

콜라겐-유도의 사람 혈소판에서 PI3K/Akt 및 MAPK 조절을 통한 Isoscopoletin의 항혈소판 효과

이동하*

남서울대학교 임상병리학과·분자진단연구소

Anti-platelet Effects of Isoscopoletin through Regulation of PI3K/Akt and MAPK on Collagen-induced Human Platelets

Dong-Ha Lee*

Department of Biomedical Laboratory Science, Molecular Diagnostics Research Institute, Namseoul University

Abstract – When blood vessels are damaged, a rapid hemostatic reaction occurs to minimize blood loss and maintain normal circulation. Platelet activation and aggregation is essential in this process. However, excessive platelet aggregation or abnormal platelet aggregation may be the cause of cardiovascular disease, such as thrombosis, stroke and atherosclerosis. Therefore, it is important to prevent and treat cardiovascular disease by finding substances that can regulate platelet activation and suppress aggregation reactions. Isoscopoletin, which is mainly found in the roots of plants *Artemisia* or *Scopolia*, has been reported to have potential pharmacological effects on anticancer and Alzheimer’s disease, but its role and mechanisms for platelet aggregation and thrombus formation are unknown. This study confirmed the effect of isoscopoletin on major regulation of collagen-induced human platelet aggregation, TXA₂ production and intracellular granular secretion (ATP and serotonin release). In addition, the effects of isoscopoletin on phosphorylation of phosphorylated proteins PI3K/Akt and MAPK involved in signal transduction in platelet aggregation was studied. As a result, isoscopoletin significantly inhibited the phosphorylation of PI3K/Akt and MAPK, significantly inhibiting platelet aggregation through TXA₂ production and intracellular granular secretion (ATP and serotonin release). Therefore, we suggest that isoscopoletin is an anti-platelet substance that regulates phosphorylation of phosphorus proteins such as PI3K/Akt and MAPK and is valuable as a preventive and therapeutic agent for platelet-derived cardiovascular disease.

Keywords – Isoscopoletin, PI3K/Akt, MAPK, TXA₂, Granule secretion

혈액은 각 장기와 조직에 산소와 영양분을 공급함과 동시에 폐기물 제거를 지원함으로써 생존에 절대적인 역할을 하며, 이 작업을 정상적으로 수행하려면 혈액 순환이 원활해야 한다. 따라서, 혈관이 손상되면 혈액 손실을 최소화하고 정상적인 순환을 원활하게 유지하기 위해 빠른 지혈 반응이 일어나며, 이 과정은 혈소판의 활성화 및 응집으로 시작된다. 그러나, 혈소판의 과다 또는 비정상적인 응집은 혈전증, 뇌졸중 및 죽상 동맥 경화증과 같은 심혈관 질환의 원인이 될 수 있다. 따라서, 혈소판의 활성화를 조절하고 응집을 억제 할 수 있는 물질을 찾는 것이 심혈관 질환의 예방 및 치료에 중요하다.^{1,2)} 혈관이 손상되면 혈소판이 부상

부위로 모집되어 혈관 활성화제(collagen, ADP 및 thrombin 등)에 의해 활성화된다. 이때, 혈소판 막에서 활성화 된 phospholipase C는 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate를 inositol 1,4,5-triphosphate(IP₃) 및 diacylglycerol(DG)로 가수 분해하고, 생성 된 IP₃는 혈소판 내 dense tubular system에 위치한 Ca²⁺ 채널을 열어 세포질 내 Ca²⁺ 농도를 증가시킨다.³⁾ 혈소판이 활성화 될 때, 세포질 막의 phospholipase A₂(cPLA₂)에 의해 가수 분해된 arachidonic acid은 TXA₂ synthase(TXAS)와 cyclooxygenase-1(COX-1)의 효소 작용으로 인해 TXA₂로 전환되고 혈소판으로부터 분비된다.^{4,5)} 방출 된 TXA₂는 다른 혈소판 막 수용체에 결합하여 지속적으로 혈소판 응집을 촉진하는 작용제로서 기능한다고 알려져 있다.⁶⁾ 또한, TXA₂의 유사 체인 U46619(9,11-dideoxy-9a.la-methanoepoxy prostaglandin F2a)는 세포질에서 Ca²⁺

*교신저자(E-mail): dhlee@nsu.ac.kr
(Tel): +82-41-580-2148

수준을 증가시켜 myosin light chains와 pleckstrin을 인산화하여 혈소판 응집을 유도하는 것으로 알려져 있다.^{7,8)}

Mitogen-activated protein kinases(MAPK)는 세포 내 신호 전달에 작용하는 것으로 알려진 인산화 효소로서, c-Jun N-terminal kinase(JNK), extracellular signal-regulated kinase(ERK) 및 p38 MAPK로 분류되며, 이들의 역할은 꾸준히 연구되어 왔다.⁹⁾ JNK, ERK 및 p38 MAPK는 사람 혈소판에서 검출되고 여러 작용제가 유발하는 단백질 인산화에 의해 활성을 갖는 것으로 보고되어 있다.¹⁰⁻¹²⁾ 이 신호 전달 분자의 인산화는 혈소판 과립 분비를 유도하는 데 중요한 역할을 하는 것으로 잘 알려져 있다.^{13,14)} 또한 MAPK는 세포막에 위치한 cPLA₂를 인산화하여 혈소판 막의 인지질에서 arachidonic acid을 생성하여 TXA₂로 변환되어 다른 혈소판의 활성화 및 응집을 유발하는 것으로 알려져 있다.^{15,16)} 또한, PI3K/Akt 경로는 혈소판에서 dense 과립의 분비 및 혈소판 응집을 포함하여 혈소판 기능의 조절에 중요한 역할을 보여주었다.¹⁷⁾

Scopolia 또는 *Artemisia* 속 식물의 뿌리에서 주로 발견되는 isoscapoletin은 항암 및 Alzheimer's disease에 도움이 될 수 있는 잠재적인 약리학적 특성에 대해 연구된 바 있다.^{18,19)} 이전의 연구에 따르면, isoscapoletin과 유사한 구조를 가진 물질인 scoparone은 PI3K/Akt/NF- κ B 경로를 조절함으로써 IL-1 β 매개의 염증 반응을 억제한다고 보고된 바 있다.²⁰⁻²²⁾ 그러나, 혈소판 활성화에서 isoscapoletin의 역할 및 사람 혈소판 응집에서 isoscapoletin의 작용기전은 알려져 있지 않다. 이 연구에서는 collagen이 유도한 혈소판 응집 및 이 과정에 중요한 인자들로 알려진 TXA₂ 생성, 혈소판에서의 과립 분비, PI3K/Akt 및 MAPK의 인산화 단백질에 대한 isoscapoletin의 효과를 확인하였다.

재료 및 방법

시약 - Isoscapoletin(6-hydroxy-7-methoxy-2H-chromen-2-one)은 Avention Corporation(Seoul, Korea)에서 구입했다(Fig. 1). Collagen은 Chrono-Log Corporation(PA, Havertown, USA)로부터 제공 받았다. TXB₂ enzyme immunoassay(EIA) kit, ATP assay kit 및 serotonin EIA kit는 Cayman

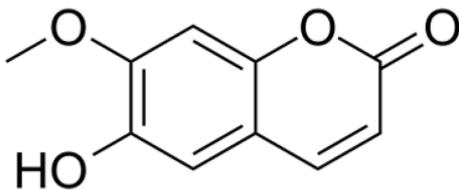


Fig. 1. The structure of isoscapoletin. PIN: 6-hydroxy-7-methoxy-2H-chromen-2-one, Chemical formula: C₁₀H₈O₄, Molar mass: 192.17 g/mol.

Chemical Co.(Ann Arbor, MI, USA)에서 구입하였다. 다른 시약은 Sigma Chemical Corporation(St. Louis, MO, USA)에서 구입 하였다. Western blotting에 사용된 antibodies 및 lysis buffers는 Cell Signaling(Beverly, MA, USA)로부터 입수하였다. Enhanced chemiluminescence solution(ECL) 및 polyvinylidene difluoride(PVDF) membrane은 General Electric Healthcare(Chalfont St. Giles, Buckinghamshire, UK)로부터 구입 하였다.

세척된 사람 혈소판의 제조 - 대한 적십자사 혈액원(수원)에서 사람 혈소판이 풍부한 혈장(Platelet Rich Plasma, PRP)을 제공받았다. 세척된 혈소판은 이전에 수행한 방법에 따라 준비되었다.²³⁾ PRP를 1,300 ×g에서 10분 동안 원심 분리하여 혈소판을 모은 후, 세척 완충액(138 mM NaCl, 12 mM NaHCO₃, 0.36 mM NaH₂PO₄, 2.7 mM KCl, 5.5 mM glucose 및 1 mM Na₂EDTA, pH 6.9)으로 2회 세척하였다. 세척한 혈소판을 현탁액 완충액(138 mM NaCl, 12 mM NaHCO₃, 0.36 mM NaH₂PO₄, 2.7 mM KCl, 0.49 mM MgCl₂, 5.5 mM glucose, 0.25% gelatin, pH 7.4)으로 현탁시켜 10⁸ cells/mL의 최종 농도로 준비하였다. 저온에서 혈소판 응집을 피하기 위하여 모든 과정을 25°C에서 수행하였으며, 이 실험은 남서울대학교의 생명윤리 기관 검토위원회(IRB)의 승인을 받아 수행되었다(1041479-HR-201803-003).

혈소판 응집능 측정 - 세척된 혈소판(10⁸ cells/mL)에 isoscapoletin을 전처리 하거나 하지 않고 2 mM CaCl₂을 첨가하여 37°C에서 총 3분 동안 예비 배양한 다음, collagen (2.5 μg/mL)을 첨가하여 자극하였다. 혈소판 응집 분석을 수행하기 위해, aggregometer에서 5분 동안 반응을 확인하였다. 혈소판 응집률(%)은 광 투과율의 증가에 의해 결정되었다. isoscapoletin을 0.1% dimethyl sulfoxide(DMSO)의 용액을 사용하여 용해시켰고, isoscapoletin을 전처리 하지 않은 대조군에도 동량의 DMSO를 첨가하여 실험하였다.

세포 독성 측정 - 세포 독성은 세포질로부터 누출되는 lactate dehydrogenase(LDH)를 통해 측정되었다. 사람 세척 혈소판(10⁸ cells/mL)을 다양한 농도의 isoscapoletin과 함께 실온에서 2시간 동안 배양한 다음, 12,000 ×g에서 2분 동안 실온에서 원심분리 하여 상층을 분리하였고, 상층액을 490 nm의 광학 파장에서 LDH assay kit(Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA)를 사용하여 측정하였다.

TXB₂의 측정 - 세척된 혈소판(10⁸ cells/mL)의 배양을 다양한 농도의 isoscapoletin을 첨가 한 후 37°C에서 3분 동안 수행 한 후, 2 mM CaCl₂를 첨가하고 5분 동안 collagen (2.5 μg/mL)으로 자극하였다. TXB₂은 TXA₂의 안정적인 대사 산물이기 때문에 TXB₂을 측정하는 것으로 TXA₂의 생성량을 확인할 수 있으며, TXB₂ EIA kit를 사용하여 synergy HT multi-reader(BioTek Instruments, Winooski, VT, USA)로 측정하였다.

ATP 및 Serotonin 방출량 측정 - 세척된 혈소판(10^8 cells/mL)을 다양한 농도의 isoscoipoletin을 첨가하여 37°C에서 3분 동안 배양한 후, 2 mM CaCl₂를 첨가하고 collagen (2.5 µg/mL)으로 5분 동안 자극 하였다. Ice-cold 2 mM EDTA를 처리하여 반응을 정지시킨 후, 원심 분리에 의해 상층을 분리시키고, 상층액에 방출된 ATP 및 serotonin을 ATP assay kit 및 serotonin EIA kit를 사용하여 synergy HT multi-reader(BioTek Instruments, Winooski, VT, USA)로 측정하였다.

Western Immunoblotting - 혈소판 응집반응을 1x lysis buffer를 첨가하여 종결하였다. 혈소판 용 해물의 단백질 농도를 측정하고 평가하기 위해 BCA protein assay kit(Pierce Biotechnology, IL, USA)를 사용하였다. 단백질(20 µg)을 4~20% SDS-PAGE를 통해 분리 한 후, PVDF 막으로 옮겼다. 1차 항체에 대해 1:1,000의 희석이 설정되었고, 2차 항체에 대해 1:2,000의 희석이 설정되었다. ECL 시약(General Electric Healthcare, Buckinghamshire, UK)의 사용으로 단백질 밴드를 시각화하였다.

통계 분석 - 실험 결과는 평균±표준편차를 사용하여 표현되었다. 통계 분석은 ANOVA 또는 Student's t-test를 사용하여 완료하였다. 분산 분석에 따라 그룹 평균간에 유의 한 차이가 있는 경우 Scheffe의 방법을 사용하여 그룹을 비교하였다.

결 과

Collagen 유도인 사람 혈소판 응집에 대한 Isoscoipoletin의 효과 - 혈소판을 2.5 µg/mL collagen으로 처리하여 응집을 유도할 때, 응집 률은 98.0±2.0%였다. Isoscoipoletin을 다양한 농도(10~500 µM)로 첨가하였을 때, collagen에 의한 증가된 응집이 isoscoipoletin의 100 µM 이상에서 세포 독성 없이 용량 의존적으로 억제되었고, 양성대조군으로 항혈소판 물질인 ticagrelor 10 µM의 혈소판 응집억제 효과와 비교하여 나타내었다(Fig. 2A, C). 이 때, isoscoipoletin의 half-maximal inhibitory concentration(IC₅₀)는 240.93 µM로 산출되었다(Fig. 2B). 이는 isoscoipoletin이 collagen-유도 혈소판 응집에 강력한 억제 효과를 갖는다는 것을 보여준다.

TXA₂ 생성에 대한 Isoscoipoletin의 효과 - 혈소판 응집을 증폭시키는 autacoid인 TXA₂의 생성에 대한 isoscoipoletin의 효과를 확인하였다. Fig. 3에 나타난 바와 같이, 유도되지 않은 세포에서 14.02±0.62 ng/10⁸ cells인 TXA₂ 생산은 collagen에 의해 92.43±9.46 ng/10⁸ cells로 증가되었다. 그러나, isoscoipoletin(100, 200 및 300 µM)은 TXA₂ 생성을 각각 47.52±2.71, 25.24±4.94, 및 15.40±1.86 ng/10⁸ cells로 크게 감소시켰다(Fig. 3).

ATP 및 Serotonin 방출에 대한 Isoscoipoletin의 효과 - 혈소판에서의 과립 방출의 지표로서 혈소판 응집과 관련된

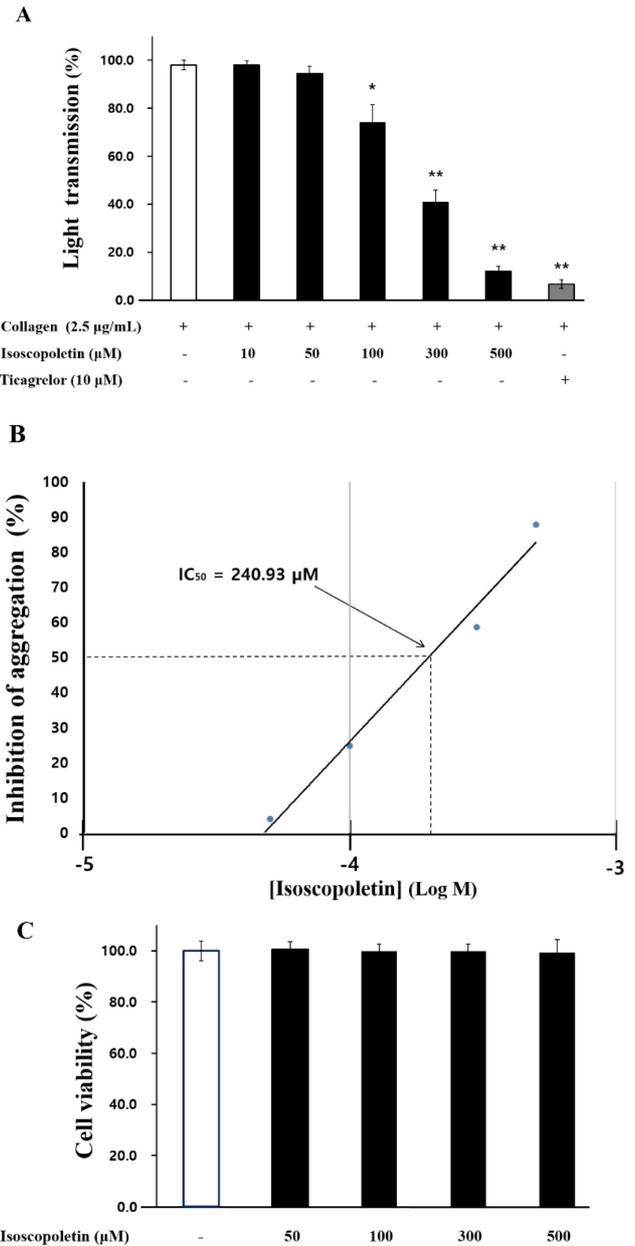


Fig. 2. Effects of isoscoipoletin on collagen-induced platelet aggregation. (A) Effects of isoscoipoletin pretreatment on collagen-stimulated platelet aggregation. (B) IC₅₀ value of isoscoipoletin on collagen-induced platelet aggregation. (C) Cytotoxicity of isoscoipoletin on human platelets. Data are expressed as mean±SD (n=4). *p<0.05, **p<0.001 compared with the collagen-stimulated platelets.

ATP 및 serotonin의 방출에 대한 isoscoipoletin의 효과를 확인하였다. 결과적으로 collagen(2.5 µg/mL)은 손상되지 않은 세포에서 0.21±0.02 µM의 ATP 방출을 8.86±0.12 µM로 ATP 방출을 강하게 증가시켰지만, 증가 된 ATP 방출은 isoscoipoletin(100, 200 및 300 µM)에 의해 크게 억제되었다

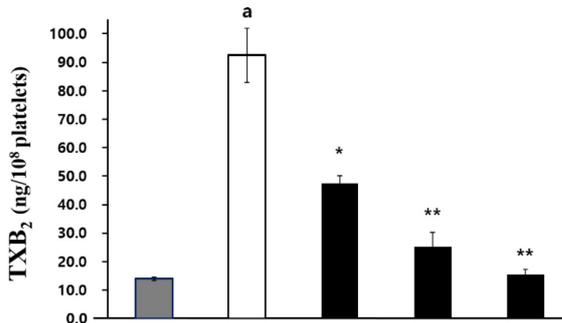


Fig. 3. Effects of isoscooletin on TXB₂ production. Measurement of TXB₂ production was described in “Materials and Methods” section. Data are expressed as mean±SD (n=4). ^a*p*<0.05 compared with no-stimulated platelets, ^{*}*p*<0.05, ^{**}*p*<0.001 compared with the collagen-stimulated platelets.

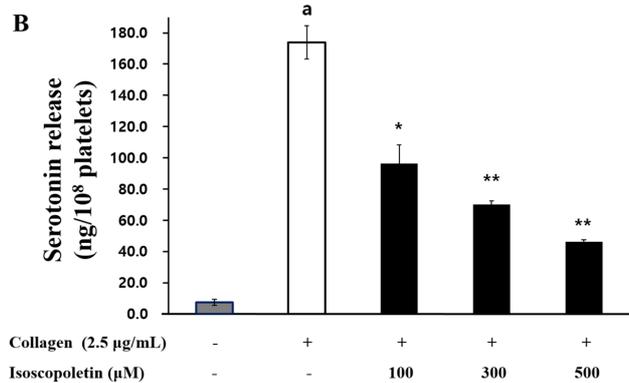
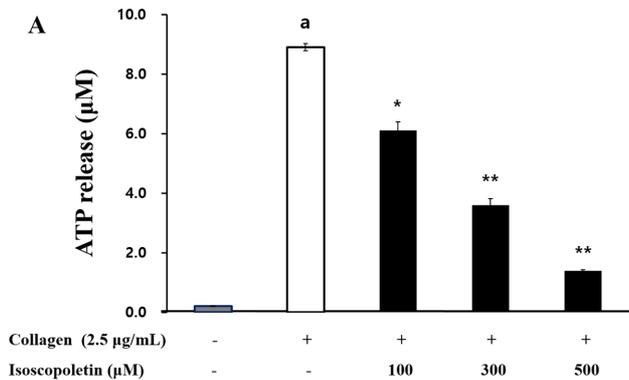


Fig. 4. Effects of isoscooletin on granule secretion. (A) Effects of isoscooletin on ATP release. (B) Effects of isoscooletin on serotonin release. Measurement of ATP and serotonin release was described in “Materials and Methods” section. Data are expressed as mean±SD (n=4). ^a*p*<0.05 compared with no-stimulated platelets, ^{*}*p*<0.05, ^{**}*p*<0.001 compared with the collagen-stimulated platelets.

(Fig. 4A). 또한, collagen(2.5 µg/mL)은 손상되지 않은 세포의 7.38±1.99 ng/10⁸ cells의 serotonin 방출을 173.90±10.77 ng/10⁸ cells로 증가시켰다. 그러나, isoscooletin(100, 200 및

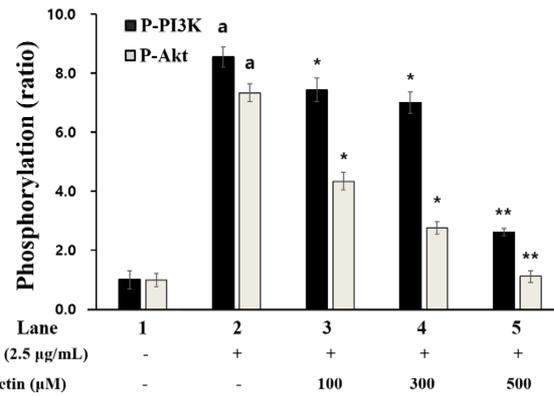
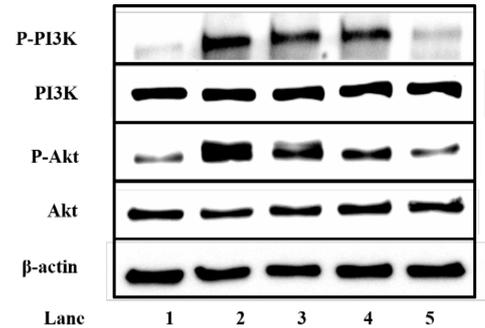


Fig. 5. Effects of isoscooletin on PI3K and Akt phosphorylation. Western blotting was determined as described in “Materials and Methods” section. Data are expressed as mean±SD (n=4). ^a*p*<0.05 compared with no-stimulated platelets, ^{*}*p*<0.05, ^{**}*p*<0.001 compared with the collagen-stimulated platelets.

300 µM)은 collagen에 의해 증가된 serotonin 방출을 96.33 ±11.82, 70.10±2.15 및 46.38±1.01 ng/10⁸ cells로 각각 감소시켰다(Fig. 4B). 이 결과들은 isoscooletin이 혈소판 내 과립 분비를 유의하게 억제한다는 것을 보여준다.

PI3K 및 Akt 인산화에 대한 Isoscooletin의 효과 - 혈소판으로부터 과립의 방출에 관여하는 단백질인 PI3K 및 Akt의 인산화에 미치는 isoscooletin의 효과를 확인하였다. Fig. 5에 나타난 바와 같이, collagen은 손상받지 않은 세포와 비교하여 PI3K의 인산화를 유의하게 증가시켰다. 그러나, collagen에 의해 증가된 PI3K의 인산화는 100 µM 이상의 isoscooletin에 의해 유의하게 감소되었다(Fig. 5). 또한, collagen은 PI3K 표적분자로 알려진 Akt의 인산화를 유의적으로 증가시켰지만, 100 µM 이상의 isoscooletin에 의해 유의하게 감소되었다(Fig. 5). 이는 isoscooletin이 collagen에 의해 증가된 PI3K 및 Akt의 인산화를 억제한다는 것을 보여준다.

MAPK 인산화에 대한 Isoscooletin의 효과 - 혈소판 과립 방출 및 TXA₂ 생성에 관여하는 단백질 MAPK(ERK, JNK 및 p38)의 인산화에 미치는 isoscooletin의 효과를 확인하였다. Fig. 6에 나타난 바와 같이, collagen은 손상받지

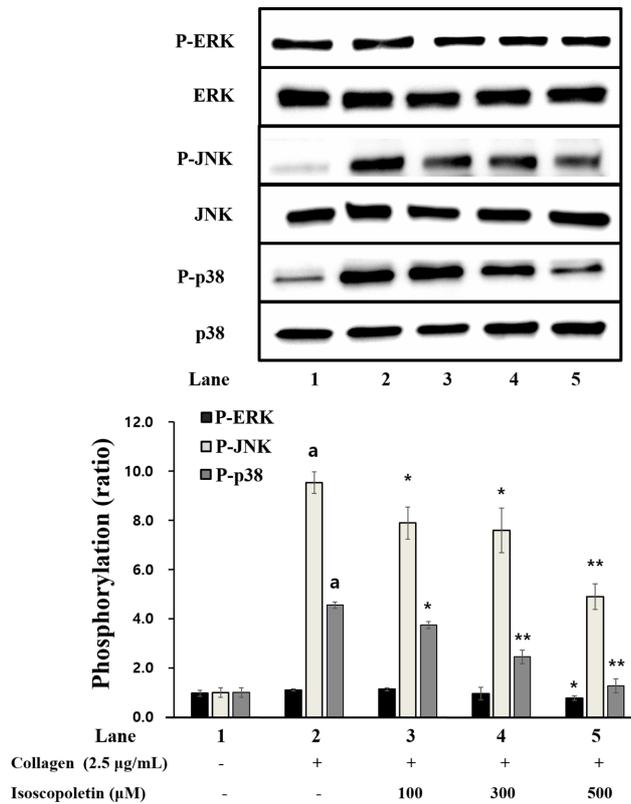


Fig. 6. Effects of isoscoipoletin on MAPK phosphorylation. Western blotting was determined as described in “Materials and Methods” section. Data are expressed as mean±SD (n=4). ^ap<0.05 compared with no-stimulated platelets, ^{*}p<0.05, ^{**}p<0.001 compared with the collagen-stimulated platelets.

않은 세포와 비교하여 JNK 및 p38의 인산화를 유의하게 증가시켰지만 ERK의 인산화에는 유의미한 영향을 미치지 않았다. 또한, collagen에 의해 증가된 JNK 및 p38의 인산화는 각각 100 μM 이상의 isoscoipoletin에 의해 유의하게 억제되었다(Fig. 6). 또한, isoscoipoletin은 500 μM에서 ERK 인산화를 유의하게 억제했다(Fig. 6). 이는 isoscoipoletin이 MAPK로 알려진 ERK, JNK 및 p38의 인산화를 억제하여 혈소판 응집의 신호 과정을 조절한다는 것을 보여준다.

고찰

혈소판 응집에 대한 isoscoipoletin의 효과 및 다양한 신호 전달 물질, 특히, phosphoprotein에 관련한 연구는 알려진 바가 없기에 본 연구에서는 collagen 유도의 혈소판 응집에 대한 isoscoipoletin의 효과를 명확히 하고자 하였다.

PI3K/Akt 경로는 혈소판 신호 전달에서 기능하는 단백질로 잘 알려져 있으며, 이들의 인산화는 혈소판 내 dense 과립의 분비 및 혈소판 응집을 포함하여 혈소판 기능의 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다.¹⁷⁾ 또한, mitogen-

activated protein kinases(MAPK)는 extracellular signal-regulated kinase(ERK), c-Jun N-terminal kinase(JNK) 및 p38 MAPK를 포함하는 인산화 효소로서 혈소판 활성화 및 응집에 관련한다고 알려져 있다.⁹⁾ MAPK는 사람 혈소판에서 검출되며 혈소판이 여러 작용제에 의해 활성화 될 때 인산화를 통해 활성화되는 것으로 보고되었다.¹⁰⁻¹²⁾ Mei-Chi 등의 연구에 따르면 p38과 같은 MAPK의 인산화는 TXA₂의 전구체인 arachidonic acid의 방출 및 TXA₂의 생성에 중요하며 혈소판 응집과 관련한다고 보고되었다. 혈소판 억제 활성화에 대한 성분 또는 물질을 평가할 때 중요한 지표로서 TXA₂의 생성인데, 이는 TXA₂가 다른 혈소판을 추가로 활성화하고 응집시키는 강력한 autacoid로 역할을 하기 때문이다.²⁴⁾ 따라서, TXA₂의 생성을 억제하는 물질이 항 혈소판 물질로서 유용하게 사용되며, 그 예로 aspirin 및 ozagrel과 같은 물질이 알려져 있다.^{25,26)}

본 연구에서 isoscoipoletin은 collagen에 의한 혈소판 응집에 대해 농도 의존적으로 억제 효과를 가지며, IC₅₀은 240.93 μM로 나타났다(Fig. 2). 이는 isoscoipoletin과 유사하게 *Artemisia* 및 *Scopolia* 속 식물의 뿌리에서 추출할 수 있는 물질로 알려진 scoparone이 가지는 collagen 유도의 혈소판 응집억제 효과(IC₅₀은 46.52 μM)에 비해서는 약한 것으로 보인다.²⁷⁾

혈소판 응집에서 중요한 지표인 TXA₂의 생성 및 혈소판 과립 분비(ATP 및 serotonin 방출)에 대한 isoscoipoletin의 효과를 측정 하였다. 또한, 본 연구에서는 isoscoipoletin과 PI3K/Akt 및 MAPK의 인산화 사이의 관계를 밝히고자 하였다. 그 결과, isoscoipoletin은 collagen에 의한 TXA₂의 증가를 억제하였고, 세포 내 과립 분비의 지표인 ATP와 serotonin의 방출을 크게 감소시켰다(Fig. 3, 4) 또한, 신호 분자로서 혈소판 활성화를 조절하는 것으로 알려진 단백질인 PI3K/Akt 및 MAPK의 인산화가 isoscoipoletin에 의해 현저히 억제됨을 확인하였다. 특히, MAPK에서 ERK의 경우, collagen에 의해 인산화가 강하게 유발되지 않았으며, isoscoipoletin에 의한 억제 효과도 약한 편이었다(Fig. 6). 혈소판 응집을 억제하는 물질에서 ERK의 인산화 억제 정도가 JNK 나 p38보다 약하다는 결과가 있으며,²⁸⁾ ERK 경로의 억제는 작용제-유도의 사람 혈소판 응집에 영향을 미치지 않는 것으로 보고된 바가 있다.²⁹⁾ 이와 관련하여, MAPK의 ERK, JNK 및 p38의 인산화가 사람 혈소판의 응집 억제에 어떻게 관여하는지에 대한 추가 연구가 필요한 것으로 보인다. 어쨌든, 본 연구의 결과를 통해 isoscoipoletin이 PI3K/Akt 및 MAPK와 같은 단백질의 인산화를 억제함으로써 TXA₂ 생성 및 세포 내 과립 분비(ATP 및 serotonin 방출)를 감소시켜 혈소판 응집을 억제한다는 것을 확인하였다.

결론적으로, 우리는 isoscoipoletin이 PI3K/Akt 및 MAPK와 같은 신호전달 과정에 관여하는 phosphoproteins의 인산

화를 조절하는 항혈소판제로서 가치가 있음을 확인하였다. 따라서, isoscapoletin은 혈소판 응집에 의해 야기되는 심혈관 질환에서 효과적인 치료제 및 예방제로서 가치가 있음을 제안한다.

사 사

Funding for this paper was provided by Namseoul University.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

인용문헌

- Jackson, S. P. (2011) Arterial thrombosis? insidious, unpredictable and deadly. *Nat. Med.* **17**: 1423-1436.
- Schwartz, S. M., Heimark, R. L. and Majesky, M. W. (1990) Developmental mechanisms underlying pathology of arteries. *Physiol. Rev.* **70**: 1177-1209.
- Payrastre, B., Missy, K., Trumel, C., Bodin, S., Plantavid, M. and Chap, H. (2000) The integrin alpha IIb/beta 3 in human platelet signal transduction. *Biochem. Pharmacol.* **60**: 1069-1074.
- Morello, F., Perino, A. and Hirsch, E. (2009) Phosphoinositide 3-kinase signalling in the vascular system. *Cardiovasc. Res.* **82**: 261-271.
- Jennings, L. K. (2009) Role of platelets in atherothrombosis. *Am. J. Cardiol.* **103**: 4A-10A.
- Sabatine, M. S. and Jang, I. K. (2000) The use of glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in patients with coronary artery disease. *Am. J. Med.* **109**: 224-237.
- Cattaneo, M., Tenconi, P. M., Lecchi, A. and Mannucci, P. M. (1991) In vitro effects of picotamide on human platelet aggregation, the release reaction and thromboxane B2 production. *Thromb. Res.* **62**: 717-724.
- Su, C. Y., Shiao, M. S. and Wang, C. T. (1999) Differential effects of ganodermic acid S on the thromboxane A2-signaling pathways in human platelets. *Biochem. Pharmacol.* **58**: 587-595.
- Adam, F., Kauskot, A., Rosa, J. P. and Bryckaert, M. (2008) Mitogenactivated protein kinases in hemostasis and thrombosis. *J. Thromb. Haemost.* **6**: 2007-2016.
- Bugaud, F., Nadal-Wollbold, F., Lévy-Toledano, S., Rosa, J. P. and Bryckaert, M. (1990) Regulation of c-jun-NH2 terminal kinase and extracellular-signal regulated kinase in human platelets. *Blood* **94**: 3800-3805.
- Kramer, R. M., Roberts, E. F., Strifler, B. A. and Johnstone, E. M. (1995) Thrombin induces activation of p38 MAP kinase in human platelets. *J. Biol. Chem.* **270**: 27395-27398.
- Nadal-Wollbold, F., Pawlowski, M., Lévy-Toledano, S., Berrou, E., Rosa, J. P. and Bryckaert, M. (2002) Platelet ERK2 activation by thrombin is dependent on calcium and conventional protein kinases C but not Raf-1 or B-Raf. *FEBS Lett.* **531**: 475-482.
- Patrono, C. (1994) Aspirin as an antiplatelet drug. *N. Engl. J. Med.* **330**: 1287-1294.
- Flevaris, P., Li, Z., Zhang, G., Zheng, Y., Liu, J. and Du, X. (2009) Two distinct roles of mitogen-activated protein kinases in platelets and a novel Rac1-MAPK-dependent integrin outside-in retractile signaling pathway. *Blood* **113**: 893-901.
- Kramer, R. M., Roberts, E. F., Um, S. L., Börsch-Haubold, A. G., Watson, S. P., Fisher, M. J. and Jakubowski, J. A. (1996) p38 mitogenactivated 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.
- McNicol, A. and Shibou, T. S. (1998) Translocation and phosphorylation of cytosolic phospholipase A2 in activated platelets. *Thromb. Res.* **92**: 19-26.
- Chuang, W. Y., Kung, P. H., Kuo, C. Y. and Wu, C. C. (2013) Sulforaphane prevents human platelet aggregation through inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Thromb. Haemost.* **109**: 1120-1130.
- Ali, M. Y., Jannat, S., Jung, H. A., Choi, R. J., Roy, A. and Choi, J. S. (2016) Anti-Alzheimer's disease potential of coumarins from *Angelica decursiva* and *Artemisia capillaris* and structure-activity analysis. *Asian. Pac. J. Trop. Med.* **9**: 103-111.
- Dong, J., Yuan, J., Wang, J. L., Ji, R. F., Quan, Q. H., Guo, X. Y., Gao, J. and Liu, Y. G. (2017) Study on screening anti-tumor active fractions and chemical components in active fractions from root of *Anacyclus pyrethrum*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **42**: 3932-3937.
- Huang, H. C., Chu, S. H. and Chao, P. D. (1991) Vaso-relaxants from Chinese herbs, emodin and scoparone, possess immunosuppressive properties. *Eur. J. Pharmacol.* **198**: 211-213.
- Huang, H. C., Lee, C. R., Weng, Y. I., Lee, M. C. and Lee, Y. T. (1992) Vasodilator effect of scoparone (6,7-dimethoxycoumarin) from a Chinese herb. *Eur. J. Pharmacol.* **218**: 123-128.
- Lu, C., Li, Y., Hu, S., Cai, Y., Yang, Z. and Peng, K. (2018) Scoparone prevents IL-1 β -induced inflammatory response in human osteoarthritis chondrocytes through the PI3K/Akt/NF- κ B pathway. *Biomed. Pharmacother.* **106**: 1169-1174.
- Shin, J. H., Kwon, H. W. and Lee, D. H. (2019) Ginsenoside F4 inhibits platelet aggregation and thrombus formation by dephosphorylation of IP3RI and VASP. *J. Appl. Biol. Chem.* **62**: 93-100.

24. Chang, M. C., Wang, T. M., Yeung, S. Y., Jeng, P. Y., Liao, C. H., Lin, C. C., Lin, B. R. and Jeng, J. H. (2011) Anti-platelet effect by p-cresol, a uremic and environmental toxicant, is related to inhibition of reactive oxygen species, ERK/p38 signaling and thromboxane A2 production. *Atherosclerosis* **219**: 559-565.
25. Cipollone, F., Patrignani, P., Greco, A., Panara, M. R., Padovano, R., Cucurullo, F., Patrono, C., Rebuzzi, A. G., Liuzzo, G., Quaranta, G. and Maseri, A. (1997) Differential suppression of thromboxane biosynthesis by indobufen and aspirin in patients with unstable angina. *Circulation* **96**: 1109-1116.
26. Patrono, C. (2001) Aspirin: new cardiovascular uses for an old drug. *Am. J. Med.* **110**: 62S-65S.
27. Lee, D. H. (2020) Inhibitory effects of scoparone through regulation of PI3K/Akt and MAPK on collagen-induced human platelets. *J. Appl. Biol. Chem.* **63**: 131-136.
28. Irfan, M., Jeong, D., Saba, E., Kwon, H. W., Shin, J. H., Jeon, B. R., Kim, S., Kim, S. D., Lee, D. H., Nah, S. Y. and Rhee, M. H. (2019) Gintonin modulates platelet function and inhibits thrombus formation via impaired glycoprotein VI signaling. *Platelets* **30**: 589-598.
29. McNicol, A. and Jackson, E. C. (2003) Inhibition of the MEK/ERK pathway has no effect on agonist-induced aggregation of human platelets. *Biochem. Pharmacol.* **65**: 1243-1250.
- (2020. 6. 6 접수; 2020. 6. 23 심사; 2020. 7. 28 게재확정)