

Anti-platelet Effects of Artemisinin through Regulation of Cyclic Nucleotide on Collagen-induced human Platelets

Dong-Ha Lee^{†,*}

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

The discovery of a novel substance capable of regulating or suppressing platelet aggregation holds significant promise for the prevention and treatment of cardiovascular diseases. Artemisinin, a compound derived from plants like *Artemisia* or *Scopolia*, has demonstrated potential across various fields, including anticancer and Alzheimer's disease research. However, its specific role and mechanisms in influencing platelet activation and thrombus formation remain incompletely understood. This study delves into elucidating how artemisinin affects platelet activation and thrombus formation. Results revealed a significant increase in cAMP production with varying doses of artemisinin, alongside notable phosphorylation of VASP and IP₃R—both substrates for cAMP-dependent kinase. This phosphorylation led to the inhibition of Ca²⁺ mobilization from the dense tubular system, consequently reducing platelet activity via αIIb/β₃ inactivation and suppressing fibrinogen binding. Furthermore, artemisinin exhibited inhibition of thrombin-induced thrombus formation. These findings suggest that artemisinin holds promise as an effective prophylactic and therapeutic agent against cardiovascular diseases, specifically targeting abnormal platelet activation and thrombus formation.

Key Words: Artemisinin, Cyclic nucleotide, Intracellular Ca²⁺, Fibrinogen binding, Thrombus formation

서 론

혈액은 우리 몸의 장기와 조직으로 산소 및 영양분을 공급할 뿐 아니라 노폐물을 제거함으로써 우리가 생존하는 데 필수적이며, 이러한 역할이 정상적으로 수행되기 위해서 혈액 순환이 원활하게 이루어지는 것이 중요하다. 여러 요인으로 인하여 혈관이 손상될 때, 우리 몸에서 지혈 반응이 촉진되며, 이를 통해 혈액 손실을 최소화시키고 정상적인 순환을 유지하는데, 혈소판 활성화 과정이 시발점이 된다(Jackson, 2011). 그러나, 혈소판이 비정상적으로 또는 과도하게 활성화되는 경우 뇌졸중, 뇌경색 및

동맥 경화증 등과 같은 혈전성의 심혈관 질환을 유발하게 된다(Schwartz et al., 1990). 그런 이유로 인해, 혈소판의 활성화를 조절함으로써 혈전 생성을 억제하는 물질을 찾고 개발하는 것이 심혈관 질환의 예방 및 치료에 중요하게 여겨진다.

혈관의 손상이 있을 때, 순환하던 혈소판이 병변으로 모여들고 혈소판 활성화유도물질(ADP, collagen 및 arachidonic acid 등)를 통해 활성화된다. 이때, 혈소판 막의 phospholipase C가 활성화되어 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate와 같은 인지질을 inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃)과 diacylglycerol (DG)로 가수분해되고, 생성이 증가된 IP₃는 혈소판 내의 dense tubular system에 위치하는 Ca²⁺ 채널을 열어

Received: June 24, 2024 / Revised: August 18, 2024 / Accepted: August 22, 2024

*Professor.

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

Tel: +82-41-580-2148, Fax: +82-42-580-2932, e-mail: dhlee@nsu.ac.kr

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

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

서 세포질 내 Ca^{2+} 농도가 강하게 증가시킨다(Payraastre et al., 2000). 그 결과 calcium/calmodulin 의존성 단백질로 알려진 myosin light chain 및 pleckstrin가 인산화시킴으로 혈소판 응집을 일으킨다(Nishikawa et al., 1980).

또한, 혈소판이 활성화되면서 혈소판 막의 인지질이 arachidonic acid로 가수분해되어 나오며, TXA synthase (TXAS) 및 cyclooxygenase-1 (COX-1)의 작용에 의해 TXA₂로 전환이 일어난 후 혈소판으로부터 방출되어 나온다(Jennings, 2009). 혈소판 외부로 분비되어 나온 TXA₂는 또 다른 혈소판들의 막 수용체에 결합되어 추가적으로 혈소판 자극하고 활성화를 촉진한다(Morello et al., 2009; Sabatine and Jang, 2000).

정상적으로 혈액 순환이 일어나고 있는 경우, 혈관 내 피세포로부터 분비되는 prostaglandin I₂과 nitric oxide는 혈소판 내 cAMP 또는 cGMP 생성을 유발하는데, cAMP 생성 증가는 protein kinase A (PKA)를 활성화시키고 cGMP 생성 증가는 protein kinase G (PKG)를 활성화시킨다. 이들 PKA와 PKG는 기질 단백질로 vasodilator stimulated phosphoprotein (VASP)이나 IP₃ receptor (IP₃R)를 인산화시키는 것으로 알려져 있다(Kim et al., 2014; Kim et al., 2015; Lee, 2017; Schwarz et al., 2001). IP₃R의 인산화는 세포질로의 Ca^{2+} 동원을 억제시키는 것으로, VASP의 인산화는 α Ib/ β_3 의 활성화를 낮춤으로써 actin filament의 신장을 저해하는 것으로 잘 알려져 있다(Cavallini et al., 1996; Quinton and Dean, 1992; Sudo et al., 2003; Laurent et al., 1999). 따라서, IP₃R 인산화와 관련한 Ca^{2+} 동원 억제능과 VASP의 인산화와 관련한 α Ib/ β_3 활성 억제능은 항혈소판 물질을 평가하는데 중요한 요소이다.

Artemisinin은 효과적인 말라리아 치료제로 오랫동안 임상에서 사용되어온 전통 의약품이며, artemisinin과 그 파생물들에서 항말라리아 특성 뿐 아니라 항염증, 항알러지 및 항암 작용 등의 광범위한 치료 효과가 있음이 입증되었고, 이는 수많은 분자 표적의 조절과 관련된 것으로 보고되었다(Wang et al., 2019; Wong et al., 2017; Yao et al., 2018). 최근 연구들에서는 artemisinin과 그 유도체가 신경 보호 특성이 있고, 이는 다양한 뇌 장애에서 예방 및 치료 가능성이 있음이 보고되었다(Das et al., 2014; Xu et al., 2017; Zeng et al., 2017; Fang et al., 2019; Zhao et al., 2019). 또한, 어떤 연구에서는 artemisinin가 ERK1/2 & CREB & BCL-2 신호 경로를 활성화하여 허혈성 뇌졸중 유발로 인한 세포사멸을 약화시킨다는 것을 확인하기도 하였다(Peng et al., 2022).

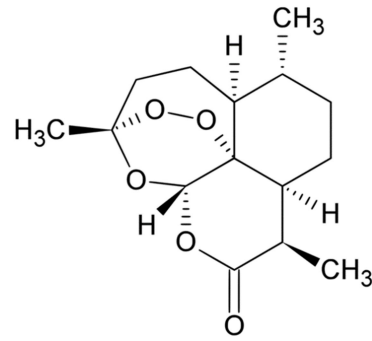


Fig. 1. The structure of artemisinin. Chemical formula: C₁₅H₂₂O₅, Molar mass: 282.33 g/mol.

뇌졸중과 동맥 경화증으로 대표되는 심혈관계 질환 (CVD)는 혈소판 활성화와 깊은 관련이 있고, artemisinin과 유사한 구조를 가진 *Artemisia* 속 식물에서 추출한 flavonoid 물질들이 항혈소판 작용을 가진다는 연구들이 알려진 바 있다(Lee, 2023a; Lee, 2021; Lee, 2019; Yoon et al., 2022). 그러나, 혈소판 활성화 및 혈전 형성에 미치는 artemisinin의 역할과 기전에 대해서는 연구된 바가 거의 없고, 앞선 연구에서 artemisinin가 PI₃K 및 MAPK의 인산화를 억제함으로써 혈소판 분비를 조절한다고 보고된 바가 있을 뿐이다(Lee, 2023b). 본 연구에서는 artemisinin의 항혈소판 효과 및 기전을 규명함으로써 artemisinin가 CVD를 억제하는 물질로써 가치가 있는지 확인하려 한다.

재료 및 방법

재료

Avention Co. (Siheung, Korea)로부터 artemisinin을 구입하였다(Fig. 1). Chrono-Log Co. (PA, Havertown, USA)에서 collagen을 구입하였고, Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI, USA)가 cAMP와 cGMP assay kit를 제공하였고, Fura 2-AM은 Invitrogen (Eugene, OR, USA)로부터 구입하였다. Anti- β -actin, anti-phospho-IP₃R type I, anti-total VASP, anti-phospho-VASP Ser157, anti-phospho-VASP Ser239, anti-rabbit IgG-HRP-conjugate 등의 항체와 lysis buffer를 Cell Signaling (Beverly, MA, USA)에서 제공받았다. Thermo fisher Scientific Co. (Middlesex County, MA, USA)로부터 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane를 구하였고, Invitrogen Molecular Probes (Eugene, OR, USA)로부터 Fibrinogen Alexa Fluor 488 접합체 및 ECL (Enhanced chemiluminescence solution)를 입수하였다. 그 외에 사용된 시약들은 Sigma

Aldrich Korea (Seoul, Korea)를 통해 구입하였다.

혈소판 현탁액의 준비과정

사람의 전혈에서 분리하여 제조한 농축혈소판 제제를 대한민국 수원에 위치한 대한적십자 혈액원의 승인을 거쳐 입수하였다. 관련된 논문의 방법을 따라 농축혈소판 제제를 1,650×g에서 8분간 원심분리하여 혈소판을 모은 후, 138 mM NaCl, 12 mM NaHCO₃, 5.5 mM glucose, 2.7 mM KCl, 0.49 mM MgCl₂ 및 0.36 mM NaH₂PO₄를 포함한 현탁 완충액(pH 7.4)에 부유시키는 방법으로 혈소판을 세척하였고, 10⁸ cells/mL 최종 농도로 혈소판 현탁액을 준비하였다(Ko et al., 2023). 낮은 온도에서 혈소판 응집이 일어나는 것을 방지하기 위해 전 과정을 실온의 상태에서 진행하였다. 실험 진행을 위해 남서울대학교 기관생명윤리 위원회로부터 승인(1041479-HR-201803-003)을 받았다.

Cyclic nucleotides (cAMP 및 cGMP) 생성량 측정

혈소판 현탁액(10⁸ cells/mL)에 다양한 농도의 artemisinin을 첨가하였고, 3분 동안 37°C에 둔 후, 2 mM CaCl₂ 및 응집 유도제를 첨가하여 5분 동안 응집을 유도하였다. 반응을 종료시키기 위해 동량의 EtOH를 첨가하였고, cGMP 또는 cAMP ELISA kit (Cayman chemical, Ann Arbor, Michigan, USA)를 사용하여 cGMP 및 cAMP의 농도를 측정하였다.

세포질 내 Ca²⁺ 동원량 측정

농축혈소판에 Fura 2-AM (5 μM)를 첨가하여 37°C에서 60분 동안 교반시킨 후, 앞서 언급한 방법에 따라 10⁸ cells/mL 농도의 혈소판 현탁액을 준비하였다. 준비된 혈소판 현탁액에 2 mM CaCl₂ 및 응집 유도제를 첨가하여 5분 동안 37°C에서 반응시키며, Fura 2가 방출하는 형광을 Fluorescence Spectrophotometer (F7000, Hitachi hightech, Seongnam, Korea)를 통해 측정하였다. 형광의 여기 파장을 340 nm에서 380 nm까지 0.5초 간격으로 증가시켰고, 510 nm의 방출 파장을 설정하였다. 측정된 형광 값은 Grynkiewicz에 의해 기술된 방법에 따라 Ca²⁺의 동원 양으로 계산하였다(Grynkiewicz et al., 1985).

Western Immunoblot법으로 단백질 인산화 측정

혈소판의 반응을 1x lysis buffer를 사용하여 종료하였고, 용해된 혈소판 현탁액의 단백질을 BCA protein kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)를 통해 측정하였다. 각 시료가 20 μg의 단백질을 포함하도록 희석하여

8% SDS-PAGE를 통해 전기영동하였다. 분리된 단백질은 PVDF membrane으로 옮긴 후, 1:1,000 희석 배율의 1차 항체에서 하루 동안 반응하였고, 1:2,000 희석 배율의 2차 항체에서 1시간 동안 반응하였다. ECL 시약(Thermo Fisher Scientific, Seoul, Korea)에 반응하여 단백질 band를 시각화하였다.

혈소판 막 αIIb/β₃에 대한 fibrinogen의 결합능 측정

혈소판 현탁액을 Alexa Fluor 488-fibrinogen (20 μg/mL)와 함께 처리한 후, 2 mM CaCl₂ 및 응집 유도제를 첨가하여 5분 동안 반응을 유도하였다. 동량의 0.5% 파라포름알데하이드를 포함하는 phosphate buffer (pH 7.4)를 첨가하여 반응을 종료하였고, 모든 과정에서 빛이 차단되도록 하였다. Fibrinogen의 결합 정도는 BD Bioscience (San Jose, CA, USA)의 FACS 장비(유세포 분석기)에서 측정되었고, 결과 값을 Cell-Quest 소프트웨어(BD Biosciences)를 이용하여 계산하였다.

혈소판 매개의 fibrin clot 형성 정도 측정

농축혈소판이 시험관 벽에 부착되어 활성화 되지 않게 하기 위하여 polyethylene 재질의 시험관에 넣은 후, 2 mM

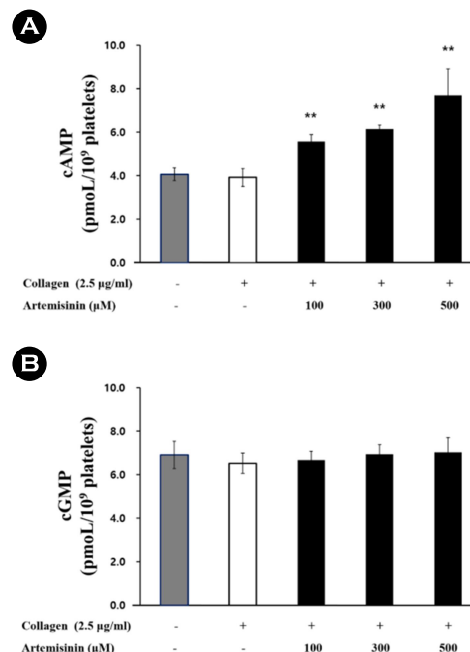


Fig. 2. Effects of artemisinin on cyclic nucleotides production. (A) Effects of artemisinin on cAMP level. (B) Effects of artemisinin on cGMP level. Results are presented as mean ± SD (n=4). Statistical significance was indicated as follows: ***P*<0.001 compared to collagen-induced platelet suspension.

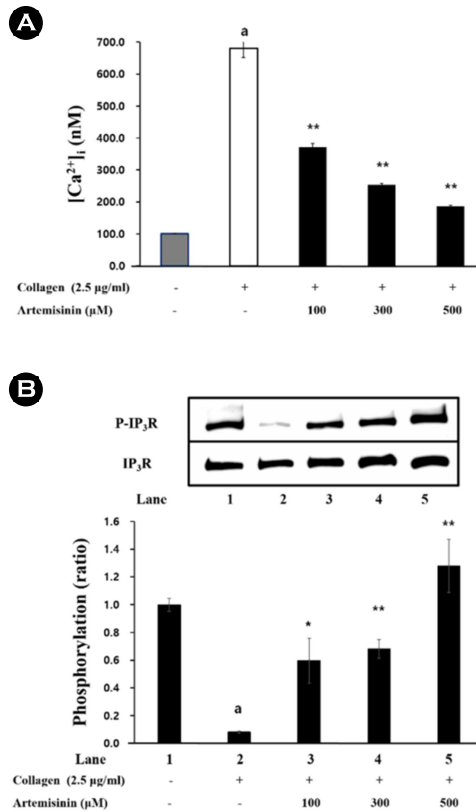


Fig. 3. Effects of artemisinin on intracellular Ca^{2+} mobilization and IP_3R phosphorylation. (A) Effects of artemisinin on intracellular Ca^{2+} mobilization. (B) Effects of artemisinin on IP_3R phosphorylation. Results are presented as mean \pm SD (n=4). Statistical significance was indicated as follows: ^a $P < 0.05$ compared to non-stimulated platelet suspension, * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ compared to collagen-induced platelet suspension.

$CaCl_2$ 및 thrombin (0.05 U/mL)을 첨가하여 37°C에서 20분 동안 반응이 일어나게 하였다. 시험관에서 fibrin 기반의 clot이 형성된 결과를 디지털 카메라로 사진 촬영하였다. ImageJ (v1.46, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)를 이용해서 촬영된 이미지로부터 응고된 영역을 계산하였고 혈전 형성 정도를 정량하였다.

통계 처리

모든 실험 결과를 평균 \pm 표준편차로 표현하였고, Student's *t*-test를 이용하여 통계분석을 수행하였다. 본 연구의 통계분석 결과, $P < 0.05$ 에서 실험 그룹 간의 결과차이가 통계적으로 유의한 것으로 판단하였다.

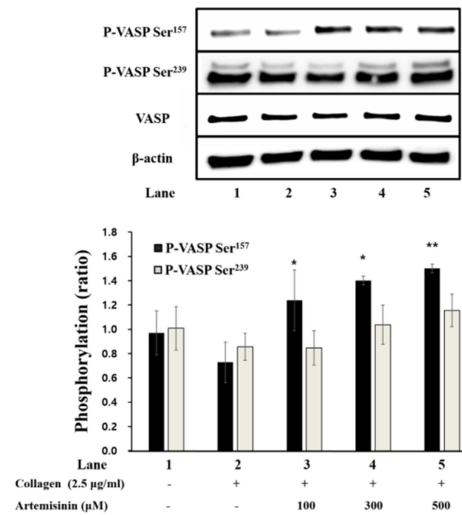


Fig. 4. Effects of artemisinin on VASP phosphorylation. Results are presented as mean \pm SD (n=4). Statistical significance was indicated as follows: * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ compared to collagen-induced platelet suspension.

결과 및 고찰

Cyclic nucleotides 생성량에 artemisinin가 미치는 효과

본 연구에서는 세포질 내로 동원되는 Ca^{2+} 양을 감소시킴으로 혈소판 활성화에 반대 효과를 미치는 것으로 알려진 cAMP 및 cGMP 수준에 대한 artemisinin의 영향을 조사하였고, Fig. 2A에 나타난 연구 결과에 따르면 artemisinin은 cAMP 생성을 3.92 ± 0.41 pmoL/ 10^8 cells에서 7.70 ± 1.22 pmoL/ 10^8 cells로 크게 증가시켰으나, cGMP 생성에서는 유의한 증가를 보이지 않았다(Fig. 2B). 이러한 결과를 통해 artemisinin이 cGMP보다는 cAMP의 생성 증가를 일으킴으로써 혈소판 활성화를 억제한다는 것을 확인하였다.

세포 내 Ca^{2+} 동원량과 IP_3R 의 인산화에 artemisinin가 미치는 효과

혈소판 활성화 및 응집에 기여한다고 알려진 세포 내로의 Ca^{2+} 동원에 artemisinin이 어떤 영향을 미치는 지 평가하였다. Fig. 3A는 collagen 자극으로 인해 $[Ca^{2+}]_i$ 가 100.9 ± 1.1 nM에서 681.1 ± 23.2 nM으로 크게 증가했음을 보여준다. 그러나 artemisinin (100~500 μ M)을 투여하였을 때, collagen에 의해 유발된 $[Ca^{2+}]_i$ 의 증가가 유의하게 약화되었다(Fig. 3A). 또한, 본 연구에서는 $[Ca^{2+}]_i$ 조절에 관여하는 수용체인 IP_3R 의 인산화에 미치는 artemisinin의 효과를

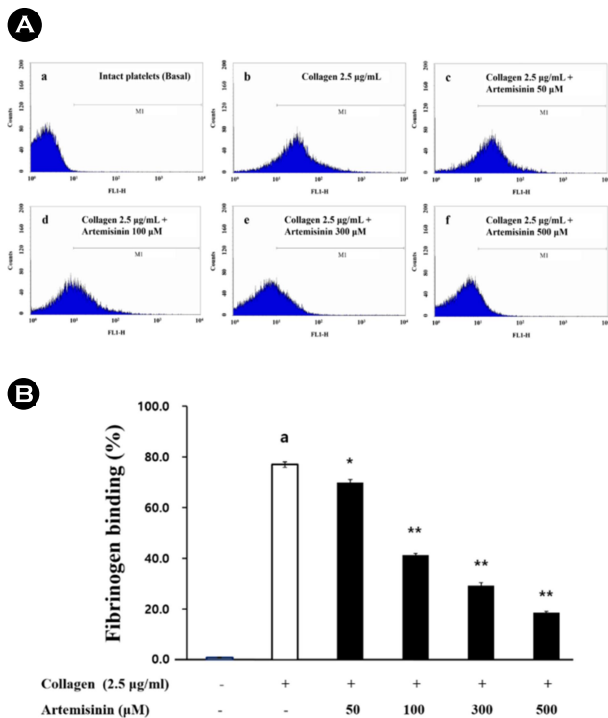


Fig. 5. Effects of artemisinin on fibrinogen binding. (A) The flow cytometry histograms on fibrinogen binding. a, Intact platelets (base); b, collagen (control); c, collagen + artemisinin (50 µM); d, collagen + artemisinin (100 µM); e, collagen + artemisinin (300 µM); f, collagen + artemisinin (500 µM). (B) Effects of artemisinin on collagen-induced fibrinogen binding (%). Results are expressed as mean ± SD (n=4). Statistical significance was indicated as follows: ^aP<0.05 compared to non-stimulated platelet suspension, *P<0.05, **P<0.001 compared to collagen-induced platelet suspension.

조사하였고, Fig. 3B에 도시된 바와 같이, collagen으로 자극된 혈소판에서 artemisinin은 IP₃R 인산화의 농도 의존적인 증가를 일으켰다. 이러한 결과는 artemisinin이 IP₃R 인산화를 통해 세포 내로 Ca²⁺의 동원을 감소시켰다는 것을 시사한다.

VASP 인산화에 artemisinin이 미치는 효과

본 연구에서, Fig. 2에서 나타난 바와 같이 artemisinin이 collagen으로 유도한 혈소판에서 cAMP 농도를 유의적으로 증가시키는 것을 확인하였다. 또한, artemisinin이 collagen으로 유도한 혈소판에서 VASP 인산화 조절에 관여하는지 확인하였고, Fig. 4는 artemisinin이 VASP Ser157의 인산화를 유의하게 증가시키는 반면, VASP Ser239에서는 유의미한 효과가 관찰되지 않았음을 보여준다. 특히, 100 µM 이상에서 artemisinin가 통계적 유의성을 가지며 효과를 나타내는 것이 관찰되었으며, 이는 artemisinin에

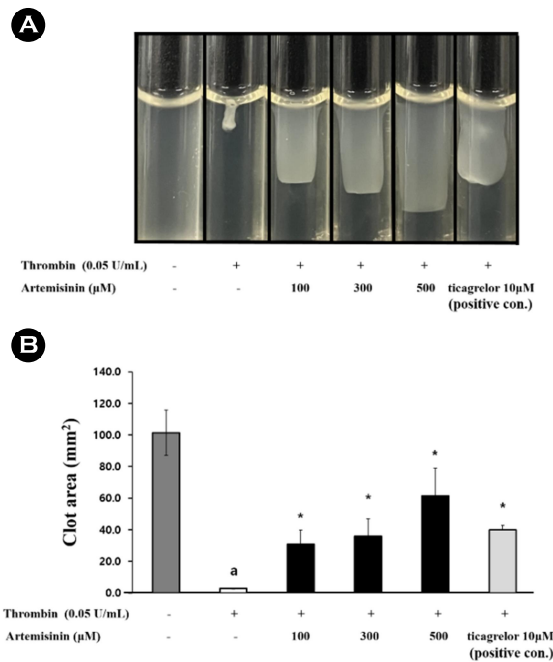


Fig. 6. Effects of artemisinin on platelet-mediated fibrin clot formation. (A) Effects of artemisinin on thrombin-induced fibrin clot formation (B) Effects of artemisinin on thrombin-induced fibrin clot formation area. Results are presented as mean ± SD (n=4). Statistical significance was indicated as follows: ^aP<0.05 compared to non-stimulated platelet suspension, *P<0.05 compared to thrombin-induced platelet suspension.

의해 유도된 향상된 cAMP 생성이 VASP Ser157 인산화를 유의하게 증가시킨다는 것을 나타낸다.

Fibrinogen의 αIIb/β₃에 대한 결합능에 artemisinin이 미치는 효과

본 연구에서는 artemisinin가 매개하는 VASP Ser157 인산화의 증가가 αIIb/β₃ 수용체에 대한 fibrinogen 결합을 저해하는지 확인하였다. Collagen 자극으로 αIIb/β₃ 수용체에 대한 fibrinogen의 결합률이 82.8±1.4%로 높아졌다(Fig. 5A-b, 5B). 그러나, Fig. 5A-f 및 5B가 보여주는 것과 같이 artemisinin은 fibrinogen의 결합력을 농도 의존적 억제하였다. 특히, 500 µM 농도의 artemisinin은 fibrinogen 결합을 78.0%까지 억제시키는 것으로 확인되었다(Fig. 5A-f, 5B). 이러한 결과는 αIIb/β₃ 수용체에 결합하는 fibrinogen에 대한 artemisinin의 억제 효과를 보여주며, 이는 VASP Ser157 인산화에 대한 영향에 기인되는 것으로 사료된다.

혈소판 매개의 fibrin clot 형성 정도에 artemisinin이 미치는 효과

혈소판 응집 유도제에 의해 혈소판이 활성화되고 응집이 촉발되면서 fibrin 응고를 형성하는 것을 억제하는 물질을 확인한 다른 연구에서, 응집 유도제로 thrombin을 사용하였고(Shin et al., 2019), 다른 응집 유도제에 비하여 thrombin이 응고작용까지 유발할 수 있음을 참고하여, 본 연구에서는 thrombin로 유도한 fibrin 응고 형성에 미치는 artemisinin의 효과를 평가하였다. Fig. 6A에 제시한 바와 같이, thrombin은 fibrin 응고 형성을 강하게 유발하였다. 그러나 다양한 용량(100, 300 및 500 μ M)의 artemisinin를 처리한 경우 fibrin 응고 형성이 농도에 따라 감소하는 것으로 나타났고, artemisinin의 억제율은 각각 28.56%, 33.5% 및 59.4%인 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6B). 이러한 결과들은 혈전 형성을 효과적으로 저해하는 artemisinin의 효력을 나타내며, artemisinin이 혈전 형성을 방해하는 효과적인 물질임을 시사한다.

기존에 임상에서 많이 활용되고 있는 항혈소판제로는 aspirin과 ozagrel이 있으며, 이들은 각각 COX-1와 TXAS의 효소반응을 저해하여 TXA₂ 생성을 억제하는 물질들로 알려져 있다(Cipollone et al., 1997; Patrono, 2001). 또한, triflusal, cilostazol, dipyridamole과 같은 PDE 억제제들도 임상적으로 cyclic nucleotides의 생산을 증가시키는 항혈소판제로 많이 사용된다(Menshikov et al., 1993). 본 연구에서, artemisinin은 cAMP의 생성을 증가시키는 항혈소판 물질로서 가능성이 있으며, 그 기전을 확실히 밝히기 위해서는 추가적인 연구가 필요하다. 또한, 본 연구에서 사용한 artemisinin의 효과 농도가 임상에서 사용되는 다른 제제들에 비하여 높은 편이기는 하지만, 인공합성 물질들과 다르게 천연물 유래의 성분이며 사람 혈소판에서 독성이 없었던 것으로 비추어 볼 때, 위염증 및 위출혈 등의 부작용이 덜할 것을 기대해 볼 수 있다. 이를 명확하게 확인하기 위하여 artemisinin을 동물식이 했을 때의 항혈전 효과 및 위장관계에 미치는 부작용들을 *in vivo*에서 규명할 필요성이 있다.

ACKNOWLEDGEMENT

Funding for this paper was provided by Namseoul University year 2024.

CONFLICT OF INTEREST

No conflict of interest.

REFERENCES

- Cavallini L, Coassin M, Borean A, Alexandre A. Prostacyclin and sodium nitroprusside inhibit the activity of the platelet inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and promote its phosphorylation. *J Biol Chem.* 1996. 271: 5545-5551.
- Cipollone F, Patrignani P, Greco A, Panara MR, Padovano R, Cuccurullo F, et al. Differential suppression of thromboxane biosynthesis by indobufen and aspirin in patients with unstable angina. *Circulation.* 1997. 96: 1109-1116.
- Das SS, Nanda GG, Alone DP. Artemisinin and curcumin inhibit Drosophila brain tumor, prolong life span, and restore locomotor activity. *IUBMB Life.* 2014. 66: 496-506.
- Fang J, Zhao X, Li S, Xing X, Wang H, Lazarovici P, et al. Protective mechanism of artemisinin on rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells against apoptosis induced by hydrogen peroxide via activation of c-Raf-Erk1/2-p90(rsk)-CREB pathway. *Stem Cell Research & Therapy.* 2019. 10: 312.
- Grynkiwicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* 1985. 260: 3440-3450.
- Jackson SP. Arterial thrombosis—insidious, unpredictable and deadly. *Nat Med.* 2011. 17: 1423-1436.
- Jennings LK. Role of platelets in atherothrombosis. *Am J Cardiol.* 2009. 103: 4A-10A.
- Kim HH, Jeong Hwa Hong JH, Ingkasupart P, Lee DH, Park HJ. Inhibitory Effects of Water Extract from Rice Bran Due to cAMP-dependent Phosphorylation of VASP (Ser157) on ADP-induced Platelet Aggregation. *Biomed Sci Letters.* 2014. 20: 129-138.
- Kim HH, Lee DH, Hong JH, Ingkasupart P, Nam GS, Ok WJ, Kim MJ, Yu YB, Kang HC, Park HJ. Inhibitory Effects of Rice Bran Water Extract Fermented Lactobacillus plantarum due to cAMP-dependent Phosphorylation of VASP (Ser157) on human Platelet Aggregation. *Biomed Sci Letters.* 2015. 21: 103-114.
- Ko SN, Son JW, Kim GR, Kim MS, Lee YJ, Kim SJ, Shin JH, Jo DI, Bok WY, Oh HG, Kwon HW. The inhibitory effects of Glycyrrhiza uralensis on human platelet aggregation and thrombus formation. *Biomed Sci Letters.* 2023. 29: 242-248.
- Laurent V, Loisel TP, Harbeck B, Wehman A, Gröbe L, Jockusch

- BM, Frank JW, Gertler B, Carlier MF. Role of proteins of the Ena/VASP family in actin-based motility of *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol*. 1999. 144: 1245-1258.
- Lee DH. Inhibitory effects of cordycepin on platelet activation via regulation of cyclic adenosine monophosphate-downstream pathway. *Biomed Sci Letters*. 2017. 23: 251-260.
- Lee DH. Inhibitory effect of scopoletin on U46619-induced platelet aggregation through regulation of Ca²⁺ mobilization. *Biomed Sci Letters*. 2019. 25: 123-130.
- Lee DH. Thrombus formation Inhibition of esculetin through regulation of cyclic nucleotides on collagen-induced platelets. *Biomed Sci Letters*. 2021. 27: 270-276.
- Lee DH. Anti-platelet effects of artesunate through regulation of cyclic nucleotide on collagen-induced human platelets. *Biomed Sci Letters*. 2023a. 29: 41-27.
- Lee DH. Antithrombotic Effect of Artemisinin through Phosphoprotein Regulation in U46619-induced Platelets. *Biomed Sci Letters*. 2023b. 29: 184-189.
- Menshikov MYU, Ivanova K, Schaefer M, Drummer C, Gerzer R. Influence of the cGMP analog 8-PCPT-cGMP on agonist-induced increases in cytosolic ionized Ca²⁺ and on aggregation of human platelets. *Eur J Pharmacol*. 1993. 245: 281-284.
- Morello F, Perino A, Hirsch E. Phosphoinositide 3-kinase signalling in the vascular system. *Cardiovasc. Res*. 2009. 82: 261-271.
- Nishikawa M, Tanaka T, Hidaka H. Ca²⁺-calmodulin-dependent phosphorylation and platelet secretion. *Nature*. 1980. 287: 863-865.
- Payrastré B, Missy K, Trumel C, Bodin S, Plantavid M, Chap H. The integrin alpha IIb/beta 3 in human platelet signal transduction. *Biochem Pharmacol*. 2000. 60: 1069-1074.
- Peng T, Li S, Liu L, Yang C, Farhan M, Chen L, Su Q, Zheng W. Artemisinin attenuated ischemic stroke induced cell apoptosis through activation of ERK1/2/CREB/BCL-2 signaling pathway *in vitro* and *in vivo*. *Int J Biol Sci*. 2022. 18: 4578-4594.
- Patrono C. Aspirin: new cardiovascular uses for an old drug. *Am J Med*. 2001. 110: S62-S65.
- Quinton TM, Dean WL. Cyclic AMP-dependent phosphorylation of the inositol-1,4,5-trisphosphate receptor inhibits Ca²⁺ release from platelet membranes. *Biochemical and Biophys Res Commun*. 1992. 184: 893-899.
- Sabatine MS, Jang IK. The use of glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in patients with coronary artery disease. *Am J Med*. 2000. 109: 224-237.
- Schwartz SM, Heimark RL, Majesky MW. Developmental mechanisms underlying pathology of arteries. *Physiol Rev*. 1990. 70: 1177-1209.
- Schwarz UR, Walter U, Eigenthaler M. Taming platelets with cyclic nucleotides. *Biochem Pharmacol*. 2001. 62: 1153-1161.
- Shin JH, Kwon HW, Lee DH. Ginsenoside F4 inhibits platelet aggregation and thrombus formation by dephosphorylation of IP3RI and VASP. *J Appl Biol Chem*. 2019. 62: 93-100.
- Sudo T, Ito H, Kimura Y. Phosphorylation of the vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) by the anti-platelet drug, cilostazol, in platelets. *Platelets*. 2003. 14: 381-390.
- Wang J, Xu C, Wong YK, Li Y, Liao F, Jiang T, Tu Y. Artemisinin, the Magic Drug Discovered from Traditional Chinese Medicine. *Engineering*. 2019. 5: 32-39.
- Wong YK, Xu C, Kalesh KA, He Y, Lin Q, Wong WSF. Artemisinin as an anticancer drug: Recent advances in target profiling and mechanisms of action. *Med Res Rev*. 2017. 37: 1492-1517.
- Xu G, Huang YL, Li PL, Guo HM, Han XP. Neuroprotective effects of artemisinin against isoflurane-induced cognitive impairments and neuronal cell death involve JNK/ERK1/2 signalling and improved hippocampal histone acetylation in neonatal rats. *J Pharm Pharmacol*. 2017. 69: 684-697.
- Yao Y, Guo Q, Cao Y, Qiu Y, Tan R, Yu Z. Artemisinin derivatives inactivate cancer-associated fibroblasts through sup-pressing TGF-β signaling in breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018. 37: 282.
- Yoon SS, Kwon HW, Shin JH, Rhee MH, Park CE, Lee DH. Anti-thrombotic effects of artesunate through regulation of cAMP and PI3K/MAPK pathway on human platelets. *Int J Mol Sci*. 2022. 23: 1586.
- Zeng Z, Xu J, Zheng W. Artemisinin protects PC12 cells against beta-amyloid-induced apoptosis through activation of the ERK1/2 signaling pathway. *Redox Biol*. 2017. 12: 625-633.
- Zhao X, Fang J, Li S, Gaur U, Xing X, Wang H. Artemisinin Attenuated Hydrogen Peroxide (H₂O₂)-Induced Oxidative Injury in SH-SY5Y and Hippocampal Neurons via the Activation of AMPK Pathway. *Int J Mol Sci*. 2019. 20: 2680.

<https://doi.org/10.15616/BSL.2024.30.3.162>

Cite this article as: Lee DH. Anti-platelet Effects of Artemisinin through Regulation of Cyclic Nucleotide on Collagen-induced human Platelets. *Biomedical Science Letters*. 2024. 30: 162-168.