

## Thrombus Formation Inhibition of Esculetin through Regulation of Cyclic Nucleotides on Collagen-Induced Platelets

Dong-Ha Lee<sup>†,\*</sup>

Department of Biomedical Laboratory Science, Molecular Diagnostics Research Institute,  
Namseoul University, Chungcheongnam-do 31020, Korea

Physiological agents trigger a signaling process called "inside-out signaling" and activated platelets promote adhesion, granule release, and conformational changes of glycoprotein IIb/IIIa ( $\alpha$ IIb/ $\beta$ <sub>3</sub>). Activated  $\alpha$ IIb/ $\beta$ <sub>3</sub> interacts with fibrinogen and initiates a second signaling step called "external signaling". These two signaling pathways can cause hemostasis or thrombosis, and thrombosis is a possible medical problem in arterial and venous vessels, and platelet-mediated thrombosis is a major cause of cardiovascular disease (CVD). Therefore, modulating platelet activity is important for platelet-mediated thrombosis and cardiovascular disease. Esculetin is a coumarin-based physiologically active 6,7-dihydroxy derivative known to have pharmacological activity against obesity, diabetes, renal failure and CVD. Although some studies have confirmed the effects of esculetin in human platelet activation and experimental mouse models, it is not clear how esculetin has antiplatelet and antithrombotic effects. We confirmed the effect and mechanism of action of esculetin on human platelets induced by collagen. As a result, esculetin decreased  $Ca^{2+}$  recruitment through upregulation of inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor. In addition, esculetin upregulates cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and cyclic guanosine monophosphate (cGMP)-dependent pathways and inhibits fibrinogen binding and thrombus contraction. Our results demonstrate the antiplatelet effect and antithrombotic effect of esculetin in human platelets. Therefore, we suggest that esculetin could be a potential phytochemical for the prevention of thrombus-mediated CVD.

**Key Words:** Esculetin, cAMP/cGMP, Intracellular  $Ca^{2+}$ , Fibrinogen binding, Fbrin clot

### 서 론

정상적인 순환에서 collagen 섬유는 혈소판에 결합할 수 없지만 내피 벽이 손상되어 collagen 섬유가 노출되게 되면, collagen 섬유가 혈소판 막 수용체의 integrin  $\alpha_2\beta_1$  및 glycoprotein VI에 결합함으로써 inside-out signaling 경로를 통해 혈소판의 활성화를 유도한다(Chen and Kahn, 2003). 혈소판 활성화가 일어나면, 세포질 내 phospholipase C $\gamma$ 2는 phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate를 inositol diacylglycerol

과 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>)로 가수분해 되는데, 내피벽이 손상되면 collagen이 노출되어 혈소판의 integrin  $\alpha_2\beta_1$  및 glycoprotein VI에 결합함으로써 혈소판 활성화가 일어나는 동안 phospholipase C $\gamma$ 2는 phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate를 inositol diacylglycerol과 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>)로 분해하고, IP<sub>3</sub>는 소포체로부터 칼슘을 세포질 내로 이동시킨다(Farndale, 2006). 활성화된 혈소판에서 이러한 신호 전달 이벤트는 glycoprotein IIb/IIIa (integrin  $\alpha$ IIb/ $\beta$ <sub>3</sub>)의 구조적 변화를 일으켜 혈전 형성 및 혈소판 매개 혈전 수축을 유발합니다(Phillips et al., 2001). 따라서 혈소판은 지혈에 필

Received: October 5, 2021 / Accepted: November 22, 2021

\*Professor.

<sup>†</sup>Corresponding author: Dong-Ha Lee. Department of Biomedical Laboratory Science, Molecular Diagnostics Research Institute, Namseoul University, 91, Daehak-ro, Seonghwan-eup, Seobuk-gu, Cheonan-si, Chungcheongnam-do 31020, Korea.

Tel: +82-41-580-2148, Fax: 041-580-2932, e-mail: dhlee@nsu.ac.kr

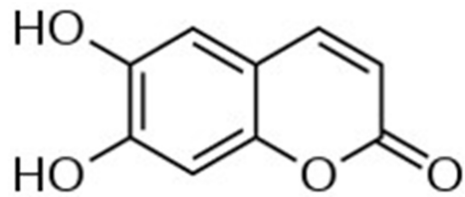
©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

수적인 요소인 동시에 혈전증의 위험을 내포하고 있습니다. CVD 환자의 혈전증을 효과적으로 감소시키기 위해 항혈소판제가 이용되기 있지만 일부 약물들의 부작용들도 보고되고 있다(Jackson, 2011). 따라서 새로운 항혈소판제 개발을 위해 다양한 약용식물의 항혈소판 활성화에 주목하고 있다. 또한, 최근 코로나19 백신으로 뇌정맥동 혈전증(CVST), 출혈성 뇌졸중 등의 부작용 사례가 보고되고 있어, 향후 코로나19 백신의 사용에 항혈전제의 병행 사용을 위해서라도 안정적인 항혈전 성분의 규명이 시급하다(Kantarcioğlu et al., 2021).

정상적인 혈액 순환에서 내피 세포는 비활성 혈소판 상태를 유지하는 nitric acid와 prostaglandin I<sub>2</sub>를 방출하는데, 이 물질들은 혈소판에 작용하여 cAMP 및 cGMP 수준을 증가시킨다. 이 중 cAMP은 protein kinase A (PKA)의 활성화를, cGMP는 protein kinase G (PKG)의 활성화를 유도하여 vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) 및 inositol 1,4,5-triphosphate receptor (IP<sub>3</sub>R)의 인산화를 일으킨다(Schwarz et al., 2011). IP<sub>3</sub>R의 인산화를 통해 IP<sub>3</sub>R의 비활성화가 이루어지며, 이는 dense tubular system으로부터 세포질 내로의 Ca<sup>2+</sup> 동원을 억제하는 결과를 초래한다(Cavallini et al., 1996; Quinton and Dean, 1992). 혈소판에서, VASP는 cAMP-의존성인 VASP Ser<sup>157</sup> 및 cGMP-의존성인 VASP Ser<sup>239</sup>가 있으며 이들의 인산화가 일어날 때, αIIb/β<sub>3</sub> 활성화 및 actin filament 활성이 억제되는 것으로 보고된 바 있다(Laurent et al., 1999; Sudo et al., 2003). 따라서, cyclic nucleotides를 조절하는 약용 식물은 혈소판 매개 혈전증에 사용될 가능성이 있다.

*Scopolia*나 *Artemisia* 속의 식물 뿌리에 주로 함유되어 있다고 보고된 esculletin은 항당뇨, 항염증, 항암 등의 여러 약리학적 효과를 가지고 있다(Karthika et al., 2012). 몇몇 연구에 따르면, esculletin은 심혈관계에 보호 효과가 있다고 보고되었고, esculletin을 경구로 전처리 하였을 때 isoproterenol로 유도한 심근경색증의 쥐에서 anti-lipoperoxidative 효과를 나타내었으며, 이는 free radical 소거 특성 때문일 것으로 보았다(Liang et al., 2017). 다른 연구에서 esculletin의 효과는 사람 혈소판 활성화 및 실험적 마우스 모델에서 조사되었으며, esculletin은 collagen 및 arachidonic acid로 유도한 사람 혈소판의 응집을 억제하기도 하였다(Hsia et al., 2019). 그러나, thrombin 및 U46619와 같은 다른 작용제에는 효과가 나타나지 않았고, esculletin가 혈소판 활성을 억제하는 기전도 불분명한 상태이다. 본 연구는 collagen 유도의 혈소판에서 esculletin가 cyclic



**Fig. 1.** The structure of esculletin. PIN: 6,7-Dihydroxy-2H-1-benzopyran-2-one, Chemical formula: C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>O<sub>4</sub>, Molar mass: 178.14 g/mol.

nucleotides 및 관련 신호 분자를 조절함으로써 혈소판 활성화 및 혈전 형성을 억제하는지를 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 시료

Avention Corporation (Incheon, Korea)에서 Esculetin을 제공하였다(Fig. 1). Collagen은 Chrono-Log Corporation (Havertown, PA, USA)로부터 제공받았고, cAMP과 cGMP Enzyme Immunoassay (EIA) kits, serotonin EIA kit 및 ATP assay kit는 Cayman Chemical (Ann Arbor, Miami, USA)로부터 구입하여 사용하였다. Invitrogen (Eugene, OR, USA)으로부터 Alexa Fluor 488-conjugate fibrinogen과 Fura 2-AM을 제공받았다. Western blotting에 이용되는 antibody들은 Cell Signaling (Beverly, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다. Enhanced chemiluminescence solution (ECL) 및 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane의 시약은 General Electric Healthcare (Chalfont St. Giles, Buckinghamshire, UK)로부터 확보하였다.

### 사람 혈소판 부유액 준비

대한 적십자사 혈액원(Suwon, Korea)에서 제공받은 사람의 혈소판 풍부 혈장(PRP)으로 실험을 수행하였다. 세척 혈소판은 기존의 준비 방법에 따라서 준비되었다(Shin et al., 2019). PRP를 1,300 ×g로 10분 동안 원심분리하고, 하층의 혈소판을 획득하여 세척완충액(138 mM NaCl, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2.7 mM KCl, 5.5 mM glucose, 0.36 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 및 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 6.9)로 2번 세척하였다. 이후 현탁완충액(138 mM NaCl, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2.7 mM KCl, 5.5 mM glucose, 0.36 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.25% gelatin, pH 7.4)을 사용하여 최종적으로 10<sup>8</sup> cells/mL가 되게 재구성하였다. 저온에서 혈소판 응집이 유발될 수 있기에 상기의 모든 과정을 실온에서 진행하였으며, 남서울대학교 In-

stitutional Review Board (IRB)의 승인(1041479-HR-201803-003)을 거쳐 실험이 이루어졌다.

### Cyclic nucleotides(cAMP 및 cGMP) 생성량의 측정

세척한 사람 혈소판에 다양한 농도의 esculetin을 전처리하였다. 37°C에서 3분간 배양하고, 2 mM의 CaCl<sub>2</sub>를 첨가한 다음, 2.5 µg/mL의 collagen를 첨가해주어 5분 동안 반응하였다. 1 M의 HCl를 첨가하여 반응을 정지하였고, cAMP 및 cGMP ELISA kits를 사용하여 ELISA-reader (Molecular devices, San Jose, CA, USA)에서 cAMP 및 cGMP 수준을 측정하였다.

### 세포 내 Ca<sup>2+</sup> 동원량의 측정

5 µM의 Fura 2-AM를 PRP에 넣고 37°C에서 60분 동안 배양한 다음, 세척 완충액으로 2번 세척하였다. 이 후, 현탁완충액으로 최종 농도가 10<sup>8</sup> cells/mL가 되도록 재구성하고, 다양한 농도의 esculetin을 전처리하였다. 37°C에서 3분 동안 배양하고, 2 mM CaCl<sub>2</sub>를 첨가한 다음, 2.5 µg/mL의 collagen로 첨가해 주어 5분 동안 반응하였다. Bio-Teck Instrument사(Winooski, Vermont, USA)의 형광분광광도계(SFM 25, USA)로 초기 값 340~380 nm의 여기파장과 510 nm의 방출 파장에서 Fura 2의 형광을 측정하였다. Grynkiewicz의 방법을 이용하여 세포질로 동원되는 Ca<sup>2+</sup>을 산출하였다(Grynkiewicz et al., 1985).

### 혈소판 막 αIIb/β<sub>3</sub>에 대한 fibrinogen binding 정도의 측정

세척된 사람 혈소판에 다양한 농도의 esculetin을 전처리하였다. 37°C에서 3분간 배양하고, 2 mM의 CaCl<sub>2</sub>를 첨가한 다음, 2.5 µg/mL의 collagen와 15 µg/mL의 Alexa Flour 488-human fibrinogen와 첨가해주어 5분 동안 반응하였다. 0.5% paraformaldehyde가 함유된 phosphate-buffered saline (pH 7.4)를 첨가함으로써 반응을 정지하였고, BD Bioscience 사(San Jose, CA, USA)의 유세포 분석기(FACS)로 fibrinogen binding 정도를 측정하였다. 항체가 가진 형광을 유지시키기 위하여 상기의 과정을 어두운 환경에서 진행하였고, Cell-Quest software (BD Biosciences)를 분석프로그램으로 사용하였다.

### 혈소판이 매개한 fibrin clot 형성능 측정

400 µL의 PRP를 polyethylene tube로 옮긴 다음, 여러 농도의 esculetin을 전처리하였다. 37°C에서 3분간 배양하고 2 mM의 CaCl<sub>2</sub>를 첨가한 다음, fibrin clot 형성을 유발하기

위해 0.05 U/mL의 thrombin를 넣어 37°C에서 15분 동안 하였다. Fibrin clot의 이미지를 디지털 카메라로 촬영하였고, Image J Software (v1.46, National Institutes of Health, USA)의 프로그램으로 fibrin clot이 형성된 면적을 계산하였다.

### Immunoblotting

세척한 사람 혈소판에 다양한 농도의 esculetin을 전처리하였다. 37°C에서 3분간 배양하고, 2 mM의 CaCl<sub>2</sub>를 첨가한 다음, 2.5 µg/mL의 collagen를 첨가해주어 5분 동안 반응하였다. 같은 양의 lysis buffer를 첨가하여 반응을 정지하였고, BCA assay kit (Pierce Biotechnology, Illinois, USA)로 단백질 농도를 정량하였다. 20 µg의 단백질을 함유한 혈소판 용해물을 SDS-PAGE (8%)에서 전기영동하였고, PVDF membrane으로 옮겨서 항체반응을 진행하였다. 1차 항체는 1:1,000의 희석배수의 1차 항체와 1:2,000의 희석배수의 2차 항체로 반응시킨 다음, ECL 시약(General Electric Healthcare, Buckinghamshire, UK)으로 시각화를 유발한 후, Image J Software (v1.46, National Institutes of Health, USA)의 프로그램으로 밴드의 면적을 계산하였다.

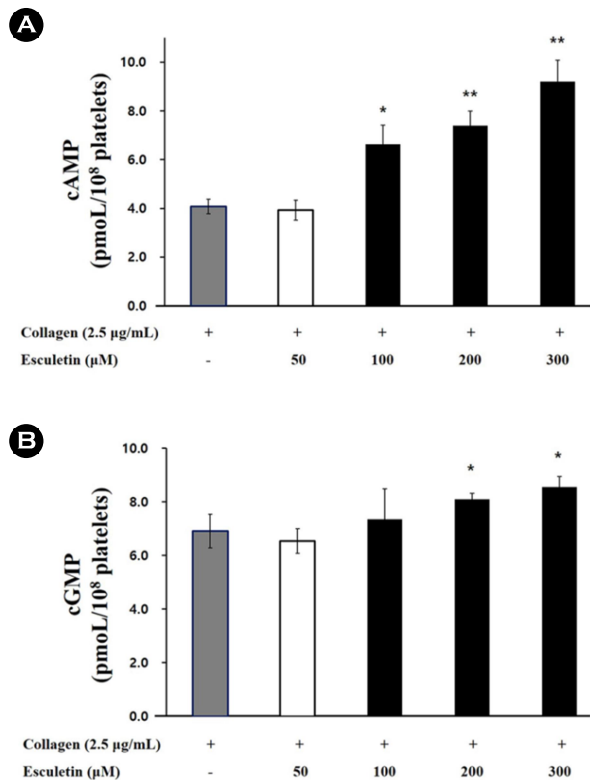
### 통계 분석

4회 이상의 반복 실험을 하였고 평균 ± 표준 편차로 실험 결과를 표시해 주었다. 각 그룹 간의 차이는 Student's *t*-test 또는 ANOVA를 이용하여 분석하였고, *P*<0.05인 경우는 통계적으로 유의한 것으로 보았다. 분산 분석에 따라 그룹 평균 간에 유의한 차이가 있을 경우에는 Scheffe의 방법을 이용하여 각 그룹을 비교분석하였다.

## 결과 및 고찰

### Cyclic nucleotides 생성에 미치는 esculetin의 효과

이전의 연구를 통해, cyclic nucleotides(cAMP 및 cGMP)가 cAMP- 및 cGMP-의존성의 protein kinase(PKA 및 PKG)를 활성화시킴으로써 세포질 내로 동원되는 Ca<sup>2+</sup>을 감소하고, 혈소판의 응집을 억제한다고 알려진 바 있다(Kuo et al., 1980). 본 연구에서는 esculetin이 cAMP 및 cGMP의 cyclic nucleotides 생성에 관여하였는지 확인하였다. Fig. 2A에 나타난 결과로 보면, esculetin에 의해 cAMP 생성이 3.92±0.41 pmol/10<sup>8</sup> cells에서 9.20±0.88 pmol/10<sup>8</sup> cells까지 강하게 증가된 것을 알 수 있다. 또한, esculetin은 cGMP 생성량도 6.53±0.46 pmol/10<sup>8</sup> cells에서 8.54±0.39 pmol/10<sup>8</sup> cells까지 농도의존적으로 증가시킨 것을 확인하였다(Fig.

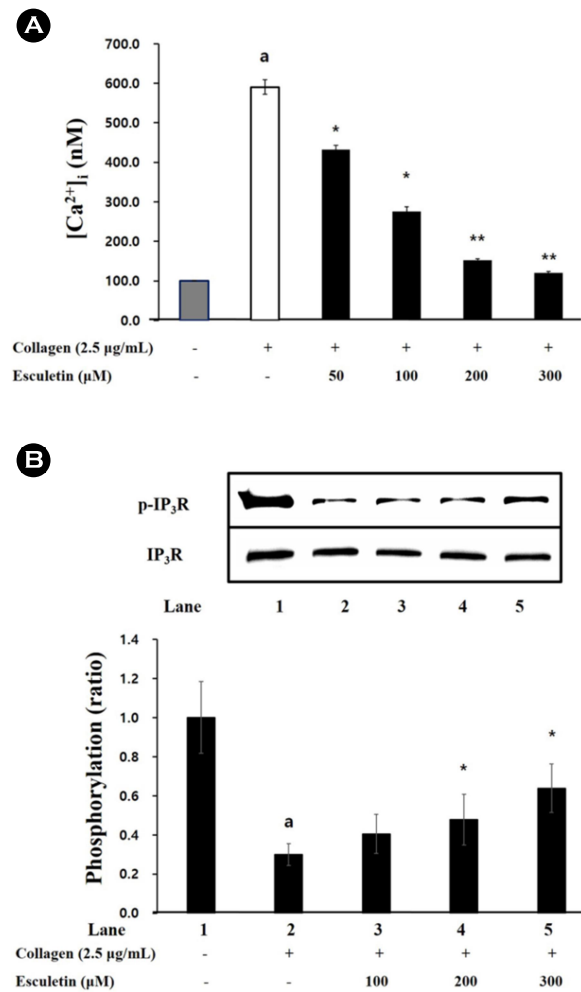


**Fig. 2.** Effects of esculetin on cyclic nucleotides production. (A) Effects of esculetin on cAMP production stimulated by collagen. (B) Effects of esculetin on cGMP production stimulated by collagen. Data are expressed as means  $\pm$  SD (n=4). \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.001 compared with the collagen-stimulated platelets.

2B). 이 결과들을 통해 esculetin이 collagen 유도 of 혈소판에서 cAMP 및 cGMP의 생성량을 농도의존적으로 강하게 증가시키면서 혈소판의 기능에 관여한다는 것을 확인하였다.

### 세포 내 Ca<sup>2+</sup> 동원 및 IP<sub>3</sub>R 인산화에 미치는 esculetin의 효과

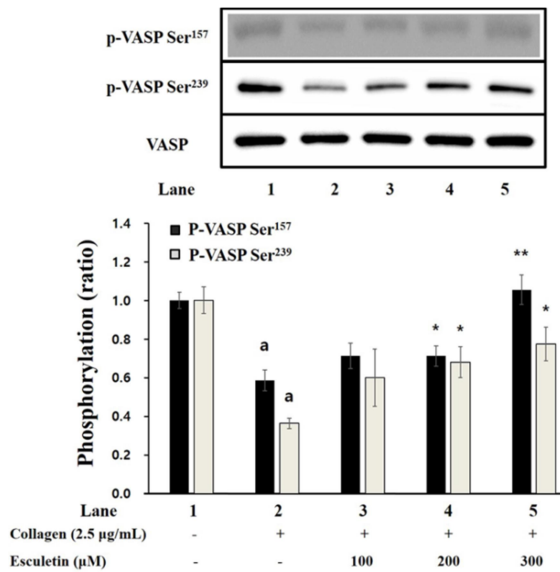
cAMP 및 cGMP의 cyclic nucleotide이 증가할 때, 의존성 단백질 kinase인 PKA 및 PKG를 활성화시키고, 이는 관련된 기질들을 인산화하는 것으로 알려져 있으며, 그 중 inositol 1,4,5-triphosphate receptor (IP<sub>3</sub>R)가 있다(Schwarz et al., 2001). IP<sub>3</sub>R는 혈소판 내 dense tubular system에 위치하는 Ca<sup>2+</sup> 통로로서 inositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>)와 결합될 때, 세포질 내로의 Ca<sup>2+</sup> 동원([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)을 유도한다. [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>가 증가하면 세포골격 단백질로 알려진 myosin light chain과 pleckstrin의 인산화가 유발되게 되며, 이 때 혈소판 내 과립 분비 및 P-selectin 발현이 일어나 혈소판 활성화 및 응



**Fig. 3.** Effects of esculetin on [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> mobilization and IP<sub>3</sub>R phosphorylation. (A) Inhibitory effects of esculetin on collagen-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> mobilization. (B) Effects of esculetin on collagen-induced IP<sub>3</sub>R phosphorylation. Measurement of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> mobilization and Western blotting was described in "Materials and Methods" section. The data are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (n=4). <sup>a</sup> $P$ <0.05 compared with no-stimulated platelets, \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.001 compared with the collagen-stimulated platelets.

집이 되는데 중요하게 역할을 한다(VargaSzabo et al., 2009).

본 연구에서는 esculetin가 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>에 어떤 영향을 미치는지 확인하였고, 그 결과, Fig. 3A에 보여준 바와 같이, collagen에 의해 100.7 $\pm$ 0.3 nM에서 590.6 $\pm$ 18.3 nM까지 증가된 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>이 여러 용도의 esculetin(50, 100, 200 및 300 µM)를 첨가하였을 때 각각 432.5 $\pm$ 10.0 nM, 275.6 $\pm$ 12.3 nM, 152.1 $\pm$ 3.2 nM 및 120.4 $\pm$ 3.6 nM로 농도 의존적으로 감소된 것을 알 수 있다(Fig. 3A). 그리고, esculetin가 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>을 조절하는 단백질인 IP<sub>3</sub>R의 인산화에 영향을 주었는지 확인하였고, Fig. 3B로 볼 수 있는 바와 같이,



**Fig. 4.** Effects of esculetin on VASP phosphorylation. Western blotting was determined as described in "Materials and Methods" section. The data are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (n=4). <sup>a</sup> $P < 0.05$  compared with no-stimulated platelets,  $*$  $P < 0.05$ ,  $**P < 0.001$  compared with the collagen-stimulated platelets.

esculetin이 collagen로 유도한 혈소판에서 IP<sub>3</sub>R를 농도 의존적으로 인산화시켰다는 것을 알 수 있다. 이 결과들은 esculetin이 cAMP/cGMP 생성 및 PKA/PKG의 활성을 증가시켜 IP<sub>3</sub>R의 인산화를 유도함으로써 dense tubular system에서 세포질로 동원되는 Ca<sup>2+</sup>를 억제한다는 것을 보여준다.

#### VASP 인산화에 미치는 esculetin의 효과

이전의 연구들을 통해, VASP가 혈소판 분비 및 점착을 조절함으로써 혈소판 활성화에 관여하는 cAMP/cGMP-의존성 PKA/PKG의 주요 기질 중 하나라는 것과, VASP의 인산화에 의해 integrin  $\alpha$ IIb/ $\beta$ <sub>3</sub>의 활성화가 억제되어 혈소판 응집을 저해한다고 알려져 있다(Napeñas et al., 2013; Wangorsch et al., 2011). 본 연구에서는, collagen 유도의 혈소판에서 esculetin에 의해 cAMP 및 cGMP 생성이 농도 의존적으로 증가된 것을 알 수 있었고(Fig. 2), 추가적으로 esculetin에 의해 cAMP-의존성의 VASP Ser<sup>157</sup> 및 cGMP-의존성의 VASP Ser<sup>239</sup>의 인산화가 어떤 영향을 받는지 확인해 보았다. 그 결과, Fig. 4에서 나타낸 바와 같이, esculetin은 VASP Ser<sup>157</sup>와 VASP Ser<sup>239</sup>의 인산화를 농도 의존적으로 증가시켰으며, 이 결과는 esculetin가 cAMP 및 cGMP의 생성을 증가시킨 것이 VASP의 인산화로 이어졌다는 것

을 보여준다.

#### $\alpha$ IIb/ $\beta$ <sub>3</sub>에 대한 fibrinogen binding에 미치는 esculetin의 효과

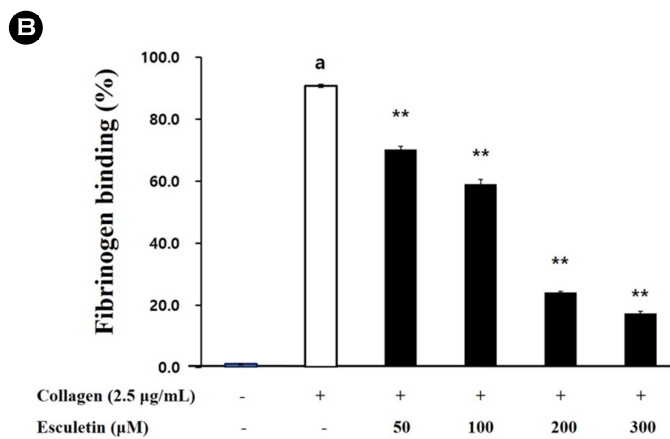
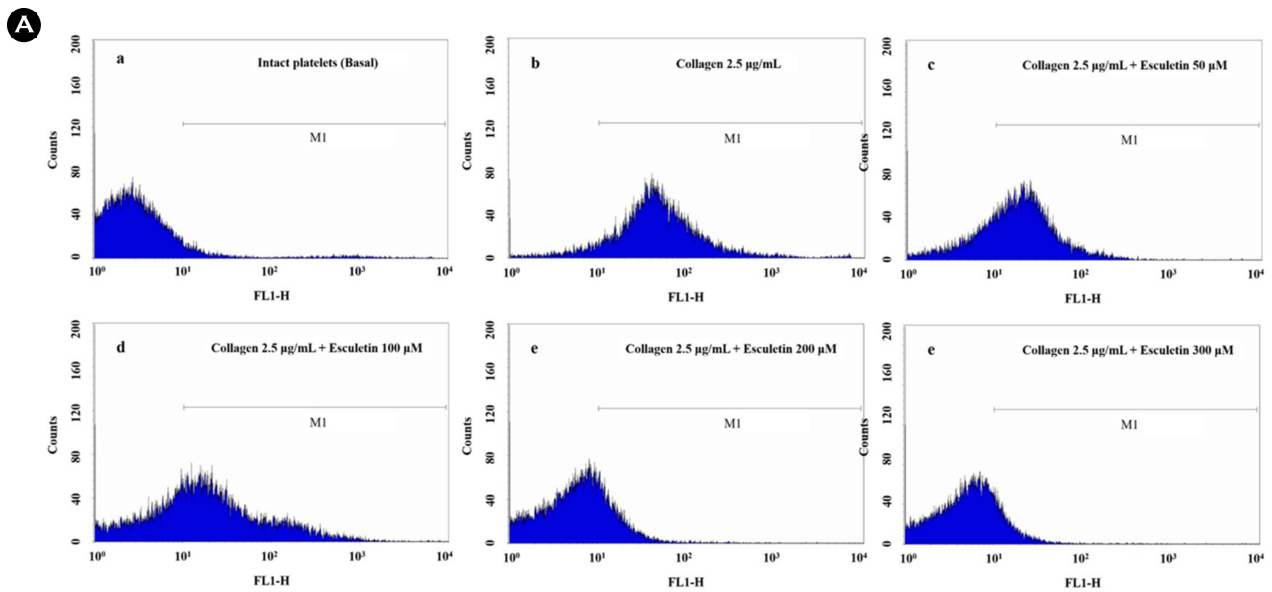
Integrin  $\alpha$ IIb/ $\beta$ <sub>3</sub>에 의한 혈소판 내 신호 전달은 세포 골격의 변형을 유발함으로써 혈소판 증식 및 혈전 생성을 일으키는 것으로 보고된 바 있다(Topol et al., 1999). 정상적인 휴지기 혈소판에서는  $\alpha$ IIb/ $\beta$ <sub>3</sub>가 낮은 친화도의 상태로 존재하다가 응집유도제에 의해 혈소판이 활성화되면 inside-out 신호전달 경로를 거쳐  $\alpha$ IIb/ $\beta$ <sub>3</sub>의 친화도를 증가되는 쪽으로 구조적인 변화가 일어난다(Phillips et al., 2001).  $\alpha$ IIb/ $\beta$ <sub>3</sub>의 친화도가 증가되면 fibrinogen의 결합이 잘 일어나므로써 추가적인 혈소판의 형태 변화와 점착을 통해 응집이 촉발된다.

본 연구에서, esculetin이 fibrinogen이  $\alpha$ IIb/ $\beta$ <sub>3</sub>에 결합하는 정도에 어떤 영향을 미치는지 확인하였고, collagen에 의해  $\alpha$ IIb/ $\beta$ <sub>3</sub>에 대한 fibrinogen 결합도가 1.0 $\pm$ 0.2%에서 90.8 $\pm$ 0.5%까지 증가되었다(Fig. 5A-b, 5B). 그러나, esculetin (50, 100, 200 및 300  $\mu$ M)을 처리하였을 때, fibrinogen의 결합 정도가 각각 70.2 $\pm$ 1.0%, 59.1 $\pm$ 1.4%, 24.1 $\pm$ 0.4% 및 17.4 $\pm$ 0.6%까지 농도 의존적으로 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 5A-c~f, 5B). 이는 esculetin에 의해 생성이 증가된 cyclic nucleotide들이 VASP 인산화를 유발하였고, integrin  $\alpha$ IIb/ $\beta$ <sub>3</sub>의 친화도를 떨어뜨림으로써 fibrinogen 결합을 억제한 것으로 보여진다.

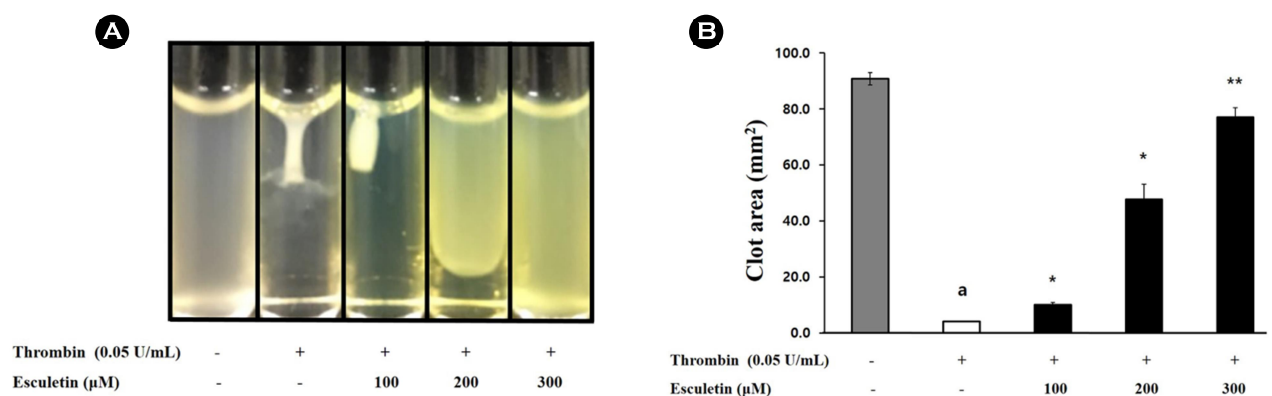
#### 혈소판 매개 fibrin clot 형성에 미치는 esculetin의 효과

Fibrin clot의 형성은 혈관의 손상된 부분이 회복되는 과정의 마지막 단계로, 손상부위에 활성화된 혈소판이 모여들어 30~60분간 수축을 일으키고 만들어진 plug를 당기면서 만들어진다. 이 때,  $\alpha$ IIb/ $\beta$ <sub>3</sub>에 대한 fibrinogen 결합 정도가 혈소판이 매개한 fibrin clot 형성에서 중요하며,  $\alpha$ IIb/ $\beta$ <sub>3</sub> 친화도를 감소시키는 물질들이 혈전 형성도 막는다고 알려져 있다(Topol et al., 1999). 또한, 혈소판 활성촉진제를 사용하여  $\alpha$ IIb/ $\beta$ <sub>3</sub>의 활성을 높이면, fibrinogen의 결합도가 증가되어 fibrin clot이 잘 형성된다.

본 연구에서는 thrombin으로 유도한 fibrin clot 형성에서 esculetin이 미치는 효과를 확인하였고, Fig. 6A에 제시한 결과와 같이, thrombin을 처리하였을 때 fibrin clot이 강하게 형성되었지만 esculetin에 의해 fibrin clot의 형성이 농도 의존적으로 억제된 것을 볼 수 있다. Esculetin(100, 200 및 300  $\mu$ M)의 억제율을 확인해 보면 각각 10.1%, 47.8%



**Fig. 5.** Effects of esculetin on collagen-induced fibrinogen binding. (A) The flow cytometry histograms on fibrinogen binding. a, Intact platelets (base); b, collagen (2.5 µg/mL); c, collagen(2.5 µg/mL) + esculetin (50 µM); d, collagen (2.5 µg/mL) + esculetin (100 µM); e, collagen (2.5 µg/mL) + esculetin (200 µM); f, collagen (2.5 µg/mL) + esculetin (300 µM) (B) Effects of esculetin on collagen-induced fibrinogen binding (%). Measurement of fibrinogen binding was described in "Materials and Methods" section. The data are expressed as the mean ± standard deviation (n=4). <sup>a</sup>*P*<0.05 compared with no-stimulated platelets, <sup>\*\*</sup>*P*<0.001 compared with the collagen-stimulated platelets.



**Fig. 6.** Effects of esculetin on fibrin clot retraction. (A) Effects of esculetin on thrombin-retracted fibrin clot photographs (B) Effects of esculetin on thrombin-retracted fibrin clot area. Quantification of fibrin clot retraction was described in "Materials and Methods" section. The data are expressed as the mean ± standard deviation (n=4). <sup>a</sup>*P*<0.05 compared with no-stimulated platelets, <sup>\*</sup>*P*<0.05, compared with the thrombin-stimulated platelets, <sup>\*\*</sup>*P*<0.001 compared with the thrombin-stimulated platelets.

및 77.0%로 확인되었다(Fig. 6B). 이 결과들은 esculetin가 cAMP/cGMP 생성 증가를 통해 VASP Ser<sup>157</sup>/VASP Ser<sup>239</sup> 인산화를 유발하였고,  $\alpha$ IIb/ $\beta$ <sub>3</sub>를 친화도를 감소시킴으로써 fibrin clot 형성 감소의 결과로 나타난 것으로 보인다.

#### ACKNOWLEDGEMENT

Funding for this paper was provided by Namseoul University year 2021.

#### CONFLICT OF INTEREST

The author declares no conflict of interest.

#### REFERENCES

- Cavallini L, Coassin M, Borean A, Alexandre A. Prostacyclin and sodium nitroprusside inhibit the activity of the platelet inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and promote its phosphorylation. *J Biol Chem.* 1996. 271: 5545-5551.
- Chen H, Kahn ML. Reciprocal signaling by integrin and non-integrin receptors during collagen activation of platelets. *Mol Cell Biol.* 2003. 23: 4764-4777.
- Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* 1985. 260: 3440-3450.
- Famdale RW. Collagen-induced platelet activation. *Blood Cell Mol Dis.* 2006. 36: 162-165.
- Hsia CW, Lin KC, Lee TY, Hsia CH, Chou DS, Jayakumar T, Velusamy M, Chang CC, Sheu JR. Esculetin, a Coumarin Derivative, Prevents Thrombosis: Inhibitory Signaling on PLC $\gamma$ 2-PKC-AKT Activation in Human Platelets. *Int J Mol Sci.* 2019. 20: 2731.
- Jackson SP. Arterial thrombosis - insidious, unpredictable and deadly. *Nat Med.* 2011. 17: 1423-1436.
- Kantarcioglu B, Iqbal O, Walenga JM, Lewis B, Lewis J, Carter CA, et al. An Update on the Pathogenesis of COVID-19 and the Reportedly Rare Thrombotic Events Following Vaccination. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2021. 27: 10760296211021498.
- Karthika P, Rajadurai M, Ganapathy P, Kanchana G. Preventive effect of esculetin on lipid peroxides and antioxidants in isoproterenol-induced myocardial infarction in Wistar rats. *J Pharm Res.* 2012. 5: 915-918.
- Kuo JF, Andersson RG, Wise BC, Mackerlova L, Salomonsson I, Brackett NL, et al. Calcium-dependent protein kinase: widespread occurrence in various tissues and phyla of the animal kingdom and comparison of effects of phospholipid, calmodulin, and trifluoperazine. *Proc Natl Acad Sci.* 1980. 77: 7039-7043.
- Laurent V, Loisel TP, Harbeck B, Wehman A, Gröbe L, Jockusch BM, et al. Role of proteins of the Ena/VASP family in actin-based motility of *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol.* 1999. 144: 1245-1258.
- Liang C, Ju W, Pei S, Tang Y, Xiao Y. Pharmacological activities and synthesis of esculetin and its derivatives: A mini-review. *Molecules.* 2017. 22: 387.
- Napeñas J, Oost FC, DeGroot A, Loven B, Hong CH, Brennan MT, et al. Review of postoperative bleeding risk in dental patients on antiplatelet therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2013. 115: 491-499.
- Phillips DR, Nannizzi-Alaimo L, Prasad KS. Beta3 tyrosine phosphorylation in  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (platelet membrane GP IIb-IIIa) outside-in integrin signaling. *Thromb Haemost.* 2001. 86: 246-258.
- Quinton TM, Dean WL. Cyclic AMP-dependent phosphorylation of the inositol-1,4,5-trisphosphate receptor inhibits Ca<sup>2+</sup> release from platelet membranes. *Biochemical and Biochem Biophys Res Commun.* 1992. 184: 893-899.
- Schwarz UR, Walter U, Eigenthaler M. Taming platelets with cyclic nucleotides. *Biochem Pharmacol.* 2001. 62: 1153-1161.
- Shin JH, Kwon HW, Lee DH. Ginsenoside F4 inhibits platelet aggregation and thrombus formation by dephosphorylation of IP<sub>3</sub>RI and VASP. *J Appl Biol Chem.* 2019. 62: 93-100.
- Sudo T, Ito H, Kimura Y. Phosphorylation of the vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) by the anti-platelet drug, cilostazol, in platelets. *Platelets.* 2003. 14: 381-390.
- Topol EJ, Byzova TV, Plow EF. Platelet GPIIb-IIIa blockers. *The Lancet.* 1999. 353: 227-231.
- VargaSzabo D, Braun A, Nieswandt B. Calcium signaling in platelets. *J Thromb Haemost.* 2009. 7: 1057-1066.
- Wangorsch G, Butt E, Mark R, Hubertus K, Geiger J, Dandekar T, et al. Time-resolved in silico modeling of finetuned cAMP signaling in platelets: feedback loops, titrated phosphorylations and pharmacological modulation, *BMC Syst Biol.* 2011. 5: 178.

<https://doi.org/10.15616/BSL.2021.27.4.270>

**Cite this article as:** Lee DH. Thrombus Formation Inhibition of Esculetin through Regulation of Cyclic Nucleotides on Collagen-Induced Platelets. *Biomedical Science Letters.* 2021. 27: 270-276.