



다래 화분 추출물의 혈소판 응집 및 혈전 형성 억제 효과

최하도^{1,2}, 김연지¹, 양혜진¹, 최홍민³, 우순옥³, 한상미³, 최장기^{1,2,*}, 김경호^{1,2,*}¹한국한의학연구원 한의기술응용센터, ²과학기술연합대학원대학교 KIOM School, ³농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부The Inhibitory Effect of 70% Ethanolic Extract of *Actinidia arguta* Pollen on Platelet Aggregation and ThrombosisHado Choi^{1,2}, Yeon-Ji Kim¹, Hye Jin Yang¹, Hongmin Choi³, Soon Ok Woo³, Sangmi Han³, Jang-Gi Choi^{1,2,*} and Kyungho Kim^{1,2,*}¹Korean Medicine (KM) Application Center, Korea Institute of Oriental Medicine, Daegu 41062, Republic of Korea²Korean Convergence Medical Science Major, KIOM School, University of Science & Technology (UST), Daejeon 34054, Republic of Korea³Department of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Wanju 55365, Republic of Korea

Abstract

Actinidia arguta has been traditionally used as a medicinal resource in Northeast Asia, and the biological activities of its leaves and fruits have been extensively investigated. However, studies regarding the antithrombotic effects of *A. arguta* pollen remain limited. In the present study, we investigated the antiplatelet and antithrombotic effects of a 70% ethanol extract of *A. arguta* pollen using *in vitro* platelet aggregation and *in vivo* FeCl₃-induced carotid artery thrombosis and tail bleeding time assays. In addition, the phosphorylation of c-Src, Syk, PLCγ2, and several proteins associated with αIIbβ3 integrin-mediated inside-out signaling was investigated. Treatment with the pollen extract (25, 50, and 100 μg/mL) significantly inhibited collagen-induced platelet aggregation in a concentration-dependent manner. Furthermore, oral administration of the extract (50 or 100 mg/kg) for 7 days significantly prolonged occlusion time in the FeCl₃-induced arterial thrombosis model. Notably, bleeding time and blood loss were not significantly different from those of the control group. Mechanistically, the extract markedly suppressed the phosphorylation of Src, Syk, PLCγ2, PI3K, AKT, and p38 MAPK following collagen-related peptide (CRP) stimulation, suggesting that the extract attenuates CRP-mediated platelet activation signaling pathways. These findings indicate that the 70% ethanol extract of *A. arguta* pollen inhibits platelet activation through the regulation of αIIbβ3 integrin-associated inside-out signaling. Collectively, our results suggest that *A. arguta* pollen may serve as a promising natural antiplatelet and antithrombotic therapeutic candidate.

Keywords

Actinidia arguta pollen, Platelet, Thrombosis, Platelet aggregation

서론

벌 화분(bee pollen)은 꿀벌이 다양한 식물의 화분을 채집한 후 타액과 효소를 혼합하여 형성한 천연 물질로 오랜 기간 동안 식품 및 약용 자원으로 활용되어 왔다. 최근

에는 다양한 생리활성 성분을 함유한 기능성 소재로서의 가치가 주목받고 있으며, 이에 대한 연구가 지속적으로 보고되고 있다. 벌 화분은 식물 유래 화분 성분과 벌 유래 생리활성 성분을 동시에 함유하는 복합 천연 자원으로 알려져 있으며, 탄수화물, 단백질, 지질, 비타민, 무기질, 페놀

산 및 플라보노이드 등의 다양한 성분이 풍부하게 함유되어 있는 것으로 보고되었다(Nogueira *et al.*, 2012; da Silva *et al.*, 2014). 이러한 성분들은 세포 및 동물실험에서 항산화, 항염증, 면역 조절, 항균 효과 등을 나타내는 것으로 알려져 있다(Kroyer and Hegedus, 2001; Almaraz-Abarca *et al.*, 2004). 이와 같이 다양한 연구에서 화분의 생리활성 효과가 입증됨에 따라 기능성 식품 및 천연물 기반 소재로서의 관심이 증가하고 있으며, 여러 질환에 대한 활용 가능성도 지속적으로 연구되고 있다(Campos *et al.*, 2010). 기존 연구에서는 일부 화분이 전립선 염증에 대해 효과적일 수 있음이 보고되었고, 일부 별 화분은 지질 대사 개선, 혈당 조절 및 간 보호 효과 등을 나타내어 만성 질환 예방을 위한 천연 소재로서의 가능성을 제시하였다(Komosinska-Vashev *et al.*, 2015; Algethami *et al.*, 2022).

다래(*Actinidia arguta*)는 우리나라를 포함한 동북아시아 지역에 널리 분포하는 덩굴식물로, 열매는 전통적으로 식용 및 약용 자원으로 활용되어 왔다. 다래에는 폴리페놀, 플라보노이드, 비타민 및 필수 영양소 등이 풍부하게 함유되어 있는 것으로 알려져 있다(Guerrero *et al.*, 2005; Leontowicz *et al.*, 2016). 다래 열매 및 잎 유래 추출물은 일부 염증 관련 질환 등에 활용 가능한 약학적 조성물로 보고된 바 있다(Latocha, 2017). 그러나 기존 연구들은 주로 다래의 열매와 잎에 포함된 유효성분 및 생리활성 평가에 집중되어 있으며, 다래 화분을 대상으로 한 연구는 상대적으로 부족한 실정이다. 최근 일부 연구에서 다래 화분의 항산화 및 항염증 효능이 보고되었으나(An *et al.*, 2016), 심혈관계 질환 및 혈소판 기능 조절과 관련된 생리활성에 대해서는 충분한 과학적 검증이 아직 충분히 이루어지지 않았다.

혈소판은 혈관 손상 시 지혈을 담당하는 핵심 세포로, 정상적인 생리 상태에서는 출혈을 방지하는 중요한 기능을 한다. 혈관 손상으로 노출된 collagen은 혈소판 표면 수용체와 결합하여 혈소판 활성화를 유도하고, 이 과정에서 세포 내 Ca^{2+} 농도 증가, 과립 분비 및 $\alpha IIb\beta 3$ integrin의 활성화가 유도되어 혈소판 응집이 일어난다(Watson *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2010; Bryckaert *et al.*, 2015). 이러한 혈소판의 활성화 및 응집은 정상적인 지혈 반응에 필수적인 반응이다. 그러나 대사 질환과 같은 병리학적 상태에서는 혈소판의 과활성화가 유도되어 혈전 생성을 촉진하여 심혈관계 질환의 주요 원인이 될 수 있다. 특히 당뇨병, 비만 등의 대사 질환에서는 산화 스트레스 및 만성 염증이 지속되며,

이로 인해 혈소판 과활성화가 유도되는 것으로 알려져 있다(Davì and Patrono, 2007). 과도하게 활성화된 혈소판은 혈전 형성을 촉진하여 심근경색, 허혈성 뇌졸중 및 동맥경화증 등의 발생 위험을 증가시킨다.

현재 임상에서 사용되는 항혈소판제는 심혈관계 질환 예방 및 치료에 효과적이거나, 장기 복용 시 출혈 위험 증가, 위장관 부작용 및 약물 내성 등의 부작용이 보고되고 있다. 또한 수술 전후의 약물 관리가 필요하며 특정 환자군(임산부 및 영유아 등)에서는 사용에 제한적이다(Davì and Patrono, 2007). 이에 따라 상대적으로 안전성이 높고 장기간 섭취가 가능한 천연물 유래 항혈소판 소재의 발굴이 필요하다. 화분은 식품으로 활용된 역사가 길고 비교적 안전성이 높은 천연 자원으로, 기능성 식품 또는 천연물 기반 항혈전 소재로서의 활용 가능성이 있다(Denisow and Denisow-Pietrzyk, 2016). 그러나 화분의 혈소판 기능 조절 효과와 관련된 연구는 제한적이며, 특히 작용 기전에 대한 과학적 근거는 충분하지 않다.

따라서 본 연구에서는 심혈관계 질환의 예방 및 관리를 위한 천연물 유래 기능성 소재를 탐색하기 위하여, 벌이 수집한 다래(*A. arguta*) 화분의 70% 에탄올 추출물(AAE)의 혈소판 기능 조절 효과를 평가하였다. 이를 위해, 다양한 혈소판 agonist에 의해 유도된 혈소판 응집에 대한 억제 효과를 비교하고, Collagen-Related Peptide (CRP)에 의해 유도된 P-selectin 발현, $\alpha IIb\beta 3$ integrin 활성화 및 Ca^{2+} mobilization 변화를 분석하였다. 또한 $FeCl_3$ 유도 경동맥 혈전증 모델과 tail bleeding time assay를 이용하여 다래 화분 추출물의 항혈전 효과 및 지혈 안전성을 평가하였으며, 혈소판 활성화와 관련된 주요 신호 전달 단백질의 인산화 변화를 분석하여 다래 화분 추출물의 항혈소판 작용 기전을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시료(다래 화분 추출물)

다래 화분은 농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부 양봉생태과로부터 제공받아 사용하였다. 건조된 다래 화분 분말 100 g에 70% (v/v) 발효 주정(에탄올)을 시료 대비 10 배량(1 L)으로 첨가한 후, 환류 냉각장치를 장착한 가열 맨틀을 이용하여 추출을 수행하였다. 추출 용매가 끓기 시작

하는 약 75°C의 온도에서 3시간 동안 환류 추출한 후, 추출액을 여과지로 여과하였다. 여과액은 감압농축기를 이용하여 1~2시간 동안 감압 농축하여 에탄올을 완전히 제거하였다. 농축된 시료는 -80°C에서 동결시킨 후 72시간 동안 동결건조기를 이용하여 감압 동결건조하였으며, 건조된 시료는 분쇄기로 분쇄하여 분말 형태로 제조한 후 사용 전까지 -20°C에서 보관하였다. 최종 추출물의 수율은 원물(다래 화분) 중량 대비 29.2%로 산출되었다. 실험 시에는 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

2. UHPLC-HRMS를 이용한 다래 화분 추출물의 성분 분석

다래 화분 추출물의 화학적 특성을 확인하기 위하여 ultra-high-performance liquid chromatography - Orbitrap high-resolution mass spectrometry (UHPLC-HRMS) 분석을 수행하였다. 분석에는 가열 전기분무 이온화(heated electrospray ionization, HESI) 소스가 장착된 Q Exactive Orbitrap 질량분석기와 이에 결합된 UltiMate 3000 UHPLC 시스템(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 사용하였다. 추출물 내 성분은 ACQUITY UPLC BEH C18 column (100×2.1 mm, 1.7 µm; Waters Corporation, Milford, MA, USA)에서 분리하였다. 이동상은 0.1% (v/v) 포름산을 함유한 물과 아세트나이트릴로 구성하였으며, 기울기 용리 방식으로 분석하였다. 이때 컬럼 온도는 40°C로 유지하였다. 양이온 및 음이온 모드에서 m/z 100~1,500 범위의 full-scan MS 및 data-dependent MS² (dd-MS²) 스펙트럼을 획득하였으며, normalized collision energy (NCE)는 25로 설정하였다. 분석 조건은 기존에 확립된 방법(Pak *et al.*, 2022)을 기반으로 설정하였다. 검출 성분은 전구체 이온의 정확질량, 원소 조성 및 MS/MS 분해 양상을 문헌 자료와 비교하여 잠정 동정하였다. 데이터 수집 및 처리는 Xcalibur v.4.2와 Tracefinder v.4.0 (Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 수행하였다. 사용된 메탄올, 아세트나이트릴, 물 및 포름산을 포함한 모든 분석용 용매는 MS-grade 제품(Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)을 사용하였다.

3. 동물

실험에 사용된 수컷 6주령 C57BL/6 마우스는 두열바이오(서울, 대한민국)에서 구매하였으며, 1주일간 일반 사료를 급여하며 23±1°C와 56% 상대습도 조건에서 순응시

킨 후 실험에 사용하였다. 모든 동물실험 절차는 한국한의약연구원 동물실험윤리위원회의 규정에 따라 진행하였다(승인번호 KIOM-25-079).

4. 마우스 혈소판 분리

마우스 혈소판은 Kim *et al.* (2023)의 방법에 따라 분리하였다. 마우스를 이소플루란을 이용하여 흡입마취시킨 뒤 항응고제 anticoagulant citrate dextrose (ACD)가 전처리된 1 mL 주사기를 이용하여 복부 하대정맥에서 채혈하였다. 혈액은 300×g에서 20분 동안 원심 분리하여 혈소판 풍부한 혈장(platelet-rich plasma, PRP)을 얻은 뒤 0.5 µM prostaglandin E1 (Sigma, USA)과 10% ACD를 첨가하여 700×g에서 50초 동안 원심 분리하여 혈소판을 침전시켰다. 이후 10% ACD를 포함한 HEPES-Tyrod 완충액(5 mM glucose, 136 mM NaCl, 12 mM NaHCO₃, 2.7 mM KCl, 5 mM HEPES, pH 7.3)으로 1회 세척한 뒤, 혈구계수기를 이용하여 혈소판 수를 측정하였다. 혈소판은 최종적으로 3×10⁸ cells/mL의 농도가 되도록 HEPES-Tyrod 완충액으로 조정하여 실험에 사용하였다.

5. 혈소판 응집 분석

HEPES-Tyrod 완충액으로 희석한 혈소판 현탁액 250 µL를 cuvette에 넣고, 다래 화분 추출물 stock solution (100 mg/mL)을 이용하여 최종 농도 25, 50, 100 µg/mL가 되도록 전처리하였다. 37°C에서 10분간 반응시킨 후 collagen (3 µg/mL; P/N-385, Chrono-Log, PA, USA), thrombin (0.05 U/mL; T7009-1KU, Sigma-Aldrich, Germany), ADP (10 µM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), U46619 (3 µM; Tocris Bioscience, Bristol, UK) 또는 CRP (0.5 µg/mL)를 처리하여 혈소판 응집을 유도하였다. CRP는 University of Cambridge, Department of Biochemistry의 Richard Farndale 박사로부터 제공받아 사용하였다. 혈소판 응집은 혈소판 응집계(4-channel platelet lumi-aggregometer; Chrono-Log Co., USA)를 이용하여 37°C, 1,000 rpm 조건에서 광투과도 변화를 측정하여 분석하였다.

6. Ca²⁺ mobilization assay

혈소판을 CaCl₂가 포함되지 않은 HEPES-Tyrod 완충액(pH 7.4)에 현탁한 후, 다래 화분 추출물(25, 50 및 100 µg/mL)을 37°C에서 10분간 전처리하였다. 이후 혈소판에 칼

습 감응 형광 염료(FLIPR Calcium 5 Assay Kit, Molecular Devices, San Jose, CA, USA)를 처리하여 37°C 암조건에서 30분간 반응시킨 다음, CRP (0.5 µg/mL)로 자극하였다. 세포 내 Ca^{2+} release를 측정된 후 2 mM $CaCl_2$ 를 첨가하여 extracellular Ca^{2+} influx를 유도하였다. Ca^{2+} 신호는 형광분광광도계(SpectraMax i3, Molecular Devices, San Jose, CA, USA)를 이용하여 excitation 485 nm 및 emission 525 nm에서 측정하였다.

7. Flow cytometric analysis

혈소판을 다래 화분 추출물(25, 50 및 100 µg/mL)로 37°C에서 10분간 전처리하였다. 이후 CRP (0.5 µg/mL)를 처리하여 37°C에서 5분간 혈소판 활성화를 유도한 다음, P-selectin 또는 활성형 $\alpha IIb\beta 3$ integrin에 대한 PE-conjugated 항체를 처리하여 15분간 반응시켰다. 유세포 분석기(Gallios, Beckman Coulter, Brea, CA, USA)를 이용하여 분석하였으며, 각 항체의 결합 정도는 control IgG 대비 geometric mean fluorescence intensity (MFI)의 비율로 정량화하였다.

8. $FeCl_3$ 유도 경동맥 혈전증 모델

다래 화분 추출물의 체내 항혈전 효능을 평가하기 위해 $FeCl_3$ 유도 경동맥 혈전증 모델을 사용하였다. 마우스에 다래 화분 추출물 저용량(50 mg/kg, BW) 및 고용량(100 mg/kg, BW)을 7일간 경구 투여하였고, 양성대조군에는 aspirin (ASA, 100 mg/kg, BW)을 투여하였다. 투여 마지막 날에는 $FeCl_3$ 처리 30분 전에 각 군별로 약물을 투여하였다. 이후 2.5% 이소플루란으로 흡입마취를 유도하고, 1.5% 이소플루란으로 마취 상태를 유지하였다. 경동맥을 노출한 후 10% $FeCl_3$ 를 흡수시킨 여과지(2 mm × 2 mm)를 2분간 경동맥 위에 적용하였으며, 혈류량계(AD Instruments, USA)를 이용하여 혈류 변화를 관찰하고 안정적 폐색까지의 시간을 측정하였다. 정확한 혈전성 폐색을 확인하기 위해 항온항습기를 이용하여 25°C, 30%의 습도를 유지하였으며 히팅 패드를 사용하여 마우스의 체온을 37°C로 유지하였다.

9. Tail bleeding time assay

다래 화분 추출물이 지혈 기능에 미치는 영향을 평가하기 위해 tail bleeding time assay를 수행하였다. 마우스에 저용량(50 mg/kg, BW) 및 고용량(100 mg/kg, BW)의 다래 화

분 추출물과 ASA (100 mg/kg, BW)를 7일간 경구 투여한 후, 꼬리 말단부 5 mm를 절단하였다. 이후 15 mL conical tube에 PBS 13 mL를 담고 꼬리를 고정된 뒤 출혈 지속 시간을 측정하였다. 정확한 출혈 지속 시간을 확인하기 위해 출혈이 멈춘 시점부터 5분간 추가 관찰하였다. PBS에 수집된 혈액은 lysis buffer (8.3 g/L NH_4Cl , 1.0 g/L $KHCO_3$, 0.037 g/L EDTA)로 처리한 뒤 575 nm에서 흡광도를 측정하여 헤모글로빈 함량을 정량화하였다.

10. Western blot assay

혈소판 현탁액 250 µL에 다래 화분 추출물(25, 50 및 100 µg/mL)을 37°C에서 10분간 전처리한 후, CRP (0.5 µg/mL)로 혈소판 활성화를 유도하였다. 이후 동일 부피의 lysis buffer (TBS, pH 7.4, containing 2% Triton X-100, 0.1% SDS, 2 mM EDTA, 2 mM Na_3VO_4 , phosphatase inhibitor cocktail, protease inhibitor cocktail, and 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride)를 첨가하여 용해하고 95°C에서 7분간 가열하였다. SDS-PAGE 후 단백질을 PVDF membrane (IPVH00010, Millipore, Tullagreen, Ireland)에 전이하고 5% bovine serum albumin (BSA)로 blocking하였다. 1차 항체를 4°C에서 12 시간 반응시킨 후, 0.01% Tween-20이 포함된 Tris-buffered saline (TBST)로 10분간 3번 세척하였다. 이후 2차 항체를 실온에서 1시간 반응시킨 뒤 TBST로 10분간 4회 세척하고, ECL (WesternBright ECL, San Jose, USA)을 이용하여 band를 검출하였으며, 단백질의 발현은 Alliance Q9 system (UVITEC, Cambridge, UK)을 사용하여 확인하였다. 이미지는 Alliance software (version 18.16c)를 이용하여 분석하였다. 본 연구에서 사용한 1차 항체 phospho-c-Src at Tyr416 (Cat. No. 2101), phospho-Akt at Ser473 (Cat. No. 9271), phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) at Tyr202/Tyr204 (Cat. No. 4377), phospho-Syk at Tyr525/526 (Cat. No. 2711), phospho-PLC gamma2 at Tyr1217 (Cat. No. 3871), phospho-p38 MAPK at Thr180/Tyr182 (Cat. No. 9211), Total c-Src (Cat. No. 2108), Total Akt (Cat. No. 9272), Total p44/p42 (Erk1/2) (Cat. No. 9102), Total Syk (Cat. No. 12358), Total PLC gamma2 (Cat. No. 3872), Total p38 MAPK (Cat. No. 9212)이며, 모두 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)로부터 구입하였다. β -Actin (Cat. No. sc-47778)은 Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)로부터 구입하였다. 2차 항체인 Donkey anti-Rabbit HRP conjugated antibody (A120-

108P)와 Donkey anti-Mouse HRP conjugated antibody (A90-137P)는 Bethyl Laboratories (Montgomery, TX, USA)로부터 구입하였다.

11. 통계 분석

모든 데이터는 평균 $\pm$ SD로 표시하였다. 통계 분석은 GraphPad Prism 8 (version 8.0.2)을 사용하였다. 두 군 간 비교는 Student's t-test를 사용하였고, 세 군 이상 비교는 one-way ANOVA 후 Dunnett post hoc test 또는 Tukey's post hoc test를 적용하였다. $P < 0.05$ 를 통계적으로 유의한 차이로 판단하였다.

실험 결과 및 고찰

1. 다래 화분 추출물의 주요 성분 확인

다래 화분 추출물의 화학적 특성을 확인하기 위하여

UHPLC-HRMS 분석을 수행하였다(Fig. 1). 전체 이온 크로마토그램 분석 결과, 하나의 우세한 피크가 확인되었으며, 이를 다래 화분 추출물의 주요 성분으로 판단하여 구조 분석을 수행하였다. 양이온 모드에서는 유지 시간 10.34분에 $[M+H]^+$ 전구체 이온이 m/z 584.2757로 검출되었으며, 이는 분자식 $C_{34}H_{37}N_3O_6$ 의 계산값 m/z 584.2755와 일치하였다. 질량오차는 0.34 ppm이었으며, MS/MS 분석에서 m/z 438.2387 및 420.2280의 주요 생성이온이 관찰되었다. 음이온 모드에서는 유지 시간 10.36분에 $[M+H]^+$ 전구체 이온이 m/z 582.2610으로 검출되었으며, 계산 값인 m/z 582.2609에 대해 0.17 ppm의 질량오차를 나타냈다. 주요 MS/MS 생성이온으로는 m/z 462.2037, 342.1475 및 119.0500으로 관찰되었다. 전구체 이온의 정확질량, 원소 조성 및 MS/MS 분해 양상을 문헌 자료와 비교하여 해당 성분을 N^1, N^5, N^{10} -(*E*)-tri-*p*-coumaroylspermidine (TPCS)으로 잠정 동정하였다. 선행 연구에서는 TPCS가 다래 벌화분 추출물에서 분리 및 구조 동정된 주요 phenol-

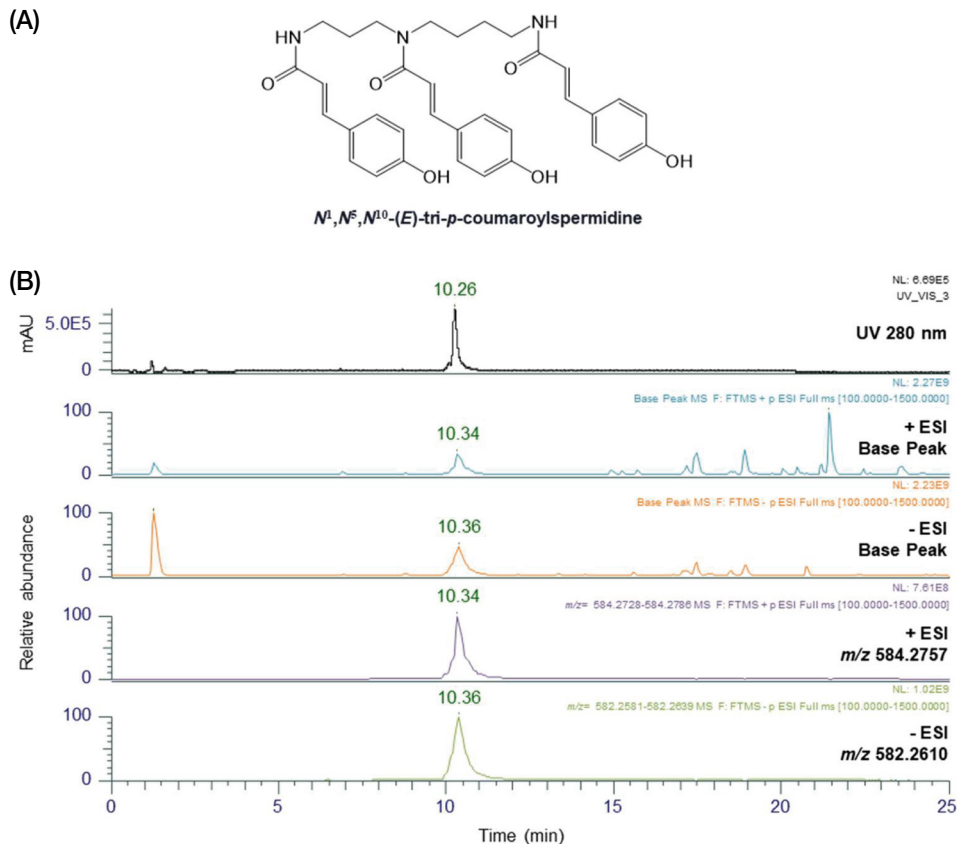


Fig. 1. UHPLC-Q Exactive Orbitrap HRMS analysis of the *Actinidia arguta* pollen extract. (A) Chemical structure of N^1, N^5, N^{10} -(*E*)-tri-*p*-coumaroylspermidine; (B) UV chromatogram, base peak chromatograms, and extracted ion chromatograms.

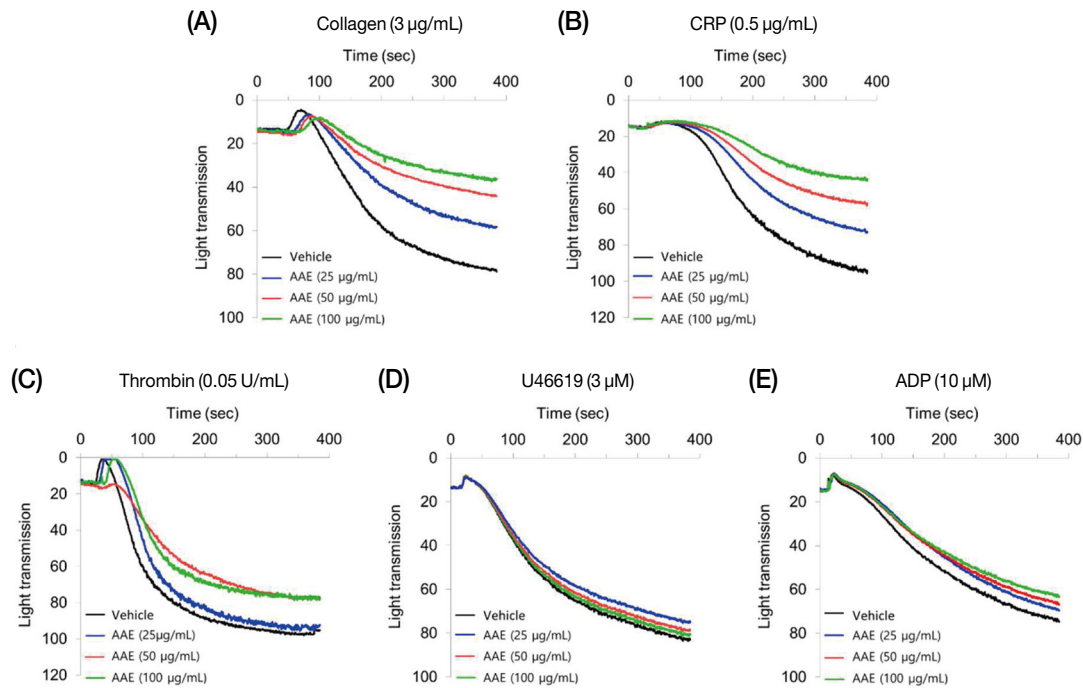


Fig. 2. Inhibitory effect of the extract of *Actinidia arguta* pollen on platelet aggregation induced by various agonists. Washed platelets were pre-incubated with each extract (25, 50, and 100 µg/mL) for 10 min at 37°C and then stimulated with collagen (3 µg/mL) (A), CRP (0.5 µg/mL) (B), thrombin (0.05 U/mL) (C), U46619 (3 µM) (D), and ADP (10 µM) (E). Platelet aggregation was measured using a light transmission aggregometer. Data are presented as the mean ± SD (n = 3). *P < 0.05, **P < 0.01, and ***P < 0.001 versus vehicle control after one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test.

amide 성분으로 보고되었다(Lee *et al.*, 2025). 또한 hydroxycinnamoyl polyamine 계열 성분은 다양한 화분에서 확인되며, 이들의 정성적·정량적 조성은 화분의 식물학적 기원과 연관된 화학적 fingerprint로 활용될 가능성이 보고되었다(Nasti *et al.*, 2022). 따라서 본 연구에서 검출된 TPCS는 다래 화분 추출물의 화학적 특성 확인과 품질관리를 위한 지표 후보성분으로 활용될 가능성이 있음을 시사한다.

2. 다래 화분 추출물의 혈소판 응집 억제 효과

마우스로부터 분리한 혈소판에 다래 화분 추출물(25, 50 및 100 µg/mL)을 전처리한 후 다양한 혈소판 응집 유도 물질(collagen, CRP, thrombin, U46619 및 ADP)을 처리하여 혈소판 응집 억제 효과를 평가하였다(Fig. 2). 그 결과 다래 화분 추출물은 collagen 및 CRP 자극에 의해 유도된 혈소판 응집을 비교적 뚜렷하게 억제하는 경향을 보였다. 특히 collagen 유도 혈소판 응집은 추출물 처리 농도에 따라 유의하게 감소하였다(Fig. 2). 혈소판에는 collagen과 상호작용하는 다양한 수용체가 존재하며, 그중 GPVI (glycoprotein VI)는 collagen에 대한 주요 수용체로 알려져 있다

(Chen *et al.*, 2002). 또한, CRP는 GPVI를 선택적으로 활성화하는 agonist로 널리 사용되므로, 본 연구에서 관찰된 collagen 및 CRP 유도 응집 억제 효과는 다래 화분 추출물이 GPVI 매개 혈소판 활성화 경로를 조절할 가능성을 시사한다.

3. 다래 화분 추출물의 혈소판 활성화 조절 효과

다래 화분 추출물이 혈소판 활성화 과정에 미치는 영향을 확인하기 위해 P-selectin 발현, αIIbβ3 integrin 활성화 및 세포 내 Ca²⁺ mobilization을 분석하였다. 혈소판에 다래 화분 추출물(25, 50 및 100 µg/mL)을 전처리한 후 CRP (0.5 µg/mL)를 처리하여 혈소판 활성화를 유도하였다. 그 결과, P-selectin 발현과 αIIbβ3 integrin 활성화가 추출물 처리에 의해 유의하게 감소하였다(Fig. 3). 또한 CRP 자극에 의해 증가한 세포 내 Ca²⁺ release 및 extracellular Ca²⁺ influx도 추출물 처리군에서 농도 의존적으로 억제되었다(Fig. 4). 이러한 결과는 다래 화분 추출물이 혈소판의 과립 분비, αIIbβ3 integrin 활성화 및 Ca²⁺ 신호 전달을 조절함으로써 혈소판 활성화를 억제할 수 있음을 의미한다.

4. FeCl₃ 유도 경동맥 혈전 모델에서 항혈전 효능

다래 화분 추출물의 체내 항혈전 효과를 확인하기 위해 저용량 (50 mg/kg) 및 고용량 (100 mg/kg)으로 7일간 경구 투여한 후 FeCl₃ 유도 경동맥 혈전 모델을 수행하였다. 그 결과, 대조군 대비 추출물 투여군에서 경동맥 폐색 시간이 유의하게 연장되었으며 (Fig. 5), 특히 고용량 투여군은 양성대조군인 ASA 투여군과 유사한 수준의 폐색 시간 연장

효과를 보였다. 이는 다래 화분 추출물이 생체 내 동맥 혈전 형성을 억제할 수 있음을 시사한다. 또한 마우스 투여 용량을 사람 기준 섭취량으로 환산하기 위해 Human Equivalent Dose (HED) 계산법 (U.S. Food and Drug Administration, 2005)을 적용하였다. 마우스 100 mg/kg 투여량은 체 표면적 보정계수에 따라 성인 65 kg 기준 약 527 mg/day에 해당한다 [$100 \text{ mg/kg} \times (\text{Km}_{\text{mouse}} / \text{Km}_{\text{human}}) \times 65 \text{ kg} = 527 \text{ mg/day}$]. 이는 시중에서 판매되는 화분 관련 건강 식품의 일반적인 섭취량 범위와 비교할 때 현실적으로 섭취 가능한 수준으로 판단된다.

5. Tail bleeding time assay를 통한 지혈 안전성 평가

경동맥 폐색 시간을 연장시킨 다래 화분 추출물이 정

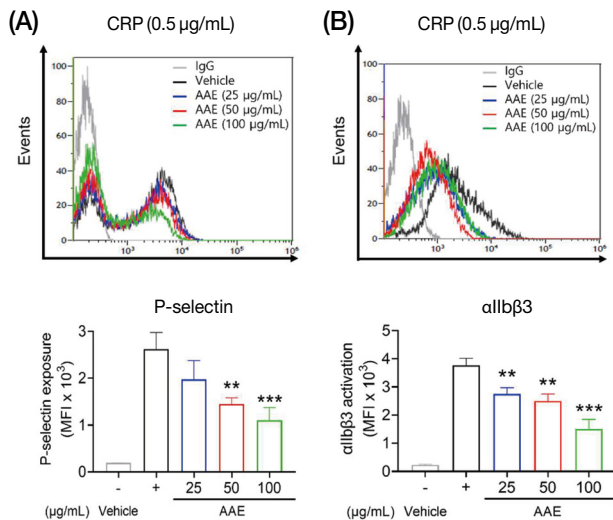


Fig. 3. Inhibitory effects of the extract of *Actinidia arguta* pollen on P-selectin exposure and αIIbβ3 integrin activation. Platelets were preincubated with the extract (25, 50, and 100 μg/mL) and stimulated with CRP (0.5 μg/mL). P-selectin exposure (A) and αIIbβ3 integrin activation (B) were analyzed by flow cytometry. The binding of anti-activated αIIbβ3 and anti-P-selectin antibodies was quantified as the ratio of the geometric mean fluorescence intensity (MFI) relative to that of control IgG. Data are presented as the mean ± SD (n = 5). **P < 0.01, and ***P < 0.001 versus vehicle control after one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test.

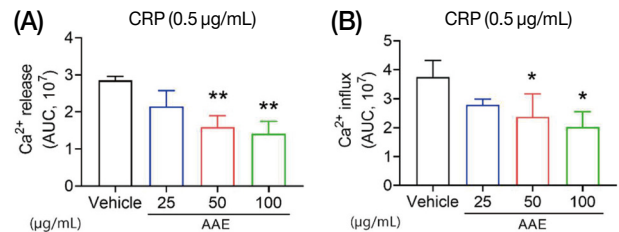


Fig. 4. Inhibitory effects of the extract of *Actinidia arguta* pollen on intracellular Ca²⁺ mobilization during platelet activation. Mouse platelets were resuspended in HEPES-Tyrod buffer without 1 mM CaCl₂ and preincubated with the extract (25, 50, and 100 μg/mL) for 10 min at 37°C. Platelets were then loaded with a calcium-sensitive dye for 30 min at 37°C in the dark, followed by stimulation with CRP (0.5 μg/mL). Subsequently, 2 mM CaCl₂ was added to initiate extracellular Ca²⁺ influx. Intracellular Ca²⁺ release (A) and influx (B) were measured and quantified as the area under the curve (AUC, arbitrary units). Data are presented as the mean ± SD (n = 5). *P < 0.05 and **P < 0.01 versus vehicle control after one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test.

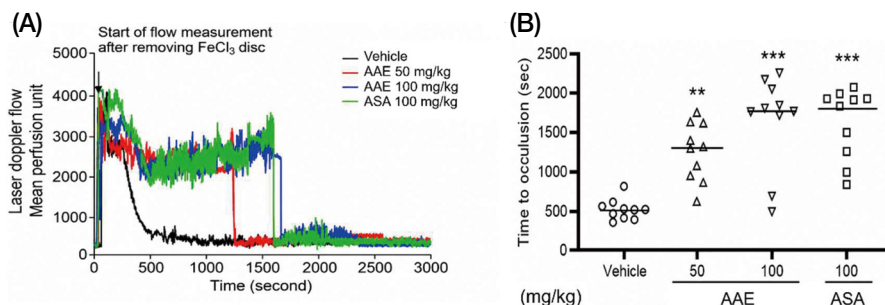


Fig. 5. Representative blood flow traces in the FeCl₃-induced carotid arterial thrombosis model. Oral administration of the extract of *Actinidia arguta* pollen (50 or 100 mg/kg) or aspirin (ASA, 100 mg/kg) for 7 days significantly delayed arterial thrombus formation. The carotid artery was treated with 10% FeCl₃ for 2 min, and blood flow was monitored until stable occlusion occurred. Representative image (A). Time to occlusion (B). Horizontal bars represent the median occlusion time (n = 10). **P < 0.05 and ***P < 0.001 versus vehicle control after one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test.

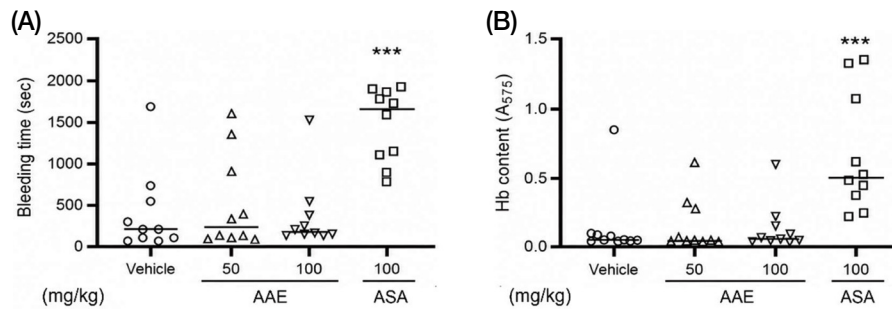


Fig. 6. Effects of the extract of *Actinidia arguta* pollen on hemostasis in the tail bleeding time. After oral administration of the extract for 7 days, the tails were amputated and bleeding time was monitored. Bleeding time (A). Hemoglobin (Hb) content (B). Horizontal bars represent the median bleeding time (n = 10). ***P < 0.001 versus vehicle control after one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test.

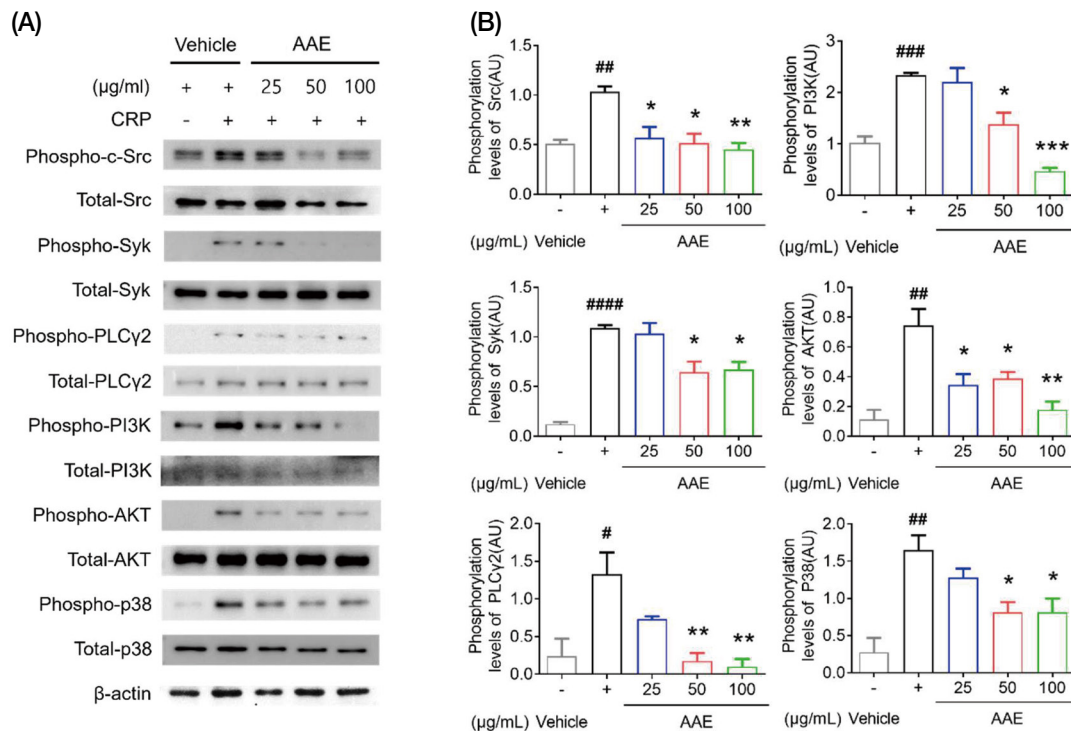


Fig. 7. The extract of *Actinidia arguta* pollen attenuated phosphorylation of c-Src, Syk, PLCγ2, PI3K, Akt, and p38 MAPK following CRP stimulation. Washed platelets were pretreated with the extract (25, 50, and 100 μg/mL) and stimulated with CRP (0.5 μg/mL). Equal amounts of cell lysate proteins were subjected to immunoblot analysis to determine phosphorylation levels. Representative blots (A). Quantitative graphs (B). Data are presented as the mean ± SD (n = 3). #P < 0.05, ##P < 0.01, ###P < 0.001, and ####P < 0.0001 versus unstimulated vehicle control (Student's t-test); *P < 0.05, **P < 0.01, and ***P < 0.001 versus stimulated vehicle control after one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test.

상 지혈 기능에 미치는 영향을 평가하기 위해 tail bleeding time assay를 수행하였다. 그 결과, 저용량(50 mg/kg) 및 고용량(100 mg/kg) 투여군은 대조군 대비 출혈 시간 및 출혈량에서 유의한 차이를 나타내지 않았다(Fig. 6). 반면 ASA 투여군에서는 출혈 시간이 유의하게 증가하고 출혈량도 증가하였다. 이는 ASA의 대표적인 부작용인 출혈 경향 증가

와 일치하는 결과이다. 이러한 결과는 다래 화분 추출물이 혈전 형성을 억제하면서 생리적 지혈 기능은 안정적으로 유지할 수 있음을 시사하며, 출혈 위험이 수반되는 기존 항혈소판제의 한계를 보완할 수 있는 천연물 소재로의 가능성을 제시한다.

6. 다래 화분 추출물의 혈소판 활성화 신호 전달

조절 효과

CRP 유도 혈소판 활성화 및 응집에는 GPVI를 통한 초기 신호 전달이 중요하게 관여한다. Collagen 또는 CRP가 GPVI를 활성화하면 Src family kinase와 Syk의 인산화가 유도되고, 이후 PLC γ 2 활성화, Ca²⁺ mobilization, granule secretion 및 α Ib β 3 integrin 활성화가 연쇄적으로 발생한다. 또한, PI3K/AKT 및 p38 MAPK 신호는 혈소판 활성화와 혈전 형성 과정에 관여하는 주요 하위 신호 전달 경로로 알려져 있다(Nieswandt and Watson, 2003; Li *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2023). 이에 본 연구에서는 다래 화분 추출물이 CRP 유도 혈소판 활성화 신호 전달에 미치는 영향을 확인하기 위해 관련 단백질의 인산화 변화를 분석하였다. 다래 화분 추출물을 25, 50 및 100 μ g/mL로 전처리한 혈소판에서 CRP 자극 후 c-Src, Syk 및 PLC γ 2의 인산화가 대조군 대비 감소하였다(Fig. 7). 또한 PI3K, Akt 및 p38 MAPK의 인산화도 추출물 처리에 의해 감소하는 양상을 보였다. 이러한 결과는 다래 화분 추출물이 GPVI 매개 초기 혈소판 활성화 신호와 그 하위 신호 전달 경로를 억제함으로써 Ca²⁺ mobilization, 과립 분비, α Ib β 3 integrin 활성화 및 혈소판 응집을 감소시킬 수 있음을 시사한다. 따라서 다래 화분 추출물의 항혈전 효과는 CRP-GPVI 축을 중심의 혈소판 활성화 경로 조절과 밀접하게 관련이 있는 것으로 판단된다.

적 요

다래 (*A. arguta*)는 동북아시아 지역에서 오래전부터 식용 및 약용 자원으로 이용되어 왔으며, 잎과 열매의 생리활성은 다수 연구를 통해 보고되었다. 그러나 다래 화분의 항혈소판 및 항혈전 효능에 대한 연구는 아직 제한적이다. 본 연구에서는 다래 화분 추출물의 혈소판 응집 억제 및 항혈전 효과를 확인하기 위하여 *in vitro* 혈소판 응집 분석, flow cytometry 기반 혈소판 활성화 분석, Ca²⁺ mobilization assay, FeCl₃ 유도 경동맥 혈전 모델 및 tail bleeding time assay를 수행하였다. 다래 화분 추출물을 25, 50, 100 μ g/mL로 처리하였을 때, collagen 및 CRP 유도 혈소판 응집이 농도 의존적으로 감소하였다. 또한 추출물은 CRP 자극에 의

해 증가한 P-selectin 발현, α Ib β 3 integrin 활성화 및 Ca²⁺ mobilization을 억제하였다. 추출물을 7일간 50 또는 100 mg/kg으로 경구 투여한 결과, FeCl₃ 유도 동맥 혈전 생성에 의한 폐색 시간이 유의하게 지연되었으며, tail bleeding time assay에서는 대조군 대비 출혈 시간 및 출혈량에 유의한 변화가 관찰되지 않았다. 더불어 CRP 자극 후 c-Src, Syk, PLC γ 2, PI3K, AKT 및 p38 MAPK의 인산화가 감소하여, 다래 화분 추출물이 GPVI 매개 혈소판 활성화 신호 전달을 억제하는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 다래 화분 추출물이 GPVI 중심의 혈소판 활성화 경로를 조절하여 항혈전 효과를 나타내며, 정상적인 지혈 기능에는 상대적으로 제한적인 영향을 나타냄을 시사한다. 따라서 다래 화분 추출물은 천연물 유래 항혈소판 소재로 활용될 가능성이 있는 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호:RS-2023-00228817)의 연구비로 지원된 결과이며 이에 깊은 감사를 드립니다.

인 용 문 헌

- Algethami, J. S., A. A. A. El-Wahed, M. H. Elashal, H. R. Ahmed, E. H. Elshafiey, E. M. Omar, Y. A. Naggar, A. F. Algethami, Q. Shou, S. M. Alsharif, B. Xu, A. A. Shehata, Z. Guo, S. A. M. Khalifa, K. Wang and H. R. El-Seedi. 2022. Bee pollen: Clinical trials and patent applications. *Nutrients* 14: 2858.
- Almaraz-Abarca, N., M. G. Campos, J. A. Ávila-Reyes, N. Naranjo-Jiménez, J. Herrera-Corral and L. S. González-Valdez. 2004. Variability of antioxidant activity among honeybee-collected pollen of different botanical origin. *Interciencia* 29: 574-578.
- An, X., S. G. Lee, H. Kang, H. J. Heo, Y. S. Cho and D. O. Kim. 2016. Antioxidant and anti-inflammatory effects of various cultivars of kiwi berry (*Actinidia arguta*) on lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *J. Microbiol. Biotechnol.* 26: 1367-1374.
- 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.

- Campos, M. G. R., C. Frigerio, J. Lopes and S. Bogdanov. 2010. What is the future of bee-pollen? J. ApiProduct ApiMedical Sci. 2: 131-144.
- Chen, H., D. Locke, Y. Liu, C. Liu and M. L. Kahn. 2002. The platelet receptor GPVI mediates both adhesion and signaling responses to collagen in a receptor density-dependent fashion. J. Biol. Chem. 277: 3011-3019.
- da Silva, G. R., T. B. da Natividade, C. A. Camara, E. M. S. da Silva, F. de A. R. dos Santos and T. M. S. Silva. 2014. Identification of sugar, amino acids and minerals from the pollen of Jandaíra stingless bees (*Melipona subnitida*). Food Nutr. Sci. 5: 1015-1021.
- Davì, G. and C. Patrono. 2007. Platelet activation and atherothrombosis. N. Engl. J. Med. 357: 2482-2494.
- Denisow, B. and M. Denisow-Pietrzyk. 2016. Biological and therapeutic properties of bee pollen: A review. J. Sci. Food Agric. 96: 4303-4309.
- Guerrero, J. A., M. L. Lozano, J. Castillo, O. Benavente-García, V. Vicente and J. Rivera. 2005. Flavonoids inhibit platelet function through binding to the thromboxane A2 receptor. J. Thromb. Haemost. 3: 369-376.
- Kim, Y. J., T. I. Kim and K. Kim. 2023. An optimized herbal medicine containing *Scutellaria baicalensis* Georgi, *Alisma orientale* Juzepczuk, and *Atractylodes japonica* Koidzumi has potent antiplatelet and antithrombotic activities. J. Tradit. Complement. Med. 13: 285-296.
- Komosinska-Vassev, K., P. Olczyk, J. Kaźmierczak, L. Mencner and K. Olczyk. 2015. Bee pollen: Chemical composition and therapeutic application. Evid. Based Complement. Alternat. Med. 2015: 297425.
- Kroyer, G. and N. Hegedus. 2001. Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 2: 171-174.
- Latocha, P. 2017. The nutritional and health benefits of kiwiberry (*Actinidia arguta*): A review. Plant Foods Hum. Nutr. 72: 325-334.
- Lee, S., M. S. Lee, Y. G. Son, S. Park, S. Kim, H. Choi, P. Im and S. O. Woo. 2025. Facile isolation of N¹, N⁵, N¹⁰-tri-p-coumaroylspermidine from Korean darae (*Actinidia arguta*) bee pollen extract. J. Apic. 40: 475-481.
- Leontowicz, H., M. Leontowicz, P. Latocha, I. Jesion, Y. S. Park, E. Katrich, D. Barasch, A. Nemirovski and S. Gorinstein. 2016. Bioactivity and nutritional properties of hardy kiwi fruit *Actinidia arguta* in comparison with *Actinidia deliciosa* 'Hayward' and *Actinidia eriantha* 'Bidan'. Food Chem. 196: 281-291.
- 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.
- Nasti, R., S. Orlandini, S. Furlanetto, M. Casale, A. Daci, A. Hajdari, F. Meneghetti, S. Villa, M. Mori and G. Beretta. 2022. An analytical investigation of hydroxylated cinnamoyl polyamines as biomarkers of commercial bee pollen botanical origin. Int. J. Food Sci. Technol. 57: 7787-7796.
- Nieswandt, B. and S. P. Watson. 2003. Platelet-collagen interaction: Is GPVI the central receptor? Blood 102: 449-461.
- Nogueira, C., A. Iglesias, X. Feás and L. M. Estevinho. 2012. Commercial bee pollen with different geographical origins: A comprehensive approach. Int. J. Mol. Sci. 13: 11173-11187.
- Pak, M. E., Y. J. Park, H. J. Yang, Y. H. Hwang, W. Li and Y. Go. 2022. Samhwangsasim-tang attenuates neuronal apoptosis and cognitive decline through BDNF-mediated activation of tyrosin kinase B and p75-neurotrophin receptors. Phytomedicine 99: 153997.
- U.S. Food and Drug Administration. 2005. Guidance for industry: Estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers. U.S. Department of Health and Human Services, Rockville, MD, USA.
- Watson, S. P., J. M. Auger, O. J. T. McCarty and A. C. Pearce. 2005. GPVI and integrin α IIB β 3 signaling in platelets. J. Thromb. Haemost. 3: 1752-1762.