



Inhibitory effect of ethanol extract of *Gryllus bimaculatus* on platelet aggregation and glycoprotein IIb/IIIa activation

Hyuk-Woo Kwon^{1,2} · Man Hee Rhee^{3,4} · Jung-Hae Shin^{3,4}

쌍별귀뚜라미 에탄올 추출물의 혈소판응집반응과 당단백질 IIb/IIIa 활성화 억제 효과

권혁우^{1,2} · 이만희^{3,4} · 신정해^{3,4}

Received: 19 April 2023 / Accepted: 22 May 2023 / Published Online: 15 June 2023

© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2023

Abstract Platelets act a fundamental role in primary- and secondary-hemostasis, however, platelet activation may cause thrombosis simultaneously. Therefore, control of platelet aggregation is crucial in preventing thrombosis-mediated diseases. Recently, the development of insect materials is attracting attention. Among the highly nutritious functional food sources, insects such as two-spotted cricket (*Gryllus bimaculatus*). *Gryllus bimaculatus* (*G. bimaculatus*) contains high protein and unsaturated fatty acids and has been registered as a food material September 2015 by the Ministry of Food and Drug Safety of Korea. In this study, we examined whether *G. bimaculatus* extract (GBE) inhibits platelet aggregation, intracellular calcium mobilization, thromboxane A₂ production and glycoprotein IIb/IIIa (integrin αIIb/β3) activation.

We investigated whether GBE can regulate signaling molecules, such as 1, 4, 5-triphosphate receptor type I, extracellular signal-regulated kinase, cytosolic phospholipase A₂, mitogen-activated protein kinases p38, vasodilator-stimulated phosphoprotein, phosphatidylinositol-3 kinase, Akt, glycogen synthase kinase-3α/β, and SYK. Taken together, GBE is a potential therapeutic drug candidate to prevent platelet-related thrombosis and cardiovascular disease.

Keywords *Gryllus bimaculatus* · Integrin glycoprotein IIb/IIIa · Platelet aggregation · Thrombosis

Jung-Hae Shin (✉)
E-mail: mlsjshin@naver.com

¹Department of Biomedical Laboratory Science, Far East University, Eumseong 27601, Republic of Korea

²Microbiological Resource Research Institute, Far East University, Eumseong 27601, Republic of Korea

³Department of Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 41566, Republic of Korea

⁴Cardiovascular Research Institute, School of Medicine, Kyungpook National University, Daegu 41944, Republic of Korea

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.

서 론

혈소판은 지혈을 위한 필수적인 세포이며 동시에 혈전증을 일으킬 수 있는 세포이다. 일반적인 지혈 과정에서, 혈소판은 혈관의 손상 부위에서 노출된 collagen을 매개로 활성화되며, 활성화된 phospholipase C에 의해서 혈소판 막의 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate는 inositol-1,4,5-triphosphate (IP₃)와 diacylglycerol로 가수분해하고, 생성된 IP₃는 혈소판 내부의 Ca²⁺ 농도를 증가시킨다. 이후 다양한 신호전달 분자들을 통하여 혈소판 막의 integrin αIIb/β3을 활성화되어 fibrin을 매개로 한 지혈 마개가 형성된다[1,2]. 혈관 손상에서 발생하는 지혈과정은 인체에 유익한 과정이지만 혈소판의 과도한 활성화 또는 과도한 응집 반응은 불필요한 혈전생성으로 다양한 심혈관계질환을 유발할 수 있다. 따라서, 혈소판 응집을 저해시킬 수 있는 다양한 약물은 심혈관계 질환의 예방을 위해 사용되고 있다[3,4].

쌍별귀뚜라미(*Gryllus bimaculatus*)는 아열대성 곤충으로 아프리카 남부에서 남부 아시아에 걸쳐 널리 분포하고 있는 종으로 잡식성이며, 높은 온도에서 번식이 빠르며 일년 내내 사육이 가능한 곤충이다[5]. 쌍별귀뚜라미는 전 세계 32종의 귀뚜라미 중 유일하게 식용으로 활용할 수 있는 종으로, 국내에서는 2000년부터 연구가 시작되어 다양한 효능이 보고되고 있다. 쌍별귀뚜라미는 단백질 함량은 높고 지방 함량은 낮으며 특히 아미노산 조성이 우수하고 항산화 활성이 높고 지방 함량보다 단백질 함량이 많아 근육 관련 질환이나 노인의 근 감소 예방 및 중장년 이후 혈중 지질 상승 예방 소재로 활용되거나 지방과 탄수화물 함량이 적어 다이어트 소재로서의 활용으로도 긍정적인 것으로 사료된다. 칼슘도 다량 함유되어 있어 청소년기의 성장과 중장년층의 골다공증 예방에 큰 영향을 미칠 수 있을 것으로 보고되었다[6]. 이 밖에도, 오메가-3, 오메가-6 등 다가 불포화지방산과 단백질, 키틴, 키토산 등 많은 기능성 성분들이 함유되어 단백질 급여원이나 키틴을 활용한 면역력을 높이는 식품, 사료 등으로 활용 가능성이 보고되었다[6]. 쌍별귀뚜라미의 생리활성 연구로는 항산화, 항당뇨, 항노화, 면역조절 작용에 관하여 연구되었으며, 이외에도 열수 추출물에서 산화 스트레스와 염증 신호전달 과정 활성화에 대한 저해 효과가 나타남으로써 알코올성 및 비알코올성 간질환에 대한 보호 효과가 보고된 바 있다[7,8]. 하지만 쌍별귀뚜라미에 관한 연구는 아직 초보적인 단계에 머물러 있어 다양한 생리활성에 대한 탐색과 성분규명에 많은 노력이 필요한 상황이다. 우리는 심혈관계 질환과 밀접한 관련이 있는 인체 혈소판에 쌍별귀뚜라미가 미치는 영향을 연구하기 위하여 쌍별귀뚜라미 70% ethanol 추출물을 동결 건조한 뒤 dimethyl sulfoxide에 재구성하여(*G. bimaculatus* extract; GBE) 항혈소판 효과를 평가하였다.

재료 및 방법

시약

쌍별귀뚜라미 시료는 건조된 상태의 귀뚜라미 전충을 (주)농업회사법인 트윈스타팜(Daejeon, Korea)에서 구매하여 사용하였다. 쌍별귀뚜라미는 70% ethanol을 이용하여 2시간 추출한 뒤 농축 및 동결건조 하였다 이후 0.1% dimethyl sulfoxide에 녹인 후 실험에 사용하였다. Collagen과 Thrombin은 Chrono-Log사(Havertown, PA, USA)를 통해 구매하였다. Fura 2-acetoxymethyl (Fura 2-AM)과 fibrinoben Alexa Fluor 488 접합체는 Invitrogen Molecular Probes (Eugene, OR, USA)을 통해 주문되었다. 항체 및 웨스턴 블롯팅 관련 시약은 Cell Signaling사(Beverly, MA, USA)로부터 주문되었다. U46619, thromboxane A₂ EIA kit, lactate dehydrogenase (LDH), cyclic adenosine monophosphate (cAMP) kit와 cyclic guanosine monophosphate (cGMP) kit는 측정 키트는 Cayman Chemical 사(Ann Arbor, MI, USA)로부터 구입하였다. 위에 나열되지 않은 그 밖의 다른 시약은 Sigma Chemical사(St. Louis, MO, USA)로부터 주문되었다.

세척 혈소판 부유액

인체 혈소판 풍부혈장을 대한 적십자사 경기 혈액원(Changwon, Korea)에서 구입하여 10분간 120 g에서 원심분리하여 적혈구를

제거한 후 1300 g에서 10분간 원심분리하여 혈소판 pellet을 얻었다. 이후 washing buffer (138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 12 mM NaHCO₃, 0.36 mM NaH₂PO₄, 5.5 mM glucose, and 1 mM Na₂EDTA, pH 6.5)로 2회 세척 후, suspension buffer (138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 12 mM NaHCO₃, 0.36 mM NaH₂PO₄, 0.49 mM MgCl₂, 5.5 mM glucose, 0.25% gelatin, pH 6.9)에 부유하여 최종 농도가 10⁸/mL이 되도록 조정하였다.

인체혈소판 응집반응 측정

혈소판 부유액(10⁸/mL)에 GBE를 0.1% dimethyl sulfoxide에 녹인 후 다양한 농도로 첨가하여 2분간 사전 배양 후 collagen을 작용제로 혈소판 응집을 유도하여 활성을 분석하였다. 혈소판 응집능은 aggregometer (Chrono-Log Corporation, Havertown, PA, USA)를 사용하여 분석되어 응집률(%)로 환산하여 나타내었다. 이 실험은 The Korea National Institute for Bioethics Policy Public Institutional Review Board (Seoul, Korea)의 승인을 받아 수행되었다(P01-201812-31-007).

세포 독성 분석

혈소판 부유액(10⁸/mL)에 GBE를 다양한 농도로 첨가하여 2분간 사전 배양 후 1300 g에서 5분간 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 세포독성은 혈소판의 세포질로부터 분리된 LDH의 양을 확인함으로써 세포독성을 평가하였다. 세포독성은 LDH EIA kit는 Cayman Chemical사(Ann Arbor, MI, USA)로부터 구입하였다.

Ca²⁺ mobilization과 Ca²⁺ influx 분석

혈소판(10⁸/mL)에 5 μM의 Fura 2-AM을 처리하고 37 °C에서 60분간 전 처리하였다. 그 후 1300 g에서 10분간 원심분리하고 suspending buffer에 다시 부유하여 Ca²⁺ 동원(Ca²⁺ mobilization) 측정용 혈소판을 제조하였다. 세척 혈소판에 다양한 농도의 GBE (75-200 μg/mL)를 첨가하여 37 °C에서 3분간 전 처리한 후, 2.5 μg/mL collagen으로 응집을 유도하고 5분간 반응시켰다. 세포 외부로부터 유입되는 Ca²⁺의 농도를 분석하기 위하여, Fura-2AM이 처리된 혈소판을 thapsigargin으로 자극 후 1분 뒤 2 mM CaCl₂을 주입하여 혈소판 내부의 Ca²⁺ 농도를 분석하였다. 형광 파장은 excitation 340 nm, emission 510 nm에서 분석되었으며 Grynkiewicz [9]의 방법을 사용하여 spectrofluorometer로(F-2700; Hitachi, Japan)로 측정하였다.

Western blotting 분석

혈소판(10⁸/mL)에 다양한 농도의 GBE (75-200 μg/mL)를 첨가하여 2분간 사전 배양 후 collagen을 작용제로 혈소판 응집을 유도한 뒤 lysis buffer (Cell Signaling)를 첨가하여 용해하였고, 혈소판 용해물의 단백질을 BCA protein assay kit를 사용하여 정량 후 SDS-PAGE로 분리하였다. 이 후 PVDF로 transfer후 1차항체(4 °C, overnight)와 2차항체(실온, 2시간) 처리하여 분석하였다.

Thromboxane A₂ 생성량 분석

혈소판(10⁸/mL)에 다양한 농도의 GBE (75-200 μg/mL)를 첨가하여 37 °C에서 3분간 전 처리한 후, 2.5 μg/mL collagen으로

응집을 유도하고 5분간 응집반응을 수행하였다. 이후 indomethacin을 첨가하여 반응을 종료하고, 상층액을 분리하여 ELISA reader (TECAN, Salzburg, Austria)로 분석하였다. 혈소판의 thromboxane A₂ (TXA₂)는 신속히 thromboxane B₂로 변환되기 때문에 TXB₂의 정량을 통해 TXA₂의 양을 분석하였다.

Fibrinogen binding 활성 측정

혈소판(10⁸/mL)에 다양한 농도의 GBE (75-200 µg/mL)를 첨가하여 37 °C에서 3분간 전 처리한 후, 2.5 µg/mL collagen으로 응집을 유도하고 5분간 응집반응을 수행하였다. 그 후 250 µL ice-cold PBS (pH 7.4)와 10 µL의 fibrinogen (alexa Fluor 488-conjugated)를 더한 후 4 °C에서 60분간 전 처리하였다. 이후 0.5% paraformaldehyde로 고정하고 flow cytometry (BD Biosciences, San Diego, CA, USA)를 사용하여 분석하였다.

Fibronectin adhesion 분석

혈소판(10⁸/mL)에 다양한 농도의 GBE (75-200 µg/mL)를 첨가하여 fibronectin adhesion kit well에 넣고 37 °C에서 3분간 전 처리한 후, 2.5 µg/mL collagen으로 반응을 유도하였다. 30분간 배양 후 phosphate buffer saline으로 세척하고 cell staining solution으로 염색한 뒤 well에 남아있는 점착된 혈소판을 용해하여 ELISA reader (TECAN, Salzburg, Austria)로 분석하였다.

Cyclic nucleotides 분석

혈소판(10⁸/mL)에 다양한 농도의 GBE (75-200 µg/mL)를 첨가하여 37 °C에서 3분간 전 처리한 후, 2.5 µg/mL collagen으로 5분간 응집반응을 수행하였다. 그 후 1M HCl을 첨가하여 반응을 정지하고, cAMP 및 cGMP ELISA kit를 사용하여 ELISA reader (TECAN)로 분석하였다.

통계 분석

측정된 모든 실험결과들은 mean ± standard deviation로 처리하여 analysis of variance (ANOVA)로 분석하였다. 그룹 간의 평균에 유의적인 차이가 있을 경우, Newman-Keuls method로 비교하여 각 그룹간에 표기하였다. *p* < 0.05일 때 유의적인 의미가 있는 것으로 판단하였다.

결과 및 고찰

인체 혈소판 응집 및 세포독성에 대한 썬별귀뚜라미 추출물의 작용

혈소판(10⁸/mL)에 다양한 농도의 GBE (75-200 µg/mL)를 첨가한 후 collagen으로 응집을 유도하였을 때, GBE가 혈소판 응집에 미치는 효과를 확인하였다. 혈소판응집반응은 collagen 자극

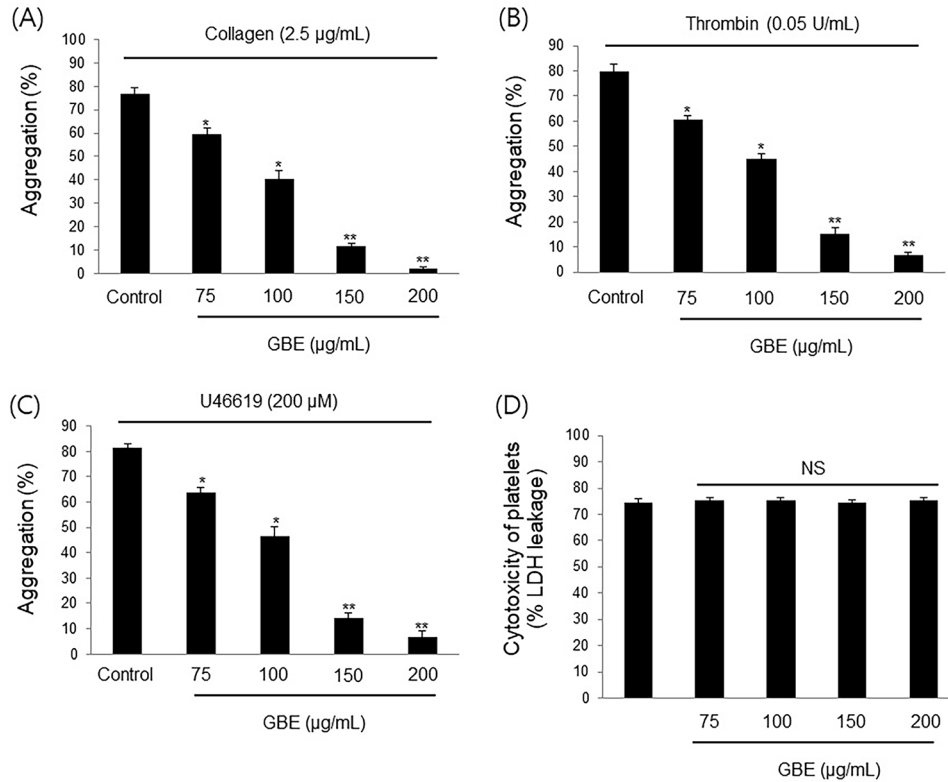


Fig. 1 GBE’s effect on platelet aggregation. (A) GBE’s effect on collagen-induced human platelet aggregation. (B) GBE’s effect on thrombin-induced human platelet aggregation. (C) GBE’s effect on U46619-induced human platelet aggregation. (D) GBE’s effect on cytotoxicity. Platelet aggregation and cytotoxicity were carried out as described in “Materials and Methods” section. The data are expressed as the mean ± standard deviation (n =4). **p* < 0.05, ***p* < 0.01 versus each agonists-stimulated human platelets. NS, not significant

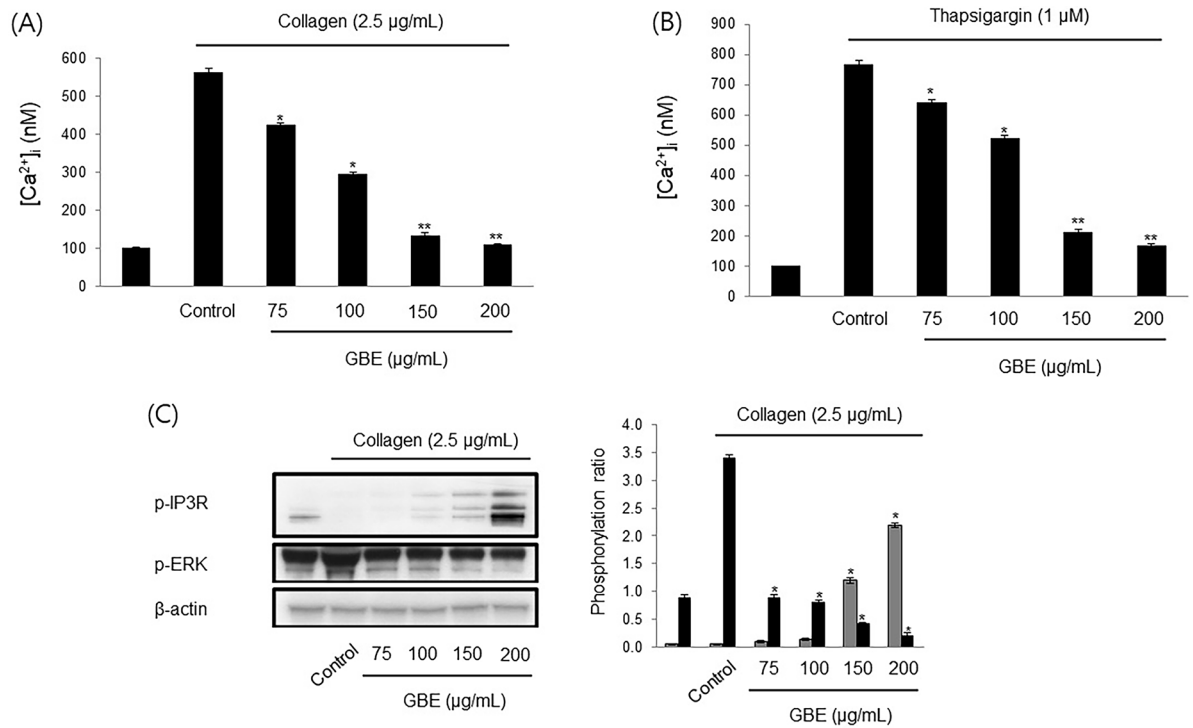


Fig. 2 GBE's effect on [Ca²⁺]_i mobilization, Ca²⁺ influx, IP3R and ERK phosphorylation. (A) Effect of GBE's effect on collagen-induced [Ca²⁺]_i mobilization. (B) GBE's effect on thapsigargin-induced Ca²⁺ influx. (C) GBE's effect on collagen-induced IP3R, ERK phosphorylation. All experiments were performed as described in "Materials and Methods" section. The data are expressed as the mean ± standard deviation (n = 4). *p < 0.05, **p < 0.01 versus the collagen-stimulated human platelets

에 의해 최대로 응집되어 77.0±2.2의 응집률을 보였지만 다양한 농도의 GBE (75-200 µg/mL)에 의해 농도의존적으로 강하게 응집이 억제되는 결과를 나타냈으며(Fig. 1A), 가장 높은 농도인 200 µg/mL에서의 억제율은 97.1%를 나타냈다. 이와 같은 항혈소판 효과는 thrombin과 U46619를 사용하여 유도한 혈소판 응집반응에서도 GBE는 동일한 농도의존적인 억제활성을 나타냈다(Fig. 1B, C). 혈소판 세포에 미치는 GBE의 독성을 평가하기 위하여 인체 혈소판 부유액에 GBE를 처리한 뒤 분비되는 LDH의 양을 측정할 결과 GBE (75-200 µg/mL)는 LDH의 증가를 유도하지 않았다(Fig. 1D). 따라서, GBE는 세포독성 없이 혈소판의 응집을 억제하는 물질임을 시사한다.

쌍별귀뚜라미가 세포 내부 칼슘 조절과 인산화 단백질에 미치는 효과

세포내부의 칼슘은 혈소판 활성화에 필수적인 secondary messenger로 작용하기 때문에, GBE가 세포내부의 칼슘동원에 미치는 영향을 확인하였다. Collagen으로 자극한 인체 혈소판의 Ca²⁺ 농도는 562.5±8.8 nM로 강하게 증가하였고, GBE (75, 100, 150, 200 µg/mL)을 처리한 결과 농도의존적인 억제양상을 나타냈다(Fig. 2A). 세포내부의 칼슘은 혈소판 내부의 endoplasmic reticulum (ER)에서 방출되지만, ER의 칼슘이 고갈되면 혈소판 외부의 칼슘이 세포내부로 유입되는 Ca²⁺ influx작용이 유도된다[10,11]. 따라서 우리는 thapsigargin으로 혈소판을 자극하여 Ca²⁺ influx작용에 GBE가 미치는 영향을 평가하였다. 그 결과,

GBE는 thapsigargin이 유도한 Ca²⁺ influx작용을 농도의존적으로 억제하였다(Fig. 2B). 세포 내 Ca²⁺의 농도는 ER membrane에 존재하는 inositol-1,4,5-trisphosphate receptor type I (IP3R)와 extracellular signal-regulated kinase (ERK)에 의해 조절되는 것으로 잘 알려져 있기 때문에[12,13], GBE가 IP3R과 ERK의 인산화에 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과 GBE는 IP3R의 인산화를 증가시키고, ERK의 인산화를 감소시켜 혈소판 내부의 칼슘 농도를 조절하였다(Fig. 2C).

쌍별귀뚜라미가 thromboxane A₂의 방출과 cPLA₂ 및 p38의 인산화에 미치는 효과

다음으로, collagen으로 자극한 인체혈소판에서 생성되는 TXA₂의 합성에 GBE가 미치는 영향을 평가하였다. TXA₂는 혈소판막의 arachidonic acid로부터 합성되는데, 세포질에 존재하는 cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂)는 세포질에 증가된 Ca²⁺과 결합 후 세포막으로 이동하고, p38 mitogen-activated protein kinase (p38)는 cPLA₂의 Ser⁵⁰⁵ 위치를 인산화시켜 활성화시킨다[14,15]. 활성화된 cPLA₂는 arachidonic acid를 세포질로 유리시키고 cyclooxygenase-1 효소와 TXA₂ synthase 효소에 의해 TXA₂는 합성되어 혈소판 외부로 분비된다. Collagen으로 자극한 인체혈소판의 TXA₂ 생성량은 85.4±2.5 nM로 강하게 증가하였고 GBE (75, 100, 150, 200 µg/mL)를 처리한 결과, 농도의존적인 억제활성을 나타냈다(Fig. 3A). 이 밖에도, cPLA₂와 p38의 인산화에 미치는 영향을 확인한 결과에서도 마찬가지로

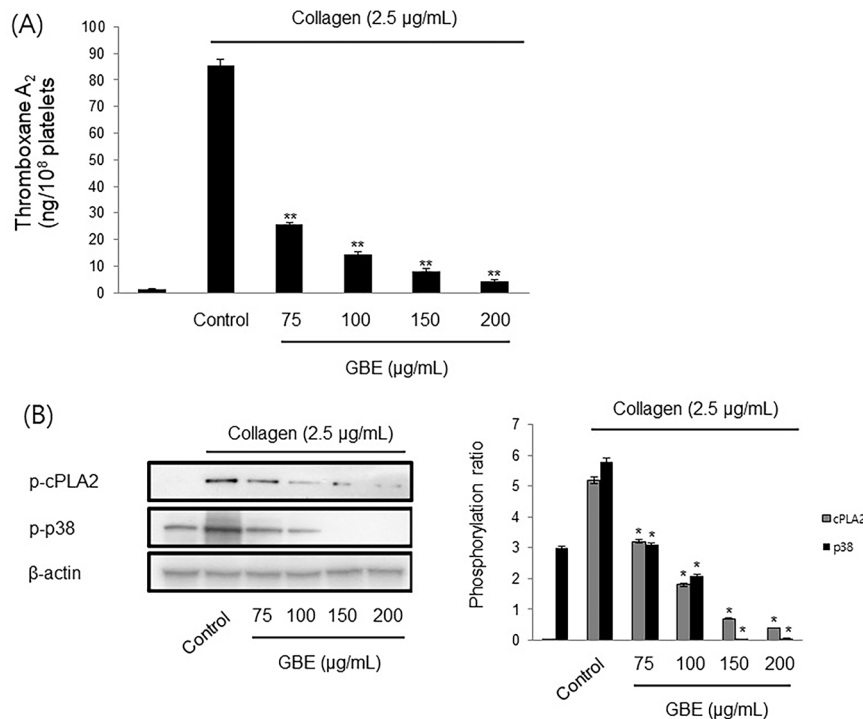


Fig. 3 GBE's effect on TXA₂ production, cPLA2, p38 phosphorylation. (A) GBE's effect on collagen-induced TXA₂ generation. (B) GBE's effect on collagen-induced cPLA2, p38 phosphorylation. All experiments were performed as described in "Materials and Methods" section. The data are expressed as the mean \pm standard deviation (n=4). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus the agonists-stimulated human platelets

GBE는 농도의존적인 억제활성을 나타냈다(Fig. 3B). 따라서 GBE가 억제하는 TXA₂ 생성효과는 cPLA2와 p38의 인산화 억제작용을 통한 효과임을 확인하였다.

쌍별귀뚜라미가 혈소판 인테그린의 활성화에 미치는 효과

혈소판 인테그린 glycoprotein IIb/IIIa (α IIb/ β 3)는 혈소판 내부의 신호전달 기전을 통해 발현되는 혈소판 막 integrin으로, 혈소판막에 매우 풍부하게 존재하고 있는 integrin이다[16]. 활성화된 α IIb/ β 3 인접한 혈소판과 혈중 단백질인 fibrinogen을 매개로 결합하게 해주며 활성화된 α IIb/ β 3는 혈소판 내부로 신호전달 과정을 거쳐 혈소판의 응집을 더욱 촉진한다. 우리는 GBE가 α IIb/ β 3의 활성화에 미치는 영향을 평가하기 위하여 fibrinogen binding 활성을 분석하였다. Collagen의 자극은 α IIb/ β 3와 fibrinogen과의 결합을 강하게 촉진시켰다, 하지만 GBE (75, 100, 150, 200 μ g/mL)를 처리한 결과 농도의존적인 억제활성이 나타났다(Fig. 4A, B). 활성화된 α IIb/ β 3는 fibronectin과 결합할 수 있으며, 이러한 결합은 혈소판의 adhesion 작용을 가능하게 한다. 우리는 GBE가 혈소판의 점착에 미치는 영향을 평가하기 위하여 fibronectin adhesion을 분석하였다. Collagen으로 자극한 fibronectin adhesion은 GBE에 농도의존적인 억제효과를 나타냈다(Fig. 4C).

쌍별귀뚜라미가 혈소판 인테그린 조절관련 인산화단백질에 미치는 영향

혈소판의 α IIb/ β 3 활성화와 관련 있는 조절인자로는 PI3K/Akt/

GSK-3와 vasodilator stimulated phosphoprotein (VASP)가 잘 알려져 있으며, PI3K/Akt/GSK-3는 자극제의 작용에 의해 인산화되며 혈소판의 활성화에 기여하고[17-19], SYK는 agonist의 자극에 활성화되는 것과, α IIb/ β 3의 활성화 이후 발생하는 outside-in signaling에 의해 인산화되며 혈소판의 활성화와 혈전의 생성을 더욱 촉진하는 것으로 보고되었다[20,21]. VASP는 α IIb/ β 3의 활성화에 기여하는 단백질이지만, 인산화에 의해 그 작용이 억제되는 것으로 알려져 있다[22]. 따라서, 우리는 collagen으로 자극한 인체 혈소판에 GBE (75, 100, 150, 200 μ g/mL)를 처리하여 다양한 α IIb/ β 3조절 분자들의 인산화를 분석하였다. 그 결과, GBE는 PI3K/Akt/GSK-3와 SYK의 인산화를 억제하고, VASP의 인산화를 증가시켰다(Fig. 5).

쌍별귀뚜라미가 cyclic nucleotides에 미치는 영향

Cyclic adenosine monophosphate (cAMP)와 cyclic guanosinemonophosphate (cGMP)는 혈소판의 억제 분자로 잘 알려져 있다[23]. 내피세포에서 분비되는 nitric oxide는 혈소판에 작용하여 혈소판의 내부에 cAMP와 cGMP의 농도를 상승시켜 혈소판의 과도한 활성을 억제하고 resting 상태를 유지시킨다. 혈소판 내부의 cAMP와 cGMP는 각각 의존성 kinase인 protein kinase A (PKA)와 protein kinase G (PKG)를 활성화 시켜 혈소판 내부의 다양한 substrate를 인산화시킨다. 대표적인 substrate로는 IP3R과 VASP가 있다. 따라서 우리는 GBE가 혈소판의 cAMP와 cGMP의 농도에 영향을 미치는지를 확인하였다. Fig. 6A와 6B에서 볼 수 있듯이, GBE는 collagen으로 자극한 인체혈소판

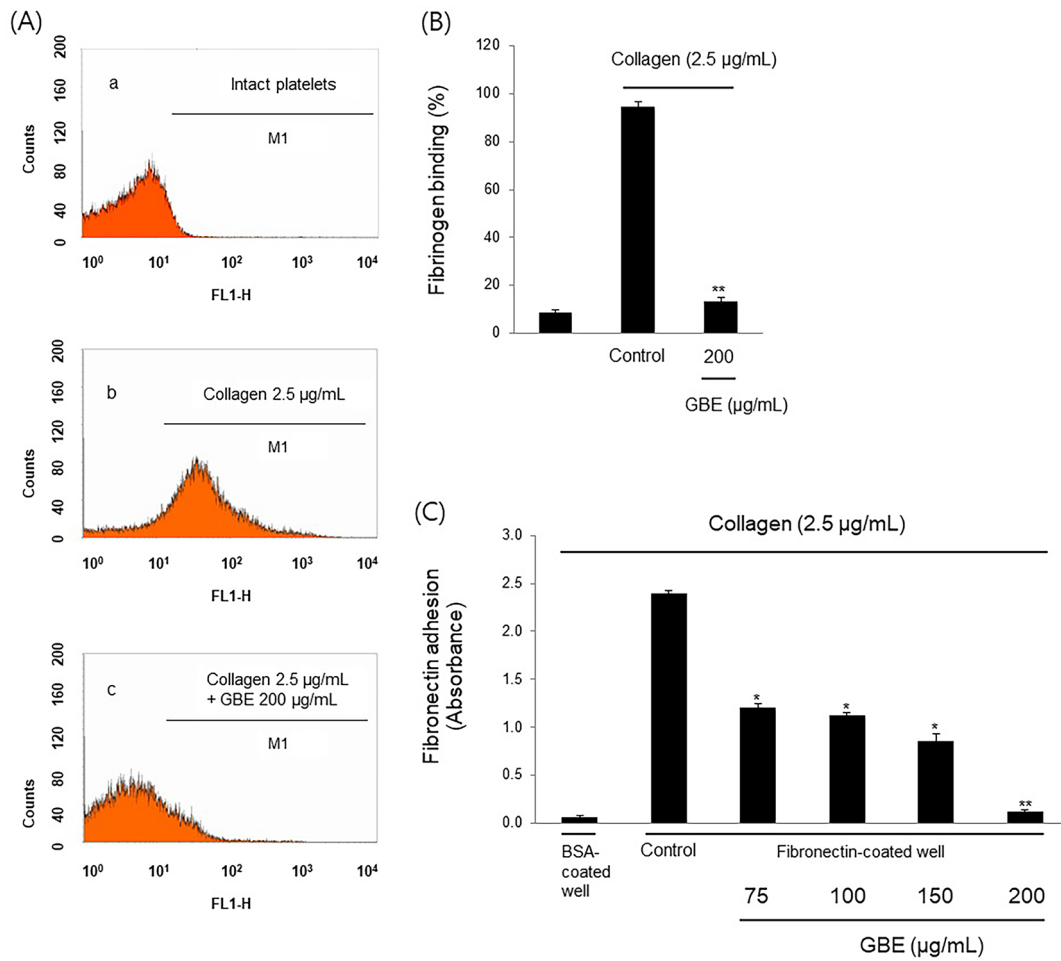


Fig. 4 GBE's effect on fibrinogen binding to α IIb/ β 3, and fibronectin adhesion. (A) The flow cytometry histograms on fibrinogen binding. (B) GBE's effect on collagen-induced fibrinogen binding (%). (C) GBE's effect on collagen-induced fibronectin adhesion. All experiments were performed as described in "Materials and Methods" section. The data are expressed as the mean \pm standard deviation (n=4). * p < 0.05, ** p < 0.01 versus the collagen-stimulated human platelets

에서 cAMP와 cGMP의 농도를 상승시켰고, cAMP의 농도를 보다 효과적으로 증가시켰다. 그러므로 GBE가 증가시킨 IP3R과 VASP의 인산화는 cAMP와 cGMP의 농도 상승으로 인함을 확인하였다. 쌍별귀뚜라미의 성분을 분석한 논문에 의하면, 쌍별귀뚜라미에는 풍부한 단백질과 필수아미노산, 그리고 풍부한 다가불포화 지방산을 함유하는 것으로 확인되었으며 건조한 쌍별귀뚜라미 100 g 중 1.125 \pm 0.35 g의 omega-3 지방산을 포함하는 것으로 보고되었다[24]. Omega-3 지방산은 혈소판의 활성을 억제하고 심혈관계질환에 효과 있는 물질로 잘 알려져 있다[25]. 따라서 GBE의 항혈소판 효과는 omega-3 지방산의 효과로 사료된다. 쌍별귀뚜라미와 유사한 항혈소판 곤충시료로는 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis seulensis*) 유충이 잘 알려져 있으며, 흰점박이꽃무지 유충에서 분리된 indole alkaloid 중 2종류의 물질에서 항혈소판 효과가 보고되었다[26,27]. 따라서, 추가적인 성분분석을 통해 쌍별귀뚜라미 추출물의 새로운 신규물질을 규명하고 분리된 물질의 생리활성에 대한 추가연구가 더욱 필요한 실정이다. 새롭게 분리된 물질들의 가능성은 추후에 연구될 예정이다.

초 록

혈소판은 1차 및 2차 지혈에서 근본적인 역할을 하는 세포지만 혈소판의 과도한 활성화는 혈전증을 유발할 수 있다. 따라서 혈소판 응집의 적절한 조절은 혈전증 매개 질환을 예방하는 데 중요하다. 최근 곤충소재의 개발이 주목을 받고 있다. 다양한 곤충 자원 중 고영양 기능성 식품원료로는 쌍별귀뚜라미(*Gryllus bimaculatus*)와 같은 곤충류가 있다. 쌍별귀뚜라미는 고단백 및 불포화지방산을 함유하고 있으며 2015년 9월 식품의약품안전처로부터 식품원료로 등록되었다. 본 연구에서는 쌍별귀뚜라미 에탄올 추출물(*G. bimaculatus* extract)이 혈소판 응집, 세포 내 Ca²⁺ 조절, thromboxane A₂ 생산 및 glycoprotein IIb/IIIa (integrin α IIb/ β 3) 활성화를 억제하는지 여부를 확인하고, 1, 4, 5-triphosphate receptor type I, extracellular signal-regulated kinase, cytosolic phospholipase A₂, mitogen-activated protein kinases p38, vasodilator-stimulated phosphoprotein, phosphatidylinositol-3 kinase, Akt, glycogen synthase kinase-3 α / β 및 SYK 같은 신호 분자를 조절할 수 있는지 여부를 조사했다. 우

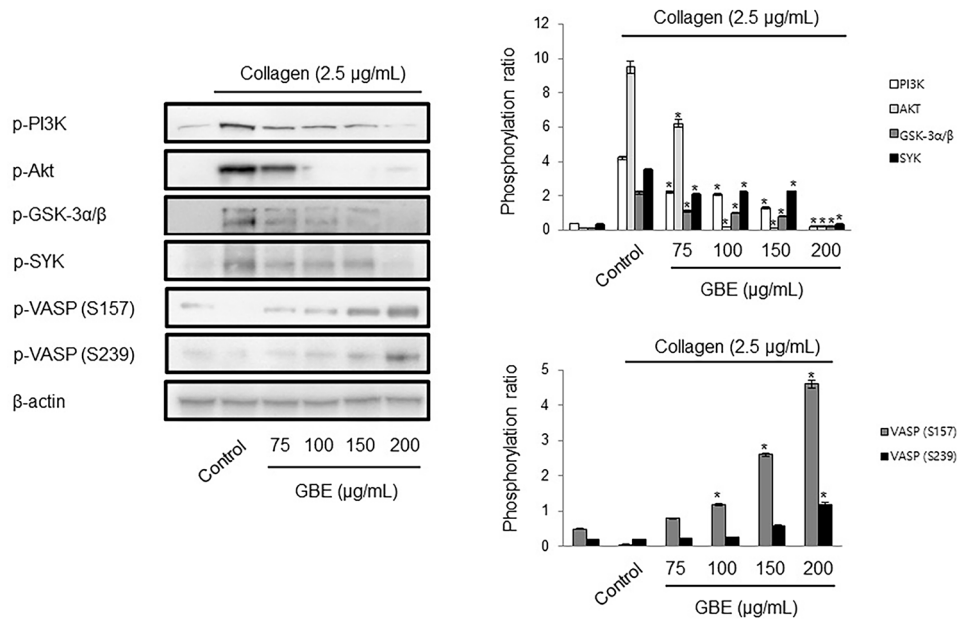


Fig. 5 GBE's effect on PI3K/Akt/GSK-3α/β, SYK and VASP phosphorylation. Western blot was performed as describe in “Materials and Methods” section. The data are expressed as the mean ± standard deviation (n =4). **p* <0.05 versus the collagen-stimulated human platelets

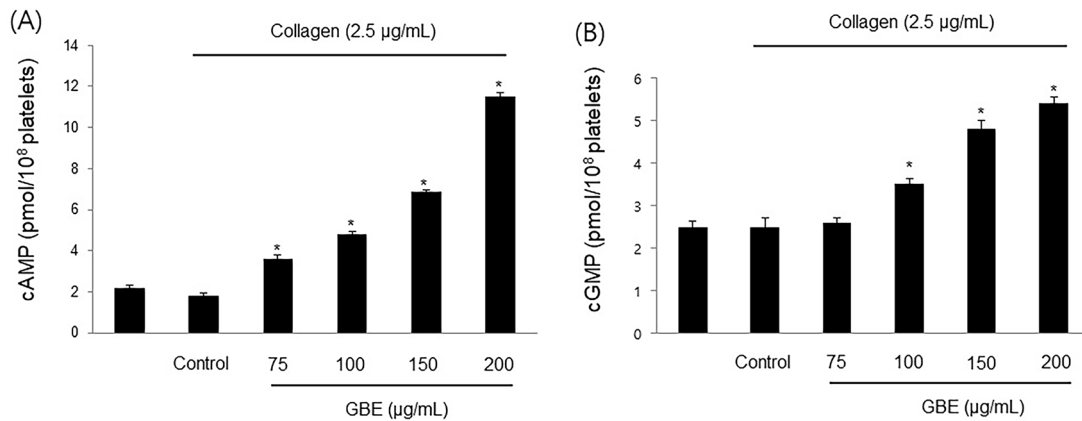


Fig. 6 GBE's effect on cAMP and cGMP production. (A) GBE's effect on collagen-induced cAMP production. (A) GBE's effect on collagen-induced cGMP production. All experiments were performed as described in “Materials and Methods” section. The data are expressed as the mean ± standard deviation (n =4). **p* <0.05, ***p* <0.01 versus the collagen-stimulated human platelets

리는 쌍별귀뚜라미 추출물이 혈소판 관련 혈전증 및 심혈관 질환을 예방할 수 있는 잠재적인 치료 약물로 가치가 있음을 규명하였다.

Keywords 세포표면 당단백질 · 쌍별귀뚜라미 · 혈소판 응집 · 혈전증

Acknowledgments 이 논문은 2020년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No. 2020R111A1A01067709).

References

1. Ruggeri ZM, Mendolicchio GL (2007) Adhesion mechanisms in platelet

function. *Circ Res* 100: 1673–1685. doi: 10.1161/01.RES.0000267878.97021.ab

2. Jennings LK (2009) Role of platelets in atherothrombosis. *Am J Card* 103: 4A–10A. doi: 10.1016/j.amjcard.2008.11.017

3. Barnathan ES, Schwartz JS, Taylor LT, Laskey WK, Kleaveland JP, Kussmaul WG, Hirshfeld Jr JW (1987) Aspirin and dipyridamole in the prevention of acute coronary thrombosis complicating coronary angioplasty. *Circulation* 76: 125–134. doi: 10.1161/01.CIR.76.1.125

4. Jackson SP (2011) Arterial thrombosis-insidious, unpredictable and deadly. *Nat Med* 17: 1423–1436. doi: 10.1038/nm.2515

5. Kim SY, Kim DI, Koo HY, Kim JE, Kim HJ, Lee YB, Kim YC (2020) Storage conditions and oviposition methods for *Gryllus bimaculatus* (Gryllidae) eggs. *Korean J Appl Entomol* 59: 133–138. doi: 10.5656/KSAE.2020.05.0.018

6. Kim SH, Kim YK, Han JS (2020) Antioxidant Activities and Nutritional Components of Cricket (*Gryllus bimaculatus*) Powder and Protein

- Extract. *Asian J Beauty Cosmetol* 18: 163–172. doi: 10.20402/ajbc.2020.0016
7. Park B, Kim SY, Kim YN, Yang SD, Seo WG, Han SY, Yoo YC (2022) Inhibitory Effect of Hot-Water Extract of *Gryllus bimaculatus* on Inflammatory Responses and NLRP3 Inflammasome Activation in Macrophages. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 51: 115–124. doi: 10.3746/jkfn.2022.51.2.115
 8. Cho HT, Sim KS, Kim Y, Chang MH, Kim T, Lee SH, Kim JH (2019) Anti-diabetic activity of edible insect *Gryllus bimaculatus* extracts in insulin-deficient diabetic mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 48: 1165–1171. doi: 10.3746/jkfn.2019.48.10.1165
 9. Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260: 3440–3450. doi: 10.1016/S0021-9258(19)83641-4
 10. Varga-Szabo D, Braun A, Nieswandt B (2009) Calcium signaling in platelets. *J Thromb Haemost* 7: 1057–1066. doi: 10.1111/j.1538-7836.2009.03455.x
 11. Varga-Szabo D, Braun A, Kleinschnitz C, Bender M, Pleines I, Pham M, Nieswandt B (2008) The calcium sensor STIM1 is an essential mediator of arterial thrombosis and ischemic brain infarction. *J Exp Med* 205: 1583–1591. doi: 10.1084/jem.20080302
 12. Quinton TM, Dean WL (1992) Cyclic AMP-dependent phosphorylation of the inositol-1, 4, 5-trisphosphate receptor inhibits Ca²⁺ release from platelet membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 184: 893–899. doi: 10.1016/0006-291X(92)90675-B
 13. Rosado JA, Sage SO (2001) Role of the ERK pathway in the activation of store-mediated calcium entry in human platelets. *J Biol Chem* 276: 15659–15665. doi: 10.1074/jbc.M009218200
 14. Kramer RM, Roberts EF, Um SL, Börsch-Haubold AG, Watson SP, Fisher MJ, Jakubowski JA (1996) p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylates cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂) in thrombin-stimulated platelets evidence that proline-directed phosphorylation is not required for mobilization of arachidonic acid by cPLA₂. *J Biol Chem* 271: 27723–27729. doi: 10.1074/jbc.271.44.27723
 15. McNicol A, Shibou TS (1998) Translocation and phosphorylation of cytosolic phospholipase A₂ in activated platelets. *Thromb Res* 92: 19–26. doi: 10.1016/S0049-3848(98)00097-8
 16. Payrastra B, Missy K, Trumel C, Bodin S, Plantavid M, Chap H (2000) The integrin α IIb/ β 3 in human platelet signal transduction. *Biochem Pharmacol* 60: 1069–1074. doi: 10.1016/S0006-2952(00)00417-2
 17. Valet C, Severin S, Chicanne G, Laurent PA, Gaits-Iacovoni F, Gratacap MP, Payrastra B (2016) The role of class I, II and III PI 3-kinases in platelet production and activation and their implication in thrombosis. *Adv Biol Regul* 61: 33–41. doi: 10.1016/j.jbior.2015.11.008
 18. Chen J, De S, Damron DS, Chen WS, Hay N, Byzova TV (2004) Impaired platelet responses to thrombin and collagen in AKT-1-deficient mice. *Blood* 104: 1703–1710. doi: 10.1182/blood-2003-10-3428
 19. Moore SF, Agbani EO, Wersäll A, Poole AW, Williams CM, Zhao X, Hers I (2021) Opposing Roles of GSK3 α and GSK3 β Phosphorylation in Platelet Function and Thrombosis. *Int J Mol Sci* 22: 10656. doi: 10.3390/ijms221910656
 20. Yanaga F, Poole A, Asselin J, Blake R, Schieven GL, Clark EA, Watson SP (1995) Syk interacts with tyrosine-phosphorylated proteins in human platelets activated by collagen and cross-linking of the Fe γ -IIA receptor. *Biochem J* 311: 471–478. doi: 10.1042/bj3110471
 21. Oberfell A, Eto K, Mocsai A, Buensuceso C, Moores SL, Brugge JS, Shattil SJ (2002) Coordinate interactions of Csk, Src, and Syk kinases with α IIb β 3 initiate integrin signaling to the cytoskeleton. *J Cell Biol* 157: 265–275. doi: 10.1083/jcb.200112113
 22. Sudo T, Ito H, Kimura Y (2003) Phosphorylation of the vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) by the anti-platelet drug, cilostazol, in platelets. *Platelets* 4: 381–390. doi: 10.1080/09537100310001598819
 23. Schwarz UR, Walter U, Eigenthaler M (2001) Taming platelets with cyclic nucleotides. *Biochem Pharmacol* 62: 1153–1161. doi: 10.1016/S0006-2952(01)00760-2
 24. Udomsil N, Imsoonthornruksa S, Goslawit C, Ketudat-Cairns M (2019) Nutritional values and functional properties of house cricket (*Acheta domestica*) and field cricket (*Gryllus bimaculatus*). *Food Sci Technol Res* 25: 597–605. doi: 10.3136/fstr.25.597
 25. Larson MK, Shearer GC, Ashmore JH, Anderson-Daniels JM, Graslie EL, Tholen JT, Harris WS (2011) Omega-3 fatty acids modulate collagen signaling in human platelets. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids* 84: 93–98. doi: 10.1016/j.plefa.2010.11.004
 26. Lee J, Lee W, Kim MA, Hwang JS, Na M, Bae JS (2017) Inhibition of platelet aggregation and thrombosis by indole alkaloids isolated from the edible insect *Protaetia brevitarsis seoulensis* (Kolbe). *J Cell Mol Med* 21: 1217–1227. doi: 10.1111/jcmm.13055
 27. Kwon HW, Kim SD, Rhee MH, Shin JH (2022) Pharmacological Actions of 5-Hydroxyindolin-2 on Modulation of Platelet Functions and Thrombus Formation via Thromboxane A₂ Inhibition and cAMP Production. *Int J Mol Sci* 23: 14545. doi: 10.3390/ijms232314545