



밤나무 꿀의 혈소판 응집 억제 효과

김연지¹, 김경호^{1,2,*}, 최장기^{1,*}

¹한국한의학연구원 한의기술응용센터, ²과학기술연합대학원대학교 KIOM School

The Inhibitory Effect of Chestnut Honey on Platelet Aggregation and Thrombosis

Yeon-Ji Kim¹, Kyungho Kim^{1,2,*} and Jang-Gi Choi^{1,*}

¹Korean Medicine (KM) Application Center, Korea Institute of Oriental Medicine, Daegu 41062, Republic of Korea

²Korean Convergence Medical Science Major, KIOM School, University of Science & Technology (UST), Daejeon 34054, Republic of Korea

Abstract

Chestnut honey is a nutritive food with antibacterial and antioxidant properties. It has been used as a traditional medicine for ameliorating inflammation due to its antioxidant and anti-inflammatory activities. However, its role in platelet activation has not been fully studied. Hence, we examined whether chestnut honey has a potent inhibitory effect on platelet aggregation and thrombus formation. The antiplatelet activities of chestnut honey were evaluated by platelet aggregation, granule secretion, intracellular Ca²⁺ mobilization, and thromboxane B₂ generation. Thrombosis and bleeding time assay were employed to investigate the in vivo effect of chestnut honey (orally administered chestnut honey at 10 and 30 g/kg once daily for 7 days). We found that treatment with chestnut honey (3, 5, 10 mg/mL) significantly impaired collagen-induced platelet aggregation and αIIbβ₃ integrin activation but not P-selectin exposure, intracellular Ca²⁺ mobilization, and thromboxan B₂ generation during cell activation. Oral administration of chestnut honey efficiently ameliorates FeCl₃-induced arterial thrombus formation without prolonging tail bleeding time, suggesting a beneficial potential of chestnut honey in thrombosis and hemostasis. Our results show that chestnut honey could have an antiplatelet and antithrombotic effect without hemostasis.

Keywords

Chestnut honey, Platelet, Thrombosis, Platelet aggregation

서론

벌꿀은 오래전부터 천연 감미료 및 약용자원으로 이용되어왔으며, 양봉 기술의 비약적인 발전과 더불어 벌꿀의 식품 첨가제, 화장품, 의약품 등의 원료로 이용하고자 하는 연구가 활발히 진행되어왔다(Chung *et al.*, 1996). 벌꿀의 성분은 밀원에 따라 성분의 차이가 있으나 일반적으로 포도당과 과당이 35~40%, 서당, maltose, 올리고당이

2~4%, 그 밖의 단백질, 아미노산, 무기질 등이 미량 존재한다(Lee *et al.*, 1991; Chung *et al.*, 1996). 국내 약 4,600여종의 식물 중 밀원으로 이용이 가능한 식물은 약 625종으로 보고되어 있으나(Kim *et al.*, 2022), 경제적으로 이용 가치가 있는 식물은 일부에 지나지 않으며, 특히 우리나라에서 생산되는 벌꿀은 아카시아와 밤나무 꿀 등을 제외하고는 대량생산이 어려운 실정이다. 또한 벌꿀이 갖는 특성과 효용에 관한 연구는 많이 진행되어 있지만, 다양한 기능을

가진 밀원의 개발과 기능성 연구는 미흡한 실정이다(Cha and Bang, 1999).

혈구 세포 중 하나인 혈소판은 활성화 물질, 특히 손상된 혈관 내피세포 내 기질 단백질인 콜라겐(collagen)과 von Willebrand factor의 노출 및 부착 여부에 따른 활성화가 주된 단계이며, 뚜렷한 신호 전달 경로를 통해 세포 내 Ca^{2+} 농도 및 단백질 키나아제 활성화를 유도한다(Bryckaert *et al.*, 2015). 또한, 활성화된 혈소판은 ADP, serotonin 및 thromboxane A_2 와 같은 과립 분자들을 분비하여 주변의 다른 혈소판 막 수용체에 결합하여 혈소판과 혈소판 응집을 더욱 유도하여 지혈의 역할을 담당한다(Varga-Szabo *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010; Bye *et al.*, 2016). 하지만, 병리학적 상태에서 비정상적 혈소판의 과도한 활성화는 혈전증, 심근경색증, 허혈성 뇌졸중, 동맥경화증 및 말초혈관 질환 등의 심혈관계 장애를 일으킬 수 있다(Nieswandt *et al.*, 2002). 이러한 이유로 혈소판의 활성화를 적절히 저해하는 역할을 할 수 있는 소재들의 개발이 무수히 많이 진행되고 있지만 여러 부작용과 적용의 한계들로 인하여 심혈관계 질환에 의해 발생하는 사망자의 수는 감소하지 않는 실정이다(Jackson *et al.*, 2011). 따라서 혈소판 기능을 정확하게 억제하는 혈소판 활성화 및 응집을 근본으로 하는 주제 메커니즘을 이해하는 것이 혈전성 질환 치료를 위한 현명한 접근법이 될 수 있다.

본 연구에서는 심혈관 질환의 예방 및 치료를 위한 천연물 소재 탐색을 위하여 밤꿀의 혈소판 응집 및 활성화에서의 역할과 콜라겐으로 유도한 혈소판 활성화 과정에서 활성화에 영향을 미치는 다양한 요인들에 밤꿀이 어떻게 작용하는지 규명함으로써 밤꿀의 항혈소판 기능을 확인하고자 하였다. 이에 대한 접근방법으로 혈소판 응집, 혈소판 활성화도, Ca^{2+} 농도, thromboxane A_2 농도, $FeCl_3$ 유도 경동맥 혈전증 및 bleeding time을 측정하였다. 이와 같은 연구 결과는 식품이나 첨가제로 이용되던 밤꿀의 활용방안을 다양화하고, 기능성 식품 소재로서의 개발 가능성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시료

밤나무 꿀은 2020년 한국양봉농협(Ansung, Korea)에서 구입하여 $25 \pm 5^\circ C$ 의 암실에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

2. 동물실험

실험에 사용된 수컷 8주령 C57BL/6 마우스는 두얼바이오(서울, 대한민국)에서 구매하였으며, 1주일 동안 일반사료 급여하에 $23 \pm 1^\circ C$ 와 56% 상대습도 조건에서 순응 기간을 거친 후 실험에 이용하였다. 모든 동물실험 절차는 한국한의학연구원 동물실험윤리위원회의 규정에 따라 진행하였다(승인번호 KIOM-21-057).

3. 마우스 혈소판 분리

마우스 혈소판은 Kim *et al.* (2023) 방법에 따라 분리하였다. 마우스를 이소플루란 용액으로 흡입마취시킨 뒤 항응고제인 anticoagulant citrate dextrose (ACD)가 전처리된 주사기를 이용하여 마우스의 복부 정맥에서 채혈하였다. 이후 마우스 혈액은 $300 \times g$ 에서 20분간 원심분리하여 혈소판이 풍부한 혈장(platelet rich plasma, PRP)을 얻은 뒤 PRP에 $0.5 \mu M$ prostaglandin E1 (Sigma, USA)을 첨가하여 $700 \times g$ 에서 4분 동안 혈소판을 침전시켰다. 이후 10% ACD를 함유한 HEPES-Tyrode 완충액(5 mM glucose, 136 mM NaCl, 12 mM $NaHCO_3$, 2.7 mM KCl, 5 mM HEPES, pH 7.3)으로 1회 세척하고, 분리된 혈소판을 혈구 계산기로 혈소판 수를 측정하여 혈소판 수가 3×10^8 cells/mL의 농도가 되도록 HEPES-Tyrode 완충액으로 희석하여 실험에 사용하였다.

4. 혈소판 응집 분석

HEPES-Tyrode 완충액으로 희석한 마우스 혈소판(3×10^8 cells/mL) 용액 250 μL 를 cuvette에 넣고, 밤꿀 원액을 D.W에 녹여 제조한 stock solution (1 g/mL)을 이용하여 3, 5, 10 mg/mL 농도가 되도록 각각 0.75, 1.25, 2.5 μL 씩 cuvette에 첨가하고 $37^\circ C$ 에서 10분 동안 배양하였다. 이후 혈소판 응집 인자인 collagen, thrombin, U46619와 ADP로 혈소판 응집을 유도하고, 혈소판 응집계(4-channel platelet lumi-aggregomete, Chrono-Log Co., USA)를 이용하여 $37^\circ C$, 1,000 rpm 조건에서 광투과도 변화를 이용한 혈소판 응집을 측정하였다. 이때 사용된 밤꿀 시료는 안정성을 위하여 상온에 보관되었다.

5. Flow cytometry 분석을 통한 혈소판 활성 평가

마우스 혈소판에 다양한 농도(5, 10 mg/mL)의 밤꿀을 전처리한 뒤 $37^\circ C$ 조건에서 10분 동안 배양하고, 콜라겐

(1 µg/mL)를 넣어 혈소판 활성을 유도하였다. 이후 PE anti-human CD62P (P-selectin, BioLegend, USA) 및 FITC anti-human αIIbβ3 (PAC1) 항체와 15분간 배양시킨 뒤 유세포 분석기(Beckman Coulter Inc., USA)를 이용하여 혈소판 활성 인자를 활성을 분석하였다.

6. 세포 내 Ca²⁺ 농도 측정

마우스 혈소판(1×10^8 cells/mL)은 CaCl₂가 없는 HEPES-Tyrode 버퍼를 이용하여 재관류시킨 후, 37°C에서 10분 동안 다양한 농도(3, 5, 10 mg/mL)의 밤꿀로 전처리하였다. 밤꿀이 전처리 된 마우스 혈소판을 암실에서 30분 동안 FLIPR Calcium 5 analysis kit (Molecular Devices, USA)를 이용하여 염색시키고, 1 µg/mL CRP를 이용하여 혈소판 활성화를 유도하였다. 혈소판 내 칼슘 분비와 유입 농도는 분광 형광분석기(Spectramax i3 plate reader, Molecular Devices)를 이용하여 excitation 파장 485 nm, emission 파장 525 nm의 조건에서 측정하였다.

7. FeCl₃를 이용한 혈전증 동물모델에서의 항혈전 효능 평가

혈전증 유도 마우스 모델을 만들기 위해 FeCl₃ (10%)를 이용하였다. 마우스는 7일 동안 저용량(10 g/kg) 및 고용량(30 g/kg)의 밤꿀과 양성대조군인 aspirin (ASA, 100 mg/kg)을 경구로 투여하였으며, 마지막 투여 2시간 후 2% 이소플루란으로 마우스를 마취시켜 마우스의 왼쪽 경동맥을 분리하였으며, FeCl₃ (10%)을 적신 필터 용지(직경 2×2 mm)를 이용하여 분리된 왼쪽 경동맥 위에 2분 동안 올려두어 혈전증을 유도하였다. 이후 혈류량은 혈액 유량계(AD 계측기, 혈류량계)를 사용하여 측정하였다.

8. Tail bleeding time 측정

혈전증에 의한 지혈 작용을 측정하기 위하여 tail bleeding time 평가를 시행하였다. 마우스는 7일 동안 저용량(10 g/kg) 및 고용량(30 g/kg)의 밤꿀과 양성대조군 ASA (100 mg/kg)를 경구로 투여하였으며, 마지막 투여 2시간 뒤 2% 이소플루란으로 마우스를 마취하였다. 이후 면도날을 사용하여 마우스 꼬리의 5 mm를 절단하고 13 mL의 PBS가 담긴 15 mL conical tube에 꼬리를 넣고 고정된 뒤 출혈시간을 측정하였다.

9. 통계처리

결과 값은 평균±표준편차로 표기하였다. 자료의 분산분석(analysis of variance, ANOVA) 검정은 GraphPad Prism 5를 이용하여 실시하였으며, 통계적 유의성은 다중집단의 ANOVA와 Dunnett's test for comparisons of multiple group, Student's *t*-test for comparisons of two groups로 분석하였다(0.05보다 낮은 *P* 값은 유의미하다고 간주하였다).

결과 및 고찰

1. 밤꿀의 혈소판 응집 억제 효능 평가

마우스 혈소판에 다양한 농도의 밤꿀(3, 5, 10 mg/mL)로 전처리한 후 콜라겐(≤1 µg/mL), thrombin (≤0.025 U/mL), U46619 (≤3 µM)와 ADP (≤2.5 µM)로 혈소판 응집을 유도한 뒤 혈소판 응집 억제 효능을 평가하였다(Fig. 1). 연구 결과, 밤꿀은 콜라겐으로 유도된 혈소판 활성화에만 선택적으로 혈소판 응집을 농도 의존적으로 저해시켰으며, 이때, 밤꿀 3, 5, 10 mg/mL로 처리 시 대조군 대비 혈소판 응집 저해율은 각각 28±4, 69±3, 96±2%로 나타났다. 하지만, 다른 응집 인자 유도에 따른 혈소판 응집에는 영향이 없었다. 현재 혈행 개선 건강기능식품 원료로 주로 은행나무 잎이 사용되고 있는데, Shiyong *et al.* (2015)의 연구에서 사람 혈소판에 은행나무 추출물(2 mg/mL)를 처리하였을 때 ADP, U46619, 콜라겐으로 유도된 혈소판 응집을 모두 완전히 저해하였다. 게다가, 뽕나무 잎 70% 주정 추출물(200 µg/mL)이 콜라겐(2 µg/mL)으로 유도된 혈소판 응집을 약 60% 감소시켰고(Kim *et al.*, 2014), 뽕나무 뿌리껍질인 상백피의 열수 추출물(100 µg/mL)의 경우 약 95% 이상 감소시키는 것으로 보고되었다(Kim *et al.*, 2022). 다른 선행 연구 결과의 천연물 대비 높은 농도에서 밤나무 꿀의 항혈전 효능을 관찰할 수 있었지만, 꿀의 경우 스푼 단위로 섭취하거나, 일회용 꿀 포장이 300 g 내외인 것을 감안하면, 일상에서 섭취가 어려운 정도는 아닐 것으로 판단된다. 또한, 혈소판에는 콜라겐과 직접 또는 간접적으로 상호 작용하는 여러 수용체가 존재하는데, 이 중 integrin α2β1 (GPIa/IIa)는 내피세포와의 부착(adhesion) 기전을 매개하고, Ig-like receptor GPVI의 경우 혈소판 응집 조절에 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 있

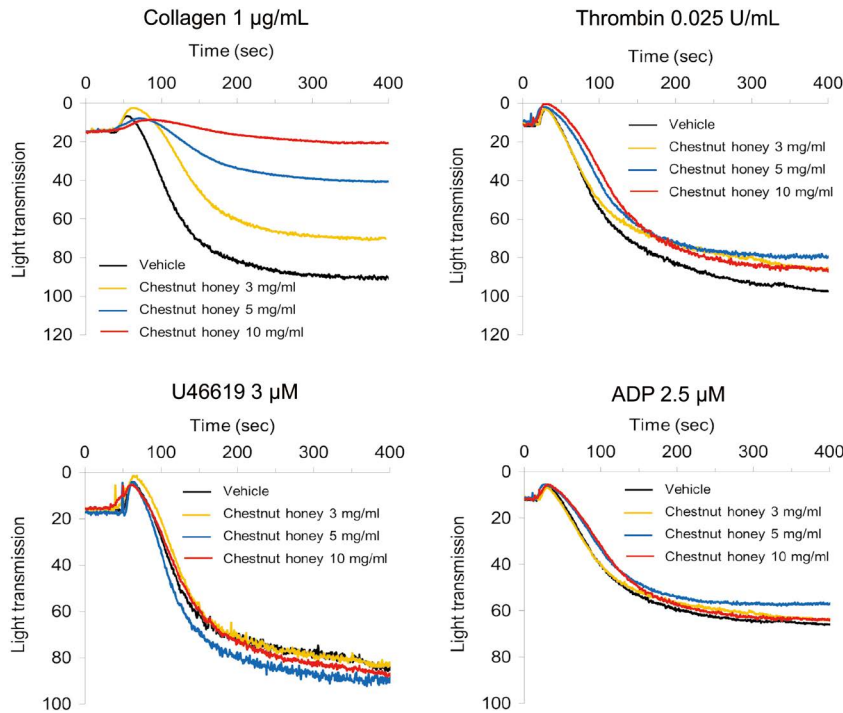


Fig. 1. Inhibitory effect of chestnut honey on platelet aggregation following stimulation with various agonists. Washed platelets were pre-incubated with various concentrations of chestnut honey (3, 5, and 10 mg/mL) for 10 minutes at 37°C and then stimulated with 1 µg/mL collagen, 0.025 U/mL thrombin, 3 µM U46619, and 2.5 µM ADP. Data represent the mean ± SD (n = 3).

다(Dutting *et al.*, 2012). 따라서 밤꿀은 GPVI 직접적인 조절을 통하여 혈소판 응집을 저해시키는 것으로 판단된다.

2. 밤나무 꿀의 혈소판 활성화 조절 효능 평가

혈소판 활성화의 positive feedback cycle을 유도하는 주요 과정 중 혈소판 활성 바이오파커로 쓰이는 α -granule의 P-selectin과 α IIB β 3 integrin 활성화 조절 기작에 대한 밤나무 꿀의 효능을 평가하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이, 밤나무 꿀의 처리는 콜라겐(≤ 1 µg/mL)으로 혈소판 활성을 유도하였을 때 P-selectin 노출(exposure)에는 영향을 주지 않았지만, α IIB β 3 integrin 활성도를 농도 의존적으로 억제하는 것을 확인하였다. P-selectin은 혈소판이 활성화될 때만 α -granule에서 분비되어 혈소판 세포막 표면으로 이동하는 막단백질로 혈소판 내부적인 활성을 확인할 수 있으며, α IIB β 3 integrin의 경우 외부에서 혈소판과 혈소판의 응집을 매개하는 인자로 혈소판 외부적 요인에 의한 혈소판 활성을 확인할 수 있다(Ni and Freedman, 2003; Durrant *et al.*, 2017). 밤나무 꿀의 경우 α IIB β 3 integrin 활성화만 억제하였으므로 외부적으로 혈소판끼리의 응집을 억제하는 기전으로 혈소판 응집을 조절하는 것으로 확인되었다.

3. 밤나무 꿀의 혈소판 내 Ca²⁺ mobilization 및 thromboxane B₂ 조절 효능 평가

혈소판 내 세포질에서 Ca²⁺ mobilization의 기본 메커니즘과 thromboxane B₂ 생성은 혈전 응집 반응에 주요한 기전으로 알려져 있다. 밤나무 꿀을 전처리한 뒤 콜라겐에 의한 혈소판 활성화에 따른 Ca²⁺ influx와 thromboxane B₂ 생성을 확인한 결과, 두 가지 인자 모두 밤나무 꿀에 의해 조절되지 않는 것을 확인하였다(Fig. 3). Fig. 2 결과와 종합하면, 밤나무 꿀은 혈소판 내부에서 혈소판 활성을 일으키는 인자들(P-selectin, calcium, thromboxane B₂)에는 영향을 주지 않고, α IIB β 3 integrin 활성화 조절을 통한 혈소판 응집을 저해하는 것으로 확인되었다.

4. 경동맥 혈전증 동물모델에서 밤나무 꿀의 혈전증 억제 효능 평가

밤나무 꿀의 혈전증 억제 효과를 측정하기 위해 마우스에 저용량(10 g/kg)과 고용량(30 g/kg)의 밤나무 꿀 및 양성대조군 ASA(100 mg/kg)를 7일간 경구 투여하였다. 실험 결과, 대조군(vehicle)에서 경동맥 폐색 시간이 평균

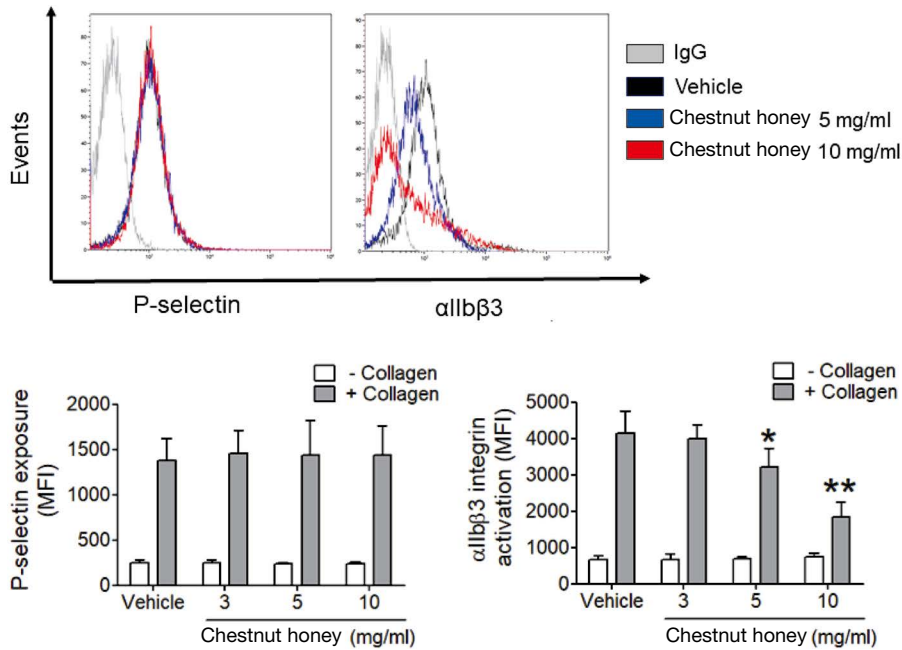


Fig. 2. Inhibitory effect of chestnut honey on αIIbβ3 integrin activation but not P-selectin exposure during platelet activation. Mouse platelets were pre-treated with various concentration of chestnut honey (3, 5, and 10 mg/mL), and stimulated with 1 μg/mL Collagen. αIIbβ3 integrin activation and P-selectin exposure were analyzed by flow cytometry. Binding of anti-activated αIIbβ3 (JON/A) and anti-P-selectin antibodies to platelets was calculated by the ratio of the geometric mean fluorescence intensity (MFI) value of antibodies to that of control IgG. Data represent mean ± SD (n = 3). *P < 0.05 and **P < 0.01 versus vehicle control after ANOVA and Dunnett's test.

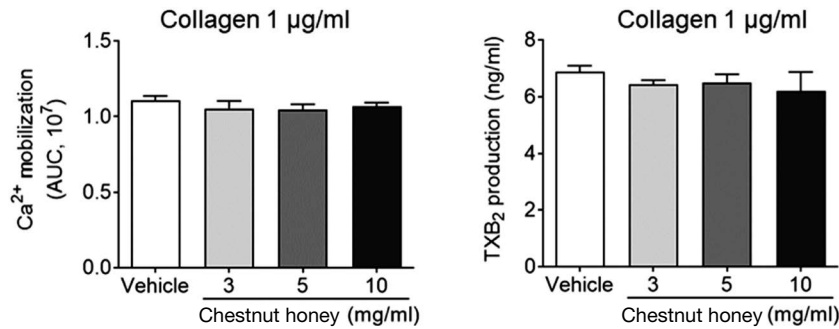


Fig. 3. Chestnut honey is not important for platelet activation through Ca²⁺ mobilization and TXB₂ generation. Mouse platelets were re-suspended in HEPES-Tyrode buffer without 1 mM CaCl₂ and pre-incubated with various concentration of chestnut honey (3, 5, and 10 mg/mL), and then incubated with a calcium-sensitive dye for 30 minutes at 37°C in the dark. After treatment with a Ca²⁺ dye, platelets were stimulated with 1 μg/mL collagen for 10 minutes. Intracellular Ca²⁺ mobilization was measured and quantified by the AUC (arbitrary units). Effect of chestnut on TXB₂ generation was measured using a TXB₂ ELISA assay kit. Washed platelet were pre-treated with various concentration of chestnut honey (3, 5, and 10 mg/mL) for 10 minutes, then stimulated with 1 μg/mL collagen. Quantitative data represent the mean ± SD (n = 3).

8.06(±2.98)분 발생하였고, 저용량 밤나무 꿀 투여군에서는 경동맥 폐색 시간이 평균 12.53(±3.76)분, 고용량 밤나무 꿀 투여군에서는 경동맥 폐색 시간이 평균 15.61(±6.42)분으로 나타나 대조군과 비교해 유의적인 증가를 확인하였다(Fig. 4). 이때 고용량 밤나무 꿀 투여군에서의 경동맥 폐색 시간은 양성대조군인 ASA 투여군 평균 17.05(±

5.26)분과 동등한 경동맥 폐색 시간 연장 효능을 보였다. ASA는 cyclooxygenase 역제를 통해 thromboxane A₂ 생성을 조절하여 혈소판 응집을 저해시키는 대표적인 항혈소판제로 혈전증 예방과 치료에 사용되고 있다(Santos-Gallego and Badimon, 2021). 하지만 위장계 출혈 및 천공 등의 심각한 부작용이 보고되고 있어, 항혈전 효능이 있고

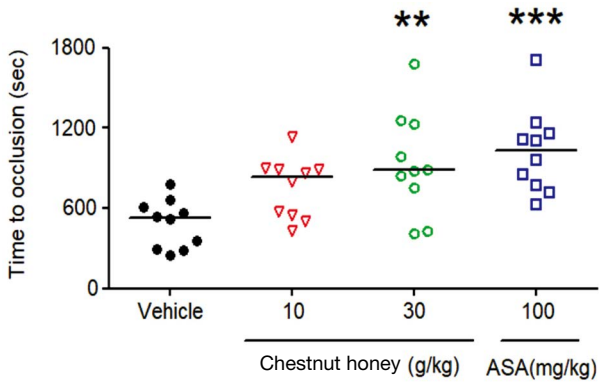


Fig. 4. Chestnut honey delayed FeCl₃-induced arterial thrombus formation. FeCl₃-induced arterial thrombus formation was performed as described in Methods. After oral administration of chestnut honey and ASA for 7 days, the mouse carotid artery was treated with 10% FeCl₃ for 2 minutes, and blood flow traces were monitored until stable occlusion took place. Horizontal bars represent the median occlusion time (n = 10). **P < 0.05 and ***P < 0.001 versus vehicle control after ANOVA and Turkey's test.

부작용이 없는 안전한 항혈소판제의 개발이 요구되고 있다(Sostres and Lanas, 2011).

5. 밤나무 꿀의 지혈 작용에 미치는 영향

혈관이 손상되면 혈소판이 활성화되어 손상 부위에 응집 및 부착하면서 혈관 손상에 따른 출혈을 지혈시키는 역할을 한다. 본 연구에서는 경동맥 혈전증을 농도 의존적으로 억제하는 효능을 보인 밤나무 꿀이 지혈 작용에 어떤 영향을 주는지 확인하였다. 꼬리 절단 후 출혈시간 및 양을 측정된 결과, 저용량 밤나무 꿀 투여군과 고용량 밤나무 꿀 투여군의 마우스 꼬리 출혈시간은 대조군과 비교 시 통계적으로 유의한 차이가 없음을 확인하였다(Fig. 5). 그러나 ASA군에서는 다른 실험군들과 비교하였을 때 출혈시간이 유의적으로 증가하였고, 이는 기존에 보고된 ASA의 출혈 부작용과 동일한 결과이다. 또한, 우수한 항혈전 효능으로 건강기능식품 시장에서 판매되고 있는 은행잎 추출물 경우에도 몇몇 임상 연구에서 약간의 출혈을 일으키는 것으로 보고된 바 있다(Bone, 2008). 따라서 밤나무 꿀이 생체 내 지혈 작용에는 영향 없이 혈전증을 억제하는 효능은 향후 혈전증을 예방하는 건강기능식품 소재나 치료제로 개발될 수 있을 것으로 판단된다.

적 요

밤나무 꿀은 항균 및 항산화 효능이 뛰어나 염증을 완화

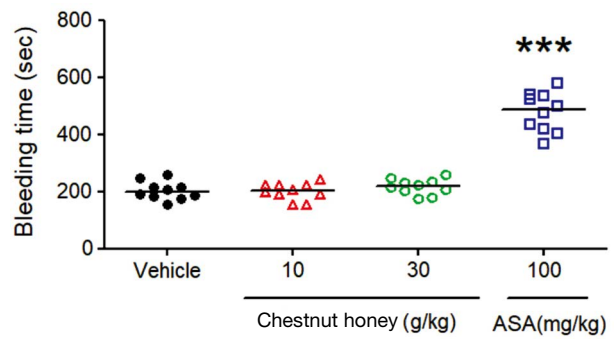


Fig. 5. The administration of chestnut honey did not affect hemostasis. After oral administration of chestnut honey and ASA for 7 days, tails of vehicle (close circle), 10 g/kg (open triangle), 30 g/kg (open circle) chestnut honey, and ASA (open square) treated mice were amputated, and bleeding time was monitored as described in Methods. Horizontal bars represent the median of bleeding times for each group of animals (n = 10). ***P < 0.001 versus vehicle control after ANOVA and Turkey's test.

하는 전통 의학으로 사용되었지만, 항혈소판 효능에 관한 연구는 아직까지 보고된 바가 없다. 본 연구에서 밤나무 꿀의 혈소판 응집 억제 효과를 확인하기 위해, 혈소판 응집, 과립 분비, 세포 내 Ca²⁺ 유입, thromboxane B₂ 생성을 평가하고, 마우스에 7일 동안 하루에 한 번 10, 30 g/kg으로 경구 투여하여 혈전증 및 출혈시간 분석하였다. 밤나무 꿀을 농도별(3, 5, 10 mg/mL)로 처리하였을 때 콜라겐 유도 혈소판 응집과 αIIbβ₃ 인테그린 활성화가 크게 감소되었지만, 혈소판이 활성화되었을 때 P-selectin 노출, 세포 내 Ca²⁺ mobilization 및 thromboxane B₂ 생성에는 영향이 없는 것을 확인하였다. 또한, 밤나무 꿀을 마우스에 경구 투여했을 때 출혈 없이 FeCl₃ 유도 동맥 혈전 형성을 효율적으로 개선하여 혈전증 및 지혈에서 밤나무 꿀의 유익한 효능을 확인하였다. 이러한 결과는 밤나무 꿀이 향후 혈전증 예방 및 치료제 소재 개발에 효과적으로 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: RS-2021-RD009724)의 연구비로 지원된 결과이며 이에 깊은 감사를 드립니다.

인용 문헌

Bone, K. M. 2008. Potential interaction of *Ginkgo biloba* leaf with antiplatelet or anticoagulant drugs: What is the evi-

- dence? Mol. Nutr. Food Res. 52: 764-771.
- Bryckaert, M., J. P. Rosa., C. V. Denis and P. J. Lenting. 2015. Of von willebrand factor and platelets. Cell. Mol. Life Sci. 72: 307-326.
- Bye, A. P., A. J. Unsworth and J. M. Gibbins. 2016. Platelet signaling: a complex interplay between inhibitory and activatory networks. J. Thromb. Haemost. 14: 918-930.
- Cha, Y. H. and K. S. Bang. 1999. Studies on the antibacterial activity of honey II. antibacterial activity of chestnut honey. J. Apic. 14: 97-104.
- Chung, D. H., S. H. Baek, W. H. Kim and S. S. Park. 1996. Effect on the change of sugar metabolism in rat by fed the honey. Korean J. Food Nutr. 9: 189-200.
- Durrant, T. N., M. T. van den Bosch and I. Hers. 2017. Integrin α IIb β 3 outside-in signaling. Blood 130: 1607-1619.
- Dütting, S., B. Markus and N. Bernhard. 2012. Platelet GPVI: a target for antithrombotic therapy?! Trends Pharmacol Sci. 33: 583-590.
- Jackson, S. P. 2011. Arterial thrombosis-insidious, unpredictable and deadly. Nat. Med. 17: 1423-1436.
- Kim, D. S., H. D. Ji, M. H. Rhee, Y. Y. Sung, W. K. Yang, S. H. Kim and H. K. Kim. 2014. Antiplatelet activity of morus alba leaves extract, mediated via inhibiting granule secretion and blocking the phosphorylation of extracellular-signal-regulated kinase and Akt. Evid. Based Complement. Alternat. Med. 2014: 639548.
- Kim, Y. J., K. Kim, H. Kweon, H. Kim and J. H. Kim. 2022. Inhibitory effect of mulberry root bark extract and its derived compounds on cholesterol regulation, inflammation, and platelet aggregation. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 51: 633-639.
- Kim, Y. J., T. I. Kim and K. Kim. 2023. An optimized herbal medicine containing *Scutellaria baicalensis* Georgi, *Alisma orientale* Juzepzuk, and *Atractylodes japonica* Koidzumi has potent antiplatelet and antithrombotic activities. J. Tradit. Complement. Med. 13: 285-296.
- Kim, Y. K., S. J. Na, H. Y. Kwon and W. G. Park. 2022. Evaluation of honey production of *Ligustrum japonicum* and *Viburnum odoratissimum* var. *awabuki* in the southern part of Korea. J. Apic. 37: 35-44.
- Lee, Y. G., B. U. Min and S. U. Lim. 1991. Comparative study on some quality-related components of different floral honeys - esp. on the contents of unsaturated higher fatty acids -. Appl. Biol. Chem. 34: 102-109.
- Li, Z., M. K. Delaney, K. A. O'brien and X. Du. 2010. Signaling during platelet adhesion and activation. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 30: 2341-2349.
- Ni, H. and J. Freedman. 2003. Platelets in hemostasis and thrombosis: role of integrins and their ligands. Transfus. Apher. Sci. 28: 257-264.
- Nieswandt, B., V. Schulte, A. Zywiets, M. P. Gratacap and S. Offermanns. 2002. Costimulation of Gi- and G12/G13-mediated signaling pathways induces integrin alpha IIb-beta 3 activation in platelets. J. Biol. Chem. 277: 39493-39498.
- Santos-Gallego, C. G. and J. Badimon. 2021. Overview of aspirin and platelet biology. Am. J. Cardiol. 144: S2-S9.
- Shiyong, Y., X. Yijia, Z. Peng, L. Chong, H. Wuming, L. Linchun and Z. Chunlai. 2015. *Ginkgo biloba* extract inhibits platelet activation via inhibition of Akt. Integr. Med. Int. 1: 234-242.
- Sostres, C. and A. Lanas. 2011. Gastrointestinal effects of aspirin. Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 8: 385-394.
- Varga-Szabo, D., A. Braun and B. Nieswandt. 2009. Calcium signaling in platelets. J. Thromb. Haemost. 7: 1057-1066.