



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](#)

약학석사학위논문

중금속 비소의 혈소판 형태 변화를  
매개한 혈소판 활성화 기전에 관한  
연구

Effects of arsenic on platelet activation through  
the induction of platelet shape change

2015년 2월

서울대학교 대학원

약학과 예방약학전공

신은경

중금속 비소의 혈소판 형태 변화를 매개한  
혈소판 활성화 기전에 관한 연구

Effects of arsenic on platelet activation through  
the induction of platelet shape change

지도교수 정진호

이 논문을 약학석사학위논문으로 제출함

2014년 11월

서울대학교 대학원

약학과 예방약학전공

신은경

신은경의 약학석사학위논문을 인준함

2014년 12월

위원장 \_\_\_\_\_ (인)

부위원장 \_\_\_\_\_ (인)

위원 \_\_\_\_\_ (인)

## 초 록

중금속 비소는 환경 중에 널리 존재하는 원소로서, 주로 음용수를 통하여 인체에 노출된다. 만성적인 비소 노출이 다양한 심혈관계 질환을 유발한다는 사실은 역학적으로 보고되어 있으며 이러한 원인 중의 하나로 비소에 의한 혈전 생성 작용에 대해 연구가 활발히 진행 중에 있지만 아직 정확한 기전은 밝혀지지 않았다. 한편 혈소판 응집에 의한 혈전 생성 기전은 여러 단계에 걸쳐서 진행되는데 일반적으로 다양한 자극에 의해 활성화된 혈소판은 그 형태가 바뀌는 shape change 과정을 수반하면서 응집이 형성된다. Shape change 과정은 활성화된 혈소판 내 cytoskeletal protein의 integrity가 변화하면서 발생하는데 이러한 shape change 과정에서 혈소판 내 과립들이 분비되고 integrin이 활성화되면서 혈소판의 응집이 촉진된다.

본 연구에서는 혈전 생성 및 다양한 심혈관 질환에 기여하는 혈소판을 대상으로 하여 비소가 혈소판의 활성화와 shape change 및 혈전 생성에 작용하는 기전을 제시하고자 하였다. 사람의 혈액으로부터 분리한 Platelet rich plasma에 Sodium Arsenite를 가하여 혈소판의 활성화를 유도하였다. 비소에 의한 혈소판의 활성화 효과는 혈소판의 형태적인 변화를 통해 확인하였다. 비소에 의한 혈소판의 활성화에 관여하는 key protein을 찾기 위해 proteomic analysis를 하였으며 이를 통해 비소에 의해 혈소판 내 filamin A protein의 인산화가 유의적으로 증가한다는 결과를 얻었다. Western blot을 통해 비소가 filamin A의 인산화 증가하며 이것이 filamin A의 안정화에 관여하는 것을 확인하였고 이러한 filamin A의 안정화는 Glycoprotein(GP)Iba unit과의 interaction 을 통해 혈소판 모양 변화에 영향을 주었다. GPIba는 비소 농도 의존적으로 surface expression이 감소하였으며 Filamin A와 함께 세포 안쪽으로 이동하였다.

Confocal microscopy를 이용하여 비소가 실제로 actin 의 assembly를 조절하는지 확인한 결과 비소에 의해 actin 의 assembly가 변화하는 것을 확인할 수 있었으며 actin의 assembly에 관여하는 상위 조절 단백질인 small GTPase protein의 활성을 측정한 결과 비소에 의해 그 활성이 감소하는 것을 확인하였다. Small GTPase protein의 하위 단계에서 actin polymerization을 조절하는 actin capping protein인 cofilin의 경우에도 그 활성이 시간에 따라 변하면서 actin dynamic에 영향을 미치는 것으로 나타났다. Actin dynamic이 변화함에 따라 혈소판  $\alpha$ -granule의 분비가 증가하는지 확인하기 위해 p-selectin의 발현을 측정한 결과 비소 농도 의존적으로 p-selectin의 발현이 증가하였다. 비소에 의한 자체적인 혈소판 응집 효과는 나타나지 않았으며 혈소판 agonist인 thrombin과 ADP에 의한 혈소판 응집 효과를 비소가 농도 의존적으로 촉진시켰다.

이상의 결과를 종합하면, 비소는 혈소판을 활성화시켜 그 형태를 변화시키며 이러한 형태변화는 혈소판의 Glycoprotein Iba - Filamin A의 relocalization 및 actin assembly의 변화를 통해 나타나는 결과임을 알 수 있다. 비소에 의해 형태적인 변화를 나타내는 혈소판에서 부착단백질인 P-selectin의 발현이 증가하였으며 agonist에 의한 혈액 응고 작용이 촉진되었다. 따라서 본 연구결과는 비소 노출에 의한 심혈관계 질환의 발병 원인 중 하나로 지목되고 있는 혈전 생성을 설명하는 한 가지 기전으로 제시될 수 있을 것이다.

주요어 : 혈소판, 비소(Arsenic), Shape change, Actin, Filamin A, GPIba, P-selectin, 혈액 응고 촉진 활성

## 목 차

초 록 .....	i
목 차 .....	iii
List of Figures .....	iv
List of Abbreviations .....	v
서 론 .....	1
실험 방법 .....	5
시약 및 antibodies .....	5
Platelet rich plasma의 조제 .....	5
주사전자현미경 (SEM)을 이용한 혈소판 모양 변화 관찰 .....	6
Proteomic analysis .....	6
Filamin A 의 발현 및 인산화 측정 .....	6
GPIIb 및 P-selectin 발현 측정 .....	7
GPIIb 및 Filamin A redistribution 관찰 .....	8
Confocal microscopy를 이용한 Actin assembly 관찰 .....	8
Small GTPase protein activity 측정 .....	9
Platelet aggregation 측정 .....	10
통계 처리 .....	10
실험 결과 .....	11
고 찰 .....	23
참 고 문 헌 .....	28
보 충 자 료 .....	34
Abstract .....	36

## List of Figures

- Figure 1.** Effects of arsenic on platelet morphological change
- Figure 2.** Proteomic analysis of arsenic treated platelets
- Figure 3.** Effects of arsenic on filamin A phosphorylation and fragmentation in platelets
- Figure 4.** Effects of arsenic on surface expression of Glycoprotein Ib alpha (GPIba) in platelets
- Figure 5.** Effects of arsenic on redistribution of GPIba and filamin A in platelets
- Figure 6.** Effects of arsenic on actin dynamic changes and related molecular activity in platelets
- Figure 7.** Effects of arsenic on P-selectin expression in platelets
- Figure 8.** Potentiation effects of arsenic on platelet aggregation

## List of Abbreviations

<b>ADP</b>	:	adenosine diphosphate
<b>As</b>	:	arsenic
<b>BSA</b>	:	bovine serum albumin
<b>CVD</b>	:	cardiovascular diseases
<b>DW</b>	:	distilled water
<b>EDTA</b>	:	ethylenediaminetetraacetic acid
<b>FACS</b>	:	Fluorescence-activated cell sorting
<b>FITC</b>	:	fluorescein isothiocyanate
<b>GDP</b>	:	Guanosine-5'-diphosphate
<b>GP</b>	:	glycoprotein
<b>GTP</b>	:	Guanosine-5'-triphosphate
<b>HEPES</b>	:	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
<b>PBS</b>	:	phosphate buffered saline
<b>PPP</b>	:	platelet poor plasma
<b>PRP</b>	:	platelet rich plasma
<b>PE</b>	:	phycoerythrin
<b>PS</b>	:	phosphatidylserine
<b>SDS</b>	:	Sodium dodecyl sulfate
<b>SEM</b>	:	scanning electron microscopy
<b>Tris</b>	:	tris(hydroxymethyl)aminomethane

# 서 론

## 중금속 비소의 심혈관 독성

비소는 환경 중에 널리 분포하는 금속물질로서, 강한 독성을 가지고 있는 주요 환경오염물질 중 하나이다. 환경 내에 존재하는 비소의 형태는 여러 가지가 있으나 무기 비소인 3 가 비소 As (III)와 5 가 비소 As (V)가 많은 부분을 차지한다. 비소의 독성은 화학 형태에 따라 크게 다르며 일반적으로 유기형태의 비소보다는 무기형태의 비소가 독성이 크며 3 가 비소가 5 가 비소에 비해 독성이 더 큰 것으로 알려져 있다. (Hughes, M. F., 2002)

일반적으로 인체가 비소에 노출되는 가장 주요한 경로는 음용수와 식품의 오염을 통한 것이다. 음용수를 통한 만성적인 비소 노출은 세계적인 문제로 대두되어 큰 주목을 받고 있으며 이에 따라 미국 환경부 (Environmental Protection Agency; EPA)와 세계 보건 기구 (World Health Organization; WHO)에서는 음용수 중 비소 규제치를 10 µg/L (ppb)로 설정하여 음용수 중 비소 농도를 낮추려는 노력을 기울이고 있다. 그럼에도 불구하고 전 세계적으로 수천만 명의 인구가 만성적으로 비소에 노출되어 있으며 비소 노출 인구 중 1300 만 명이 미국에서 (U.S. Environmental Protection Agency, 2009), 5 천만 명 이상이 방글라데시에서 보고되고 있다 (British Geological Survey, 2007). 라틴아메리카 (Bhattacharya et al., 2006) 및 호주 (O'Shea B et al., 2007) 에서도 기준 농도 이상의 비소가 검출되고 있으며 아시아 지역에서도 만성적 비소 노출에 의한 독성을 주요한 환경 재해로 보고하면서 계속해서 그 심각성을 경고하고 있다.

비소를 만성적으로 섭취하였을 경우 피부와 신장, 폐, 방광 등 여러 장기에서 암이 발병함이 알려져 있으며 (Tchounwou PB, 1999) 발암성은 비소

의 독성 중 가장 큰 비중을 차지한다. International Agency for Research on Cancer (IARC) 에서는 인체 역학 조사를 근거로 하여 비소를 1급 발암 물질로 평가하였다. 비소는 발암성 이외에도 여러 가지 기전을 경유한 다양한 독성을 유발하는데 비소의 만성적인 노출에 의한 심혈관계 질환, 호흡기계 질환, 피부 질환 및 신경계 질환의 유발이 보고되고 있으며 (Tchounwou et al., 2003) 그 중 비소에 의한 심혈관계 질환의 발병은 발암성과 더불어 비소의 주요한 독성으로 주목 받고 있다 (Abernathy et al., 2003; Yoshida et al., 2004). 음용수를 통한 만성적인 비소의 노출이 고혈압 유발을 촉진시키고 심혈관 질환에 의한 치사율을 증가시킨다는 역학적인 보고가 있으며 (National Research Council, 2001; Rahman M. et al., 1999) 비소의 만성적 노출과 ischemic heart disease (ISHD) 에 의한 치사율 증가에 대해서도 보고된 바가 있다 (Chen CJ et al., 1996). 이 밖에도 cerebrovascular disease, atherosclerosis 등이 비소 오염 지역의 역학 조사에서 보고된 바 있으며 그 심각성이 최근까지 계속해서 대두되고 있다 (Tseng, C. H., 2003, 2008; Chen, Y., 2011). 그렇지만 비소가 심혈관 질환을 유발하는 기전에 관해서는 아직까지 명확한 규명이 이루어지지 않은 상태이며, 이를 확인하려는 연구들이 활발히 진행되고 있다.

## 혈소판의 활성화 및 모양 변화

혈액의 한 구성 성분인 혈소판은 megakaryocyte 로부터 분화 생성되며 안정적인 상태의 혈소판은 둥근 판 모양 (discoid)을 하고 있으며 핵이 없는 것이 특징이다. 정상 상태에서의 혈소판은 혈관 손상 등의 상황에서 과도한 혈액 손실을 방지하기 위한 지혈 작용을 담당하며 이러한 작용은 혈소판의 활성화에 의한 혈관 내 부착, 모양 변화, 분비 및 응집에 이르는 일련의 과정을 통해 이루어진다 (Broos, K., 2012). 혈소판의 내부에는 다양한 cytoskeleton 구조가 발달되어 있으며 비활성 상태에서 둥근 판 모양을 유지하다가 활성화 시 빠른 모양 변화 (Shape change)를 유발한다. 이러한 모

양 변화에 의해 혈소판의 부착 및 응집이 용이하게 되며 결과적으로 안정적인 혈소판 응집체를 형성하는데 기여한다 (Jackson, S. P., 2007). 혈소판의 모양 변화는 혈소판 활성화의 initial 단계에서 나타나며 이 때 cytoskeleton의 재조합이 유발되어 actin dynamic의 변화가 나타난다 (Hartwig, J. H., 1992). 이러한 shape change 과정에서 혈소판 내부의 소기관들이 가운데로 모이게 되고 granule 내에 함유되어 있던 다양한 혈소판 활성화 물질들이 분비되는데 이러한 물질들은 이차적인 혈소판 활성화를 유발함으로써 견고한 혈소판 응집체를 형성하는데 기여한다 (Murugappan et al., 2004).

### 심혈관 질환에서의 혈소판의 역할

혈소판은 정상 상태에서 지혈 작용을 담당하며 심혈관계의 항상성 유지에 중요한 역할을 하지만 병리 상태에서 과도하게 활성화되면서 다양한 심혈관계 질환의 발병 또는 진전을 야기한다 (Ruggeri, Z. M., 2002; Gawaz, M., 2004). 이러한 과정은 주로 과도한 혈전 생성에 의해 매개되는데 생성된 혈전으로 인해 심장 혈관이나 뇌혈관 등의 폐색이 유발될 수 있다. 말초 순환 역시 과도한 혈소판 활성화 및 혈전 생성의 영향을 받음으로써 사지 순환 등에 장애가 생기는 경우도 보고된다 (Matsagas et al., 2002). 또한 혈소판 유래의 여러 물질들은 만성적인 염증 반응을 유발하여 심혈관계 질환을 심화시키는데 (Wagner and Burger, 2003; Weber, 2005) 혈소판에서 유래된 P-selectin 과 여러 종류의 cytokine 이 동맥 경화의 진행을 촉진시킴이 보고되었다 (Burger, P. C., 2003).

### 연구 목적

본 연구실에서는 과거에 혈소판에 대한 비소의 효과를 검토하였으며 3 가 무기 비소가 혈소판 응집을 촉진시키고 부착 단백질의 발현을 증가시킴으로써 혈소판을 활성화시킴을 확인하였다 (Lee, M. Y., 2002). 또 비소에 의해서 혈소판의 phosphatidylserine 의 발현이 증가하고 이에 따라 혈소판의

coagulant activity 가 증가함을 확인한 바 있다 (Bae, O. N., 2007). 그러나 비소에 의한 혈소판 응집 촉진 효과에 대한 기전에 대해서는 아직 밝혀진 바가 없다.

본 연구에서는 비소가 혈소판의 활성화 단계 중 initial 단계인 혈소판의 shape change 에 미치는 영향을 확인하고 단계적으로 혈소판의 응집 촉진 효과에 미치는 영향을 확인하고자 하였으며 결과적으로 이러한 비소의 혈소판 활성화 효과에 대한 세포 내 기전을 규명하고자 하였다. 이러한 일련의 연구를 통하여 비소의 혈소판 shape change 유발을 매개한 혈소판 활성화 및 혈액 응고 촉진 활성을 만성적인 비소 노출 집단에서 발견되는 심혈관 질환 발병의 한 가지 가능성 있는 기전으로 제시하고자 하였다.

## 실 험 방 법

### 시약 및 antibodies

Sodium arsenite,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{MgCl}_2$ , HEPES, glucose,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaHCO}_3$ , Tris/HCl, ethanol, glutaraldehyde, formaldehyde, osmium tetroxide ( $\text{OsO}_4$ ), Triton X-100, thrombin, Adenosine diphosphate (ADP), poly-L-lysine, BSA 등의 시약은 모두 Sigma chemical Co. (St. Louis, USA)로부터 구입하였다.

Fluorescein-isothiocyanate (FITC)-labeled monoclonal P-selectin antibody (CD62p-FITC), R-phycoerythrin (PE)-labeled mouse anti-human GPIIb (CD42b-PE)는 BD biosciences (San Jose, CA)에서 구입하였다. Anti-filamin A antibody, anti-phospho-filamin A antibody는 Abcam (Cambridge, UK)에서, 나머지 antibody는 모두 Cell Signaling Technology (Danvers, US)에서 구입하였다. RhoA/Rac1/Cdc42 Activation Assay Combo Biochem Kit는 Cytoskeleton (Denver, USA)에서 구입하였으며 그 밖의 시약은 모두 특급 시약을 구입하여 사용하였다.

### Platelet rich plasma의 조제

사람의 혈액으로부터 Platelet rich plasma (PRP)를 조제하기 위하여 2 주 이상 약물 복용하지 않은 건강한 남성의 정맥에서 Sodium citrate를 항응고제로 하여 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액을 900 rpm에서 15 분간 원심 분리하여 상층액에서 platelet rich plasma (PRP)를 얻고 pellet을 3000 rpm에서 20 분간 원심 분리하여 상층액에서 platelet poor plasma (PPP)를 얻는다. PRP 중의 혈소판 수는 광학 현미경을 이용하여 hematocytometer로 세었으며, PPP로 희석하여 1 ml에  $3 \times 10^8$ 개의 혈소판이 포함되도록 한 후 실험에 이용하였다.

## 주사전자현미경 (SEM)을 이용한 혈소판 모양 변화 관찰

비소에 의한 혈소판의 모양 변화를 Scanning electron microscopy (SEM)을 이용하여 관찰하였다. 비소 또는 용매인 증류수를 PRP에 가하고 37°C에서 2시간 반응 시킨 다음 2000 g에서 1 분간 원심 분리하여 혈소판을 pellet으로 가라앉힌 후 상층액을 제거하였다. 2% glutaraldehyde를 가해 pellet을 재현탁 시킨 후 4°C에서 1시간 동안 pre-fixation 하였다. 고정된 현탁액을 PBS를 이용하여 2번 세척한 후 1 % osmium tetroxide (OsO<sub>4</sub>) 고정액을 가하여 상온에서 30 분간 post-fixation 하였다. 이를 PBS로 2번 세척한 후 30, 50, 70, 90, 100%의 에탄올 용액을 순차적으로 각각 10분씩 가하여 시료를 탈수시켰다. 100 %의 Ethanol로 세척한 후 재현탁한 시료를 알루미늄 호일이 붙은 구리 mount에 적당량 올린 후 데시케이터에서 완전히 건조시켰다. 백금으로 coating 하여 JSV 540 scanning electron microscope (JEOL, Japan)에서 관찰하였다.

## Proteomic analysis

PRP에 비소 또는 증류수를 2 시간 동안 처리한 후 원심 분리하여 상층액을 제거한 혈소판 pellet을 Genomine, Inc. 에 의뢰하여 2DE gel로 분리한 후 인산화된 단백질을 staining 하였다. 세 번의 실험을 통해 비소를 처리한 군에서 유의적으로 인산화가 증가하는 spot을 선정하여 4700 Proteomics Analyzer MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems)로 아미노산 서열을 분석하였다.

## Filamin A 의 발현 및 인산화 측정

Proteomic analysis를 통해 도출된 filamin A의 발현 및 인산화를 western blotting 으로 확인하였다. 비소 또는 증류수를 가하여 37°C에서 2 시간동안 incubation 시킨 PRP를 600 g에서 5 분간 원심 분리하였다. 상층

액을 제거한 후 protease inhibitor와 phosphatase inhibitor가 포함된 lysis buffer 300  $\mu$ l로 재현탁하여 ice에서 1 시간 동안 lysis 시켰다. Lysate를 10,000 g에서 20 분간 원심 분리하여 debris를 제거하였다.

이렇게 얻은 혈소판 lysate를 단백질 정량한 뒤 7.5 % SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) 용 acrylamide gel에서 분리하였고, PVDF membrane으로 transfer 하였다. 5% BSA가 포함된 Tris/glycine buffer (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA)로 1시간 동안 blocking 하고 anti-filamin A antibody 또는 anti-phospho-filamin A antibody를 4  $^{\circ}$ C에서 하루 동안 부착시켰다. Membrane의 세척은 0.05% Tween-20을 포함한 Tris/glycine buffer를 사용하였고 antibody 희석은 5 % BSA를 포함한 Tris/glycine buffer를 사용하였다. 1차 antibody 부착이 끝난 membrane 을 세척한 뒤 2차 antibody인 HRP-linked anti-rabbit IgG 또는 anti-mouse IgG로 2시간 동안 상온에서 부착시키고 다시 세척하여 Super Signal West Femto 를 이용해 발색하였다. 단백질 band의 분석은 Quantity One 1-D analysis software (Bio-Rad laboratories, Inc)를 이용하였다.

## **GPIIb 및 P-selectin 발현 측정**

PRP에 비소 또는 용매인 증류수를 가하여 37  $^{\circ}$ C에서 2 시간 동안 반응시켰다. 시료 중 10  $\mu$ l를 취하여 tyrode's buffer 290  $\mu$ l에 가함으로써 반응을 정지시켰다. 희석한 시료 중 50  $\mu$ l를 취하여 anti-GPIIb-PE 또는 anti-P-selectin-FITC 10  $\mu$ l를 미리 넣어 놓은 FACS tube에 넣어 차광 조건에서 20 분 동안 상온에서 반응시켰다. 여기에 tyrode's buffer 500  $\mu$ l를 가함으로써 반응을 종결시켰다. 준비된 flow cytometric analysis 용 sample 을 BD FACSCaliber (BD bioscience)에서 분석하였다. 분석 프로그램으로는 CellQuest Pro software를 이용하였다. Flow cytometry는 혈소판 분석을 위해 최적화된 상태로 calibration하여 사용하였으며 네 가지 지표로서 입자분석을 위한 forward scatter, side scatter, orange (PE), green (FITC)

fluorescence를 이용하여 분석하였다. GPIIb/IIIa 와 P-selectin의 발현 정도는 PE 와 FITC fluorescence에 의해 정량적으로 측정하였다.

### **GPIIb/IIIa 및 Filamin A redistribution 관찰**

Confocal microscopy를 이용하여 혈소판 내 GPIIb/IIIa와 filamin A의 localization 변화를 관찰하였다. 비소 또는 용매인 증류수를 가하여 37 °C에서 2 시간 동안 반응시킨 PRP를 원심 분리하여 상층액 제거 후 PBS로 세척하였다. 혈소판 현탁액을 Poly-L-lysine이 coating된 cover glass에 1 ml씩 가하여 37 °C에서 30 분간 부착시켰으며 세척을 통해 부착되지 않은 혈소판을 제거하였다. 부착된 혈소판에 2 % formaldehyde를 가하여 상온에서 10 분간 고정하였다. PBS로 세척 후 0.5 % Triton X-100 1 ml를 가하여 상온에서 10 분간 permeation 시키고 2 % BSA가 포함된 PBS를 가하여 상온에서 1 시간 동안 blocking 시켰다. anti-GPIIb/IIIa-PE antibody 및 anti-filamin A antibody 를 가하여 차광 조건에서 1 시간 동안 반응시킨 후 PBS로 세척하였다. Anti-rabbit-FITC antibody를 가하여 30 분 동안 반응시킨 sample을 PBS로 세척한 후 mounting solution을 이용하여 slide glass에 mounting 하였다. Confocal microscopy 관찰은 argon laser로 형광 입자를 activation 시킨 후 Leica confocal microscopy (Leica, Wetzlar, Germany)를 이용하여 수행하였다.

### **Confocal microscopy를 이용한 Actin assembly 관찰**

비소 또는 용매인 증류수를 가하여 37 °C에서 2 시간 동안 반응시킨 PRP를 원심 분리하여 상층액 제거 후 PBS로 세척하였다. 혈소판 현탁액을 Poly-L-lysine이 coating된 cover glass에 1 ml씩 가하여 37 °C에서 30 분간 부착시켰으며 세척을 통해 부착되지 않은 혈소판을 제거하였다. 부착된 혈소판에 2 % formaldehyde를 가하여 상온에서 10 분간 고정하였다. PBS로 세척 후 0.5 % Triton X-100 1 ml를 가하여 상온에서 10 분간

permeation 시키고 2 % BSA가 포함된 PBS를 가하여 상온에서 1 시간 동안 blocking 시켰다. PBS에 1:500으로 희석시킨 Rhodamin-phalloidin 과 DNase I을 차광 조건에서 1 시간 동안 반응시켜 각각 F-actin과 G-actin을 staining 한 후 PBS로 세척하였다. Mounting solution을 이용하여 slide glass에 mounting 한 후 Leica confocal microscopy (Leica, Wetzlar, Germany)를 이용하여 관찰하였다.

### Small GTPase protein activity 측정

RhoA/Rac1/Cdc42 Activation Assay Combo Biochem Kit (Cytoskeleton, Inc.)를 사용하여 actin assembly를 조절하는 상위 단백질인 small GTPase protein의 activity를 측정하였다. 비소 또는 용매인 증류수를 가하여 2 시간 동안 incubation 한 PRP를 600 g에서 5 분간 원심 분리하였다. 상층액을 제거한 후 protease inhibitor와 phosphatase inhibitor가 포함된 lysis buffer 300  $\mu$ l로 재현탁하여 ice에서 5 분 동안 lysis 시켰다. Lysate를 4  $^{\circ}$ C 조건 하에 10,000 g에서 1 분간 원심 분리하여 debris를 제거하였다.

상층액 중 25  $\mu$ l에는 2 $\times$  Laemmli sample buffer를 가하고 95  $^{\circ}$ C에서 5 분간 boiling 하여 total small GTPase protein 샘플을 얻었다. 나머지 상층액 중 250  $\mu$ l에는 20  $\mu$ l의 PAK-GST Protein beads를 가하고 4  $^{\circ}$ C에서 1 시간 동안 교반 시키면서 active small GTPase protein의 binding을 유도하였다. Incubation 후 4  $^{\circ}$ C에서 3,000 g로 1 분간 원심 분리하여 beads를 가라앉히고 상층액을 제거하였다. Wash buffer 500  $\mu$ l를 가하여 beads를 세척한 후 2 $\times$  Laemmli sample buffer를 가하고 95  $^{\circ}$ C에서 5 분간 boiling하여 active small GTPase protein 샘플을 얻었다. 이렇게 얻은 샘플을 15 % SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) 용 acrylamide gel에서 분리하였고, PVDF membrane으로 transfer 하였다. 5% BSA가 포함된 Tris/glycine buffer (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA)로 1시간 동안 blocking 하고 anti-Rac1 또는 anti-Cdc42 antibody를 4  $^{\circ}$ C에서 하루 동

안 부착시켰다. Membrane의 세척은 0.05% Tween-20을 포함한 Tris/glycine buffer를 사용하였고 antibody 희석은 5 % BSA를 포함한 Tris/glycine buffer를 사용하였다. 1차 antibody 부착이 끝난 membrane을 세척한 뒤 2차 antibody인 HRP-linked anti-mouse IgG 로 2시간 동안 상온에서 부착시키고 다시 세척하여 Super Signal West Femto 를 이용해 발색하였다. 단백질 band의 분석은 Quantity One 1-D analysis software (Bio-Rad laboratories, Inc)를 이용하였다.

### Platelet aggregation 측정

혈소판의 응집 정도를 lumi-aggregometer (Chrono-Log Co., USA)를 이용하여 turbidity 변화정도로 측정하였다. PRP의 light transmission을 0 %, PPP의 light transmission을 100 %로 맞춘 후 37℃에서 혈소판의 aggregation 정도에 따른 light transmission을 측정하였다. 측정 시 silicon 으로 코팅된 aggregometer cuvette을 사용하였으며, 반응이 일어나는 동안 1,000 rpm에서 지속적으로 교반시켰다. PRP를 aggregometer cuvette에 넣고 비소 또는 증류수를 가한 후 1 시간 동안 자체 응집 효과를 측정하였으며 positive control 로는 200  $\mu$ M의 메틸수은을 사용하였다. 또 비소에 의한 혈소판 응집 촉진 효과를 확인하기 위해 비소 또는 증류수를 가하여 2 시간 동안 37 °C에서 incubation 시킨 PRP를 aggregometer cuvette에 넣고 sub-threshold 농도의 thrombin 또는 adenosine-diphosphate (ADP)를 가한 후 5분간 혈소판 응집 정도를 관찰하였다.

### 통계처리

실험 결과는 mean  $\pm$  SEM으로 표시하였다. 두 군 사이의 차이는 t-test 로서 검증하였으며, 세 군 이상의 비교에서는 ANOVA test를 수행한 후 Duncan's multiple range test를 실시하여 유의성을 검증하였다. 유의적인 차이는 p value가 0.05 이하인 경우에 인정하였다.

## 실 험 결 과

### 비소에 의한 혈소판 모양 변화 및 기전

비소가 혈소판의 활성화에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위해 주사전 자현미경 (SEM)을 이용하여 비소에 의한 혈소판의 모양 변화를 관찰하였다. 혈소판에 비소 10, 25, 50  $\mu\text{M}$  또는 vehicle인 증류수를 2 시간동안 처리하여 관찰한 결과 비소 농도 의존적으로 혈소판의 모양이 변화하는 것을 확인하였다 (Fig. 1).

비소에 의한 혈소판 shape change 기전에 관여하는 후보 단백질을 찾아내기 위해 Proteomic analysis를 의뢰하였으며 3 번의 실험을 통해 비소 처리한 그룹에서 유의적으로 인산화가 증가하는 단백질 spot을 찾아내었다. Mass 분석을 통해 아미노산 서열을 비교한 결과 단백질 후보들 중 2개의 spot이 filamin A protein과 matching 되었으며 (Fig. 2) 이를 통해 비소가 actin의 cross-linking에 관여하는 cytoskeletal protein인 filamin A의 인산화를 증가시킴을 확인하였다.

Filamin A는 homodimer 형태로 존재하는 280 kDa 의 cytoskeletal protein 으로서 actin polymer 간의 cross-linking 에 관여하며 세포 내 다양한 binding partner 와 상호작용하여 세포의 adhesion, spreading 및 migration을 조절한다 (Nakamura, 2011; Stossel T. P., 2001). 또한 혈소판에서 Filamin A는 membrane 에 존재하는 다양한 glycoprotein 및 integrin 과 binding 하여 actin polymer를 혈소판 표면에 anchor 시킴으로써 혈소판의 모양을 유지하는데 중요한 작용을 하는 것으로 보고되어 있다 (van der Flier, A., 2001). Filamin A의 인산화는 다양한 protein kinase 에 의해 유도되는데 p21-activated kinase 1 (Pak1)에 의해 인산화 된 filamin A는 Pak1 과 상호작용 하여 cytoskeletal reorganization을 유발하고 ruffle을 형성한다고 보고되어 있다 (Vadlamudi, R. K., 2002). 인산화에 의해 filamin A의

actin cross-linking activity가 감소한다는 보고도 있으며 (Cukier, I. H., 2007) 또 다른 연구에서는 filamin A의 integrin binding affinity가 조절된다고 예측하고 있지만 (Chen, H. S., 2009) 아직 filamin A 인산화의 역할에 대해서는 의견이 분분하다.

Western blotting을 통해 filamin A의 인산화가 비소 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였으며 인산화가 증가함과 동시에 filamin A의 degradation이 비소 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 3). Filamin A의 인산화에 의해 filamin A가 안정화가 되며 이로 인해 calpain에 의한 filamin A의 proteolysis가 감소한다는 보고가 있으며 (Ming Chen et al., 1989) 본 결과를 통해 비소에 의해 filamin A의 인산화가 유도되는 동시에 안정화되는 것을 확인할 수 있었다. Filamin A를 fragmentation 시키는 효소인 calpain의 활성화에 대한 비소의 영향을 확인한 결과 비소 농도에 따라 calpain의 활성화에는 변화가 없었으며 (suppl. 1) 이를 통해 비소가 filamin A의 fragmentation을 조절하는 기전이 calpain의 활성화 변화에 의한 것은 아님을 추측할 수 있었다.

Filamin A는 혈소판 표면에 분포되어 있는 glycoprotein 인 GPIIb/IIIa unit과 binding 하여 혈소판의 모양을 형성하며 (Berndt, M. C., 2006) 두 단백질간의 상호작용이 혈소판의 크기를 결정한다고 보고되어 있다 (Taisuke Kanaji, 2012). 이러한 참고 문헌을 토대로 혈소판 내 Filamin A의 인산화와 더불어 GPIIb/IIIa의 surface 발현에 미치는 비소의 영향을 확인하기 위해 flow cytometry를 이용하여 GPIIb/IIIa의 surface 발현을 측정하였다. 그 결과 비소 농도 의존적으로 GPIIb/IIIa의 surface 발현이 감소하였으며 (Fig. 4A) confocal microscopy를 이용하여 GPIIb/IIIa의 세포 내 위치 변화를 확인한 결과 비소에 의해 GPIIb/IIIa가 혈소판의 표면에서 중앙으로 이동하는 것을 확인하였다 (Fig. 4B). 이러한 localization의 변화가 filamin A와 동시에 일어나는 변화인지 확인하기 위해 GPIIb/IIIa와 filamin A를 각각 PE 와 FITC 로 염색하여 관찰한 결과 두 단백질이 같은 위치에 존재하는 것을 확인하였으며 두 단백질 모두

비소 농도 의존적으로 혈소판의 표면에서 중앙으로 이동하였다 (Fig. 5).

Agonist에 의해서 혈소판의 모양이 변화하는 현상은 혈소판의 cytoskeletal protein의 assembly가 변화함으로써 나타나는데 (Hartwig, J. H., 1992) 비소에 의한 혈소판의 모양 변화 또한 이러한 cytoskeletal protein의 변화를 매개한 현상인지 확인하기 위해 confocal microscopy를 이용하여 F-actin과 G-actin assembly의 변화를 관찰하였으며 그 결과 비소에 의해 F-actin과 G-actin 모두 그 assembly가 변화하는 것을 확인하였다 (Fig. 6A). Actin의 assembly를 조절하는 상위 단계인 small GTPase의 활성화에 비소가 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위해 pull-down assay를 하여 rac1과 cdc42의 활성을 측정하였다. 혈소판에 비소 50  $\mu$ M를 처리한 후 0, 5, 10, 30, 60, 120 분 동안 incubation 하여 각각 rac1 및 cdc42의 활성을 측정한 결과 단백질의 활성이 시간 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 6B). 또 small GTPase protein에 의해 조절된다고 알려져 있는 actin capping protein인 cofilin의 활성 또한 비소를 처리한 시간에 따라 변화함을 확인하였다 (Fig 6C).

이를 통해 비소에 의한 혈소판 모양 변화 및 혈소판 활성화는 비소에 의한 혈소판 내 cytoskeletal protein의 변화에 기인한 현상이며 이러한 변화는 세포 내 GPIIb와 filamin A의 재분포를 수반한 형태 변화 및 small GTPase protein 의 활성 변화로 인한 actin dynamic change 에 의해 나타나는 현상임을 알 수 있었다.

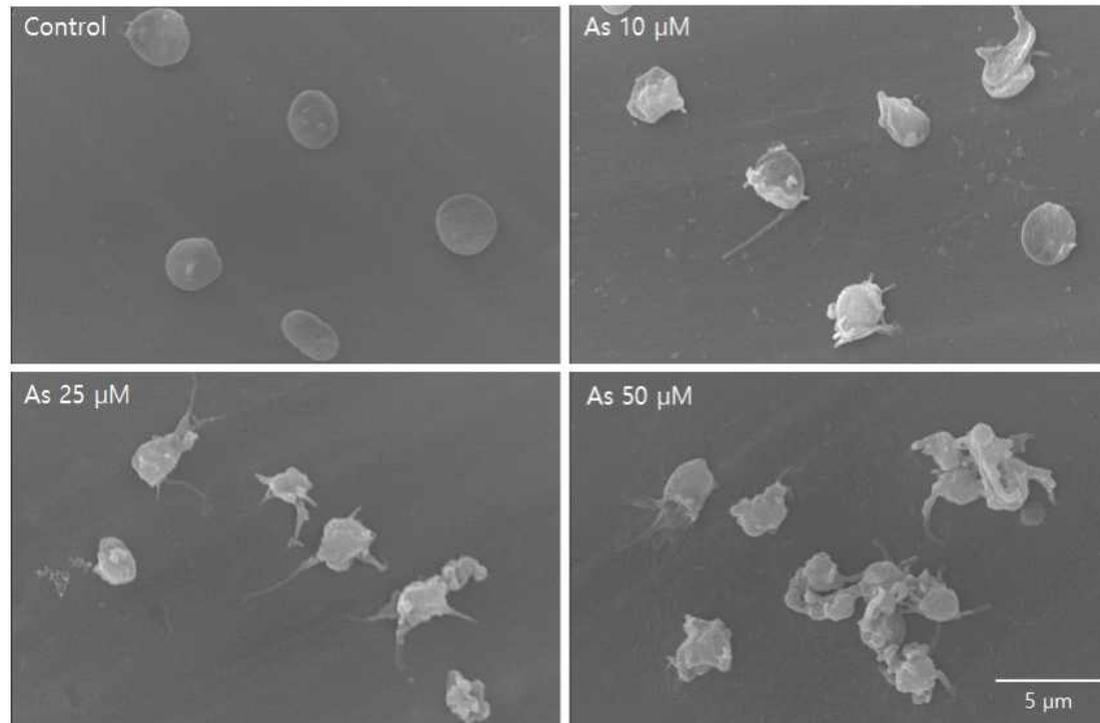
### **비소에 의한 혈소판 활성화 및 응집 효과**

비소에 의한 이러한 혈소판 모양 변화가 혈소판의 활성화에 어떠한 영향을 주는지 확인하기 위해 flow cytometry를 이용하여 비소에 의한 p-selectin 발현의 변화를 측정하였으며 그 결과 비소 농도 의존적으로 p-selectin의 발현이 증가하였다 (Fig. 7).

비소에 의한 혈소판 활성화가 혈소판 응집에 미치는 영향을 확인하기 위

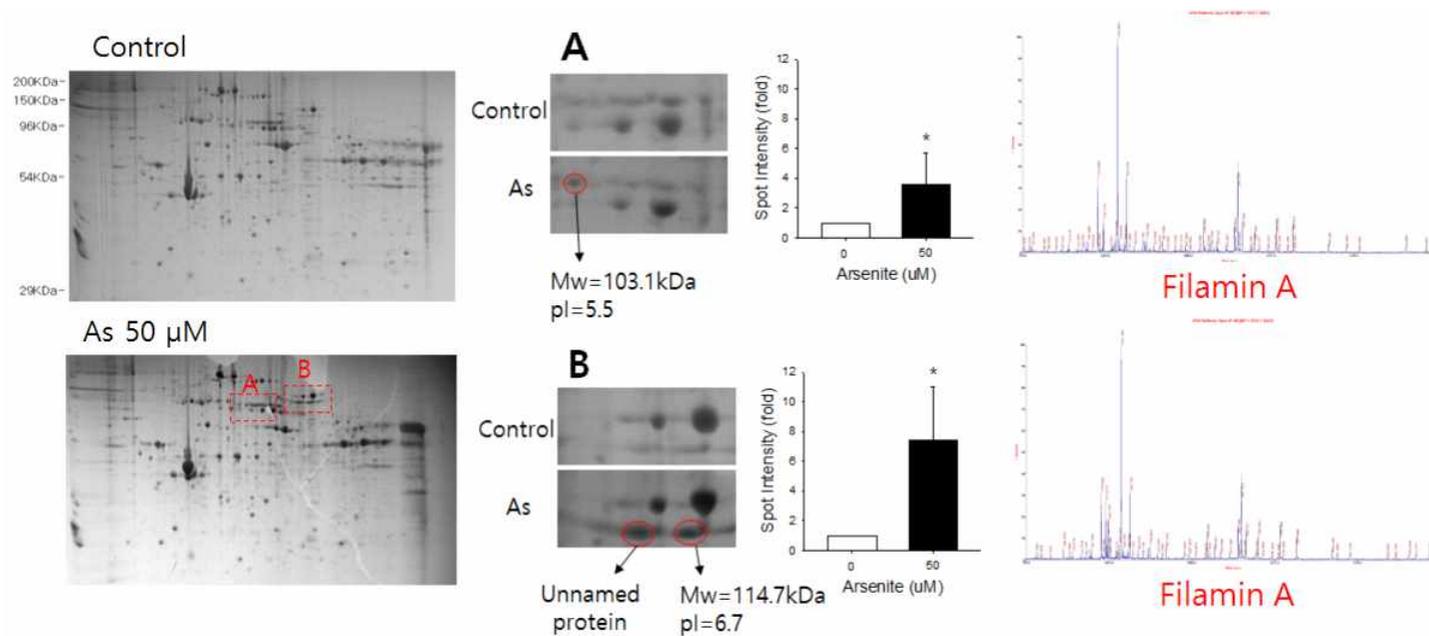
해 혈소판에 비소 50  $\mu$ M 를 처리한 후 aggregometer를 이용하여 혈소판의 응집을 측정된 결과 비소 자체적으로는 혈소판의 응집을 유도하지 않았다 (Fig. 8A). 혈소판 활성화의 마지막 단계에서 응집이 일어나기 위해서는 혈소판 membrane에 존재하는 fibrinogen receptor인 GP IIb/IIIa가 활성화 되어 혈소판간의 cross-linking 이 형성되어야 하는데 (Li, Z., 2010) 실제로 flow cytometer를 사용하여 GP IIb/IIIa의 surface 발현과 활성화된 GP IIb/IIIa 의 발현 정도를 확인한 결과 비소에 의한 영향이 나타나지 않았다 (Suppl. 2). 비소가 혈소판의 응집 효과를 potentiation 시키는지 확인하기 위해 비소 또는 증류수를 가하여 incubation 시킨 PRP에 혈소판 응집을 일으키지 않는 sub-threshold 농도의 thrombin을 가하였다. 그 결과 비소를 처리한 그룹에서 혈소판 응집이 증가하였으며 이를 light microscopy로 관찰하였다 (Fig. 8B). Sub-threshold 농도의 thrombin을 aggregometer 상에서 가했을 때에도 혈소판 응집이 비소 농도 의존적으로 증가하였으며 약한 agonist인 ADP에 의해 유도되는 혈소판 응집도 비소 농도 의존적으로 증가하였다 (Fig. 8C).

이상의 결과들을 통해 비소가 혈소판의 모양 변화를 유도하며 연속적으로 혈소판의 p-selectin expression을 증가시키고 혈소판의 응집을 potentiation 시킴을 확인할 수 있었다. 이러한 일련의 과정은 비소에 의한 혈전 생성을 설명하는 한 가지 기전으로 제시될 수 있을 것이다.



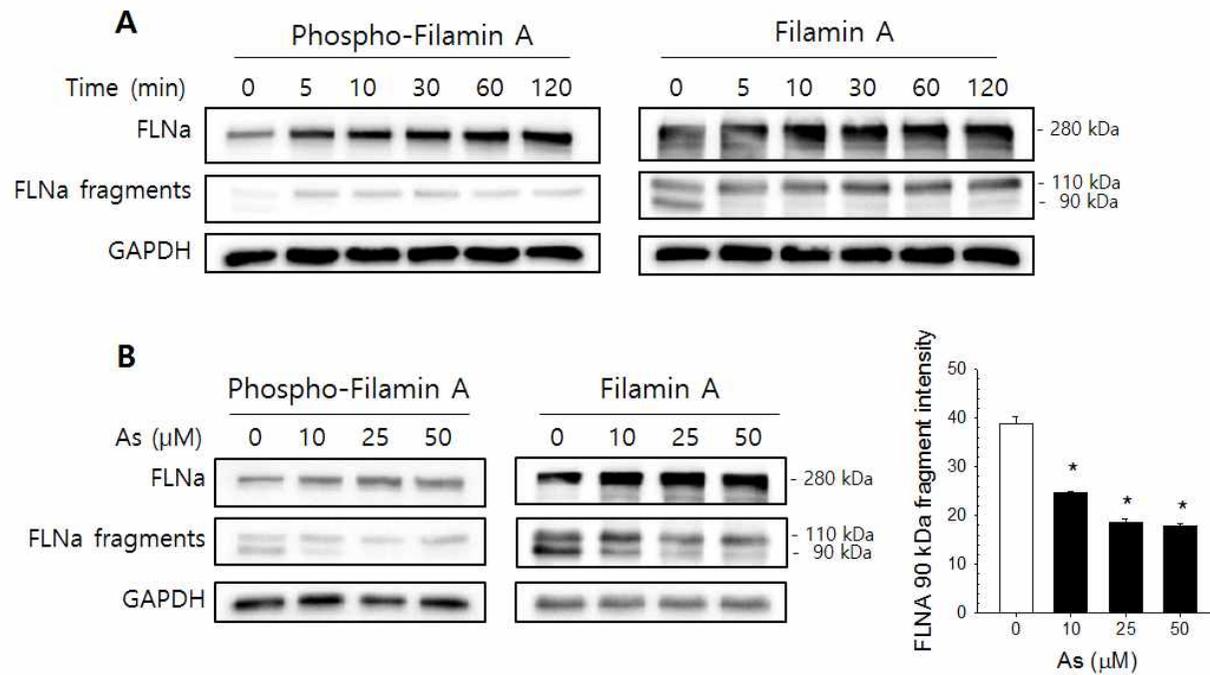
**Figure 1. Effects of arsenic on platelet morphological change**

After PRP were incubated with distilled water (Control) or 10, 25, 50  $\mu\text{M}$  arsenite for 2 hours at 37  $^{\circ}\text{C}$ , platelet morphological changes were examined using scanning electron microscopy (SEM). Original magnification was  $\times 5000$ .



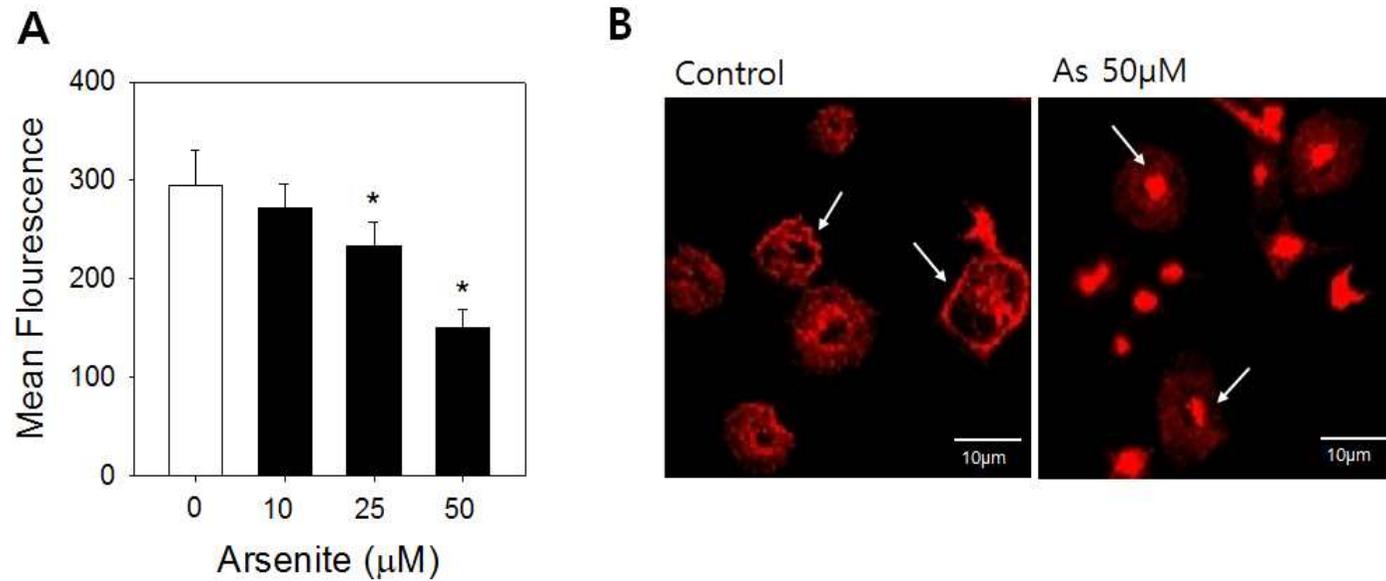
**Figure 2. Proteomic analysis of arsenic treated platelets**

PRP were incubated with distilled water (Control) and 50 μM of arsenite for 2 hours at 37 °C and then centrifuged to make samples of platelets for proteomic analysis. Proteomic analysis was performed by Genomine, Inc. Platelet pellets were lysed and loaded to 2-DE gel. Phosphorylated proteins were stained by CBB and protein candidates were detected after triplicate analysis. Filamin A protein was proved by mass analysis using 4700 Proteomics Analyzer MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems).



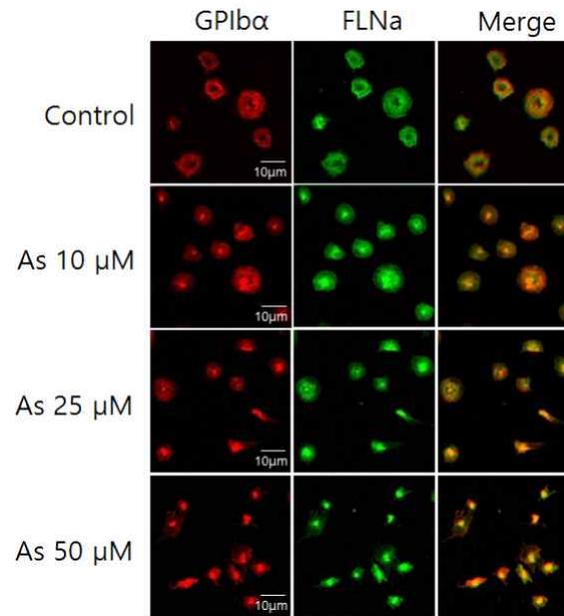
**Figure 3. Effects of arsenic on filamin A phosphorylation and fragmentation in platelets**

After PRP were incubated with distilled water (Control) or 50  $\mu$ M arsenite for 5, 10, 30, 60, 120 min at 37  $^{\circ}$ C, phospho-filamin A and filamin A were detected by western blotting (A). Platelets incubated with distilled water (Control) or 10, 25, 50  $\mu$ M of arsenite for 2 h at 37  $^{\circ}$ C were detected by western blotting (B). Values are the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. (\*) Significantly different from the Control ( $p < 0.05$ ).



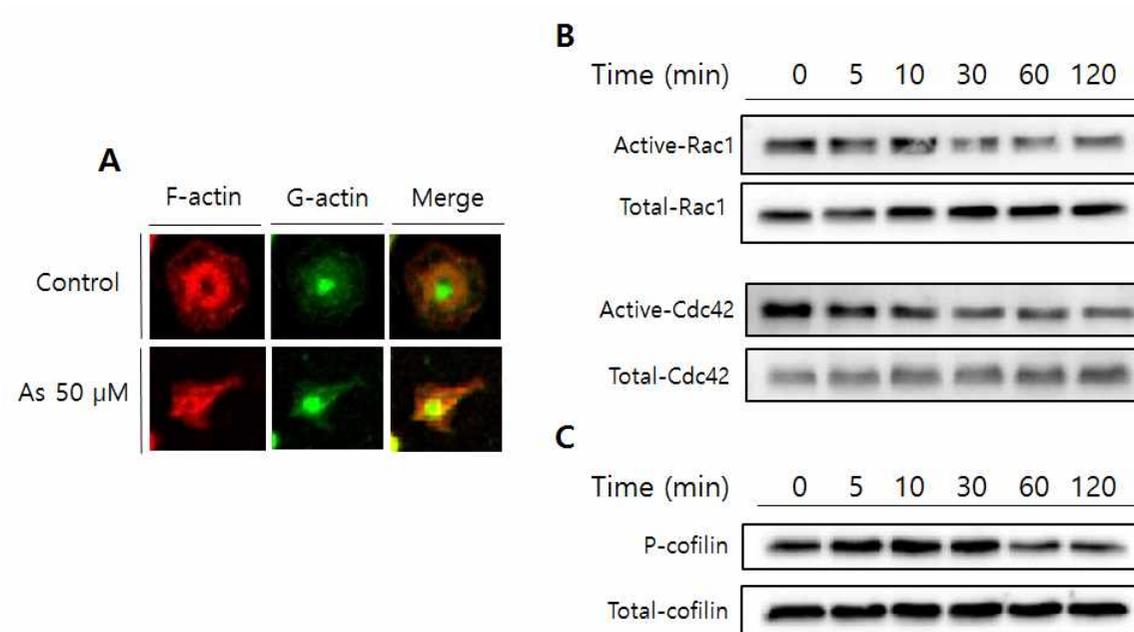
**Figure 4. Effects of arsenic on surface expression of Glycoprotein Ib alpha (GPIIb/IIIa) in platelets**

After 2 hour incubation of distilled water (Control) and 10, 25, 50  $\mu\text{M}$  arsenite, surface expression of GPIIb/IIIa were detected by flow cytometry (A). Confocal microscopy was used to observe redistribution of GPIIb/IIIa induced by arsenite (B). Values are the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. (\*) Significantly different from the Control ( $p < 0.05$ ).



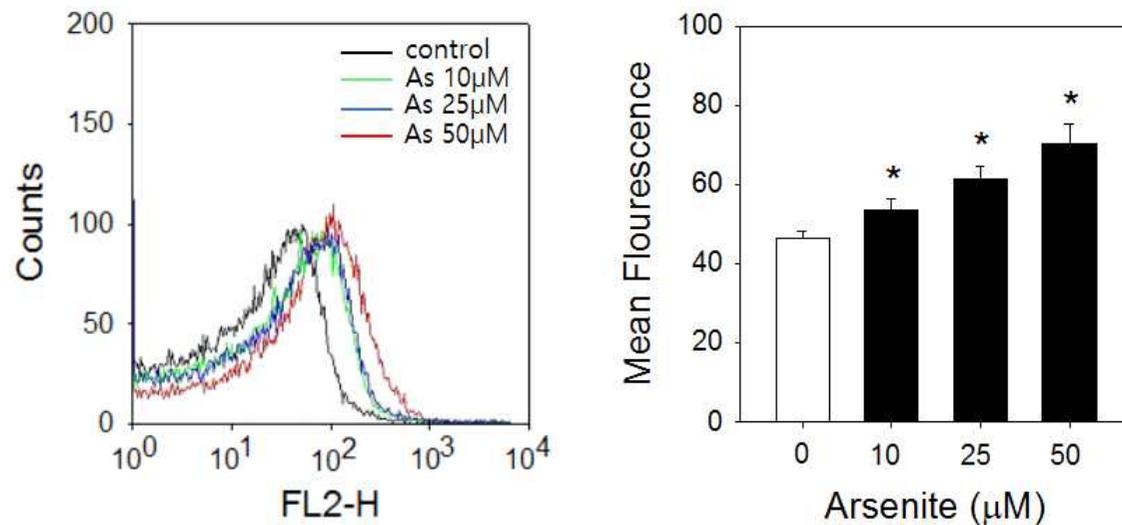
**Figure 5. Effects of arsenic on redistribution of GPIb $\alpha$  and filamin A in platelets**

PRP were incubated with distilled water (Control) or 10, 25, 50  $\mu$ M arsenite for 2 hours at 37  $^{\circ}$ C, and then platelets were loaded on poly-L-lysine coated cover glass. After fixation and permeation, anti-GPIb $\alpha$  antibody linked with PE was treated to binding platelets. At the same time, anti-filamin A antibody and FITC linked anti-rabbit antibody were treated to platelets. Fluorescence was detected by confocal microscopy and the result showed arsenite induce redistribution of GPIb $\alpha$  and filamin A.



**Figure 6. Effects of arsenic on actin dynamic and related molecular activity in platelets**

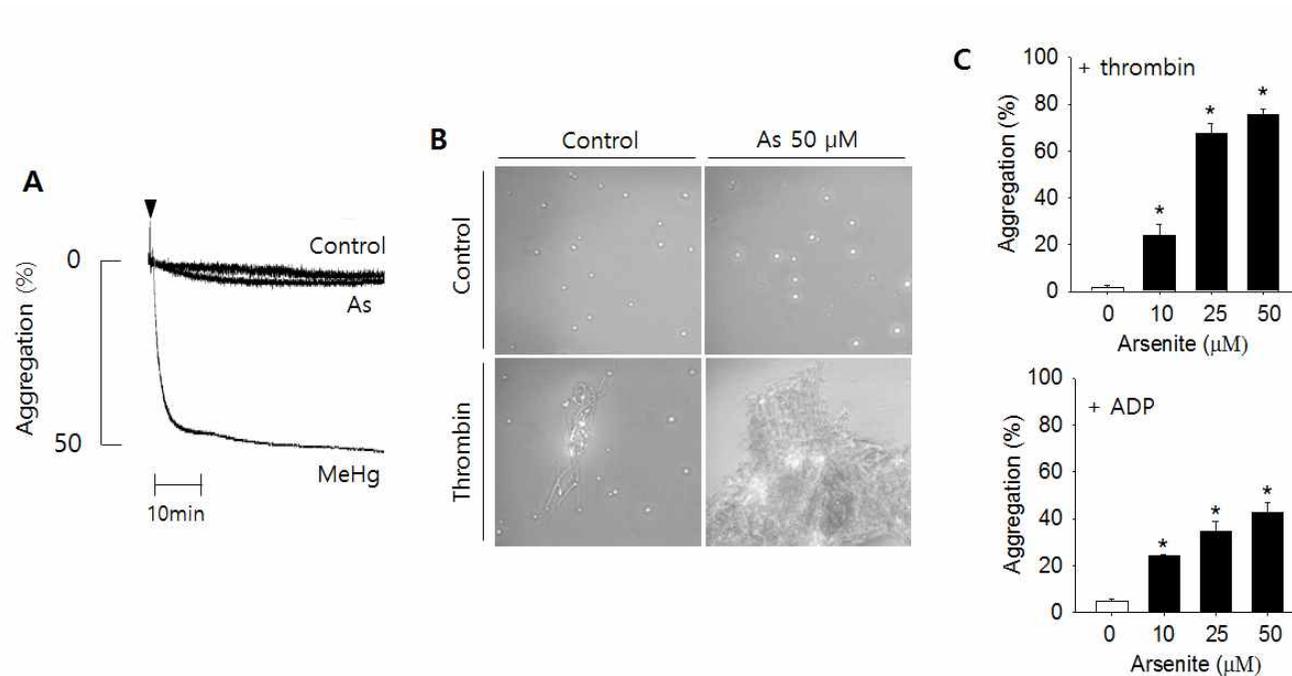
After 2 hour incubation of distilled water (Control) and 50  $\mu$ M arsenite, F-actin is stained by rhodamin-phalloidin and G-actin by DNase I. Actin dynamic changes induced by arsenite were detected by confocal microscopy (A). The activities of small GTPase proteins which control actin dynamic changes were detected by immuno-blotting (B) and cofilin activities, downstream signaling of small GTPase proteins, were detected by western blotting in time dependent manner after treated with distilled water (Control) and 50  $\mu$ M arsenite (C).



**Figure 7. Effects of arsenic on P-selectin expression in platelets**

Platelets incubated with distilled water (Control) and 10, 25, 50 µM of arsenite were stained with anti-P-selectin-PE antibody and the expression of P-selectin was detected by flow cytometry. Fluorescence was determined and the result showed arsenite induce P-selectin expression. Values are the mean ± SEM of three independent experiments.

(\*) Significantly different from the Control ( $p < 0.05$ ).



**Figure 8. Potentiation effects of arsenic on platelet aggregation**

Platelets treated with arsenite alone didn't induce platelet aggregation in the aggregometer (A). MeHg was used as positive control. Arsenite treated platelets were primed with sub-threshold concentration of thrombin and samples were detected with light microscopy (B). Arsenite potentiate platelet aggregation in the presence of sub-threshold concentration of thrombin and ADP in the aggregometer (C). Values are the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. (\*) Significantly different from the Control ( $p < 0.05$ ).

## 고 찰

비소의 심혈관계 독성은 발암성과 더불어 비소의 주요한 독성으로 수십년간 연구되어 왔다. 본 연구에서는 심혈관계 질환의 발병에 주요한 역할을 하는 혈소판을 대상으로 비소의 영향에 대해 확인하였으며 비소에 의한 심혈관계 질환 발병의 한 가지 기전으로 제시하였다.

본 연구에서 +3 가 무기 비소인 arsenite는 혈소판의 형태 변화를 유도함으로써 혈소판의 활성화에 기인하며 더 나아가 agonist에 의해 유도되는 혈소판 응집 작용을 촉진시켰다. 비소가 혈소판 내 cytoskeletal protein인 filamin A의 인산화를 촉진시킨다는 것이 proteomic analysis를 통해 확인되었으며 western blotting을 통해 이 결과를 확인하는 과정에서 filamin A의 fragmentation 또한 비소에 의해 감소하는 것을 확인하였다. 이 결과를 토대로 filamin A의 인산화가 calpain에 의해 유도되는 filamin A의 proteolysis를 억제하여 안정화시킴을 예측할 수 있었다. 비소에 의한 filamin A의 인산화 및 안정화는 상호작용 하고 있는 actin filament의 cross-linking에 변화를 유발하고 결과적으로 혈소판의 형태를 변화시키는데 관여할 것이라고 유추할 수 있다.

Filamin A를 fragmentation 시키는 효소인 calpain의 활성화에 대한 비소의 영향을 확인한 결과 비소 농도에 따라 calpain의 활성화에는 변화가 없었으며 이를 통해 비소가 filamin A의 fragmentation을 조절하는 기전이 calpain 활성의 변화가 아니라 filamin A의 인산화에 기인한 것이라고 추측할 수 있다. 비소에 의한 혈소판의 형태 변화가 filamin A의 인산화로부터 기인한 현상이라고 예측한다면 filamin A의 인산화를 inhibition 시키는 specific inhibitor를 사용하여 인산화를 억제시킨 후 혈소판의 형태 변화를 확인하는 과정이 필요하다. Filamin A의 인산화를 일으키는 효소로서 PKCa (Chen, M., 1989; Tigges, U., 2003), RSK (Woo, 2004) 등 다양한 효소들이 문헌상

으로 제시되고 있지만 filamin A만 specific하게 인산화 시키는 효소는 아직 밝혀지지 않았으며 이러한 이유로 인해 inhibition study를 진행할 수 없었던 점은 본 실험의 한계라고 볼 수 있다.

GPIb/IX/V는 안정적인 혈소판의 경우 그 표면에 존재하여 subendothelium과 혈소판의 부착을 매개하지만 혈소판이 활성화되는 경우에는 표면으로부터 사라지는 것이 잘 알려져 있다. 이러한 현상은 표면에 존재하는 GPIb/IX/V가 open canalicular system으로 재분포되면서 나타나며 thrombin, ADP 등 다양한 agonist에 의해 전반적으로 나타난다고 보고되어 있다 (Han, Y., 2003; 2005). 하지만 이러한 재분포가 혈소판의 활성화 및 adhesion 반응에 어떻게 관여하는지에 대해서는 논란이 많은 상태이다. 실험을 통해 GPIb/IX/V 중 filamin A와 상호작용하는 GPIba subunit의 surface expression이 비소에 의해 감소하는 것이 확인되었으며 이러한 현상이 혈소판의 형태 변화 및 활성화에 기인할 것이라고 예측하였다. 실제로 agonist에 의한 혈소판의 활성화 과정에서 GPIba 의 surface expression이 감소하고 centralization 되는 현상에 actin assembly가 관여한다는 문헌 보고가 있으며 (Kovacsovics, T. J. et al., 1996) 이를 토대로 비소에 의한 GPIba의 centralization 또한 혈소판의 활성화에 기인하며 동시에 shape change를 수반하는 현상임을 예측할 수 있다. 본 실험에서 Filamin A와 GPIba가 같은 위치에 존재하며 비소에 의해 동시에 re-distribution 되는 현상을 confocal microscopy로 확인하였지만 두 단백질 간의 상호작용에 비소가 어떠한 영향을 미치는지에 대해서는 추후에 확인해볼 필요가 있다.

비소에 의한 actin assembly의 변화는 confocal microscopy로 확인하였는데 polymer 상태인 F-actin 및 monomer 상태인 G-actin의 assembly에 각각 다른 형광을 staining 하여 관찰한 결과 비소에 의해 각각의 assembly에 변화가 나타나며 이 결과를 통해 비소에 의해 실제로 cytoskeletal protein의 assembly가 변화함에 따라 혈소판의 형태 변화가 나타남을 확인할 수 있었다. 비소에 의해 actin assembly 가 변화함을 확인한 후 그에 대한

molecular mechanism을 찾아내기 위하여 actin의 상위 단계에 존재하는 signaling protein 의 활성을 측정하였다. Small GTPase protein 인 rac1 및 cdc42는 actin 의 polymerization에 관여하며 lamellapodia 와 filopodia의 형성을 유도하여 혈소판의 spreading을 조절하는 역할을 한다 (Aslan, J. E., 2013). 비소에 의한 actin assembly 의 변화에 이러한 small GTPase protein이 관여하는지 확인하기 위해 비소를 처리한 혈소판에서 rac1과 cdc42 의 activity를 측정하였다. Rac1과 cdc42의 활성은 binding 되어있는 GDP 가 GTP 로 shift 되는 과정에서 나타나며 이는 가역적인 반응이라고 보고되어 있으므로 비소를 처리한 시간에 따라 5 분에서 120 분 까지 순차적으로 detection 한 결과 그 활성이 점차적으로 감소하는 경향이 나타났다. 이는 비소를 처리한 후 시간이 지남에 따라 actin polymerization activity가 감소하는 것으로 해석할 수 있으며 결과적으로 비소에 의해 혈소판의 spreading 이 감소할 것이라고 예측할 수 있다. Rac1 과 cdc42 signal 의 하위단계에서 actin의 capping을 조절하는 protein인 cofilin은 인산화 됨에 따라 그 활성이 감소하여 actin polymerization을 유도하는 역할을 하며 cofilin에 의한 이러한 actin turnover가 혈소판의 크기를 조절하는 역할을 한다는 보고도 있다 (Bender, M., 2010). 비소에 의한 cofilin의 활성 변화를 측정한 결과 비소를 처리한 시간에 따라 cofilin의 인산화가 변화하였다. Cofilin은 비소를 처리한 시간에 따라 그 인산화가 증가하였다가 감소하였는데 이는 actin의 polymerization 활성이 증가되었다가 감소함을 의미하며 이를 통해 결과적으로 비소에 의한 actin dynamic 의 변화가 유발된다고 해석할 수 있다.

혈소판이 활성화됨에 따라 표면에 발현된다고 알려져 있는 adhesion molecule 중 하나인 P-selectin은 intact 한 혈소판 내  $\alpha$ -granule에 존재하는 부착단백질로써 혈소판 활성화 시에 granule이 표면으로의 분비되면서 그 expression이 증가하며 혈소판의 혈관 내 부착 및 혈소판 응집을 활성화 시키는데 관여한다 (Furie, 2001). 혈소판의 활성화에 의해 표면 발현이 증

가된 P-selectin은 GPIIb/IIIa와 fibrinogen의 상호작용을 안정화 시켜 더 크고 안정적인 혈소판 응집을 형성하는데 기여한다고 보고되어 있다 (Merten M., 2000). 비소에 의해서도 p-selectin 의 발현이 증가하는지 확인하기 위해 flow cytometry를 이용하여 그 surface 발현을 측정된 결과 비소 농도의존적으로 P-selectin 의 surface 발현이 증가하였으며 이는 비소에 의해 혈소판 응집 형성이 안정화 되고 효율적으로 진행될 수 있음을 시사한다.

비소에 의한 혈소판 응집 촉진 효과를 확인하기 위해 light transmission 을 측정하여 응집 정도를 확인할 수 있는 aggregometer를 사용하였으며 이 실험을 통해 비소가 자체적으로 혈소판의 응집을 유발하지 않는다는 것을 확인하였다. 비소가 다른 agonist에 의한 혈소판의 응집 효과를 potentiation 시키는지 확인한 결과 strong agonist인 thrombin 및 weak agonist인 ADP 에서 모두 비소가 혈소판 응집 효과를 촉진시킴을 확인할 수 있었다. 혈소판의 응집이 일어나기 위해서는 혈소판이 활성화되는 과정에서 더 나아가 혈소판 표면에 발현되어 있는 fibrinogen receptor 인 GPIIb/IIIa가 활성화되어 혈장 내 fibrinogen과 binding 하면서 혈소판 간의 cross-linking을 형성하여야 한다 (Broos K., 2012). 비소 자체가 직접 혈소판의 응집을 유도하지는 않지만 다른 agonist 들에 의한 혈소판 응집을 촉진시키는 결과를 통해서 비소 자체가 GP IIb/IIIa 와 같은 fibrinogen receptor를 활성화 시키지는 않지만 그 상위 단계에서 혈소판의 활성화를 유발함으로써 agonist에 의한 자극에 좀 더 민감하게 반응할 수 있도록 유도하는 역할을 하였다고 볼 수 있다. 실제로 flow cytometer를 사용하여 확인한 결과 GP IIb/IIIa의 활성화는 비소가 영향을 주지 않았다.

본 연구의 결과들을 종합해보면 비소는 혈소판의 형태 변화를 유발하고 그에 따른 혈소판의 활성화에 관여하여 응집을 촉진시키는 작용을 하였다. 하지만 혈소판의 형태를 변화시키는 과정에 관여하는 다양한 단백질의 활성 변화 및 signaling 의 선후관계를 파악하는 데에는 한계가 있었으며 앞으로 이에 대한 명확한 기전 연구가 필요할 것이다. 본 연구에서는 비소에 의한

혈소판 형태 변화를 매개한 혈소판의 활성화 기전을 확인하였으며 더 나아가 이것이 혈소판의 응집을 촉진시킴으로써 혈관 내 정상적인 혈류의 흐름을 방해하고 다양한 질병을 유발할 수 있다는 사실을 토대로 비소에 의한 심혈관 질환 기전의 한 가지 가능성을 제시한데 그 의의가 있다.

## 참 고 문 헌

- Aslan, J. E., A. Itakura, J. M. Gertz and O. J. McCarty. "Platelet Shape Change and Spreading." *Methods Mol Biol* 788, (2012): 91-100.
- Aslan, J. E. and O. J. McCarty. "Rho Gtpases in Platelet Function." *J Thromb Haemost* 11, no. 1 (2013): 35-46.
- Bae, O. N., K. M. Lim, J. Y. Noh, S. M. Chung, H. Kim, C. R. Lee, J. D. Park and J. H. Chung. "Arsenite-Enhanced Procoagulant Activity through Phosphatidylserine Exposure in Platelets." *Chemical Research in Toxicology* 20, no. 12 (2007): 1760-1768.
- Bender, M., A. Eckly, J. H. Hartwig, M. Elvers, I. Pleines, S. Gupta, G. Krohne, E. Jeanclos, A. Gohla, C. Gurniak, C. Gachet, W. Witke and B. Nieswandt. "Adf/N-Cofilin-Dependent Actin Turnover Determines Platelet Formation and Sizing." *Blood* 116, no. 10 (2010): 1767-75.
- Berndt, M. C. "Filamin a Interaction with Gpib : The Platelet Shapes Up." *Blood* 107, no. 5 (2006): 1745-1745.
- Bhattacharya, P., M. Claesson, J. Bundschuh, O. Sracek, J. Fagerberg, G. Jacks, R. A. Martin, R. Storniolo Adel and J. M. Thir. "Distribution and Mobility of Arsenic in the Rio Dulce Alluvial Aquifers in Santiago Del Estero Province, Argentina." *Sci Total Environ* 358, no. 1-3 (2006): 97-120.
- Bhattacharya, Prosun, Alan H Welch, Kenneth G Stollenwerk, Mike J McLaughlin, Jochen Bundschuh and G Panaullah. "Arsenic in the Environment: Biology and Chemistry." *Science of the total environment* 379, no. 2 (2007): 109-120.
- Broos, K., S. F. De Meyer, H. B. Feys, K. Vanhoorelbeke and H.

- Deckmyn. "Blood Platelet Biochemistry." *Thromb Res* 129, no. 3 (2012): 245-9.
- Burger, P. C. and D. D. Wagner. "Platelet P-Selectin Facilitates Atherosclerotic Lesion Development." *Blood* 101, no. 7 (2003): 2661-6.
- Chen, C. J., H. Y. Chiou, M. H. Chiang, L. J. Lin and T. Y. Tai. "Dose-Response Relationship between Ischemic Heart Disease Mortality and Long-Term Arsenic Exposure." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16, no. 4 (1996): 504-10.
- Chen, H. S., K. S. Kolahi and M. R. Mofrad. "Phosphorylation Facilitates the Integrin Binding of Filamin under Force." *Biophys J* 97, no. 12 (2009): 3095-104.
- Chen, M. and A. Stracher. "In Situ Phosphorylation of Platelet Actin-Binding Protein by Camp-Dependent Protein Kinase Stabilizes It against Proteolysis by Calpain." *J Biol Chem* 264, no. 24 (1989): 14282-9.
- Chen, Y., J. H. Graziano, F. Parvez, M. Liu, V. Slavkovich, T. Kalra, M. Argos, T. Islam, A. Ahmed, M. Rakibuz-Zaman, R. Hasan, G. Sarwar, D. Levy, A. van Geen and H. Ahsan. "Arsenic Exposure from Drinking Water and Mortality from Cardiovascular Disease in Bangladesh: Prospective Cohort Study." *Bmj* 342, (2011): d2431.
- Cukier, I. H., Y. Li and J. M. Lee. "Cyclin B1/Cdk1 Binds and Phosphorylates Filamin a and Regulates Its Ability to Cross-Link Actin." *FEBS Lett* 581, no. 8 (2007): 1661-72.
- Gawaz, M. "Role of Platelets in Coronary Thrombosis and Reperfusion of Ischemic Myocardium." *Cardiovasc Res* 61, no. 3 (2004): 498-511.

- HAN, Yue, Xiao-xu LU and Lan DAI. "Redistribution of Platelet Membrane Glycoproteins on Activated Platelet Surface [J]." *Chinese Journal of Hemorheology* 3, (2005): 003.
- Han, Y., A. Nurden, R. Combrie and J. M. Pasquet. "Redistribution of Glycoprotein Ib within Platelets in Response to Protease-Activated Receptors 1 and 4: Roles of Cytoskeleton and Calcium." *J Thromb Haemost* 1, no. 10 (2003): 2206-15.
- Hartwig, J. H. "Mechanisms of Actin Rearrangements Mediating Platelet Activation." *J Cell Biol* 118, no. 6 (1992): 1421-42.
- Hughes, M. F. "Arsenic Toxicity and Potential Mechanisms of Action." *Toxicol Lett* 133, no. 1 (2002): 1-16.
- Jackson, S. P. "The Growing Complexity of Platelet Aggregation." *Blood* 109, no. 12 (2007): 5087-95.
- Kanaji, T., J. Ware, T. Okamura and P. J. Newman. "Gpib Alpha Regulates Platelet Size by Controlling the Subcellular Localization of Filamin." *Blood* 119, no. 12 (2012): 2906-2913.
- Kovacsovics, T. J. and J. H. Hartwig. "Thrombin-Induced Gpib-Ix Centralization on the Platelet Surface Requires Actin Assembly and Myosin Ii Activation." *Blood* 87, no. 2 (1996): 618-29.
- Lee, M. Y., O. N. Bae, S. M. Chung, K. T. Kang, J. Y. Lee and J. H. Chung. "Enhancement of Platelet Aggregation and Thrombus Formation by Arsenic in Drinking Water: A Contributing Factor to Cardiovascular Disease." *Toxicol Appl Pharmacol* 179, no. 2 (2002): 83-8.
- Li, Z., M. K. Delaney, K. A. O'Brien and X. Du. "Signaling During Platelet Adhesion and Activation." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30, no. 12 (2010): 2341-9.

- Matsagas, M. I., G. Geroulakos and D. P. Mikhailidis. "The Role of Platelets in Peripheral Arterial Disease: Therapeutic Implications." *Ann Vasc Surg* 16, no. 2 (2002): 246-58.
- Merten, M. and P. Thiagarajan. "P-Selectin Expression on Platelets Determines Size and Stability of Platelet Aggregates." *Circulation* 102, no. 16 (2000): 1931-6.
- Murugappan, S., H. Shankar and S. P. Kunapuli. "Platelet Receptors for Adenine Nucleotides and Thromboxane A<sub>2</sub>." *Semin Thromb Hemost* 30, no. 4 (2004): 411-8.
- Nakamura, Fumihiko, Thomas P Stossel and John H Hartwig. "The Filamins: Organizers of Cell Structure and Function." *Cell adhesion & migration* 5, no. 2 (2011): 160.
- O'Shea, B., J. Jankowski and J. Sammut. "The Source of Naturally Occurring Arsenic in a Coastal Sand Aquifer of Eastern Australia." *Sci Total Environ* 379, no. 2-3 (2007): 151-66.
- Price, Leo S, Jie Leng, Martin Alexander Schwartz and Gary M Bokoch. "Activation of Rac and Cdc42 by Integrins Mediates Cell Spreading." *Molecular biology of the cell* 9, no. 7 (1998): 1863-1871.
- Rahman, M., M. Tondel, S. A. Ahmad, I. A. Chowdhury, M. H. Faruquee and O. Axelson. "Hypertension and Arsenic Exposure in Bangladesh." *Hypertension* 33, no. 1 (1999): 74-8.
- Ruggeri, Z. M. "Platelets in Atherothrombosis." *Nat Med* 8, no. 11 (2002): 1227-34.
- Stossel, T. P., J. Condeelis, L. Cooley, J. H. Hartwig, A. Noegel, M. Schleicher and S. S. Shapiro. "Filamins as Integrators of Cell Mechanics and Signalling." *Nature Reviews Molecular Cell*

- Biology* 2, no. 2 (2001): 138-145.
- Tchounwou, P. B., A. K. Patlolla and J. A. Centeno. "Carcinogenic and Systemic Health Effects Associated with Arsenic Exposure--a Critical Review." *Toxicol Pathol* 31, no. 6 (2003): 575-88.
- Tchounwou, P. B., B. Wilson and A. Ishaque. "Important Considerations in the Development of Public Health Advisories for Arsenic and Arsenic-Containing Compounds in Drinking Water." *Rev Environ Health* 14, no. 4 (1999): 211-29.
- Tigges, U., B. Koch, J. Wissing, B. M. Jockusch and W. H. Ziegler. "The F-Actin Cross-Linking and Focal Adhesion Protein Filamin a Is a Ligand and in Vivo Substrate for Protein Kinase C Alpha." *J Biol Chem* 278, no. 26 (2003): 23561-9.
- Tseng, C. H. "Cardiovascular Disease in Arsenic-Exposed Subjects Living in the Arseniasis-Hyperendemic Areas in Taiwan." *Atherosclerosis* 199, no. 1 (2008): 12-8.
- Tseng, C. H., C. K. Chong, C. P. Tseng, Y. M. Hsueh, H. Y. Chiou, C. C. Tseng and C. J. Chen. "Long-Term Arsenic Exposure and Ischemic Heart Disease in Arseniasis-Hyperendemic Villages in Taiwan." *Toxicol Lett* 137, no. 1-2 (2003): 15-21.
- Vadlamudi, R. K., F. Li, L. Adam, D. Nguyen, Y. Ohta, T. P. Stossel and R. Kumar. "Filamin Is Essential in Actin Cytoskeletal Assembly Mediated by P21-Activated Kinase 1." *Nat Cell Biol* 4, no. 9 (2002): 681-90.
- van der Flier, A. and A. Sonnenberg. "Structural and Functional Aspects of Filamins." *Biochim Biophys Acta* 1538, no. 2-3 (2001): 99-117.
- Woo, Michele S, Yasutaka Ohta, Isaac Rabinovitz, Thomas P Stossel and John Blenis. "Ribosomal S6 Kinase (Rsk) Regulates

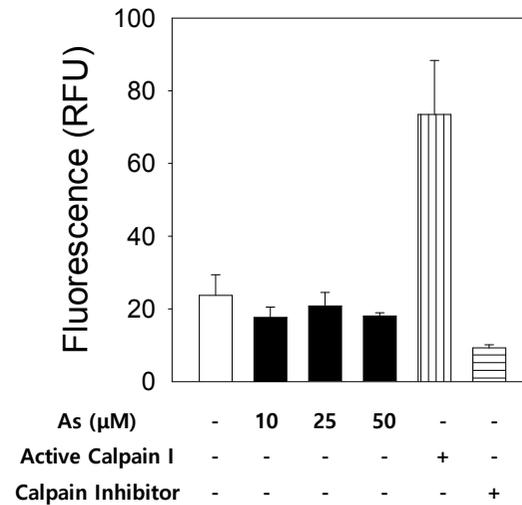
Phosphorylation of Filamin a on an Important Regulatory Site."

*Molecular and cellular biology* 24, no. 7 (2004): 3025-3035.

Yoshida, T., H. Yamauchi and G. Fan Sun. "Chronic Health Effects in People Exposed to Arsenic Via the Drinking Water:

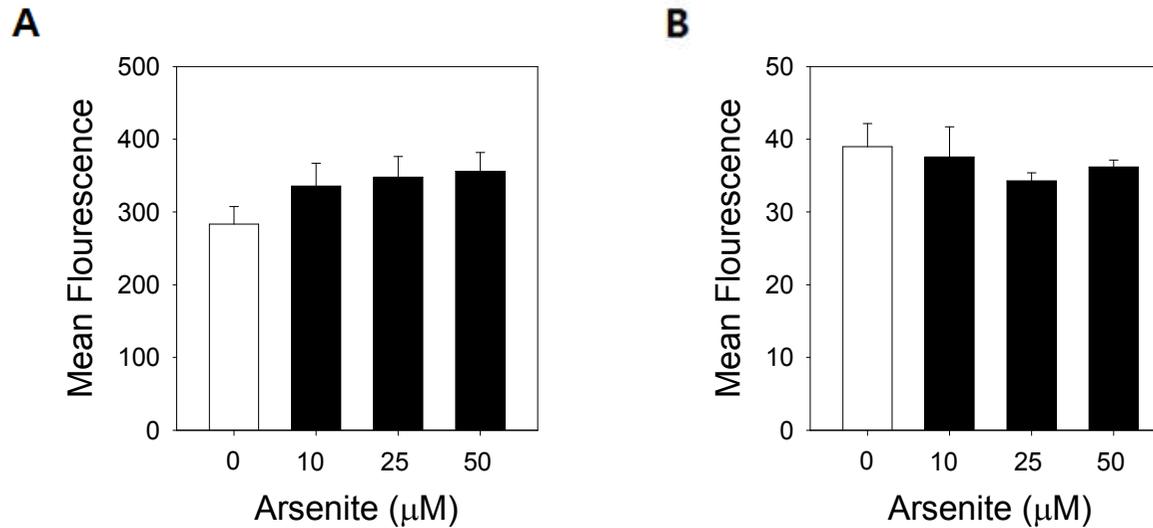
Dose-Response Relationships in Review." *Toxicol Appl Pharmacol*

198, no. 3 (2004): 243-52.



**Suppl 1. Effects of arsenic on calpain activity in human platelets**

Human platelets were incubated with distilled water (Control) and 10, 25, 50 µM of arsenite right before extraction with extraction buffer. Calpain substrates were treated to all samples and after 1 h incubation in dark, fluorescences were detected by fluorometer. Active calpain I and calpain inhibitor were treated to platelet extraction as positive control and negative control. Fluorescences were determined at 400 nm of excitation and 505 nm of emission wavelength. Values are the mean ± SEM of three independent experiments.



**Suppl 2. Effects of arsenic on expression of GP IIb/IIIa and activation of GP IIb/IIIa in human platelets**

Platelets incubated with distilled water (Control) and 10, 25, 50  $\mu\text{M}$  of arsenite were stained with anti-CD61-PE antibody and the expressions of GP IIb/IIIa were detected by flow cytometry (A). Active forms of GP IIb/IIIa were stained by PAC-1 and fluorescences were determined by flow cytometry (B). The results showed that arsenite have no significant effects on platelet GP IIb/IIIa expression and activation. Values are the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments.

## Abstract

Arsenic, as a ubiquitous element in the environment, is harmful to our health mainly through drinking water. In addition, it has been reported that chronic exposure of arsenic induces various cardiovascular diseases. One of the main reasons of arsenic induced cardiovascular disease is thrombus generation mediated by platelet. Therefore, researches are being studied to find out the mechanism of thrombus generation induced by arsenic, but it has not been clarified until now. Various steps are involved in the mechanisms of platelet aggregation. Platelet shape change is associated with the process of activated platelets stimulated by kinds of stimuli causing platelet aggregation and it is consistent with the integrity change of cytoskeletal proteins of activated platelets with granule secretion and integrin activation of platelets.

In this study, we tried to investigate the mechanism of arsenic induced platelet activation accompanied by shape change and ultimate effect on thrombus generation. Sodium arsenite was treated to platelet rich plasma isolated from human blood. Platelet activation induced by arsenic was confirmed through observing morphologic changes of platelets. To find out which key proteins were correlated with platelet activation induced by arsenic, we did the experiment of proteomic analysis and confirmed that phosphorylation of filamin A protein was dose-dependently increased by arsenic. Both filamin A phosphorylation induced by arsenic and its relation with filamin A stabilization were further confirmed by Western blotting. Additionally, filamin A stabilization had an effect on platelet shape change through interaction with Glycoprotein Ib a unit. GPIba, which surface expression decreased at a dose-dependent manner of

arsenic, moved to intracellular space together with filamin A.

To confirm the effect on actin assembly induced by arsenic, the activity of small GTPase protein, which is the previous regulator, decreased due to arsenic in time-dependent manner. Arsenic also changed the activity of cofilin, a factor related to actin polymerization as the actin capping protein, as time went on and then had an effect on actin dynamic as well. To investigate whether the secretion of platelet  $\alpha$ -granule increased or not as actin dynamic changed, expression of p-selectin were increased induced by arsenic in dose-dependent manner. Arsenic itself could not result in platelet aggregation, however, it could potentiate the effect of platelet aggregation caused by thrombin and ADP, which were both as platelet agonists.

In summary, arsenic was a substance contributed to platelet activation and its shape change, which resulted from re-localization of Glycoprotein Iba-Filamin A and changes of actin assembly. In addition, arsenic increase the expression of adhesion molecule such as P-selectin and platelet aggregation was increased and facilitated. Therefore, these results were to explain one of mechanisms of thrombus formation which was one of the key factors contributed to cardiovascular diseases resulting from arsenic.

Key words : Platelet, Arsenic, Shape change, Actin, Filamin A, GPIIb/IIIa, P-selectin, Platelet aggregation