



# Inhibitory effects of artemether on thrombus formation via regulation of cyclic nucleotides in collagen-induced platelets

Chang-Eun Park · Dong-Ha Lee

## 콜라겐-유도의 혈소판에서 사이클릭 뉴클레오티드의 조절을 통한 Artemether의 항혈전 효과

박창은 · 이동하

Received: 26 August 2022 / Accepted: 26 September 2022 / Published Online: 31 December 2022  
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2022

**Abstract** Although normal activation of platelets is important in the process of hemostasis, excessive or abnormal activation of platelets can lead to cardiovascular diseases. Therefore, the discovery of novel substances capable of regulating or inhibiting platelet activation may be helpful in the prevention and treatment of cardiovascular diseases. Artemether is a derivative of artemisinin, known as an active ingredient of *Artemisia annua*, which has been reported to be effective in treating malaria, and is known to function through antioxidant and metabolic enzyme inhibition. However, the role of artemether in platelet activation and aggregation and the mechanism of action of artemether in collagen-induced human platelets are not known until now. This study investigated the effects of artemether on platelet activation and thrombus formation induced by collagen. As a result, cAMP level was significantly increased by artemether, and VASP and IP3R, substrates of cAMP-dependent kinase, were phosphorylated. IP3R phosphorylation by Artemether inhibited  $Ca^{2+}$  recruitment into the cytoplasm, and phosphorylated VASP inhibited fibrinogen binding by inactivating  $\alpha IIb/\beta 3$  located on the platelet membrane.

Consequently, artemether inhibited thrombin-induced fibrin clot formation. Therefore, we propose that artemether can act as an effective prophylactic and therapeutic agent for cardiovascular diseases caused by excessive platelet activation and thrombus formation.

**Keywords** Artemether · Cyclic nucleotides · Inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor · Intracellular  $Ca^{2+}$  · Vasodilator-stimulated phosphoprotein

## 서 론

혈관 내 혈소판의 병태생리학적 반응은 궁극적으로 세계에서 가장 흔한 사망 원인인 혈전증 및 심혈관 질환(CVD)으로 이어질 수 있다[1]. 혈전증에 사용할 수 있는 약물에는 소화 불량 및 복통과 같은 합병증과 여러 부작용이 있는 경우가 있다. 따라서, CVD의 발병을 중단시키기 위한 약학적 또는 식이 요법이 필요하다. 실제로, 의료 식물의 많은 식물 화학 물질이 CVD 위험을 명백하게 감소시키는 원인이 되는 것으로 나타났다. 이와 관련하여 최근에는 심혈관계 질환을 예방하기 위한 한약학적 접근이 세계적인 관심을 받고 있다[1].

혈소판에서 활성화 과정은 arachidonic acid (AA)로 지방산의 촉매작용을 개시함으로써 시작되는데, 이 때, cyclooxygenase (COX) 경로에 의한 AA의 대사는 prostaglandin, thromxane, lipoxin 및 eoxin과 같은 여러 활성 eicosanoid를 생성한다. 포유류 세포에는 COX-1과 COX-2의 두 가지 형태의 COX 활성이 있는데, COX-1은 혈소판에서는 주로 발현된다[2]. COX-1은

Dong-Ha Lee (✉)  
E-mail: dhlee@nsu.ac.kr

Department of Biomedical Laboratory Science, Molecular Diagnostics Research Institute, Namseoul University, 91, Daehak-ro, Seonghwan-eup, Seobuk-gu, Cheonan-si, Chungcheongnam-do 31020, Republic of Korea

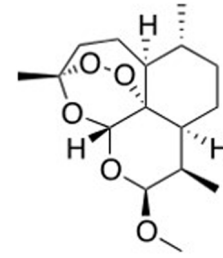
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly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

AA에서 prostanglandin (PG)<sub>2</sub>/PGH<sub>2</sub>로의 2단계 전환을 촉진하고, thromboxane A 합성효소는 PGH<sub>2</sub>를 thromboxane A<sub>2</sub>(TXA<sub>2</sub>)로 전환한다. TXA<sub>2</sub>는 thrombin, collagen, ADP 및 epinephrine과 같은 강력한 작용제에 대한 혈소판의 신호자극을 증폭하는 역할을 하며, 직접적으로 혈소판을 자극할 수도 있다[3].

혈관 내피 세포에서 방출되는 prostanglandin I<sub>2</sub> 또는 nitric oxide와 같은 물질은 정상적인 혈액 순환의 과정에서 혈소판 세포의 cAMP 또는 cGMP 생성을 증가시키고, 이들에 의존적으로 활성이 증가되는 Protein kinase A (PKA) 또는 protein kinase G (PKG)에 의해 기질 단백질인, vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) 및 inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor (IP<sub>3</sub>R)가 인산화된다고 알려져 있다[4]. IP<sub>3</sub>R는 세포 내 dense tubular system에 위치한 Ca<sup>2+</sup> 통로로서 인산화될 때 구조적인 변화를 일으켜 세포질로의 Ca<sup>2+</sup> 동원이 저해되는 것으로 보고되어 있다[5,6]. 혈소판 세포의 VASP는 PKA 또는 PKG에 의해 인산화되는 기질단백질로서 인산화가 증가될 때 integrin αIIb/β<sub>3</sub> 활성화 및 actin filament 활성을 억제한다고 보고되어 있다[7,8]. 따라서, IP<sub>3</sub>R의 인산화는 Ca<sup>2+</sup>의 동원 억제와 VASP의 인산화가 αIIb/β<sub>3</sub> 억제를 통해 혈소판 활성을 억제하므로 항혈소판 효과를 확인하는데 필수적이다.

Integrin은 세포-세포 및 세포-세포 외 기질의 접착을 촉진하는 막횡단 수용체의 큰 family로 알려져 있으며, 이에 대한 ligand가 integrin에 결합되면 신호 전달 경로를 활성화하여 세포 주기의 조절, 세포내 세포골격의 조직화, 외부 및 내부 신호 전달을 중재한다[9]. 혈소판에서 collagen, thrombin, ADP 및 TXA<sub>2</sub>는 integrin αIIb/β<sub>3</sub>의 낮은 친화도가 높은 친화도 상태가 되도록 변화를 유도한다. Integrin αIIb/β<sub>3</sub>의 주요한 역할은 정상적인 지혈이지만, fibrinogen, fibrin 또는 von Willebrand factor와 같은 특정 혈장 단백질에 과도하게 결합되어 병태생리학적 혈전 형성을 유발할 수도 있다[10]. Integrin αIIb/β<sub>3</sub>의 clustering은 과립 분비를 유도하고 외부 신호 전달 경로를 통해 혈소판 응집을 지속적으로 강화한다. 응고 수축은 혈소판 활성화의 마지막 단계이며, 섬유소 mesh의 수축을 초래하는 integrin αIIb/β<sub>3</sub>에 의한 외부 신호 전달에 의해 구동된다[10].

Artemether는 *Artemisia annua*의 유효성분으로 알려진 artemisinin의 유도체로서 기생충의 액포에서 ferriprotoporphyrin IX (heme) 또는 철 이온과 상호 작용하여 세포 독성 radical을 생성하여 말라리아 치료에 효과적이라고 보고된 바 있다[11]. 제안된 메커니즘 중 하나는 항산화 및 대사 효소 억제를 통해 artemether가 세포에 산화 및 대사 스트레스를 가함으로써 기생충의 병변 및 성장에 감소시킨다는 것이다[12]. 또한, Artemether가 마우스의 지방 생성, 염증 및 섬유증을 억제하여 비알코올성 지방간염을 개선한다고 보고된 바도 있기에 심혈관계 질환의 효과를 기대해 볼 수 있다[13]. 그러나, 혈소판 활성화 및 응집에 관하여 artemether가 어떤 역할을 하며, artemether이 collagen으로 유도한 사람 혈소판에서 어떻게 작용하는지에 대한 기전은 현재까지 알려진 바가 없다. 본 연구는 collagen이 유도하는 혈소판 활성화 과정에서 활성화에 영향을 미치는 다양한 요인들에 artemether가 어떻게 작용하는지 규명함으로써 artemether의 항혈소판 기능을 확인하고자 하였다.



**Fig. 1** The structure of artemether. PIN: Dihydroartemisinin methyl ether, Chemical formula: C<sub>16</sub>H<sub>26</sub>O<sub>5</sub>, Molar mass: 298.379 g/mole

## 재료 및 방법

### 시약

Artemether는 Avention Corporation (Siheung, Korea)에서 구입하여 사용하였다(Fig. 1). Collagen은 Chrono-Log Co. (Havertown, PA, USA)에서 입수하였고, cyclic AMP 및 GMP ELISA kit와 LDH assay kit는 Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)에서 입수하여 사용하였다. 아스피린은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 입수하였다. Fura-2AM 및 Alexa Fluor 488-접합 fibrinogen은 Molecular Probe (Eugene, OR, USA)에서 입수하였다. VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein), phospho-VASP (Ser<sup>157</sup>), phospho-inositol trisphosphate receptor (phospho-IP<sub>3</sub>R), β-actin는 Cell Signaling (Beverly, MA, USA)으로부터 입수하였다. Bicinchoninic acid Pierce™ BCA 단백질 분석 kit는 및 PVDF membrane은 Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, USA)에서 입수하여 사용하였다.

### 세척 혈소판의 제조

CPDA액을 함유한 인간 혈소판 풍부 혈장(PRP)을 대한 적십자사 경기혈액원(Suwon, Korea)에서 구입하여 10분 동안 125 g으로 원심분리하여 적혈구를 제거한 후 1300 g에서 10분간 원심분리하여 혈소판 pellet을 얻었다. 혈소판 pellet을 세척 완충액(138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.36 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.5 mM glucose 및 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 6.9)으로 2회 세척한 다음 현탁액 완충액(138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.36 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.49 mM MgCl<sub>2</sub>, 5.5 mM glucose, 0.25% gelatin, pH 7.4)으로 최종 농도 5×10<sup>8</sup>/mL가 되도록 재현탁시켰다. 세척된 혈소판을 사용하여 collagen에 의한 혈소판 반응을 확인하였다. 위의 모든 절차는 저온에 의한 혈소판 활성화를 피하기 위해 25 °C에서 수행되었으며, 남서울대학교의 생명윤리 기관 심의위원회(IRB)의 승인을 받아 실험이 수행되었다(1041479-HR-201803-003).

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

세척된 사람 혈소판을 다양한 농도의 artemether와 함께 2 mM CaCl<sub>2</sub>의 존재 하에 37 °C에서 2분 동안 배양한 다음 collagen (2.5 μg/mL) 5분 동안 반응하였다. 80% 에탄올을 첨가하여 반응을 중단시키고, 실온에서 30분 동안 방치한 다음, 4 °C에서

10분 동안 2000 g에서 원심분리하였다. 그리고 나서 상층액을 새로운 튜브에 옮기고, 진공 원심분리에 의해 건조시켰다. 건조된 pellet을 cAMP 또는 cGMP EIA kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)의 ELISA 완충액에 용해시켰다. cAMP 또는 cGMP level을 Synergy HT Multi-Model Microplate Reader (BioTek Instruments, Winooski, Vermont, USA)를 통해 측정하였다.

**세포질 내 Ca<sup>2+</sup> 동원량 측정**

사람의 PRP를 암실에서 37 °C에서 60분 동안 5 μM Fura-2/AM과 함께 배양하였다. 세척된 사람 혈소판의 제조에 대해 설명된 절차를 사용하여 Fura-2/AM가 함유된 사람 혈소판을 제조하였다. Fura-2/AM가 함유된 인간 혈소판을 다양한 농도의 artemether와 함께 2 mM CaCl<sub>2</sub>의 존재 하에 37 °C에서 2분 동안 배양한 다음 collagen (2.5 μg/mL) 5분 동안 반응하였다. 세포질에서 Fura-2 형광은 이전에 수행된 Schaeffer와 Blaustein의 방법에 따라 분광형광법(SFM 25; Bio-Teck Instrument, Italy)에 의해 다음 공식을 사용하여 측정되었습니다[14].  $[Ca^{2+}]_i = 224 \text{ nM} \times (F - F_{min}) / (F_{max} - F)$ , 여기서 224 nM은 Fura-2-Ca<sup>2+</sup> 복합체의 해리 상수이고 F<sub>min</sub> 및 F<sub>max</sub>는 각각 Ca<sup>2+</sup>의 최소 및 최대 농도에서의 형광 강도이다.

**Fibrinogen 결합능의 측정**

세척된 사람 혈소판을 다양한 농도의 artemether와 함께 2 mM CaCl<sub>2</sub>의 존재 하에 37 °C에서 2분 동안 배양한 다음 collagen (2.5 μg/mL) 5분 동안 반응하였다. 그런 다음 4 °C에서 30분 동안 0.5% 파라포름알데히드로 고정하고 인산완충식염수(PBS)로 3회 세척한 후, Alexa Fluor 488가 결합된 사람 fibrinogen이 함유된 3% BSA/PBS에서 어둠 속에서 4 °C에서 30분 동안 반응하였다. 분석은 FACSCalibur II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)에 의해 수행되었고, CellQuest 버전 5.2.1 소프트웨어를 사용하여 결과값을 산출하였다.

**혈소판 매개 fibrin clot 형성 정도의 측정**

세척된 사람 혈소판을 다양한 농도의 artemether와 함께 2 mM CaCl<sub>2</sub>의 존재 하에 37 °C에서 2분 동안 배양한 다음, thrombin (0.05 U/mL)을 첨가하여 37 °C에서 15분 동안 반응시켰다. Fibrin clot의 사진은 digital camera로 측정하였고, 응고된 영역의 계산은 ImageJ 소프트웨어(v1.46, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)를 이용하여 분석하였다. fibrin clot 형성율은 다음과 같이 계산되었습니다.  $\text{Retraction (\%)} = 100 - [(\text{sample clot area}/\text{intact sample area}) \times 100]$ .

**단백질 추출 및 Western Immunoblotting 분석**

세척된 사람 혈소판을 다양한 농도의 artemether와 함께 2 mM CaCl<sub>2</sub>의 존재 하에 37 °C에서 2분 동안 배양한 다음 collagen (2.5 μg/mL) 5분 동안 반응하였다. 반응을 종결하기 위해 1× lysis buffer를 첨가해 주었고, 용해물은 4 °C에서 10분 동안 5000 g에서 debris를 제거하고 단백질 농도는 Bicinchoninic acid Pierce™ BCA 단백질 분석 kit (Thermo Fischer Scientific, USA)를 사용하여 확인하였다. 혈소판 용해물로부터 동량의 단백질을 SDS-PAGE로 전기영동으로 분리하고 PVDF 막으로 옮긴 후 1

차 항체를 4 °C에서 밤새 반응시킨 다음 2차 항체와 2시간 동안 실온에서 반응시켰다. 단백질 밴드는 화학발광 기질을 사용하여 시각화하고 Luminescent Image Analyzer LAS-4000 (Fujifilm, Tokyo, Japan)으로 사진을 찍어 밀도 측정을 통해 정량 분석하였다.

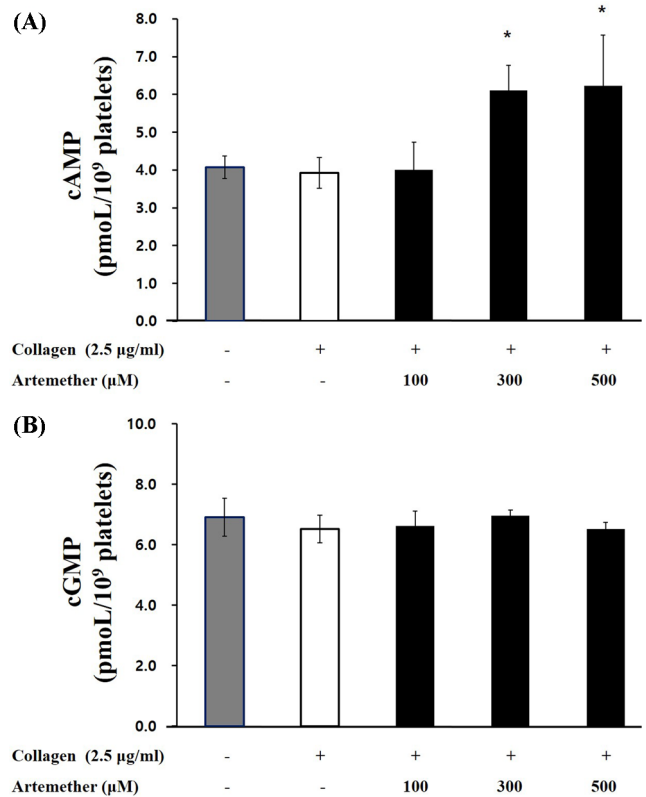
**통계 분석**

그룹 간의 유의한 차이는 분산 분석(ANOVA)에 의해 평가되었습니다. ANOVA 결과가 유의한 차이를 나타내면 SPSS V20.0 소프트웨어(SPSS, Chicago, IL, USA)를 사용하여 그룹 평균간에 유의성이 보이는 경우, Scheffé의 방법을 사용하여 그룹을 비교하였다. 결과는 평균 ± 표준 편차 및 관찰 횟수로 표시하였고. 통계적 유의성은  $p < 0.05$ 에서 인정되었다.

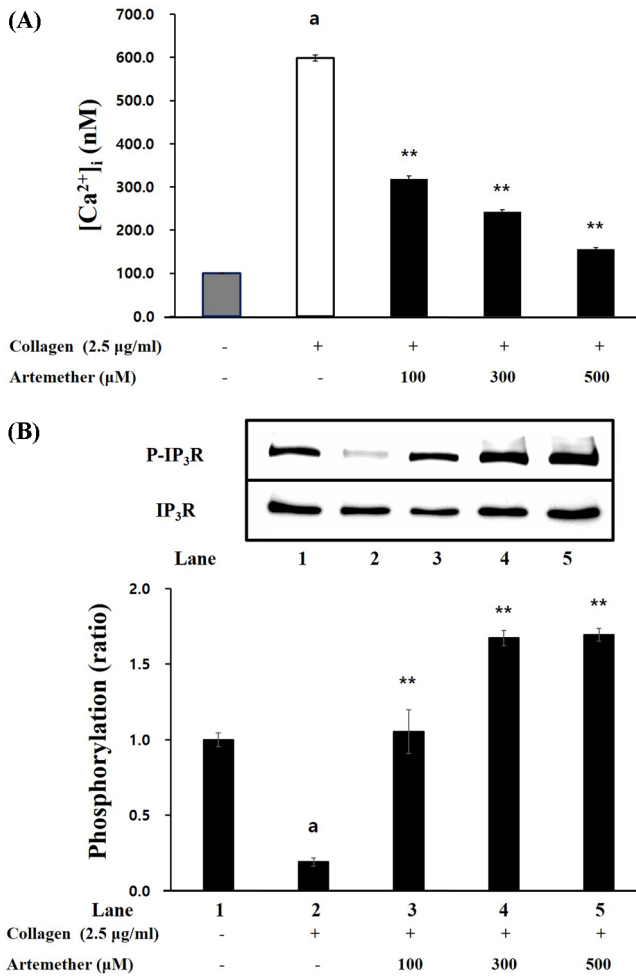
**결과 및 고찰**

**Artemether이 cyclic nucleotides level에 미치는 영향**

cyclic nucleotides (cAMP 및 cGMP)의 상승은 세포질 내 Ca<sup>2+</sup> 동원을 억제하고 cAMP 및 cGMP 의존성 단백질 kinase

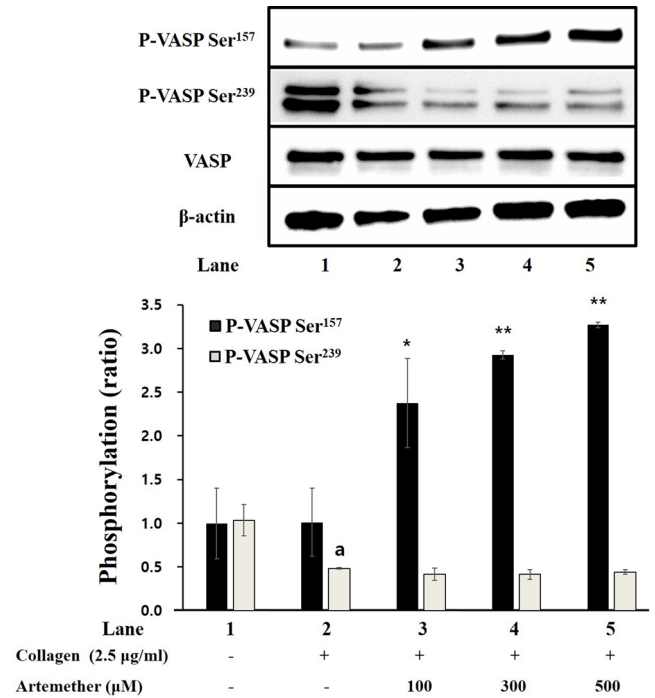


**Fig. 2** The effect of artemether on cyclic nucleotides levels. (A) The effect of artemether on cAMP levels in collagen-activated platelets. (B) The effect of artemether on cGMP levels in collagen-activated platelets. The analysis of cAMP and cGMP levels was described in “materials and methods” section. The data are expressed as the mean ± standard deviation (n=4). \* $p < 0.05$  compared with no-stimulated platelets, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$  compared with the collagen-stimulated platelets



**Fig. 3** The effect of artemether on [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> mobilization and IP<sub>3</sub>R phosphorylation. (A) The effect of artemether on intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization. (B) The effect of artemether on IP<sub>3</sub>R phosphorylation. The analysis of intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization and IP<sub>3</sub>R phosphorylation 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, \*p < 0.05, \*\*p < 0.001 compared with the collagen-stimulated platelets

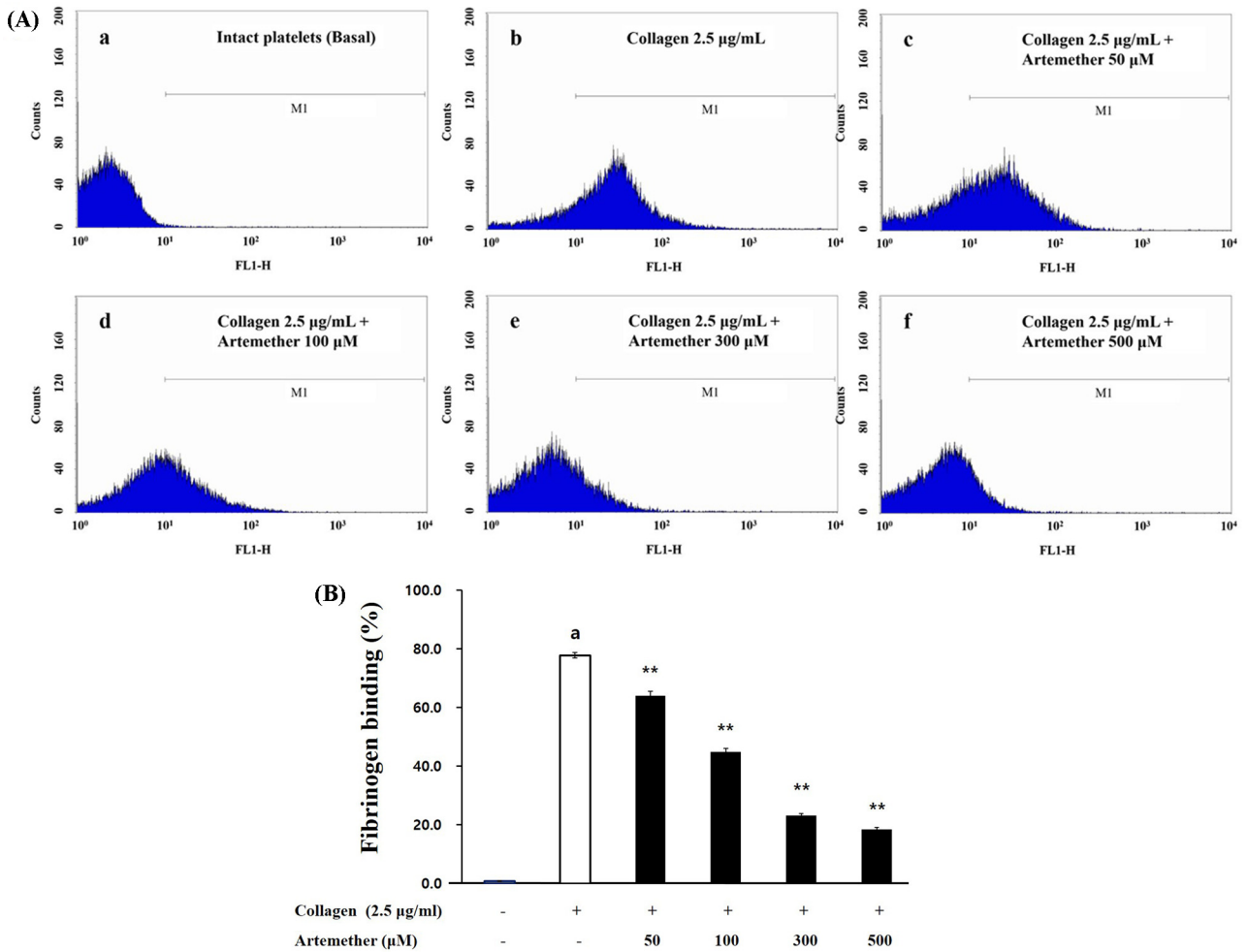
(PKA 및 PKG)를 활성화시키며 혈소판 활성화 경로를 저해한다[15]. 따라서, 본 연구에서는 collagen이 활성화 시키는 혈소판에서 cAMP나 cGMP level에 미치는 artemether의 효과를 평가하였다. 결과는 collagen을 단독 처리하였을 때 intact cell과 비교해 cAMP와 cGMP level의 유의적인 변화가 나타나지 않았고, artemether를 첨가하여 collagen로 반응하였을 때, 3.92±0.41 pmol/10<sup>8</sup> cells이었던 cAMP level이 500 μM의 artemether에 의해 6.23±1.34 pmol/10<sup>8</sup> cells까지 증가하였다(Fig. 2A). 그러나, cGMP level은 artemether에 의해 유의적인 변화가 나타나지 않았다(Fig. 2B). 이 결과들은 artemether가 collagen으로 유도한 혈소판에서 cGMP level에는 영향을 미치지 않고 cAMP level만 유의하게 증가시켰으므로 혈소판의 기능에 영향을 미친다는 것을 보여준다.



**Fig. 4** The effect of artemether on VASP phosphorylation. The analysis of western blotting 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, \*p < 0.05, \*\*p < 0.001 compared with the collagen-stimulated platelets

**Artemether가 세포 내의 Ca<sup>2+</sup> 동원과 IP<sub>3</sub>R의 인산화에 미치는 영향**  
 증가된 cAMP 및 cGMP level은 이에 의존적 kinase인 PKA 및 PKG를 활성화함으로써 다른 기질 단백질들의 인산화에 기여한다고 알려져 있고, 그 중 inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor (IP<sub>3</sub>R)의 인산화가 보고되어 있다[16]. 혈소판 내 dense tubular system에 존재하는 IP<sub>3</sub>R는 inositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>)와의 결합에 의해 세포질 내로 Ca<sup>2+</sup> 동원([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)을 유도하고, 이를 통해 증가된 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>은 세포골격 단백질인 myosin light chain 및 pleckstrin의 인산화를 일으켜 혈소판 내 과립 분비와 P-selectin 발현을 유도함으로써 혈소판 활성화 및 응집을 유도한다고 보고되었다[17].

본 연구에서 우리는 artemether가 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>에 어떤 영향을 미치는지 살펴보았다. 그 결과, Fig. 3A는 혈소판을 collagen (2.5 μg/mL)으로 자극했을 때, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>의 수준이 기저 수준인 100.5±1.2 nM에서 598.1±7.0 nM으로 증가되었음을 보여준다. 그러나 이러한 증가는 용량 의존적 방식으로 (50-500) μM의 다양한 농도의 artemether에 의해 농도존적으로 감소되었다. 또한, dense tubular system의 IP<sub>3</sub>R이 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 채널로 작용하기 때문에 artemether가 IP<sub>3</sub>R을 조절할 수 있는지 확인하였다. 그 결과, Fig. 3B는 collagen에 의해 유도된 혈소판의 IP<sub>3</sub>R 인산화가 artemether에 의해 감소되었음을 보여준다. 이는 artemether에 의해 증가된 cAMP/cGMP level 및 PKA /PKG가 IP<sub>3</sub>R의 인산화를 유발함으로써 dense tubular system의 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>를 감소시킨다는 것을 나타낸다.



**Fig. 5** The effect of artemether on fibrinogen binding to integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . (A) The flow cytometry histograms on collagen-induced fibrinogen binding to integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . a, Intact platelets (base); b, collagen (2.5  $\mu\text{g/mL}$ ); c, collagen (2.5  $\mu\text{g/mL}$ ) + artemether (50  $\mu\text{M}$ ); d, collagen (2.5  $\mu\text{g/mL}$ ) + artemether (100  $\mu\text{M}$ ); e, collagen (2.5  $\mu\text{g/mL}$ ) + artemether (300  $\mu\text{M}$ ); f, collagen (2.5  $\mu\text{g/mL}$ ) + artemether (500  $\mu\text{M}$ ). (B) The effect of artemether on collagen-induced fibrinogen binding (%). The analysis of fibrinogen binding 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, <sup>\*\*</sup> $p < 0.001$  compared with the collagen-stimulated platelets

**Artemether가 VASP 인산화에 미치는 영향**

이전 연구들에서 VASP가 cAMP/cGMP-의존성 PKA/PKG의 주요 기질 중 하나로서 혈소판 분비 및 점착을 조절하며, VASP가 인산화되면 integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ 의 활성화가 억제됨으로써 혈소판 응집이 저해된다고 보고되었다[18,19].

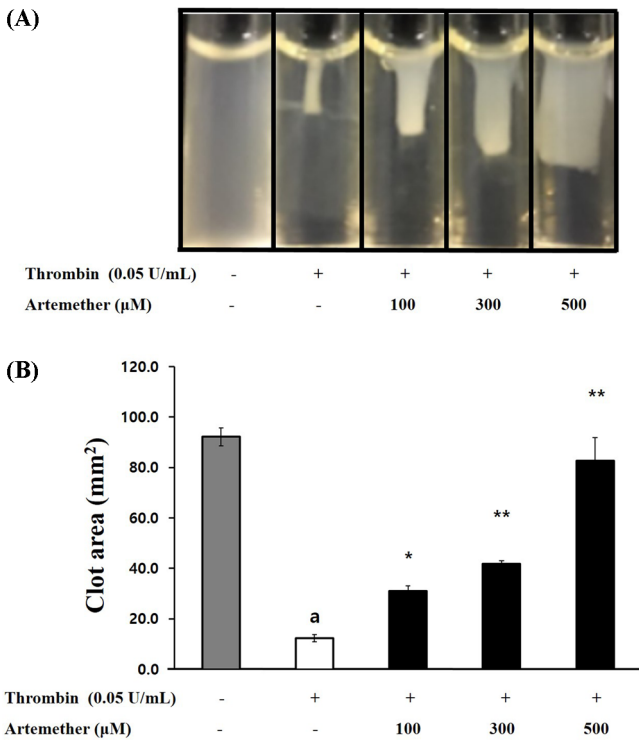
우리는 collagen에 의해 활성화된 혈소판에서 cAMP 및 cGMP level에 대한 artemether의 효과를 평가하였고, 그 결과, artemether의 존재 하에서 cAMP 수준이 유의하게 증가된다는 것을 확인하였다(Fig. 4A). VASP (Vasodilator-stimulated phosphoprotein)는 cAMP 의존성 단백질 키나아제의 일반적인 기질이며 혈소판에서 cAMP에 의해 인산화됩니다[20]. 우리는 추가적으로 artemether에 의해 VASP Ser<sup>157</sup> 및 VASP Ser<sup>239</sup>의 인산화에 관여하는지 조사하였다. 그 결과, collagen에 활성화되는 혈소판에서 VASP Ser<sup>157</sup>가 artemether에 의해 인산화가 강하게 증가되는 것을 확인하였고, VASP Ser<sup>239</sup>에서는 artemether에 의한 인산화의 변화가 나타나지 않았다(Fig. 4B). 이는 artemether에

의해 증가된 cAMP level이 VASP의 인산화의 증가로 이어진다는 것을 보여준다.

**Artemether가  $\alpha_{IIb}\beta_3$ 에 대한 fibrinogen 결합에 미치는 영향**

Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ 을 매개로 일어나는 신호 전달은 혈소판 세포 골격에 변형을 유도하여 혈소판 활성화와 혈전 생성을 유발한다고 보고된 바 있다[21]. 휴지기 혈소판에서  $\alpha_{IIb}\beta_3$ 는 낮은 친화도 상태로 존재하다가, 응집유도제 의해 inside-out 신호전달 경로가 활성화되면, 구조적인 변화가 일어나  $\alpha_{IIb}\beta_3$ 의 친화도가 증가된다고 알려져 있다[22]. Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ 의 친화도가 증가될 때, fibrinogen가 수용체인  $\alpha_{IIb}\beta_3$ 에 결합함으로써 추가적인 혈소판 골격의 형태 변화와 점착을 통해 혈소판 응집을 증폭시킨다. 이전 연구에서는 사람 혈소판에서 integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ 의 활성화와 관련 integrin 의존적 기능이 cAMP의 증가와 VASP의 인산화에 의해 강력하게 억제된다는 것이 입증되었다[23].

본 연구에서는  $\alpha_{IIb}\beta_3$ 에 대한 fibrinogen의 결합에 하는데



**Fig. 6** The effect of artemether on thrombin-retracted fibrin clot. (A) The effect of artemether on thrombin-retracted fibrin clot photographs (B) The effect of artemether on thrombin-retracted fibrin clot area. The analysis of fibrin clot retraction was described in in “materials and methods” section. The data are expressed as the mean±standard deviation (n=4). \**p*<0.05 compared with no-stimulated platelets, \**p*<0.05, \*\**p*<0.001 compared with the thrombin-stimulated platelets

artemether가 미치는 영향을 확인하였다. Fig. 5A는 125-500 μM의 다양한 농도의 artemether가 존재할 때 혈소판의 활성화된 integrin αIIb/β<sub>3</sub>에 결합된 Alexa Fluor 488-conjugated fibrinogen의 형광 신호를 보여줍니다. Collagen에 의해 활성화된 혈소판은 자극 받지 않은 혈소판과 비교하여 강한 integrin αIIb/β<sub>3</sub> 활성화를 유발하였으나, artemether는 이를 현저하게 억제하였다 (Fig. 5A 및 5B). 이 결과는, artemether에 의해 증가된 cAMP level과 VASP가 integrin αIIb/β<sub>3</sub>의 친화도를 억제한 것으로 보여진다. 또한, artemether이 혈소판 세포에 독성을 가지는지 LDH (lactate dehydrogenase) 분비를 통해 확인하였고, 사람 혈소판에 artemether (50, 100, 200, 300 μM)에 의한 유의한 차이를 확인할 수 없었다(data not shown). 이러한 결과는 artemether이 세포독성을 가지지 않고 혈소판의 활성화를 조절한다는 것을 보여준다.

**Artemether가 혈소판 매개 fibrin clot 형성에 미치는 효과**

혈전 생성은 손상된 혈관이 회복될 때 필수적인 단계로, 활성화된 혈소판이 손상된 혈관에 모이면 30-60분이 지나 수축이 일어나고 생성된 plug를 당겨 fibrin clot을 형성한다. 이 과정에서 αIIb/β<sub>3</sub>과 fibrinogen의 상호 작용이 혈소판이 매개하는 fibrin clot을 형성에 있어 중요한 역할을 하고, αIIb/β<sub>3</sub> 활성을 저해하는 물질이 혈전 형성을 강하게 억제한다고 보고되었다

[21]. 혈소판 활성화유도제로 αIIb/β<sub>3</sub>를 활성화하면 이에 대한 fibrinogen의 결합이 증폭되고 fibrin clot 형성으로 이어진다.

본 연구에서는 thrombin로 유도한 fibrin clot 형성에 artemether가 어떤 영향을 미치는지 살펴보았다. Fig. 6A에서 볼 수 있듯이, thrombin 자극에 의해 강하게 형성된 fibrin clot을 100 μM 이상의 artemether가 농도 의존적으로 억제하였다. Artemether (100, 300 및 500 μM)에 의해 각각 23.5, 36.9 및 88.0%로 fibrin clot이 억제되었음을 확인할 수 있다(Fig. 6B). 이러한 결과는 artemether가 cAMP level 및 VASP Ser<sup>157</sup> 인산화를 증가시키고 αIIb/β<sub>3</sub>를 친화도를 억제함으로써 fibrin clot 형성을 억제한 것으로 보여진다. Artemether는 다양한 *Artemisia* 속 식물체를 methanol로 추출했을 경우, 최대 0.34%까지 함유되어 있는 것으로 알려져 있기에, *Artemisia* 속 식물체를 알콜추출하여 응용한다면 혈전형성을 억제할 수 있을 것으로 기대되며, 향 후 동물식이 실험을 통해 효과를 규명할 필요성이 있다고 사료된다[24].

**초 록**

지혈이 일어나는 과정에서 혈소판의 정상적인 활성화가 중요하지만, 혈소판의 과도하거나 비정상적인 활성화는 뇌졸중, 죽상동맥 경화증 및 혈전증과 같은 심혈관 질환을 유발할 수 있다. 따라서, 혈소판 활성화를 조절하거나 억제할 수 있는 새로운 물질의 발견은 심혈관 질환의 예방 및 치료에 도움이 될 수 있다. Artemether는 *Artemisia annua*의 유효성분으로 알려진 artemisinin의 유도체로서 말라리아 치료에 효과적이라고 보고된 바 있고, 항산화 및 대사 효소 억제를 통해 기능하는 것으로 알려져 있다. 그런데, 혈소판 활성화 및 응집에 있어서의 artemether의 역할과 collagen으로 유도한 사람 혈소판에서 artemether의 작용기전은 현재까지 알려진 바가 없다. 본 연구는 artemether가 collagen에 의해 유도된 혈소판 활성화와 혈전 형성에 어떤 영향을 미치는지 연구하였다. 그 결과, cAMP level이 artemether에 의해 유의하게 증가되었고, cAMP-의존성 kinase의 기질인 VASP 및 IP<sub>3</sub>R이 인산화되었다. Artemether에 의한 IP<sub>3</sub>R 인산화는 세포질 내로의 Ca<sup>2+</sup> 동원을 억제하였고, 인산화된 VASP는 혈소판 막에 위치한 αIIb/β<sub>3</sub> 불활성화를 일으켜 fibrinogen 결합을 억제하였다. 결과적으로, artemether는 thrombin으로 유도한 fibrin clot의 형성을 억제하였다. 따라서, 우리는 artemether가 과도한 혈소판 활성화 및 혈전 형성으로 인한 심혈관 질환의 효과적인 예방 및 치료제로 작용할 수 있음을 제안한다.

**Keywords** Artemether · Cyclic nucleotides · Inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor · Intracellular Ca<sup>2+</sup> · Vasodilator-stimulated phosphoprotein

**References**

1. Thompson RC, Allam AH, Lombardi GP, Wann LS, Sutherland M., Sutherland JD, Soliman TT, Frohlich B, Mininberg DT, Monge JM, Vallodolid CM, Cox SL, Abd el-Maksoud G, Badr I, Miyamoto MI, el-Halim Nur el-Din A, Narula J, Finch CE, Thomas GS (2013)

- Atherosclerosis across 4000 years of human history: the Horus study of four ancient populations. *Lancet* 381: 1211–1222. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60598-X
2. Rouzer CA, Marnett LJ (2005) Structural and functional differences between cyclooxygenases: fatty acid oxygenases with a critical role in cell signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 338: 34–44. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.07.198
  3. Li Z, Delaney MK, O'Brien KA, Du X (2010) Signaling during platelet adhesion and activation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30: 2341–2349. doi: 10.1161/ATVBAHA.110.207522
  4. 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
  5. Quinton TM, Dean WL (1992) Cyclic AMP-dependent phosphorylation of the inositol-1,4,5-trisphosphate receptor inhibits  $Ca^{2+}$  release from platelet membranes. *Biochemical and Biochem Biophys Res Commun* 184: 893–899. doi: 10.1016/0006-291X(92)90675-B
  6. Cavallini L, Coassin M, Borean A, Alexandre A (1996) Prostacyclin and sodium nitroprusside inhibit the activity of the platelet inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and promote its phosphorylation. *J Biol Chem* 271: 5545–5551. doi: 10.1074/jbc.271.10.5545
  7. Laurent V, Loisel TP, Harbeck B, Wehman A, Gröbe L, Jockusch BM, Frank JW, Gertler B, Carlier MF (1999) Role of proteins of the Ena/VASP family in actin-based motility of *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol* 144: 1245–1258. doi: 10.1083/jcb.144.6.1245
  8. Sudo T, Ito H, Kimura Y (2003) Phosphorylation of the vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) by the anti-platelet drug, cilostazol, in platelets. *Platelets* 14: 381–390. doi: 10.1080/09537100310001598819
  9. Ma YQ, Qin J, Plow EF (2007) Platelet integrin  $\alpha$ (IIb) $\beta$ (3): activation mechanisms. *J Thromb Haemost* 5: 1345–1352. doi: 10.1111/j.1538-7836.2007.02537.x
  10. Payrastra B, Missy K, Trumel C, Bodin S, Plantavid M, Chap H (2000) The integrin  $\alpha$  IIb/ $\beta$  3 in human platelet signal transduction. *Biochem Pharmacol* 60: 1069–1074. doi: 10.1016/S0006-2952(00)00417-2
  11. Esu EB, Effa EE, Opie ON, Meremikwu MM (2019) Artemether for severe malaria. *Cochrane Database Syst Rev* 6: CD010678. doi: 10.1002/14651858.CD010678.pub3
  12. Saeed ME, Krishna S, Greten HJ, Kreamsner PG, Efferth T (2016) Antischistosomal activity of artemisinin derivatives *in vivo* and in patients. *Pharmacological Research* 110: 216–226. doi: 10.1016/j.phrs.2016.02.017
  13. Xu J, He X, Huang X, Zhang F, Ren X, Asakiya C, Li Y, Huang K (2022) Artemether Ameliorates Non-Alcoholic Steatohepatitis by Repressing Lipogenesis, Inflammation, and Fibrosis in Mice. *Front Pharmacol* 13: 851342. doi: 10.3389/fphar.2022.851342
  14. Schaeffer J, Blaustein MP (1989) Platelet free calcium concentrations measured with fura-2 are influenced by the transmembrane sodium gradient. *Cell Calcium* 10: 101–113. doi: 10.1016/0143-4160(89)90050-X
  15. Dong J, Yuan J, Wang JL, Ji RF, Quan QH, Guo XY, Gao J, Liu YG (2017) Study on screening antitumor active fractions and chemical components in active fractions from root of *Anayceclus pyrethrum*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 42: 3932–3937. doi: 10.19540/j.cnki.cjmm.2017.0158
  16. Shin JH, Kwon HW, Lee DH (2019) Ginsenoside F4 inhibits platelet aggregation and thrombus formation by dephosphorylation of IP3RI and VASP. *J Appl Biol Chem* 62: 93–100. doi: 10.3839/jabc.2019.014
  17. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of  $Ca^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260: 3440–3450. doi: 10.1016/S0021-9258(19)83641-4
  18. Nishikawa M, Tanaka T, Hidaka H (1980)  $Ca^{2+}$ -calmodulin-dependent phosphorylation and platelet secretion. *Nature* 287: 863–865. doi: 10.1038/287863a0
  19. Kuo JF, Andersson RG, Wise BC, Mackerlova L, Salomonsson I, Brackett NL, Katoh N, Shoji M, Wrenn RW (1980) 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* 77: 7039–7043. doi: 10.1073/pnas.77.12.7039
  20. Gambaryan S, Kobsar A, Rukoyatkina N, Herterich S, Geiger J, Smolenski A, Lohmann SM, Walter U (2010) Thrombin and collagen induce a feedback inhibitory signaling pathway in platelets involving dissociation of the catalytic subunit of protein kinase A from an  $\text{NF}\kappa\text{B}$ - $\text{I}\kappa\text{B}$  complex. *J Biol Chem* 285: 18352–18363. doi: 10.1074/jbc.M109.077602
  21. Wangorsch G, Butt E, Mark R, Hubertus K, Geiger J, Dandekar T, Dittrich M (2011) Time-resolved *in silico* modeling of finetuned cAMP signaling in platelets: feedback loops, titrated phosphorylations and pharmacological modulation. *BMC Syst Biol* 5: 178. doi: 10.1186/1752-0509-5-178
  22. Phillips DR, Nannizzi-Alaimo L, Prasad KS (2001) Beta3 tyrosine phosphorylation in  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (platelet membrane GP IIb-IIIa) outside-in integrin signaling. *Thromb Haemost* 86: 246–258. doi: 10.1055/s-0037-1616222
  23. Horstrup K, Jablonka B, Honig-Liedl P, Just M, Kochsiek K, Walter U (1994) Phosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at Ser157 in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition. *Eur J Biochem* 225: 21–27. doi: 10.1111/j.1432-1033.1994.00021.x
  24. Singha P, Bajpai V, Khandelwal N, Varshney S, Gaikwad AN, Srivastava M, Singh B, Kumar B (2021) Determination of bioactive compounds of *Artemisia* Spp. plant extracts by LC-MS/MS technique and their *in-vitro* anti-adipogenic activity screening. *J Pharm Biomed Anal* 193:113707. doi: 10.1016/j.jpba.2020.113707