

2-(4-시아노페닐)아미노-1,4-나프탈렌디온-3-피리디니움 퍼클로레이트 (PQ5)의 항혈소판작용

김도희 · 이수환* · 최소연* · 문창현* · 김대경** · 윤여표*** · 유충규#

이화여자대학교 약학대학, *아주대학교 의과대학, **중앙대학교 약학대학, ***충북대학교 약학대학

(Received September 3, 1999)

Antiplatelet Activity of 2-(4-Cyanophenyl)amino- 1,4-naphthalenedione-3-pyridinium perchlorate (PQ5)

Do-Hee Kim, Soo Hwan Lee*, So Yeon Choi*, Chang-Hyun Moon*,
Dae-Kyung Kim**, Yeo-Pyo Yun*** and Chung-Kyu Ryu#

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

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

**College of Pharmacy, Choongang University, Seoul 156-756, Korea and

***College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

Abstract — The effect of 2-(4-cyanophenyl)amino-1,4-naphthalenedione-3-pyridinium perchlorate (PQ5) on platelet aggregation and its action mechanisms were investigated with rat platelet. PQ5 inhibited the platelet aggregation induced by collagen (6 µg/ml), thrombin (0.4 U/ml) and A23187 (3 µM) in concentration-dependent manner with IC₅₀ values of 5.50, 25.89 and 37.12 µM, respectively. PQ5 also significantly reduced the thromboxane A₂ (TXA₂) formation in a concentration dependent manner. The collagen-induced arachidonic acid (AA) release in [³H]-AA incorporated platelet, an indication of the phospholipase A₂ activity, was decreased by PQ5 pretreatment. PQ5 significantly inhibited the activity of thromboxane synthase only at high concentration (100 µM), but did not affect the cyclooxygenase activity at all. Collagen-induced ATP release was significantly reduced by PQ5. Calcium-induced platelet aggregation experiment suggests that the elevation of intracellular free Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_i) by collagen stimulation is decreased by the pretreatment of PQ5, which is due to the inhibition of calcium release from intracellular store and influx from outside of the cell. PQ5 did not show the effect of anticoagulation as prothrombin time (PT) or activated partial thromboplastin time (APTT). From these results, it is suggested that PQ5 exerts its antiplatelet activity through the inhibition of the intracellular Ca²⁺ mobilization and the decrease of the TXA₂ synthesis.

Keywords □ 2-(4-cyano-phenyl)amino-1,4-naphthalenedione-3-pyridinium perchlorate (PQ5), antiplatelet activity, ATP release, calcium mobilization, TXA₂ synthesis, phospholipase A₂, thromboxane synthase.

혈소판은 지혈반응에 있어 중심적인 역할을 담당하는 세포로서 혈소판의 활성화는 생리적으로 혈액순환에 대해 일어나는 생체의 정상적인 방어기전이다. 그러나 혈소판의 비정상적인 활성화에 의해 생성되는 혈관내 혈전은 동맥경화증을 비롯한 심근경색, 협심증,

미소순환장애 등을 유발시키는 주요한 원인이 되며,^{1,2)} 따라서 비정상적인 혈소판의 활성화를 억제함으로써 심혈관 및 뇌혈관 질환 등의 효과적인 예방 및 치료를 기대할 수 있다.

혈소판은 collagen, thrombin, epinephrine 등의 여러 인자들에 의해 활성화되며,³⁾ 활성화된 혈소판에서는 세포내 Ca²⁺ 농도가 급격히 증가하게 되어 혈소판 과립분비 및 응집현상에 관여하는 효소들의 활

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-3277-3027, (팩스) 02-3277-3051

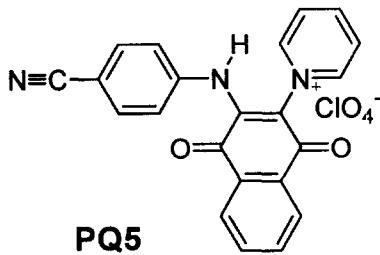


Fig. 1 - Chemical structure of PQ5.

성화가 촉진되는 것으로 알려져 있다.⁴⁾ 활성화 초기 혈소판의 과립에서 분비되는 ADP, serotonin 등과 arachidonic acid 대사경로를 통해 생성, 유리되는 prostaglandin G₂ (PGG₂), PGH₂, thromboxane A₂ (TXA₂) 등은 다시 인접한 혈소판의 수용체와 결합하여 응집반응을 증폭시키게 되며,⁵⁻⁷⁾ 이러한 2차적인 비가역적 혈소판 응집반응을 통해 안정한 혈소판 응집괴가 형성된다.

현재 임상에서 혈소판 응집 저해를 목적으로 이용되고 있는 약물들은 고용량에서의 부작용과 독성 등으로 인해 그 사용이 크게 제한되고 있어 이들을 대체하기 위한 보다 안전하고 효과적인 새로운 약물의 개발이 요구되고 있다. 항혈소판 약물의 개발은 혈소판 응집 반응과정을 저해하는 작용기전에 따라 arachidonic acid 대사 저해제, TXA₂ 길항제, prostaglandin 유도체, fibrinogen 수용체 길항제, 5-HT₂ 길항제, cAMP phosphodiesterase 저해제 및 기타의 약물군으로 구분되어 진행되고 있다.⁵⁾

1,4-Naphthalenedione 모핵을 갖고 있는 vitamin K는 출혈시 항혈액응고 작용과 비출혈시 완화된 항혈전 작용을 나타내는 것으로 알려져 있다.⁸⁾ Vitamin K와 구조가 유사한 1,4-naphthalenedione 모핵을 함유한 화합물들의 항 혈소판 응집활성이 보고되어 있다.⁹⁻¹¹⁾ 본 연구자 등은 1,4-naphthalenedione 계열 물질의 항혈소판제를 개발하기 위하여 2,3-disubstituted-1,4-naphthalenedione 유도체를 새로이 합성하고, 그 혈소판 응집억제작용을 연구하여 보고한바 있다.¹²⁻¹³⁾ 본 논문에서는 선행연구 결과 새롭게 합성한 수침종의 유도체 중 그 약효가 검색된 새로운 2-(4-cyanophenyl)amino-1,4-naphthalenedione-3-pyridinium perchlorate (PQ5, Fig. 1)의 혈소판응집 억제 작용 및 그 작용기전을 보고한다. PQ5가 혈소판 활성화 과정에 중요한 단계로 알려져 있는 granule release 반응, 세포내

calcium 동원에 미치는 영향 및 thromboxane A₂ 합성에 미치는 영향과 thromboxane A₂ 합성 과정에 관여하는 효소들의 활성화에 미치는 영향 등을 검토한 연구 결과를 보고하고자 한다.

실험방법

PQ5의 합성 - PQ5의 합성은 보고된 방법¹⁴⁾에 준하여 행하였다. 즉, 2,3-dichloro-1,4-naphthalenedione 2.27 g (10 mmol) 과 4-cyanoaniline (11 mmol)을 20 ml의 pyridine에 녹인 후 5시간 동안 reflux 시킨 후 하루 밤을 방치하였다. 생성된 침전을 200 ml의 뜨거운 물에 용해시키고 여과해서 안 녹는 부분은 제거하고 여액에 70% HClO₄ 2 ml를 더해주고 냉각시켜 여과해서 찬물로 세척하여 건조했다. 얻어진 침전물을 CH₃CN-Et₂O로 반복해서 재결정하여 주황색 분말 2.2 g을 얻었다. m.p. 325~326°C; IR(KBr, cm⁻¹); 3400(NH), 2240(CN), 1700(C=O), 1630, 1480, 1350, 1300, 1110, 740, 630; ¹H-NMR(DMSO-d₆); δ 7.90~8.10(4H, m, benzene ring), 8.20-8.60(6H, m, H5-H8, 2'-and 5'-H), 8.90(1H, m, 4'H), 9.00(2H, m, 2'-and 6'-H), 10.60(1H, s, NH) ppm; MS(m/z): 451(M⁺), 425(M-26), 352, 251, 154, 136, 80.

실험동물 - Sprague-Dawley 흰쥐(350-450 g)를 대한 실험동물센터 (충북 음성, 한국)에서 공급받아 20±2°C, 습도 50-60%, 12시간 명암 주기의 사육조건에서 1주 이상 적응시킨 후 사용하였으며, 고품사료(Purina Korea)와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다.

PRP와 Washed Platelet 조제 - 흰쥐를 ether로 마취시킨 후 개복하여 18 guage needle로 복대동맥으로부터 채혈하였고 sodium citrate (최종 농도: 0.38%)를 가해 혈액응고를 방지하였다.¹⁵⁾ 혈액을 770 rpm에서 12분간 원심분리하여 상층인 platelet-rich plasma(PRП)를 얻었다. PRP를 다시 2,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 pellet을 취한 뒤 washing buffer(modified Tyrode's buffer: 134 mM NaCl, 3 mM KCl, 0.3 mM NaH₂PO₄, 2 mM MgCl₂, 5 mM glucose, 12 mM NaHCO₃, 1 mM EDTA, 3.5 mg/ml bovine serum albumin at pH 7.4)로 pellet을 재현탁시킨 후 다시 원심분리하는 과정을 2회 반복하였다. 최종 pellet을 EDTA가 들어있지 않은 suspension buffer로 3×10⁸ cells/ml의 농도가 되도록

재현탁 시켰다.

Platelet Aggregation 측정 - Aggregometer (Chrono-log, Harvertown, PA, USA)를 사용하여 suspension buffer에 의한 흡광도를 100%로, washed platelet의 흡광도를 0%로 설정한 후 혈소판 응집에 따른 흡광도의 변화를 측정하였다. 1 mM CaCl_2 존재 하에 washed platelet (3×10^8 cells/ml)을 cuvette에 담아 37°C, 1,200 rpm으로 교반하면서 PQ5를 5분간 전처리 한 뒤, 응집 유발제를 가하여 흡광도 변화를 측정하였다. Ca^{2+} 유도 혈소판 응집 억제능은 PQ5를 5분간 전처리 한 뒤 thapsigargin 또는 과량의 CaCl_2 를 가한 후 8분에 나타나는 값을 % aggregation으로 하였으며 용매 대조군의 % aggregation 값에 대한 % inhibition을 구하였다.

Lactate Dehydrogenase 유출실험 - 젖산 탈수소효소 (lactic acid dehydrogenase : LDH)는 혈소판의 세포질 내에 존재하는 효소로서 혈소판 막이 손상되거나 세포용해 현상 등의 세포독성이 유발되면 세포외액으로 유출된다. 따라서, 시료를 전처리한 후에 유출된 젖산탈수소효소를 정량 함으로써 시료의 세포독성 유발여부를 확인할 수 있다. 세정 혈소판에 PQ5를 용해시키는 용매 (대조군), PQ5 또는 세포막을 분해시키는 작용을 하는 Triton X-100(0.1%)을 가한 후에 상온에서 12,000×g으로 2분 동안 원심 분리시킨 후에 상층을 분리하였다. 분리된 상층액에 젖산 탈수소효소 측정시약인 LD-L10(Sigma, St. Louis, USA)을 가한 다음 UV-spectrophotometer(Milton Roy, Model Spectronic 601)를 이용하여 340 nm 에서의 흡광도를 측정함으로써 유출된 젖산 탈수소효소 활성을 정량 하였다.

Thromboxane A2 생성능에 미치는 영향 - Ko등¹³⁾에 의해 기술된 방법에 따라 다음과 같이 TXA_2 의 생성능을 측정하였다. 1 mM Ca^{2+} 존재 하에 0.5 ml의 washed platelet (3×10^8 cells/ml)을 큐벳에서 37°C를 유지시키면서 실험을 수행하였다. 먼저 세정 혈소판을 PQ5로 5분간 전처리한 후에 collagen (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 가하였다. 6분 동안 배양한 후에 2 mM EDTA와 50 μM indomethacin을 가하여 반응을 정지시키고 상온에서 12,000×g, 2분 동안 원심분리 시킨 후에 상층을 취하여 -20°C에서 보관하였다. TXA_2 는 불안정한 구조를 가지고 있기 때문에 곧바로 안정된 형태인 TXB_2 로 변환되므로, TXB_2 의 생성을 TXA_2 생성의 지표로

하여 방사면역 측정법 (radioimmunoassay)으로 측정하였다.

Arachidonic Acid Release - Washed platelet에 [^3H]-arachidonic acid (4 μCi)를 가하여 37°C에서 90분간 배양한 뒤 BSA (30 mg/150 ml)를 가하여 37°C, 10분간 배양하고 3회 세척하였다.¹⁶⁾ 세포현탁액 (4×10^8 cells/ml)에 10 μM 의 indomethacin을 가한 후 37°C에서 30분간 배양한 뒤 1 mM CaCl_2 존재 하에 37°C에서 교반하면서 5분간 약물을 전처리하였다. 응집 유발제로서 collagen (최종농도: 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 가한 5분 후 4°C 하에서 EDTA 2 mM을 가하여 반응을 정지시키고 14,000 rpm에서 3분간 원심분리하여 얻은 상층액 중의 방사능을 측정하였다. 혈소판에 0.1% Triton X-100을 처리했을 때 나타나는 방사능을 세포 내로 혼입된 총 [^3H]-arachidonic acid 값으로 하였다.

Cyclooxygenase 활성 측정 - 양의 정량으로부터 분리한 마이크로솜 분획 (SVM)을 이용한 cyclooxygenase assay kit(Biomol K-41, Plymouth Meeting, USA)를 이용하여 cyclooxygenase 억제 활성을 측정하였다. Kit에 제공된 SVM 및 cofactor 혼합물과 PQ5를 적당한 농도로 혼합한 뒤 22°C water bath에서 3분간 배양하였다. Arachidonic acid 2 μl 를 가한 뒤 강하게 혼합하고 3분간 더 배양한 후 10 μl 의 FeCl_2 용액을 가하여 섞은 뒤 실온에서 15분간 방치하였다. 4°C, 3,000×g에서 10분간 원심분리한 뒤 상층을 얻어 방사면역 측정법에 의해 PGE_2 를 정량하였다.

Thromboxane Synthase Assay - Thromboxane synthase assay kit (BIOMOL[®], Plymouth Meeting, USA)를 사용하여 실험하였다. Silicon (Sigma coat[®], St. Louis, USA)으로 코팅한 시험관에 약물과 혈소판으로부터 분리한 마이크로솜을 가한 다음 25°C의 수욕 상에서 3분간 미리 가온하였다. PGH_2 를 반응액에 가한 다음 잘 교반하고 3분간 반응시켰다. FeCl_2 를 가해 반응을 중지시키고 실온에서 15분간 방치한 후 4°C, 4,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액 중의 TXB_2 의 양을 방사면역 측정법에 의해 정량하였다.

ATP Release 측정 - 혈소판 현탁액중의 ATP는 fire fly luciferin-luciferase 용액과 반응하여 luminescent light를 방출하며 그 강도는 세포질내의 ATP 존재량에 비례한다. 따라서 과립으로부터 유리된 ATP의 양은 이 light를 lumiaggregometer를 통하여 측정함으로써 간접적으로 알 수 있다. Silicon으로

coating된 cuvette에 혈소판 현탁액 (450 μ l)과 10^{-4} M ~ 10^{-6} M의 sample (50 μ l)을 가하고 37°C에서 2분간 pre-incubation하였다. 50 μ l의 luciferin-luciferase 용액 (Chronolog, Harvertown, USA)을 가하여 다시 2분간 배양한 다음 collagen (3 μ g)을 혈소판 응집 유도제로하여 혈소판을 활성화 시켜 유리되어 나온 ATP를 측정하였다. 유리된 ATP의 양은 chart상에 나타난 peak의 높이를 측정한 후 0.04 μ M ATP를 이용하여 동일한 실험을 진행시키고 그 peak 높이로부터 비교 산출하였다.

혈액응고에 대한 효과 - 혈액응고의 지표인 PT (prothrombin time)과 APTT (activated partial thromboplastin time)을 측정하였다. 0.38%의 sodium citrate가 포함되어도록 채혈한 후 2000 rpm에서 15분간 원심분리하여 platelet-poor-plasma를 얻었다. Reagent reservoir에 plasma 500 μ l와 측정농도의 약물을 넣은 다음 PT와 APTT를 동시에 측정할 수 있는 Coagulyzer ACL-3000(Instrumentation Lab., USA)을 이용하여 검사하였다.

통계처리 - 모든 실험결과는 mean \pm S.E.M.으로 나타내었으며 Student's t-test로 분석하여 각 군의 차이가 $p < 0.05$ 의 경우 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

실험결과 및 고찰

Vitamin K는 출혈시 항혈액응고 작용과 비출혈시 완화된 항혈전 작용을 나타내는 것으로 알려져 있으며⁸⁾, vitamin K의 모핵을 수식한 1,4-naphthalenedione 화합물들 역시 항혈소판 활성이 보고되어 있다.⁹⁻¹³⁾ 본 연구에서는 1,4-naphthalenedione 유도체인 PQ5 (Fig. 1)의

Table I - Inhibitory activities of PQ5 on agonist induced rat platelet aggregation

Sample	Inhibition (%)		
	Collagen (6 μ g/ml)	Thrombin (0.4 U/ml)	A23187 (3 μ M)
Aspirin (100 μ M)	71.0	44.1	66.2
PQ5	100.0	83.8	76.5

Rat platelets were incubated with PQ5 (100 μ M) for 5 min followed by the addition of collagen (6 μ g/ml), thrombin (0.4 U/ml) or A23187 (3 μ M). The peak level of aggregation was measured at 8 min after the addition of agonist. Aspirin (100 μ M) was used as a positive control. Data were representative of three separate experiments.

Table II - IC₅₀ of PQ5 required to inhibit rat platelet aggregation

Sample	IC ₅₀ (μ M)		
	Collagen (10 μ g/ml)	Thrombin (0.1 U/ml)	A23187 (10 μ M)
Aspirin	89.26	67.52	157.20
PQ5	5.50	25.89	37.12

Rat platelets were incubated with varying concentrations of PQ5 or aspirin for 5 min followed by the addition of collagen (6 μ g/ml), thrombin (0.4 U/ml) or A23187 (3 μ M). The peak level of aggregation was measured at 8 min after the addition of agonists and IC₅₀ values were determined from % inhibition of aggregation at each concentration.

항 혈소판 작용을 밝히고자 혈소판 응집 억제능과 혈소판 응집반응을 조절하는 주요 과정들인 TXA₂생성 및 과립분비반응에 미치는 영향 등을 검토하였다.

PQ5의 혈소판 응집 억제 작용 - PQ5의 혈소판 응집 저해활성을 검색하기 위해, 본 연구에서는 생리적 환경에서 혈소판 응집을 일으키는 collagen (6 μ g/ml), thrombin (0.4 U/ml)과 calcium ionophore인 A23187 (3 μ M)로 유도한 혈소판 응집반응에 미치는 영향을 검토하였다. 그 결과 PQ5는 100 μ M까지의 농도에서 collagen은 100%, thrombin은 83.8% 그리고 A23187에 대해서는 76.5%의 최대 억제율을 보였으며 (Table I) 이들 각각에 대해 계산된 IC₅₀는 5.50 μ M, 25.89 μ M, 37.12 μ M이었다 (Table II). 결과에서 보듯이 PQ5는 collagen으로 유도한 혈소판 응집반응에 대한 억제 활성이 특히 강력하였으며 표준물질로 사용한 aspirin보다 억제능이 강한 것을 확인할 수 있었다. PQ5의 혈소판에 대한 직접 세포 독성을 검토하기 위해 LDH 유출 실험을 한 결과 유의할 만한 직접적인 세포 독성작용은 관찰되지 않았다 (Table III). 따라서 PQ5의 응집 억제 활성은 직접적인 세포독성에는

Table III - Effect of PQ5 on LDH release from rat platelet

Sample	Concentration (μ M)	% of Total release
Saline		12.0 \pm 2.09
Vehicle (DMSO)		13.8 \pm 4.62
PQ5	100	14.5 \pm 0.00
	10	13.3 \pm 2.09
Triton X-100		100.0 \pm 0.00

Rat platelets were incubated with PQ5 or vehicle (DMSO 0.1%) for 10 min and centrifuged for 2 minutes (12,000 \times g). Supernatants were assayed for the activity of lactate dehydrogenase. Total activity was determined from TritonX-100 (0.1%) treated lysate. Values are mean \pm SEM.

기인하지 않는 것으로 확인되었다.

PQ5가 TXA₂ 합성 경로에 미치는 영향 - 혈소판이 활성화되면 세포질내의 PLA₂가 세포질막쪽으로 이동하여 활성이 증가되며 이는 세포질막으로부터 arachidonic acid 유리를 증가시키게 된다.¹⁷⁾ 유리된 arachidonic acid는 cyclooxygenase 및 thromboxane synthase에 의해 강력한 혈소판 응집 유발 물질인 TXA₂로 변화한다. 또한 혈소판이 활성화되는 초기 응집과정에서 ADP 및 serotonin 등이 분비되고 이들에 의해서도 TXA₂ 생성이 촉진되는데 이렇게 생성된 TXA₂가 혈소판 표면의 수용체에 결합함으로써 비가역적인 2차 응집반응으로 증폭되는 현상이 일어나게 된다.^{5,6)} TXA₂는 0.1 μM 농도 이하에서도 혈소판의 혈관벽에 대한 부착능의 증가,¹⁸⁾ 혈소판 형태 변화 유발, adenylate

cyclase 억제제를 통한 cAMP 생성의 감소,^{19,20)} 혈소판 내 칼슘 농도의 증가,²¹⁾ fibrinogen 수용체의 노출 증가 등의 작용으로 혈소판의 응집반응을 증폭시켜 대규모의 혈괴를 형성시키는 것으로 알려져 있다.²²⁾ 이와 같이, TXA₂는 혈소판 응집 반응에 있어 중심적인 조절자로서 작용하며, 따라서 이의 생성을 차단함으로써 효과적인 혈소판 응집 저해작용을 기대할 수 있다. 실제로 이는 현재 혈소판 응집 저해제 개발에 있어 주된 연구방향이기도 하다.⁵⁾ 1,4-Naphthalenedione 유도체들은 혈소판 응집 유발제 처리에 의한 TXA₂ 생성을 억제하는 것으로 보고된 바 있어,^{9,12)} 본 연구에서도 PQ5가 TXA₂ 합성에 미치는 영향을 살펴봄으로써 혈소판 응집 억제작용과의 관련성을 검토하였다. 그 결과, PQ5는 collagen (6 μg/ml)처리에 의해 유도되는 TXA₂ 합성을 농도 의존적으로 억제하였으며 사용된 모든 농도에서 용매 대조군과 비교하여 통계적으로 유의적인 차이가 관찰되었다 (Fig. 2A). 이와는 달리 arachidonic acid로 TXA₂ 합성을 유도한 경우에는 PQ5에 의한 억제작용이 관찰되지 않았다 (Fig. 2B). 이 결과들은 PQ5의 혈소판 응집 억제작용이 TXA₂ 합성 저해에 기인하며, TXA₂ 합성에 관여하는 효소들 중 arachidonic acid를 기질로 사용하는 cyclooxygenase나 그 아랫 단계인 thromboxane synthase의 활성 저해가 아니라 혈소판 세포내막으로부터의

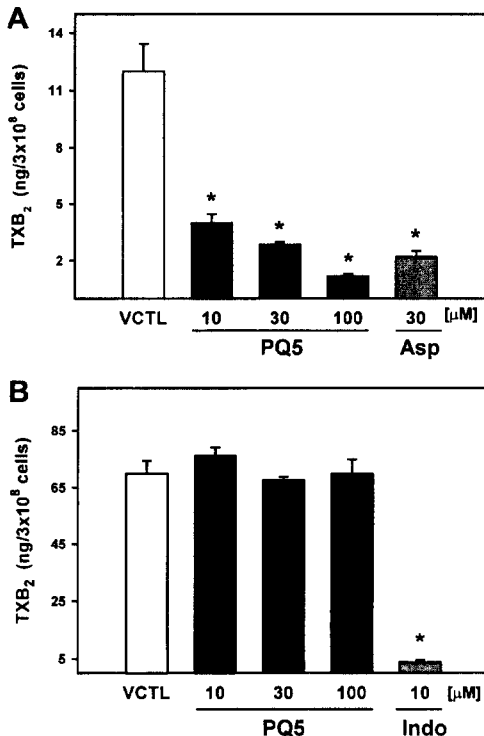


Fig. 2 - Effects of PQ5 on agonist-induced TXB₂ formation in rat platelet: PQ5 was incubated with platelets at 37°C for 5 min, followed by the addition of collagen (A. 6 μg/ml) or arachidonic acid (B. 30 μM). After 6 minutes, TXB₂ formation was terminated by the addition of EDTA (2 mM) and indomethacin (Indo, 50 μM). Aspirin (Asp, 30 μM) and indomethacin (10 μM) were used as the positive inhibitors. Data are expressed as mean ± SEM (n=5). *p<0.05 as compared to vehicle control (VCTL).

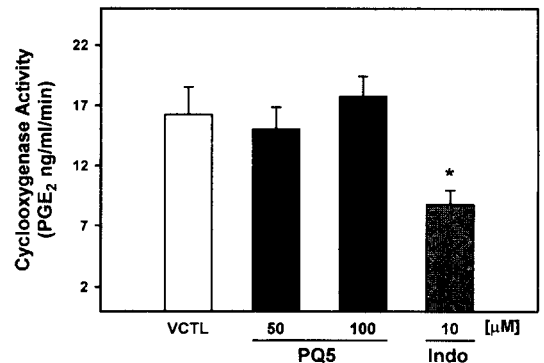


Fig. 3 - Effect of PQ5 on cyclooxygenase activity: Sheep vesicular gland microsomes were pretreated with PQ5 at 25°C for 3 minutes and further incubated with AA for another 3 minutes. Reaction was stopped by FeCl₂ and supernatant was subjected to RIA for PGE₂ determination. Indomethacin (Indo, 10 μM) was used as positive inhibitor. Data are expressed as mean ± SEM (n=4). *p<0.05 as compared to vehicle control (VCTL).

arachidonic acid 유리 억제에 기인할 것임을 강하게 시사하고 있다. 이러한 추론을 확인하고자, cyclooxygenase 활성, thromboxane synthase 활성 및 arachidonic acid 유리에 미치는 영향을 검토하였으며, 그 결과, PQ5는 cyclooxygenase 활성을 억제하지 못하였고(Fig. 3), thromboxane synthase의 활성은 100 μM 에서만 억제함을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 반면,

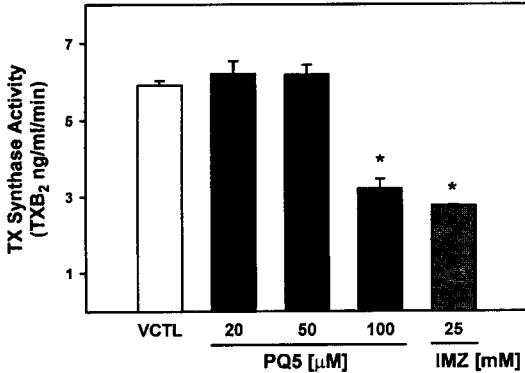


Fig. 4 – Effect of PQ5 on thromboxane synthase activity: Human platelet microsome was pretreated with PQ5 at 25°C for 3 minutes and further incubated with prostaglandin H₂ for another 3 minutes. TXB₂ synthesis was terminated by FeCl₂ and supernatant was subjected to RIA for TXB₂ determination. Imidazole (IMZ, 20 mM) was used as positive inhibitor. Data are expressed as mean \pm SEM (n=4). *p<0.05 as compared to vehicle control (VCTL).

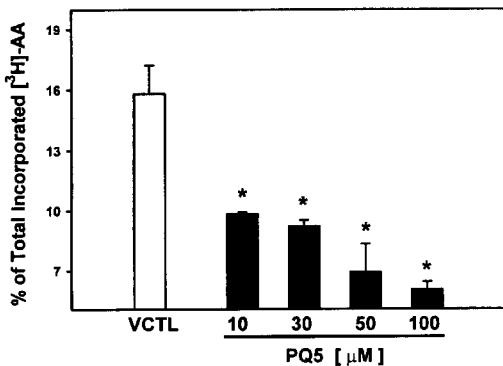


Fig. 5 – Effect of PQ5 on arachidonic acid (AA) release in [3H]-AA incorporated platelet: [3H]-AA incorporated platelet was incubated with PQ5 at 37°C for 5 min, followed by the addition of collagen (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). After 5 minutes, AA release was terminated by the addition of EDTA (25 mM). Data are expressed as mean \pm SEM (n=4). *p<0.05 as compared to vehicle control (VCTL).

동위원소 표지된 arachidonic acid 유리정도를 척도로 PLA₂의 활성을 간접적으로 측정할 경우 PQ5는 10 μM 농도에서도 통계적으로 유의한 억제작용을 나타내었다(Fig. 5). 따라서 PQ5에 의한 TXA₂ 합성 저해 작용은 주로 세포막으로부터의 arachidonic acid 유리 억제에 기인하는 것임을 확인할 수 있었다.

1,4-Naphthalenedione 유도체가 TXA₂ 생성 효소들에 미치는 영향은 논문에 따라 상이한 결과들이 보고되어 있는데, menadione의 경우 arachidonic acid 유리에는 영향을 주지 않으나,⁸⁾ 2-chloromenadione 또는 acetylshikonin등은 arachidonic acid 유리를 억제함으로써 TXA₂ 생성을 저해하는 것으로 알려져 있다.⁹⁾ 또한, 2-arylamino-3-chloro-1,4-naphthalenedione 유도체인 NQ-Y15는 PLA₂ 및 cyclooxygenase의 활성에는 영향을 주지 않으나 thromboxane synthase 활성을 강하게 억제하는 것으로 보고된 바 있어¹²⁾ PQ5의 작용과는 약간의 차이를 보이고 있다. 1,4-Naphthalenedione 유도체들의 이러한 작용상의 차이점들은 그 구조적 상이성에 기인하는 것으로 추정되나 이는 향후 진전된 연구를 통해 규명되어야 할 것이다.

PQ5가 granule release 및 세포내 calcium 동원에 미치는 영향 – 혈소판 응집은 1차 가역적 응집 반응과 2차 비가역적 응집 반응으로 구분되며, 2차 비가역적 응집 반응을 통해 안정된 응집괴가 형성되는 것으로 알려져 있다. 이 2차 비가역적 응집 반응 과정에서는 혈소판내의 각종 granule들의 release가 촉진되어 다

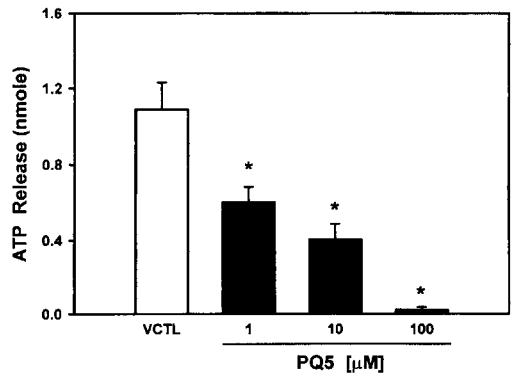


Fig. 6 – Effect of PQ5 on collagen-induced ATP release in rat platelet: Platelets were pretreated with PQ5 for 5 min and further incubated with collagen (6 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 6 minutes. Data are expressed as mean \pm SEM (n=4). *p<0.05 as compared to vehicle control (VCTL).

양한 종류의 효소 및 ATP, serotonin, calcium 등의 활성 물질들이 분비되며 이로 인해 혈소판 응집 반응이 증폭, 안정화된다. 따라서 granule release 반응을 차단함으로써 혈소판 응집을 효과적으로 억제할 수 있다. 본 연구에서는 PQ5의 혈소판 응집 억제 기전을 확인하기 위하여 ATP release를 지표로 dense granule release에 미치는 영향을 검토하였다. 그 결과, PQ5는 농도 의존적으로 ATP release를 억제하였으며, 1 μM 의 농도에서도 통계적으로 유의적인 저해작용을 나타내었다(Fig. 6).

혈소판 과립성분의 분비는 cytoskeleton인 actin-myosin의 수축에 의해 과립들간이나 과립과 혈소판 표

면으로 연결된 통로인 surface connected canalicular system (SCCS)이 융합되면서 일어나게 된다.²³⁾ 이러한 과립 분비현상이 일어나기 위해서는 세포 내 Ca^{2+} 농도의 상승이 필요조건이며, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 가 상승하면 혈소판 응집과 과립분비에 관여하는 효소인 phospholipase C, myosin light chain kinase (MLCK), PLA_2 등이 활성화되는 것으로 알려져 있다. 그러므로 세포내 Ca^{2+} 농도 증가는 혈소판 활성화의 중요한 신호가 된다고 할 수 있다. 이와 같은 사실들로부터 PQ5에 의한 혈소판 응집 억제 및 혈소판 과립분비 저해작용은 세포내 Ca^{2+} 농도상승 억제와 관련이 있을 것으로 추론하고 세포내 Ca^{2+} 의 농도증가에 의해 유발되는 혈소판 응집을 측정하여 PQ5의 세포내 calcium 동원에 미치는 영향을 검토하였다.

우선, 세포 외액으로부터의 Ca^{2+} 유입에 미치는 PQ5의 영향을 확인하고자 과량의 EDTA (0.1 mM) 처리로 세포의 Ca^{2+} 을 제거하고 저농도의 collagen (2 $\mu\text{g}/\text{m}$)을 가해 세포내 저장소의 Ca^{2+} 도 유리시켜 제거한 후 세포외액에 과량의 CaCl_2 (4.0 mM)를 가함으로써 유도되는 Ca^{2+} 유입에 의한 혈소판 응집 반응을 검토한 결과, PQ5는 5 μM 농도까지 유의적인 억제효과를 나타내었다(Fig. 7A). 또한, 혈소판내의 Ca^{2+} 저장소인 dense tubular system의 Ca^{2+} -ATPase를 억제함으로써 저장소로의 Ca^{2+} uptake를 차단하여 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 을 증가시키는 것으로 알려진 thapsigargin (0.1 μM)으로 유도한 혈소판 응집반응의 경우에도 PQ5는 농도 의존적인 억제효과를 나타내었다(Fig. 7B). 이들 결과로부터 PQ5는 세포외액으로부터 세포질내로의 calcium 유입과 함께 세포내 저장소로부터의 calcium 유리를 저해함으로써 세포질내 유리 calcium 농도($[\text{Ca}^{2+}]_i$)의 증가를 억제하며 이를 통해 과립 분비반응 및 혈소판 응집을 억제하는 것으로 추론할 수 있었다. 1,4-

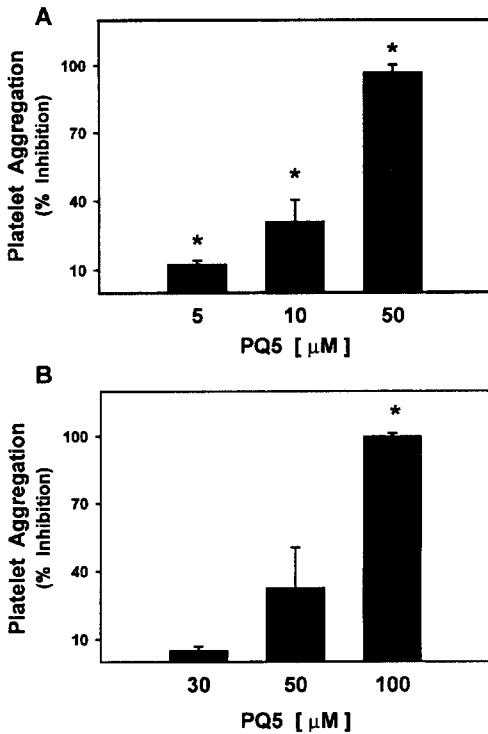


Fig. 7 - Effects of PQ5 on calcium-induced platelet aggregation: (A) Effect of PQ5 on extracellular calcium-mediated aggregation induced by collagen: Platelets in the buffer containing EDTA (0.1 mM) were incubated with PQ5 at 37°C for 5 min, followed by the addition of collagen (2 $\mu\text{g}/\text{m}$). After 1 minute, CaCl_2 (4.0 mM) was added to trigger aggregation. (B) Effect of PQ5 on thapsigargin-induced platelet aggregation: Platelets were incubated with PQ5 for 5 min followed by the addition of thapsigargin (0.1 μM). Data are expressed as mean \pm SEM (n = 4). *p < 0.05 as compared to vehicle control (VCTL).

Table IV - Effects of PQ5 on blood coagulation

Sample	Concentration (μM)	PT (second)	APTT (second)
Blank		18.2 \pm 0.08	21.4 \pm 0.02
V-control		18.0 \pm 0.07	20.9 \pm 0.05
PQ5	10 μM	18.2 \pm 0.06	21.5 \pm 0.11
	50 μM	18.2 \pm 0.05	21.1 \pm 0.07
	100 μM	18.1 \pm 0.03	21.2 \pm 0.07

PQ5 was added to rat platelet-poor-plasma and PT and APTT were determined using Coagulzyer ACL-3000 (Instrumentation Lab., USA). PT: prothrombin time; APTT: activated partial thromboplastin time. Values are mean \pm SEM.

Naphthalenedione 유도체는 일반적으로 혈소판 응집 유발제에 의한 세포내 Ca^{2+} 농도상승을 억제하는 것으로 보고되고 있으나 세포내 저장소로부터의 유리 또는 외부로부터의 유입에 미치는 영향에 대해서는 연구자 또는 물질마다 상이한 연구결과가 보고되어 있다.^{9,11-13)} 일부 1,4-naphthalenedione 유도체들은 phosphoinositide turnover의 저해를 통해 세포내 Ca^{2+} 농도 상승을 억제하는 것으로 알려져 있으며,^{11,13)} 따라서, PQ5에 의한 세포내 Ca^{2+} 농도 상승저해 작용도 유사한 기전에 의할 것으로 추정되나 이에 관해서는 향후 진전된 연구를 통하여 확인하고자 한다.

PQ5가 혈액 응고 인자에 미치는 영향 - Vitamin K 유도체들은 일반적으로 혈액응고 인자 생성을 억제함으로써 항혈액응고 작용 (anticoagulation)을 나타내는 것으로 알려져 있다. 본 연구에 이용된 PQ5가 vitamin K 와 동일 1,4-naphthalenedione 모핵을 갖는 구조 유사체 (analog)이어서 PQ5의 혈액 응고에 미치는 영향을 검토한 결과, Table IV에서 보듯이 prothrombin time (PT) 또는 activated partial thromboplastin time (APTT)에 전혀 유의적인 영향을 주지 못하였으며, 따라서 PQ5의 항혈전 작용은 혈소판 응집억제 작용에 국한되어 있음을 확인할 수 있었다.

이상의 결과들을 종합해 볼 때, PQ5는 혈소판 내 Ca^{2+} 농도 상승을 억제하여 과립분비를 차단하는 것과 더불어 PLA_2 의 활성을 저해함으로써 TXA_2 생성을 감소시킴으로써 혈소판 응집을 억제하는 것으로 사료된다.

감사의 말씀

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

문 헌

- Packham, M. A. : The role of platelets in thrombosis and hemostasis. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **72**, 278 (1994).
- Winocour, P. D.: Platelets, vascular disease and diabetes mellitus. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **72**, 295 (1994).
- Blockmans, D., Deckmyn, H. and Vermeylen, J. : Platelet activation. *Blood Rev.* **9**, 143 (1995).
- Johnson, W. T. and Dufault, S. N. : Intracellular calcium mobilization in rat platelets is adversely affected by copper deficiency. *Biochim. Biophys. Acta* **1175**, 263 (1993).
- Meanwell, N. A. and Seiler, S. M. : Platelet activation and drugs that modify platelet function. In *Drugs and the delivery of oxygen to tissue.* (Fleming, J.S., Ed.), CRC Press, p. 135 (1990).
- Hourani, S. M. O. and Cusack, N. J. : Pharmacological receptors on blood platelets. *Pharmacol. Rev.* **43**(3), 243 (1991).
- FitzGerald, G. A. : Mechanism of platelet activation: thromboxane A_2 as an amplifying signal for other agonists. *Am. J. Cardiol.* **11B-15B** (1991).
- Blackwell, G. J., Radomski, M. and Moncada, S. : Inhibition of human platelet aggregation by vitamin K. *Thromb. Res.* **37**, 103 (1985).
- Ko, F. N., Sheu, S. J., Lin, Y. M., Huang, T. F. and Teng, C. M. : Inhibition of rabbit platelet aggregation by 1,4-naphthoquinones. *Thromb. Res.* **57**, 453 (1990).
- Huang, L. J., Chang, F. C., Lee, K. H., Wang, J. P., Teng, C. M. and Kuo, S. C. : Synthesis and antiplatelet, antiinflammatory, and antiallergic activities of substituted-chloro-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone and related compounds. *Bioorg. Med. Chem.* **6**(12), 2261 (1998).
- Liao, C. H., Ko, F. N., Kuo, S. C. and Teng, C. M. : Effect of PPID-1, a synthetic antiplatelet compound, on rabbit platelets. *Jpn. J. Pharmacol.* **76**(2), 141 (1998).
- Chang T. S., Kim H. M., Lee, K. S. Mar, W. C., Ryu C. K. and Moon C. K. : Thromboxane A_2 synthase inhibition and thromboxane A_2 receptor blockade by 2-(4-cyanophenyl)amino-3-chloro-1,4-naphthalenedione (NQY-15) in rat platelets. *Biochem. Pharmacol.* **54**, 259 (1997).
- Kang, W. S., Joo, J. C., Ryu, C. K., Chung, K. H., Ko, M. W., Yuk, D. Y., Yoo, H. S. and Yun, Y. P. : Studies on the antithrombotic and antiplatelet activities of NQ304, a newly synthesized naphthoquinone derivative. *Arzneimittel-Forschung (Drug Res.)* in press (1999).
- Argarwal, N. L. and Schaefer, W.: Reaction of 2,3-

- dichloro-1,4-naphthoquinone with arylamines in pyridine. *J. Org. Chem.* **45**, 5139 (1980).
- 15) Lee, S. H., Jung, Y. S., Hong, J., Kim, M. H., Lee, H. J., Baik, E. J., Wang, H. J., Kim, M. W. and Moon, C. H.: Effect of MCT (medium-chain triglyceride) and LCT (long-chain triglyceride) on myocardial ischemia/reperfusion injury and platelet aggregation in rat. *J. Appl. Pharmacol.* **6**, 358 (1998).
- 16) Bartoli, F., Lin, H. K., Ghomaschi, F., Gelb, M. H., Jain, M. K. and Apitz-Castro, R.: Tight binding inhibitors of 85-KDa phospholipase A₂ but not 14-KDa phospholipase A₂ inhibit release of free arachidonate in thrombin-stimulated human platelets. *J. Biol. Chem.* **269**, 15625 (1994).
- 17) Purdon, A. D., Patelunas, D. and Smith, J. B.: Evidence for the release of arachidonic acid through the selective action of phospholipase A₂ in thrombin-stimulated human platelets. *Biochim. Biophys. Acta* **920**, 205 (1987).
- 18) Bennett, J. S., Vilair, G. and Burch, J. W.: A role for prostaglandins and thromboxanes in the exposure of platelet fibrinogen receptors. *J. Clin. Invest.* **68**, 981 (1981).
- 19) Gorman, R. R., Fitzpatrick, F. A. and Miller, O. V.: Reciprocal regulation of human platelet cAMP levels by thromboxane A₂ and protacyclin. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* **9**, 597 (1978).
- 20) Avdonin, P. V., Svitina-Ulltina, I. V., Leytin, V. L. and Tkachuk, V. A.: Interaction of stable prostaglandin endoperoxide analogs U46619 and U44069 with human platelet membranes coupling of receptors with high-affinity GTPase and adenylate cyclase. *Thromb. Res.* **40**, 101 (1985).
- 21) Moriyama, T., Takamura, H., Narita, H., Tanaka, K., Matsuura, T. and Kito, M.: Elevation of cytosolic free Ca²⁺ is directly evoked by thromboxane A₂ in human platelets during activation with collagen. *J. Biochem.* **103**, 901 (1988).
- 22) Pollock, W. K., Armstrong, R. A., Brydon, L. J., Jones, R. L. and MacIntyre, D. E.: Thromboxane-induced phosphatidate formation in human platelets. Relationship to receptor occupancy and to changed in cytosolic free calcium. *Biochem. J.* **219**, 833 (1984).
- 23) Feinman, R. D., Detwiler, T. C. and Ingerman-Wojewski, C.: The lumiaggregometer as a research and tool. In: *The platelets: physiology and pharmacology*. (Longenecker, G.L., Ed.). p. 429, Academic Press, New York. (1985).