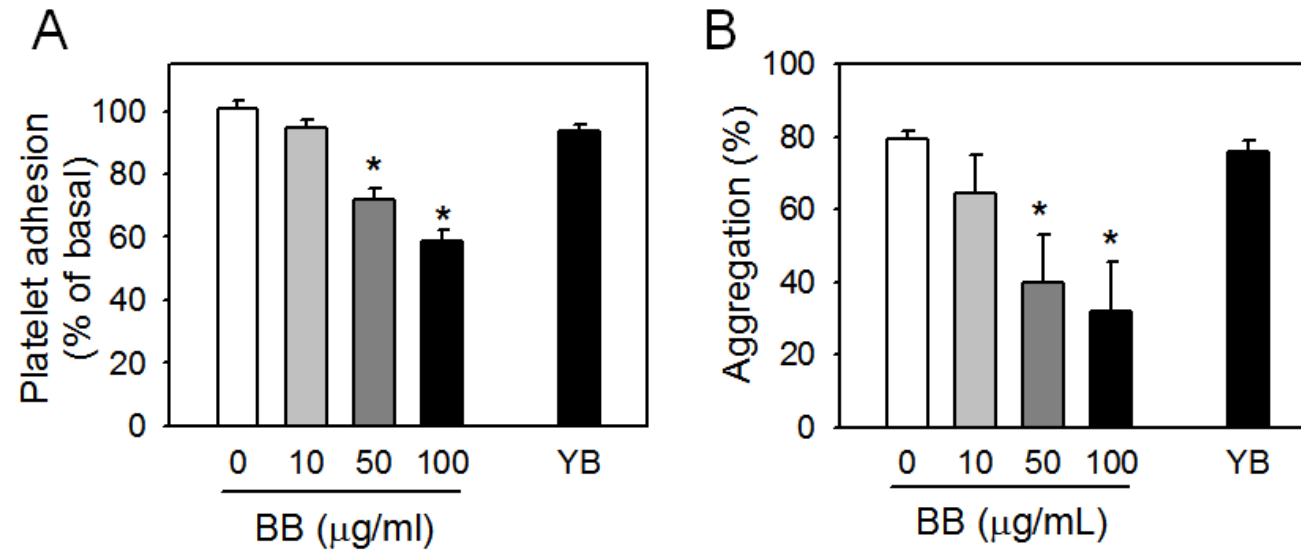


Figure 20. Effects of BB on adhesion and aggregation in human washed platelets

(A) Various concentrations of BB or YB (100 µg/ml) were treated for 10 min, and human platelets were stimulated with collagen (1–4 µg/ml) for 6 min. Platelet aggregation was measured using lumi-aggregometer. (B) Calcein-loaded platelets were exposed to BB or YB (100 µg/ml) for 10 min and placed onto collagen-coated microwells for 30 min. Adhered platelets were analyzed by calcein fluorescence. Values are means ± SEM of 3-4 independent experiments. * represents significant differences from corresponding control (p < 0.05).

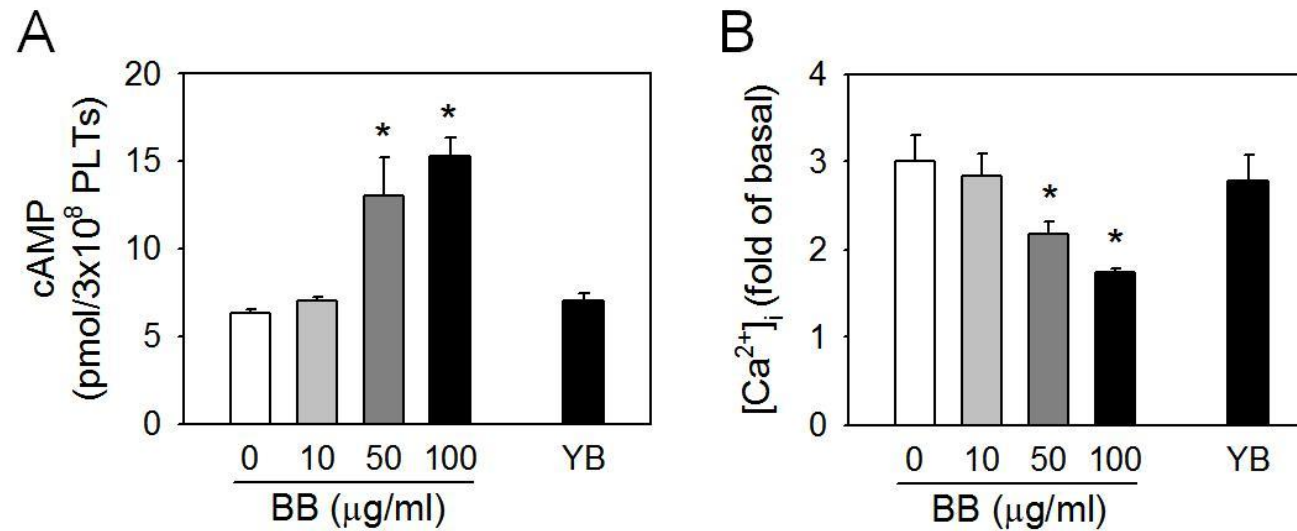


Figure 21. Effects of BB on intracellular cAMP and calcium level

(A) Various concentrations of BB or YB (100 µg/ml) were treated for 10 min and intracellular cAMP level was determined after collagen stimulation. Intracellular cAMP level in collagen-stimulated platelets was determined using commercial cAMP ELISA kit. (B) Effect of BB or YB on collagen-induced intracellular calcium increase was examined by flow cytometry. Values are means \pm SEM of 3-4 independent experiments. * represents significant differences from corresponding control ($p < 0.05$).

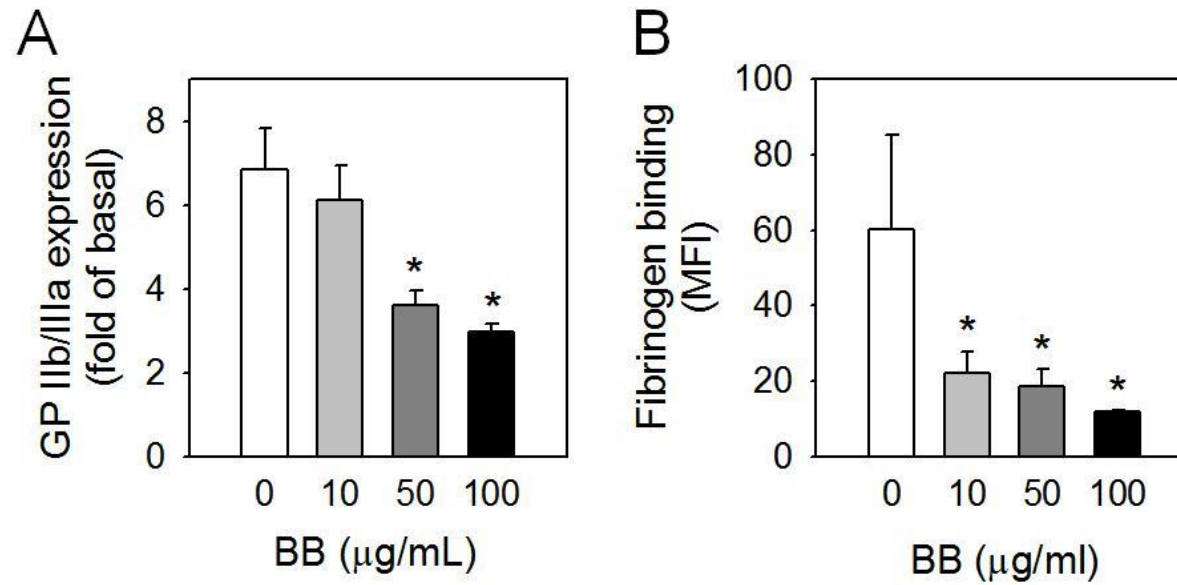


Figure 22. Effects of BB on collagen-induced GPIIb/IIIa expression and fibrinogen binding

(A) Various concentrations of BB were treated for 10 min and GP IIb/IIIa expression was determined after collagen stimulation. (B) Fibrinogen binding was examined by flow cytometry after pretreatment of BB and collagen stimulation. Values are means \pm SEM of 3-4 independent experiments. * represents significant differences from corresponding control ($p < 0.05$).

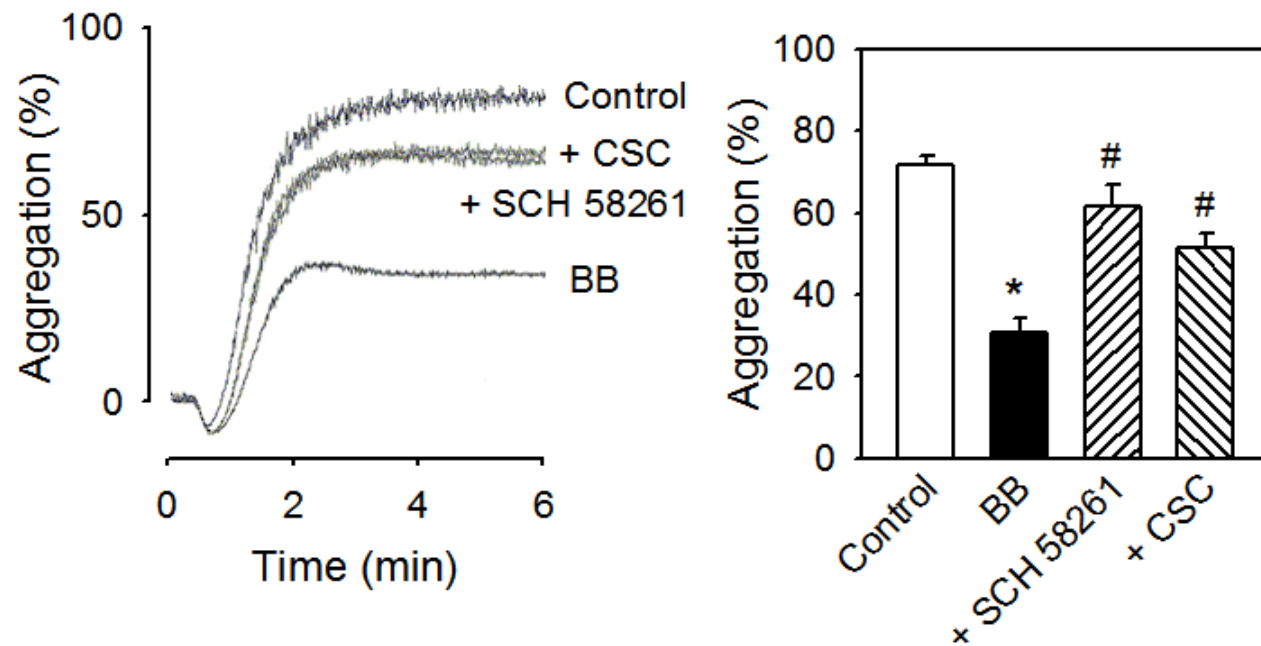


Figure 23. Role of adenosine in inhibitory effects of BB on collagen-induced platelet aggregation

BB (100 $\mu\text{g/ml}$) was treated for 10 min in the presence of adenosine receptor antagonist SCH 58261 (300 nM) or CSC (1 μM), and platelet aggregation was initiated with collagen. Values are means \pm S EM of 3-4 independent experiments. * represents significant differences from corresponding control ($p < 0.05$). # represents significant differences from BB treated group ($p < 0.05$).

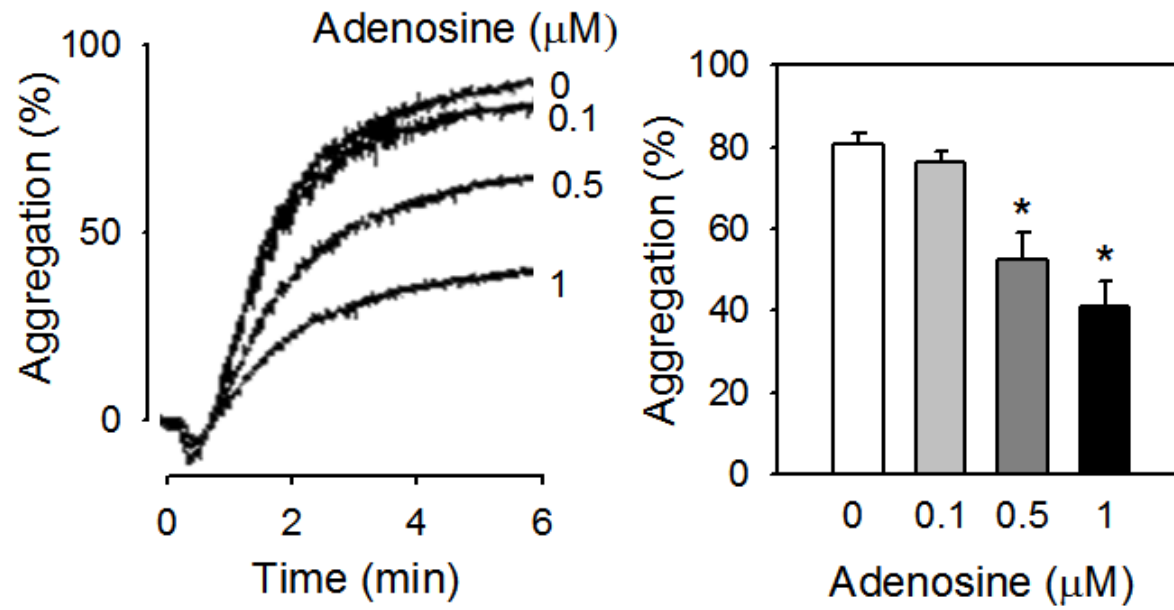


Figure 24. Effects of adenosine on collagen-induced platelet aggregation

Various concentrations of adenosine were treated for 10 min, and collagen-induced platelet aggregation was examined. Values are means \pm SEM of 3-4 independent experiments. * represents significant differences from corresponding control ($p < 0.05$).

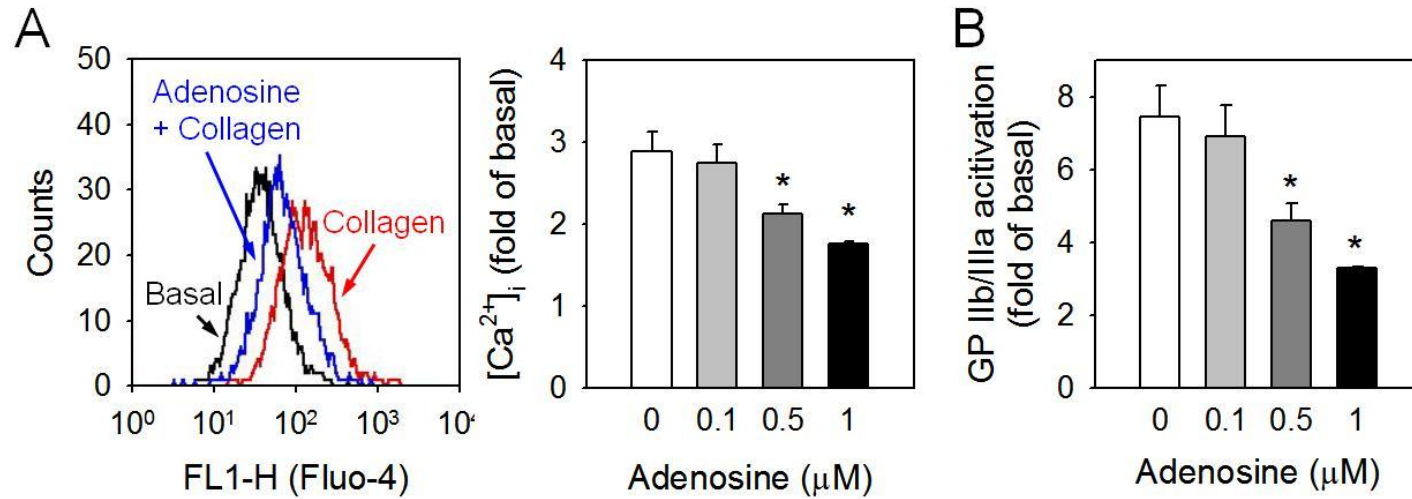


Figure 25. Effects of adenosine on collagen-induced calcium mobilization and GP IIb/IIIa expression

(A) Various concentrations of adenosine were treated to platelets and Fluo-4 elicited intracellular calcium increase was determined after collagen stimulation using flow cytometry. (B) Effect of adenosine on adhesion receptor GP IIb/IIIa expression was examined following collagen stimulation. Values are means \pm SEM of 3-4 independent experiments. * represents significant differences from corresponding control ($p < 0.05$).

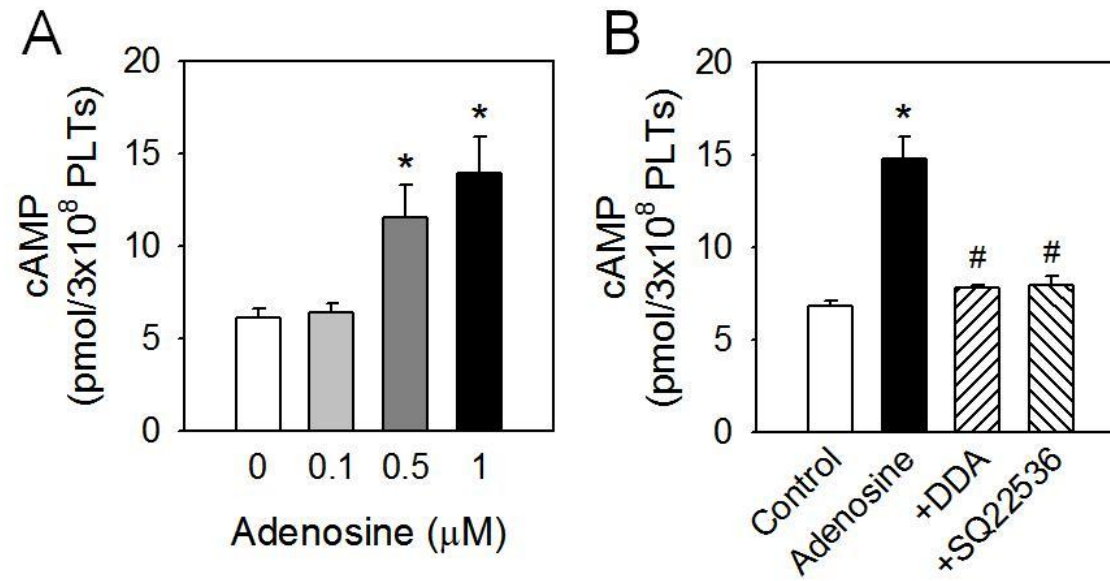


Figure 26. Effects of adenosine on intracellular cAMP level

(A) Effect of adenosine on intracellular cAMP level was examined following collagen stimulation. (B) Treatment of DDA (100 μM) or SQ22536 (20 μM) for 10 min reversed adenosine effect on cAMP level. Values are means ±S EM of 3-4 independent experiments. * represents significant differences from corresponding control (p<0.05). # represents significant differences from BB treated group (p<0.05).

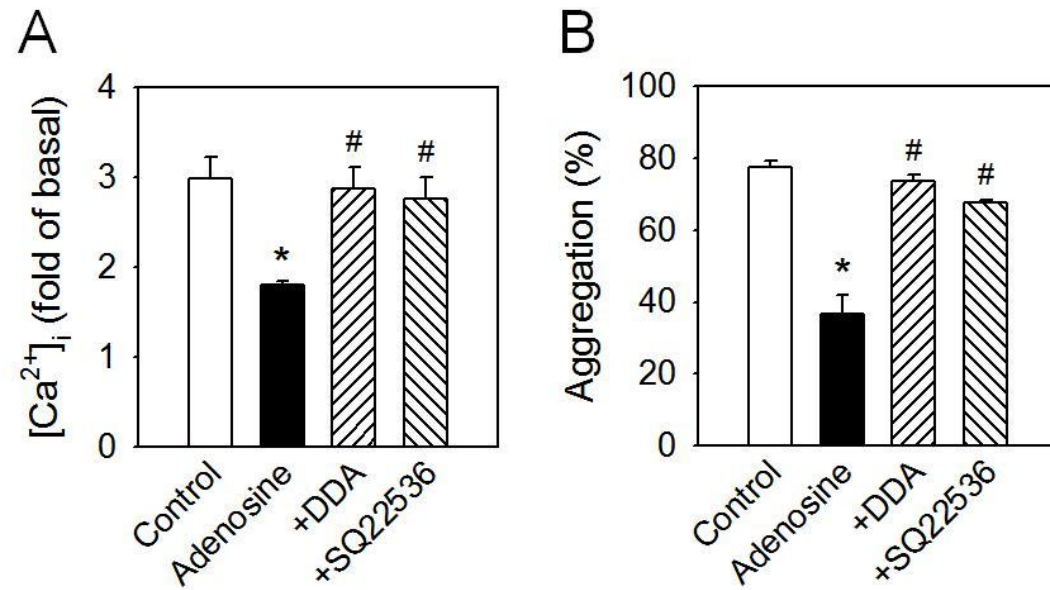


Figure 27. Role of adenosine-cAMP signaling on collagen-induced platelet activation

Treatment of DDA (100 μ M) or SQ22536 (20 μ M) for 10 min reversed adenosine effect on (A) intracellular calcium level and (B) aggregation in collagen-stimulated human platelets. Values are means \pm SEM of 3-4 independent experiments. * represents significant differences from corresponding control ($p < 0.05$). # represents significant differences from BB treated group ($p < 0.05$).

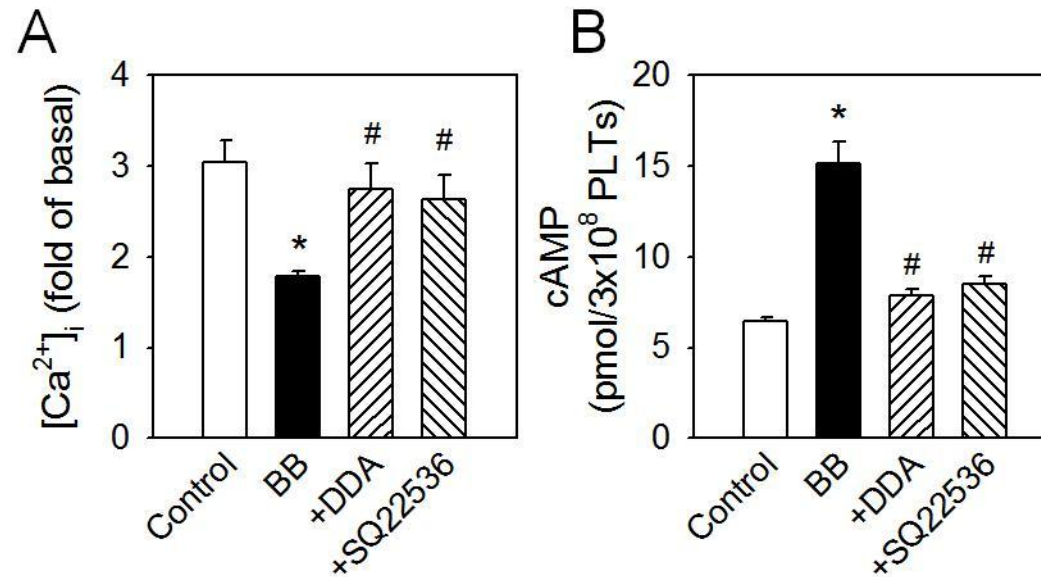


Figure 28. Elucidation of the inhibitory mechanism of BB on platelet activation

Adenylyl cyclase inhibition by DDA (100 μ M) or SQ22536 (20 μ M) for 10 min reversed the effects of BB on (A) cAMP level and (B) intracellular calcium level in collagen-stimulated human platelets. Values are means \pm SEM of 3-4 independent experiments. * represents significant differences from corresponding control ($p < 0.05$). # represents significant differences from BB treated group ($p < 0.05$).

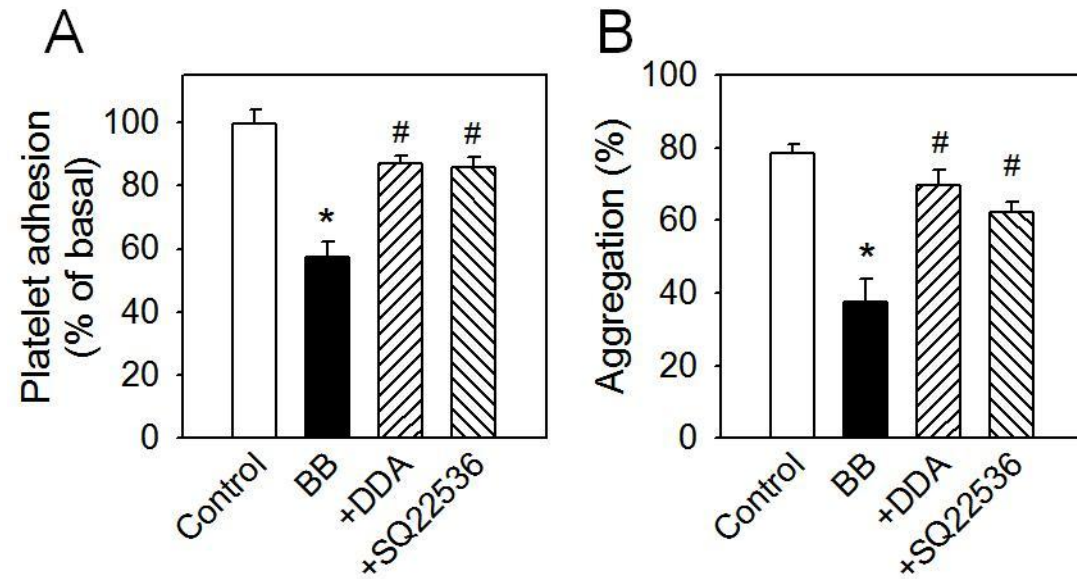


Figure 29. Elucidation of the inhibitory mechanism of BB on platelet adhesion and aggregation

Adenylyl cyclase inhibition by DDA (100 μ M) or SQ22536 (20 μ M) for 10 min reversed the effects of BB on (A) platelet aggregation and (B) adhesion in collagen-stimulated human platelets. Values are means \pm SEM of 3-4 independent experiments. * represents significant differences from corresponding control ($p < 0.05$). # represents significant differences from BB treated group ($p < 0.05$).

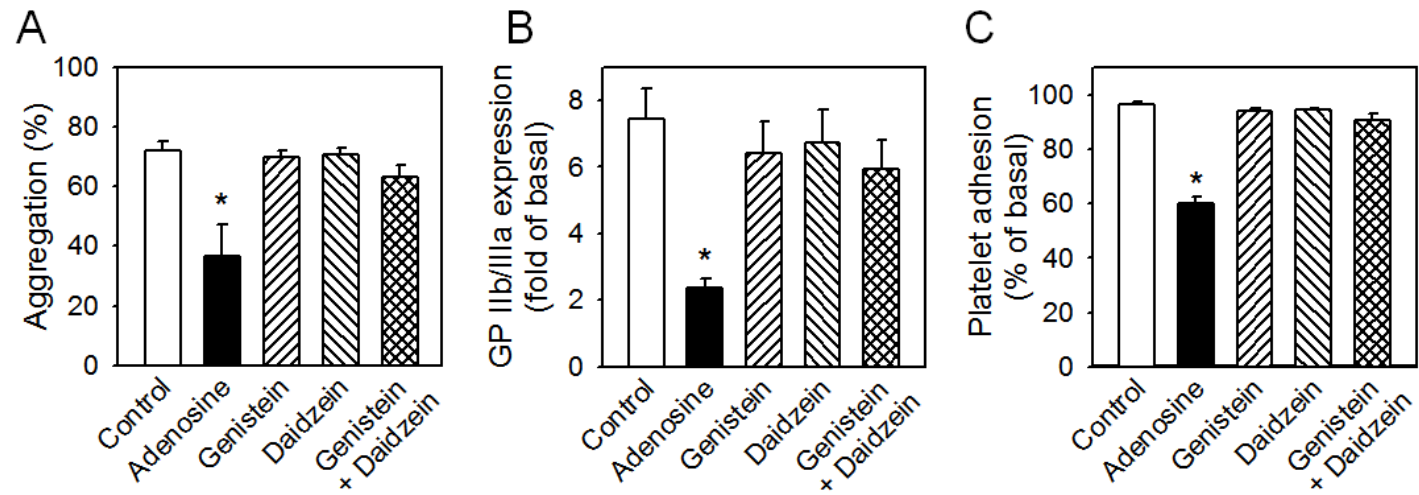


Figure 30. Effects of adenosine and soy isoflavones on platelet activation

Adenosine (1 μ M), genistein (0.3 μ M), Daidzein (0.3 μ M) and combination of genistein and daidzein (0.3 μ M for both compound) were treated for 10 min, and collagen-induced platelet aggregation (A), GPIIb/IIIa expression (B) or platelet adhesion (C) was examined. Values are means \pm SEM of 3-4 independent experiments. * represents significant differences from corresponding control ($p < 0.05$).

고 찰

본 연구에서는 검은콩 추출물이 collagen에 의한 혈소판 응집 및 활성화를 억제함을 확인하였다. 반면, 노란콩 추출물은 미미한 억제 효과를 보였다. 이러한 *in vitro* 실험 결과들은 *ex vivo* 혈소판 응집 억제 및 *in vivo* 정맥 혈전 생성 저해를 통해 검증되었다. 반면에 혈액응고기능이상 및 출혈 부작용에 대해서 검은콩 추출물은 영향을 주지 않았다. 검은콩 추출물의 항혈소판 작용에 대한 활성성분은 bioassay-directed fractionation을 통해 분리되었으며, NMR 및 Mass 분석을 통해 adenosine으로 규명되었다. 검은콩 추출물의 항혈소판 작용은 camp level의 증가를 매개하여 세포 내 calcium 동원, glycoprotein (GP) IIb/IIIa 발현 및 fibrinogen 부착을 저해하는데 기인하였다. 결과적으로 검은콩 추출물은 활성성분 adenosine에 의한 cAMP 신호경로의 활성화를 매개로 혈소판의 활성화, 응집 및 부착을 억제함으로써 혈전 생성을 저해하였다. 이상의 결과는 Figure 31에 요약되어 있다.

기존에 사용되어 온 항혈소판제들은 내출혈, 위장관 출혈 등의 부작용을 가지고 있어 심혈관계 질환의 예방을 위해 사용하는데 있어 문제가 되어왔다 (Jackson and Schoenwaelder, 2003; Barrett et al., 2008). 대표적인 항혈소판제인 aspirin의 경우 예방의 목적으로 진행된 22 건의 임상연구들을 분석한 결과, 대출혈 (major bleeding)의 위험성은 71% 증가하였으며 소출혈 (minor bleeding)의 위험성도 62% 증가하였다 (McQuaid and Laine, 2006). 또한 aspirin의 예방효과와 출혈 부작용을 비교한 6건의 임상연구 분석에서는 혈전 발생은 0.57%에서 0.51%로 미미하게 감소한 반면 출혈 부작용은 0.07%에서 0.1%로 증가하였다 (Antithrombotic Trialists et al., 2009). 이러한 이유로 심혈관계 질환의 예방을 목적으로 한 기존의 항혈소판제들의

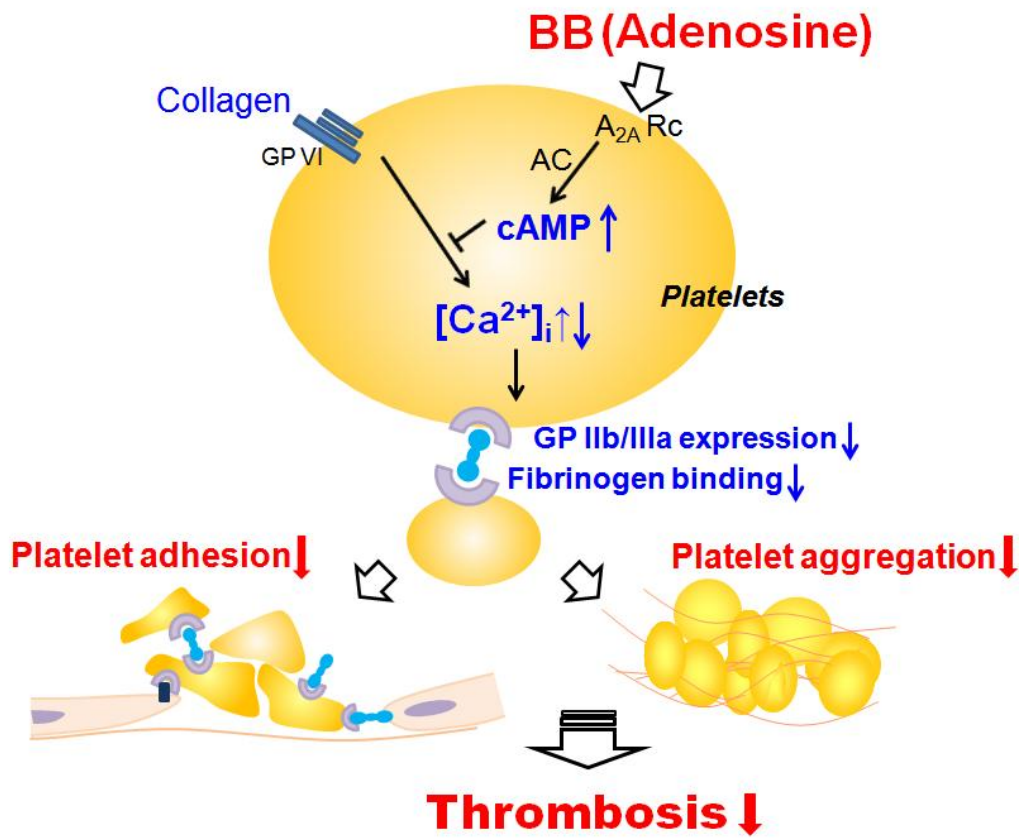


Figure 31. Suggested mechanism for the inhibitory effect of Black soybean on collagen-stimulated platelet activation

대안으로서 보다 안전한 천연물 및 식품들에 대한 관심이 많아졌다 (Craig, 1999; Hu, 2003). 대표적인 향신료인 마늘 (*Allium sativum*)을 대상으로 한 7건의 임상연구에서 건강한 사람들과 심혈관계 환자들에게 있어서 항혈소판 작용이 확인된 바 있다 (Rahman and Lowe, 2006). 또한 양파 (*Allium cepa*)의 경우 *in vivo* 동물 혈전 모델들을 통해 항혈전 작용이 밝혀진 바 있다 (Briggs et al., 2001; Yamada et al., 2004). 그러나 마늘과 양파의 강한 맛과 향은 매일 복용하는데 있어서 어려움을 줄 수 있으며, 게다가 과도한 마늘과 양파의 섭취는 위장병, 빈혈, 알레르기 반응 등의 문제를 일으킬 수 있어 심혈관계 질환의 예방을 목적으로 활용하는데 있어 부적당하다 (Amagase et al., 2001). 본 연구에서는 검은콩 추출물이 항혈소판 작용을 매개하여 항혈전 작용을 보였으며, 출혈 부작용에는 영향을 주지 않음을 밝혔다. 위에 서술된 마늘과 양파와 달리 검은콩은 부작용 없이 매일 섭취할 수 있다는 점에서 심혈관계 질환의 예방에 있어서 활용가능성이 높다.

검은콩 추출물의 PRP에서 collagen에 혈소판 응집에 대한 IC_{50} 는 $100 \pm 46.0 \mu\text{g/ml}$ 으로 (Fig. 4), 기존의 항혈소판제인 aspirin ($25 \pm 2.0 \mu\text{g/ml}$), ticlopidine ($134 \pm 10.1 \mu\text{g/ml}$)과 크게 차이가 나지 않는다 (De La Cruz et al., 2002). 게다가 검은콩 추출물의 활성성분 함유한 C-3 분획의 경우 IC_{50} 가 $1 \mu\text{g/ml}$ 이하까지 낮아졌다 (Fig. 17B). 이는 검은콩 추출물의 항혈소판 및 항혈전 작용이 약물학적으로나 영양학적으로 충분히 의미 있음을 말한다. 또한 검은콩 추출물을 투여한 경우 *in vivo* 혈전 모델에서 항혈전 효과를 보인 것이 이를 뒷받침한다. 특히 *in vivo* 실험에서 사용한 50-100 mg/kg은 실제 콩 식품의 일일 섭취량 (20-80 g)을 고려했을 때 타당한 용량이었다 (Omoni and Aluko, 2005). 검은콩 추출물의 수율이 7.6% 였으므로, 50-100 mg/kg은 약 650-1,300 mg soybean/kg에 해당하며 성인 (60 kg)의 경우 약 40-80 g 섭취하는 정도이다. 게다가 2주간 반복 투여한 경우 단독 투여한 경우에 비하여 보다

낮은 농도에서도 유의미한 혈전 생성 억제 효과를 보였다는 점은 (Fig. 8), 꾸준히 섭취할 경우 더 큰 효과를 기대할 수 있다는 것을 의미한다.

기존의 연구들에서 검은콩은 다른 콩들에 비해 강한 생리활성을 보였다. Takahashi et al. (2005)은 검은콩 추출물이 LDL 산화에 대해서 보다 강한 항산화 활성을 가지며 이는 껍질에 상대적으로 높은 polyphenol 함량, 특히 anthocyanin에 기인한다고 보고하였다. Xu and Chang (2008)은 검은콩이 다른 콩에 비하여 상대적으로 강한 free radical 제거 활성을 가진다고 보고하였다. 이 보고에 따르자면, protocatechuic acid, protocatechualdehyde, caffeic acid와 같은 phenolic acid가 노란콩을 포함한 다른 콩들에 비해 검은콩에 더 많이 존재하며, anthocyanin은 검은콩에만 존재한다. 몇몇 연구들에서 이들 물질들의 혈소판 활성화 및 응집에 대한 억제 작용이 보고된 바 있다. 그러나 protocatechuic acid (>100 µg/ml)과 caffeic acid (>100 µg/ml)는 상당히 높은 농도에서 collagen에 의한 혈소판 응집을 억제하였으며 (Yun-Choi et al., 1987; Wu et al., 2001), 이는 본 연구에서 보인 검은콩 추출물 ($IC_{50} = 100 \pm 46.0$ µg/ml) 의 강한 혈소판 응집 억제 효과를 설명하기는 어렵다. 또한 기존의 보고들에서 anthocyanin은 혈소판 활성화 및 응집에 대해서 미미하거나 거의 억제 효과를 보이지 않는다고 알려져 있다 (Garcia-Alonso et al., 2004; Rechner and Kroner, 2005). 또한 대부분의 anthocyanin을 함유하고 있는 검은콩 껍질의 추출물의 경우 collagen에 의한 혈소판 활성화 및 응집에 대해서 효과가 없었으며 (Fig. 6), 이는 검은콩의 항혈소판 작용이 다른 성분이 기인함을 의미한다.

또한, 이전의 연구들에서 콩이 가지는 항암, 항당뇨, 항골다공증 등의 생리활성에 있어서 isoflavone을 주요 활성성분으로 여겨져 왔다 (Lu et al., 2008; Song et al., 2008; Jian, 2009; Messina, 2010). 또한 soy isoflavone은 심혈관계 개선 효과도 보고된 바 있으며 (Anthony et al., 1998; Marsh et al., 2011; Pase et al., 2011), 특히 혈소판에 대해서 genistein과 daidzein은

thromboxane A₂ signaling, serotonin 분비, 혈소판 응집 등의 혈소판 활성화를 조절할 수 있다고 알려져 있다 (Nakashima et al., 1991; Kondo et al., 2002; Guerrero et al., 2005; Guerrero et al., 2007). 이들 연구에서 제시한 genistein의 혈소판 응집 억제 효과에 대한 IC₅₀는 10-30 μM 정도로 검은콩 추출물에서의 함량을 고려했을 때 잘 맞지 않는다. 실제 검은콩 추출물 내의 함량 (genistein; 0.14%, daidzein; 0.11%)을 고려한 농도 (0.3 μM)에서는 genistein과 daidzein이 collagen에 의한 혈소판 응집에 영향을 미치지 않았다 (Fig. 25). 이 결과와 일치하여 Gooderham et al. (1996)은 soy isoflavone (genistein, daizein)의 함량이 높은 soy protein의 섭취가 혈중 gensitein 농도는 0.9 μM 수준으로 높였으나 혈소판 응집에 대해서는 영향이 없다고 보고하였다. 이는 콩의 생리활성에 있어서 isoflavone 외에 다른 활성성분들이 관여할 수 있는 가능성을 제시하는 것이다.

본 연구에서는 검은콩의 항혈소판 작용에 대한 활성성분을 bioassay-directed fractionation과 NMR 및 Mass 분석을 통하여 adenosine으로 규명하였다. Adenosine의 항혈소판 작용에 대한 유효농도 (IC₅₀)는 1.85 ± 0.86 μM으로 검은콩 추출물의 유효농도 100 ± 46.0 μg/ml와 adenosine의 함량 (0.36%)을 고려했을 때 잘 맞았다. 또한 검은콩 추출물과 노란콩 추출물 (0.16%)의 adenosine 함량의 차이는 검은콩 추출물의 상대적으로 강한 항혈소판 효과를 설명할 수 있을 것이다. 뿐만 아니라 검은콩 추출물의 추출조건에 따른 adenosine과 isoflavone의 함량 그리고 항혈소판 작용의 차이도 이를 뒷받침하는 결과이다. 20% ethanol로 추출한 검은콩 추출물 (BB₂₀)은 70% ethanol로 추출한 검은콩 추출물 (BB₇₀)에 비해 강한 혈소판 응집 억제 효과를 보였다 (Fig. 2) 이 때 BB₂₀과 BB₇₀에서의 adenosine 함량은 각각 0.5%, 0.04% 인데 비해 isoflavone의 함량은 각각 0.09%, 0.11%로 큰 차이가 없었다.

Adenosine은 다양한 생리활성을 가지며, adenosine의 대사나 adenosine 수용체를 조절하는 것이 다양한 질병들의 치료에서 target으로 여겨지고

있다 (Jacobson and Gao, 2006; Fredholm, 2007; Hasko et al., 2008; Polosa and Blackburn, 2009; Gessi et al., 2011). 그러나 식품에서의 adenosine의 활성성분으로서의 역할에 대한 연구는 제한적으로 이루어졌다 (Saito et al., 1999; Kuo et al., 2008). 또한 이전의 연구에서 마늘, 양파, 버섯에서 adenosine을 항혈소판 작용에 대한 활성성분으로서의 가능성을 제시한 바 있으나, 이는 직접적인 활성이나 기전을 확인하지 않고 성분을 분리하는 것에 그쳤다 (Shimizu et al., 1985; Makheja and Bailey, 1990). 혈소판에서 adenosine은 A_{2A} 수용체와 상호작용하여 adenylyl cyclase를 활성화시켜 cAMP를 생성시키며, cAMP는 세포 내 calcium 동원을 저해하여 혈소판 응집을 억제한다 (Paul et al., 1990). 이러한 adenosine의 항혈소판 작용은 검은콩 추출물에서도 동일하게 나타났다. 혈소판 응집뿐 아니라 serotonin 분비, P-selectin 발현 등 혈소판 활성화에 대한 adenosine의 억제 작용도 검은콩 추출물에 의해 동일하게 나타났다 (Cooper et al., 1995; Minamino et al., 1998). 또한 PDE의 억제를 통한 cAMP level 상승을 기전으로 하는 cilostazol과 dipyridamole이 상대적으로 적은 출혈 부작용을 가진다는 것은 본 연구에서 검은콩 추출물이 출혈 부작용 없이 혈전 생성을 억제한 것을 설명할 수 있다 (Goto, 2005; Booze and Serebruany, 2006).

Adenosine은 혈중에서 주로 적혈구 내로 들어가서 adenosine kinase에 의해 인산화 되어 adenosine monophosphate가 되거나, adenosine deaminase에 의해 inosine으로 바뀌어 빠르게 제거된다. 실제 adenosine의 반감기는 0.6-1.5 초 정도로 매우 짧으며, 이러한 이유로 adenosine은 상심실성 빈맥 (supraventricular tachycardia)에서만 정맥 주사 형태로 쓰인다 (Camm and Garratt, 1991; Lerman and Belardinelli, 1991). 그러나 혈중 adenosine 농도는 식이, 질병과 같은 내적, 외적 요인들에 의해 변할 수 있다. 예를 들어, dipyridamole과 cilostazol은 적혈구에 의한 adenosine의 흡수를 저해하여 혈중 adenosine을 높일 수 있다 (Saito et al., 1999; Sun et al., 2002). 본 연구에서도 흰

쥐에게 검은콩 추출물을 투여한 경우와 adenosine을 투여한 경우에 adenosine의 혈중농도변화를 비교한 결과, 검은콩 추출물을 투여한 경우에 adenosine의 혈중농도도 상대적으로 높고 제거되는 시간도 늦어지는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 18). 또한 흰 쥐와 사람을 전혈에서 adenosine 제거 정도를 비교한 결과 adenosine만을 처리한 경우 5 분 동안 거의 대부분 제거되었으나, 검은콩 추출물을 함께 처리한 경우 60% 정도만이 제거되었다 (Fig. 19). 이는 검은콩 추출물 내의 다른 성분이 adenosine이 적혈구에 흡수되는 과정을 저해하여 adenosine의 혈중 농도를 유지하는데 기여하는 것으로 생각되며, 추후 연구가 필요한 부분이다.

지금까지의 병적인 상태의 혈소판 활성화에 대한 연구는 대부분 혈소판의 부착보다는 혈소판 응집에 그 초점을 맞추었다. 그러나 GP IIb/IIIa와 같은 부착 단백질의 발현을 매개한 혈소판의 부착은 혈소판의 활성화에 있어서 필수적인 과정이다 (Calderwood, 2004; Abrams, 2005). GP IIb/IIIa는 soluble fibrinogen의 binding site가 되며, 세포 내 신호전달 활성화 및 세포골격단백의 변화에 기여하여 혈소판의 확장 (spreading) 및 모양 변화 (shape change)에 관여한다 (Calderwood et al., 2002; Jennings, 2009). 검은콩 추출물은 collagen에 의한 혈소판의 부착 및 GP IIb/IIIa의 발현, fibrinogen 부착을 억제하였다 (Fig. 20A & 22). 혈소판의 부착과 더불어 검은콩 추출물은 granule 분비 (P-selectin expression, serotonin secretion), thromboxane A₂ (TxA₂) 생성을 억제하였다 (Fig. 7 and 8). P-selectin은 혈관내피세포, 염증세포와 혈소판의 상호작용에 중요한 역할을 하며 혈전의 생성에 기여할 수 있다 (Vandendries et al., 2004; Nemmar et al., 2007). Serotonin과 TxA₂는 혈소판에 2차 agonist로 직접 작용하여 혈소판의 반응들을 증폭시킬 수 있으며, 혈관의 수축 및 혈관 평활근세포의 증식을 유발한다 (Pakala et al., 1997; Cirillo et al., 1999). 따라서 검은콩 추출물은 병적인 상태에서의 혈소판 활성화 과정을 전체적으로 억제하여 혈전 및 심혈관계 질환을 예방하는데

있어 상승효과를 보일 수 있다.

본 연구를 통하여 검은콩 추출물이 출혈 부작용 없이 항혈소판 및 항혈전 작용을 보일 수 있으며, 이러한 작용은 adenosine의 cAMP 신호경로 활성화를 매개함을 확인하였다 (Fig. 31). 이러한 결과들은 혈전 질환 및 심혈관계 질환의 예방에 있어서 검은콩의 이용 가능성과 식품 내 adenosine이 활성성분으로 역할 할 수 있음을 뒷받침한다. 나아가서 보다 안전한 심혈관계 질환의 예방에 있어서 식품들의 활용이 대안이 될 수 있음을 시사한다.

참 고 문 헌

- Abrams CS (2005) Intracellular signaling in platelets. *Curr Opin Hematol* **12**:401-405.
- Adlercreutz H (2002) Phyto-oestrogens and cancer. *Lancet Oncol* **3**:364-373.
- Agnelli G and Verso M (2011) Management of venous thromboembolism in patients with cancer. *J Thromb Haemost* **9 Suppl 1**:316-324.
- Amagase H, Petesch BL, Matsuura H, Kasuga S and Itakura Y (2001) Intake of garlic and its bioactive components. *J Nutr* **131**:955S-962S.
- Amin A, Stemkowski S, Lin J and Yang G (2007) Thromboprophylaxis rates in US medical centers: success or failure? *J Thromb Haemost* **5**:1610-1616.
- Andrews RK and Berndt MC (2004) Platelet physiology and thrombosis. *Thromb Res* **114**:447-453.
- Anthony MS, Clarkson TB and Williams JK (1998) Effects of soy isoflavones on atherosclerosis: potential mechanisms. *Am J Clin Nutr* **68**:1390S-1393S.
- Antithrombotic Trialists C (2002) Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ* **324**:71-86.
- Antithrombotic Trialists C, Baigent C, Blackwell L, Collins R, Emberson J, Godwin J, Peto R, Buring J, Hennekens C, Kearney P, Meade T, Patrono C, Roncaglioni MC and Zanchetti A (2009) Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials. *Lancet* **373**:1849-1860.
- Auger JM, Kuijpers MJ, Senis YA, Watson SP and Heemskerk JW (2005) Adhesion of human and mouse platelets to collagen under shear: a unifying model. *FASEB J* **19**:825-827.

- Barrett NE, Holbrook L, Jones S, Kaiser WJ, Moraes LA, Rana R, Sage T, Stanley RG, Tucker KL, Wright B and Gibbins JM (2008) Future innovations in anti-platelet therapies. *Br J Pharmacol* **154**:918-939.
- Baum JA, Teng H, Erdman JW, Jr., Weigel RM, Klein BP, Persky VW, Freels S, Surya P, Bakhit RM, Ramos E, Shay NF and Potter SM (1998) Long-term intake of soy protein improves blood lipid profiles and increases mononuclear cell low-density-lipoprotein receptor messenger RNA in hypercholesterolemic, postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* **68**:545-551.
- Berger JS, Roncaglioni MC, Avanzini F, Pangrazzi I, Tognoni G and Brown DL (2006) Aspirin for the primary prevention of cardiovascular events in women and men: a sex-specific meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA* **295**:306-313.
- Bhathena SJ and Velasquez MT (2002) Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. *Am J Clin Nutr* **76**:1191-1201.
- Bhatt DL, Hirsch AT, Ringleb PA, Hacke W and Topol EJ (2000) Reduction in the need for hospitalization for recurrent ischemic events and bleeding with clopidogrel instead of aspirin. CAPRIE investigators. *Am Heart J* **140**:67-73.
- Bhatt DL and Topol EJ (2003) Scientific and therapeutic advances in antiplatelet therapy. *Nat Rev Drug Discov* **2**:15-28.
- Booze CD and Serebruany VL (2006) The action of dipyridamole to prevent thrombosis: practical implications for the treatment and prevention of stroke. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* **8**:221-227.
- Briggs WH, Folts JD, Osman HE and Goldman IL (2001) Administration of raw onion inhibits platelet-mediated thrombosis in dogs. *J Nutr* **131**:2619-2622.
- Calderwood DA (2004) Integrin activation. *J Cell Sci* **117**:657-666.
- Calderwood DA, Yan B, de Pereda JM, Alvarez BG, Fujioka Y, Liddington RC and

- Ginsberg MH (2002) The phosphotyrosine binding-like domain of talin activates integrins. *J Biol Chem* **277**:21749-21758.
- Camm AJ and Garratt CJ (1991) Adenosine and supraventricular tachycardia. *N Engl J Med* **325**:1621-1629.
- Choung MG, Baek IY, Kang ST, Han WY, Shin DC, Moon HP and Kang KH (2001) Isolation and determination of anthocyanins in seed coats of black soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *J Agric Food Chem* **49**:5848-5851.
- Cirillo P, Golino P, Ragni M, Battaglia C, Pacifico F, Formisano S, Buono C, Condorelli M and Chiariello M (1999) Activated platelets and leucocytes cooperatively stimulate smooth muscle cell proliferation and proto-oncogene expression via release of soluble growth factors. *Cardiovasc Res* **43**:210-218.
- Cohen AT, Agnelli G, Anderson FA, Arcelus JI, Bergqvist D, Brecht JG, Greer IA, Heit JA, Hutchinson JL, Kakkar AK, Mottier D, Oger E, Samama MM, Spannagl M and Europe VTEIAGi (2007) Venous thromboembolism (VTE) in Europe. The number of VTE events and associated morbidity and mortality. *Thromb Haemost* **98**:756-764.
- Committee CS (1996) A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). CAPRIE Steering Committee. *Lancet* **348**:1329-1339.
- Cooper JA, Hill SJ, Alexander SP, Rubin PC and Horn EH (1995) Adenosine receptor-induced cyclic AMP generation and inhibition of 5-hydroxytryptamine release in human platelets. *Br J Clin Pharmacol* **40**:43-50.
- Craig WJ (1999) Health-promoting properties of common herbs. *Am J Clin Nutr* **70**:491S-499S.
- De La Cruz JP, Arrebola MM, Guerrero A and Sanchez de la Cuesta F (2002) Influence of nitric oxide on the in vitro antiaggregant effect of ticlopidine. *Vascul*

Pharmacol **38**:183-186.

- De Meyer SF, Stoll G, Wagner DD and Kleinschnitz C (2012) von Willebrand factor: an emerging target in stroke therapy. *Stroke* **43**:599-606.
- Elmarakby AA (2012) Reno-protective mechanisms of epoxyeicosatrienoic acids in cardiovascular disease. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **302**:R321-330.
- Farndale RW, Sixma JJ, Barnes MJ and de Groot PG (2004) The role of collagen in thrombosis and hemostasis. *J Thromb Haemost* **2**:561-573.
- Feijge MA, Ansink K, Vanschoonbeek K and Heemskerk JW (2004) Control of platelet activation by cyclic AMP turnover and cyclic nucleotide phosphodiesterase type-3. *Biochem Pharmacol* **67**:1559-1567.
- Fredholm BB (2007) Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell Death Differ* **14**:1315-1323.
- Furie B and Furie BC (2008) Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med* **359**:938-949.
- Garcia-Alonso M, Rimbach G, Rivas-Gonzalo JC and De Pascual-Teresa S (2004) Antioxidant and cellular activities of anthocyanins and their corresponding vitisins A--studies in platelets, monocytes, and human endothelial cells. *J Agric Food Chem* **52**:3378-3384.
- Garcia D and Quintana D (2011) Thrombosis and malignancy: a case-based review. *Semin Hematol* **48**:259-263.
- Gessi S, Merighi S, Fazzi D, Stefanelli A, Varani K and Borea PA (2011) Adenosine receptor targeting in health and disease. *Expert Opin Investig Drugs* **20**:1591-1609.
- Gooderham MH, Adlercreutz H, Ojala ST, Wahala K and Holub BJ (1996) A soy protein isolate rich in genistein and daidzein and its effects on plasma

- isoflavone concentrations, platelet aggregation, blood lipids and fatty acid composition of plasma phospholipid in normal men. *J Nutr* **126**:2000-2006.
- Goto S (2005) Cilostazol: potential mechanism of action for antithrombotic effects accompanied by a low rate of bleeding. *Atheroscler Suppl* **6**:3-11.
- Guerrero JA, Lozano ML, Castillo J, Benavente-Garcia O, Vicente V and Rivera J (2005) Flavonoids inhibit platelet function through binding to the thromboxane A2 receptor. *J Thromb Haemost* **3**:369-376.
- Guerrero JA, Navarro-Nunez L, Lozano ML, Martinez C, Vicente V, Gibbins JM and Rivera J (2007) Flavonoids inhibit the platelet TxA(2) signalling pathway and antagonize TxA(2) receptors (TP) in platelets and smooth muscle cells. *Br J Clin Pharmacol* **64**:133-144.
- Hasko G, Linden J, Cronstein B and Pacher P (2008) Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat Rev Drug Discov* **7**:759-770.
- He J, Gu D, Wu X, Chen J, Duan X, Chen J and Whelton PK (2005) Effect of soybean protein on blood pressure: a randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* **143**:1-9.
- Heemskerk JW, Kuijpers MJ, Munnix IC and Siljander PR (2005) Platelet collagen receptors and coagulation. A characteristic platelet response as possible target for antithrombotic treatment. *Trends Cardiovasc Med* **15**:86-92.
- Hooper WC and Evatt BL (1998) The role of activated protein C resistance in the pathogenesis of venous thrombosis. *Am J Med Sci* **316**:120-128.
- Hu FB (2003) Plant-based foods and prevention of cardiovascular disease: an overview. *Am J Clin Nutr* **78**:544S-551S.
- Hung YH, Huang HY and Chou CC (2007) Mutagenic and antimutagenic effects of methanol extracts of unfermented and fermented black soybeans. *Int J Food*

Microbiol **118**:62-68.

- Ishimi Y (2010) Dietary equol and bone metabolism in postmenopausal Japanese women and osteoporotic mice. *J Nutr* **140**:1373S-1376S.
- Jackson SP (2007) The growing complexity of platelet aggregation. *Blood* **109**:5087-5095.
- Jackson SP, Nesbitt WS and Westein E (2009) Dynamics of platelet thrombus formation. *J Thromb Haemost* **7 Suppl 1**:17-20.
- Jackson SP and Schoenwaelder SM (2003) Antiplatelet therapy: in search of the 'magic bullet'. *Nat Rev Drug Discov* **2**:775-789.
- Jacobson KA and Gao ZG (2006) Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* **5**:247-264.
- Jang EH, Moon JS, Ko JH, Ahn CW, Lee HH, Shin JK, Park CS and Kang JH (2008) Novel black soy peptides with antiobesity effects: activation of leptin-like signaling and AMP-activated protein kinase. *Int J Obes (Lond)* **32**:1161-1170.
- Jenkins DJ, Kendall CW, Jackson CJ, Connelly PW, Parker T, Faulkner D, Vidgen E, Cunnane SC, Leiter LA and Josse RG (2002) Effects of high- and low-isoflavone soyfoods on blood lipids, oxidized LDL, homocysteine, and blood pressure in hyperlipidemic men and women. *Am J Clin Nutr* **76**:365-372.
- Jennings LK (2009) Mechanisms of platelet activation: need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis. *Thromb Haemost* **102**:248-257.
- Jian L (2009) Soy, isoflavones, and prostate cancer. *Mol Nutr Food Res* **53**:217-226.
- Jurk K and Kehrel BE (2005) Platelets: physiology and biochemistry. *Semin Thromb Hemost* **31**:381-392.
- Kang J, Badger TM, Ronis MJ and Wu X (2010) Non-isoflavone phytochemicals in soy and their health effects. *J Agric Food Chem* **58**:8119-8133.

- Kim JM, Kim JS, Yoo H, Choung MG and Sung MK (2008) Effects of black soybean [Glycine max (L.) Merr.] seed coats and its anthocyanidins on colonic inflammation and cell proliferation in vitro and in vivo. *J Agric Food Chem* **56**:8427-8433.
- Kondo K, Suzuki Y, Ikeda Y and Umemura K (2002) Genistein, an isoflavone included in soy, inhibits thrombotic vessel occlusion in the mouse femoral artery and in vitro platelet aggregation. *Eur J Pharmacol* **455**:53-57.
- Kuo MC, Chang CY, Cheng TL and Wu MJ (2008) Immunomodulatory effect of *Antrodia camphorata* mycelia and culture filtrate. *J Ethnopharmacol* **120**:196-203.
- Lee SA, Shu XO, Li H, Yang G, Cai H, Wen W, Ji BT, Gao J, Gao YT and Zheng W (2009) Adolescent and adult soy food intake and breast cancer risk: results from the Shanghai Women's Health Study. *Am J Clin Nutr* **89**:1920-1926.
- Lerman BB and Belardinelli L (1991) Cardiac electrophysiology of adenosine. Basic and clinical concepts. *Circulation* **83**:1499-1509.
- Li R, Mitra N, Gratkowski H, Vilaire G, Litvinov R, Nagasami C, Weisel JW, Lear JD, DeGrado WF and Bennett JS (2003) Activation of integrin α IIb β 3 by modulation of transmembrane helix associations. *Science* **300**:795-798.
- Lu MP, Wang R, Song X, Chibbar R, Wang X, Wu L and Meng QH (2008) Dietary soy isoflavones increase insulin secretion and prevent the development of diabetic cataracts in streptozotocin-induced diabetic rats. *Nutr Res* **28**:464-471.
- Makheja AN and Bailey JM (1990) Antiplatelet constituents of garlic and onion. *Agents Actions* **29**:360-363.
- Marsh TG, Straub RK, Villalobos F and Hong MY (2011) Soy protein supports cardiovascular health by downregulating hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and sterol regulatory element-binding protein-2 and increasing

- antioxidant enzyme activity in rats with dextran sodium sulfate-induced mild systemic inflammation. *Nutr Res* **31**:922-928.
- McQuaid KR and Laine L (2006) Systematic review and meta-analysis of adverse events of low-dose aspirin and clopidogrel in randomized controlled trials. *Am J Med* **119**:624-638.
- Meadows TA and Bhatt DL (2007) Clinical aspects of platelet inhibitors and thrombus formation. *Circ Res* **100**:1261-1275.
- Messina M (2010) A brief historical overview of the past two decades of soy and isoflavone research. *J Nutr* **140**:1350S-1354S.
- Mezei O, Banz WJ, Steger RW, Peluso MR, Winters TA and Shay N (2003) Soy isoflavones exert antidiabetic and hypolipidemic effects through the PPAR pathways in obese Zucker rats and murine RAW 264.7 cells. *J Nutr* **133**:1238-1243.
- Michelson AD (2008) P2Y12 antagonism: promises and challenges. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**:s33-38.
- Michelson AD (2010) Antiplatelet therapies for the treatment of cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov* **9**:154-169.
- Minamino T, Kitakaze M, Asanuma H, Tomiyama Y, Shiraga M, Sato H, Ueda Y, Funaya H, Kuzuya T, Matsuzawa Y and Hori M (1998) Endogenous adenosine inhibits P-selectin-dependent formation of coronary thromboemboli during hypoperfusion in dogs. *J Clin Invest* **101**:1643-1653.
- Morel O, Kessler L, Ohlmann P and Bareiss P (2010) Diabetes and the platelet: toward new therapeutic paradigms for diabetic atherothrombosis. *Atherosclerosis* **212**:367-376.
- Nakashima S, Koike T and Nozawa Y (1991) Genistein, a protein tyrosine kinase inhibitor, inhibits thromboxane A2-mediated human platelet responses. *Mol*

Pharmacol **39**:475-480.

- Nemmar A, Hoet PH, Vandervoort P, Dinsdale D, Nemery B and Hoylaerts MF (2007) Enhanced peripheral thrombogenicity after lung inflammation is mediated by platelet-leukocyte activation: role of P-selectin. *J Thromb Haemost* **5**:1217-1226.
- Offermanns S (2006) Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ Res* **99**:1293-1304.
- Omoni AO and Aluko RE (2005) Soybean foods and their benefits: potential mechanisms of action. *Nutr Rev* **63**:272-283.
- Pakala R, Willerson JT and Benedict CR (1997) Effect of serotonin, thromboxane A₂, and specific receptor antagonists on vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation* **96**:2280-2286.
- Pase MP, Grima NA and Sarris J (2011) The effects of dietary and nutrient interventions on arterial stiffness: a systematic review. *Am J Clin Nutr* **93**:446-454.
- Paul S, Feoktistov I, Hollister AS, Robertson D and Biaggioni I (1990) Adenosine inhibits the rise in intracellular calcium and platelet aggregation produced by thrombin: evidence that both effects are coupled to adenylate cyclase. *Mol Pharmacol* **37**:870-875.
- Pipe EA, Gobert CP, Capes SE, Darlington GA, Lampe JW and Duncan AM (2009) Soy protein reduces serum LDL cholesterol and the LDL cholesterol:HDL cholesterol and apolipoprotein B:apolipoprotein A-I ratios in adults with type 2 diabetes. *J Nutr* **139**:1700-1706.
- Polosa R and Blackburn MR (2009) Adenosine receptors as targets for therapeutic intervention in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Trends Pharmacol Sci* **30**:528-535.

- Poredos P and Jezovnik MK (2011) Dyslipidemia, statins, and venous thromboembolism. *Semin Thromb Hemost* **37**:897-902.
- Rahman K and Lowe GM (2006) Garlic and cardiovascular disease: a critical review. *J Nutr* **136**:736S-740S.
- Rechner AR and Kroner C (2005) Anthocyanins and colonic metabolites of dietary polyphenols inhibit platelet function. *Thromb Res* **116**:327-334.
- Renda G and de Caterina R (2012) Impact of antiplatelet therapy in heart disease. *Adv Cardiol* **47**:5-19.
- Ridker PM, Cook NR, Lee IM, Gordon D, Gaziano JM, Manson JE, Hennekens CH and Buring JE (2005) A randomized trial of low-dose aspirin in the primary prevention of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* **352**:1293-1304.
- Rivas M, Garay RP, Escanero JF, Cia P, Jr., Cia P and Alda JO (2002) Soy milk lowers blood pressure in men and women with mild to moderate essential hypertension. *J Nutr* **132**:1900-1902.
- Rivera J, Lozano ML, Navarro-Nunez L and Vicente V (2009) Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. *Haematologica* **94**:700-711.
- Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Adams RJ, Berry JD, Brown TM, Carnethon MR, Dai S, de Simone G, Ford ES, Fox CS, Fullerton HJ, Gillespie C, Greenlund KJ, Hailpern SM, Heit JA, Ho PM, Howard VJ, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Makuc DM, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, McDermott MM, Meigs JB, Moy CS, Mozaffarian D, Mussolino ME, Nichol G, Paynter NP, Rosamond WD, Sorlie PD, Stafford RS, Turan TN, Turner MB, Wong ND, Wylie-Rosett J, American Heart Association Statistics C and Stroke Statistics S (2011) Heart disease and stroke statistics--2011 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* **123**:e18-e209.

- Ruggeri ZM and Mendolicchio GL (2007) Adhesion mechanisms in platelet function. *Circ Res* **100**:1673-1685.
- Saito H, Nishimura M, Shinano H, Makita H, Tsujino I, Shibuya E, Sato F, Miyamoto K and Kawakami Y (1999) Plasma concentration of adenosine during normoxia and moderate hypoxia in humans. *Am J Respir Crit Care Med* **159**:1014-1018.
- Serebruany VL, Malinin AI, Eisert RM and Sane DC (2004) Risk of bleeding complications with antiplatelet agents: meta-analysis of 338,191 patients enrolled in 50 randomized controlled trials. *Am J Hematol* **75**:40-47.
- Serebruany VL, Steinhubl SR, Berger PB, Malinin AI, Baggish JS, Bhatt DL and Topol EJ (2005) Analysis of risk of bleeding complications after different doses of aspirin in 192,036 patients enrolled in 31 randomized controlled trials. *Am J Cardiol* **95**:1218-1222.
- Setchell KD and Lydeking-Olsen E (2003) Dietary phytoestrogens and their effect on bone: evidence from in vitro and in vivo, human observational, and dietary intervention studies. *Am J Clin Nutr* **78**:593S-609S.
- Shi J, Arunasalam K, Yeung D, Kakuda Y, Mittal G and Jiang Y (2004) Saponins from edible legumes: chemistry, processing, and health benefits. *J Med Food* **7**:67-78.
- Shimizu A, Yano T, Saito Y and Inada Y (1985) Isolation of an inhibitor of platelet aggregation from a fungus, *Ganoderma lucidum*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **33**:3012-3015.
- Sim DS, Merrill-Skoloff G, Furie BC, Furie B and Flaumenhaft R (2004) Initial accumulation of platelets during arterial thrombus formation in vivo is inhibited by elevation of basal cAMP levels. *Blood* **103**:2127-2134.
- Song Y, Paik HY and Joung H (2008) Soybean and soy isoflavone intake indicate a

- positive change in bone mineral density for 2 years in young Korean women. *Nutr Res* **28**:25-30.
- Sun B, Le SN, Lin S, Fong M, Guertin M, Liu Y, Tandon NN, Yoshitake M and Kambayashi J (2002) New mechanism of action for cilostazol: interplay between adenosine and cilostazol in inhibiting platelet activation. *J Cardiovasc Pharmacol* **40**:577-585.
- Surin WR, Barthwal MK and Dikshit M (2008) Platelet collagen receptors, signaling and antagonism: emerging approaches for the prevention of intravascular thrombosis. *Thromb Res* **122**:786-803.
- Takahashi R, Ohmori R, Kiyose C, Momiyama Y, Ohsuzu F and Kondo K (2005) Antioxidant activities of black and yellow soybeans against low density lipoprotein oxidation. *J Agric Food Chem* **53**:4578-4582.
- Tertyshnikova S and Fein A (1998) Inhibition of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca²⁺ release by cAMP-dependent protein kinase in a living cell. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:1613-1617.
- USDA (2011) U.S. Dry bean statistics, 1970-2010, in, U.S. Department of Agriculture.
- van Ee JH (2009) Soy constituents: modes of action in low-density lipoprotein management. *Nutr Rev* **67**:222-234.
- Vandendries ER, Furie BC and Furie B (2004) Role of P-selectin and PSGL-1 in coagulation and thrombosis. *Thromb Haemost* **92**:459-466.
- Vane JR and Botting RM (2003) The mechanism of action of aspirin. *Thromb Res* **110**:255-258.
- Varga-Szabo D, Pleines I and Nieswandt B (2008) Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**:403-412.
- Vazzana N, Ranalli P, Cuccurullo C and Davi G (2012) Diabetes mellitus and thrombosis. *Thromb Res* **129**:371-377.

- Wangen KE, Duncan AM, Xu X and Kurzer MS (2001) Soy isoflavones improve plasma lipids in normocholesterolemic and mildly hypercholesterolemic postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* **73**:225-231.
- Wu TS, Tsang ZJ, Wu PL, Lin FW, Li CY, Teng CM and Lee KH (2001) New constituents and antiplatelet aggregation and anti-HIV principles of *Artemisia capillaris*. *Bioorg Med Chem* **9**:77-83.
- Xu B and Chang SK (2008) Total phenolics, phenolic acids, isoflavones, and anthocyanins and antioxidant properties of yellow and black soybeans as affected by thermal processing. *J Agric Food Chem* **56**:7165-7175.
- Yamada K, Naemura A, Sawashita N, Noguchi Y and Yamamoto J (2004) An onion variety has natural antithrombotic effect as assessed by thrombosis/thrombolysis models in rodents. *Thromb Res* **114**:213-220.
- Yan L and Spitznagel EL (2009) Soy consumption and prostate cancer risk in men: a revisit of a meta-analysis. *Am J Clin Nutr* **89**:1155-1163.
- Yang G, Shu XO, Li H, Chow WH, Cai H, Zhang X, Gao YT and Zheng W (2009) Prospective cohort study of soy food intake and colorectal cancer risk in women. *Am J Clin Nutr* **89**:577-583.
- Yun-Choi HS, Kim JH and Lee JR (1987) Potential inhibitors of platelet aggregation from plant sources, III. *J Nat Prod* **50**:1059-1064.

Abstract

Many clinical trials have demonstrated the beneficial effects of soybean (*Glycine max*) on general cardiovascular health. Among a variety of soybeans, black soybean is known to display diverse biological activities superior to yellow or green soybeans such as in antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities. However, few studies have been directed on the effect of black soybean on cardiovascular function. In this study, we aimed to investigate the effect of black soybean extract (BB) on platelet activation, a key contributor to thrombotic diseases. In the freshly isolated human platelets, BB has shown potent inhibitory activity on collagen-induced platelet aggregation while yellow soybean extract had only marginal activity. BB also attenuated serotonin secretion and P-selectin expression, important factors for the platelet-tissue interaction along with thromboxane A₂ formation. These in vitro results were further confirmed in ex vivo platelet aggregation measurement and in vivo venous thrombosis model where oral administration of BB reduced collagen-induced platelet aggregation and FeCl₃-induced thrombus formation significantly. Of particular note, administration of BB didn't increase coagulation disorder and bleeding risks, a common and severe side effect of antiplatelet drugs. A potential active ingredient for anti-platelet effects of BB was isolated and identified to be adenosine through bioassay-directed fractionation and NMR and ESI-MS analysis. These results indicate that black soybean can be a novel dietary supplement for the prevention of cardiovascular risks and the improvement of blood circulation. We further elucidated the molecular mechanism of BB-mediated anti-platelet activity and demonstrated the significant role of adenosine in BB-induced health effects. Adenosine-cAMP signaling is found to be responsible for BB-mediated effects, resulting in inhibition of collagen-stimulated platelet activation such as intraplatelet calcium increase, adhesion

receptor GP IIb/IIIa expression, fibrinogen binding and further platelet adhesion/aggregation. Taken together, we provide a complete understanding for molecular mechanism of BB-induced anti-platelet activity and a new insight into the role of adenosine as a bioactive compound in soybeans.

Key words: Black soybean, platelet, platelet aggregation, adenosine, cAMP, thrombosis

Student Number: 2008-30995

