



Artesunate inhibits collagen-induced human platelets aggregation through regulation of PI3K/Akt and MAPK pathway

Dong-Ha Lee

PI3K/Akt 및 MAPK 기전 조절을 통한 Artesunate의 콜라겐 유도인인 사람 혈소판 응집 억제효과

이동하

Received: 17 January 2022 / Accepted: 2 March 2022 / Published Online: 31 March 2022
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2022

Abstract Excessive activation and aggregation of platelets is a major cause of cardiovascular disease. Therefore, inhibition of platelet activation and aggregation is considered an attractive therapeutic target in preventing and treating cardiovascular diseases. In particular, strong platelet activation and aggregation by collagen secreted from the vascular endothelium are characteristic of vascular diseases. Artesunate is a compound extracted from the plant roots of *Artemisia* or *Scopolia* species, and has been reported to be effective in anticancer and Alzheimer's disease fields. However, the effect and mechanism of artesunate on collagen-induced platelet activation and aggregation have not been elucidated. In this study, the effect of artesunate on collagen-induced human platelet aggregation was confirmed and the mechanism of action of artesunate was clarified. Artesunate inhibited the phosphorylation of PI3K/Akt and Mitogen-activated protein kinases, which are phosphoproteins that are known to act in the signal transduction process when platelets are activated. In addition, artesunate decreased TXA₂ production and decreased granule secretion in platelets such as ATP and serotonin release.

As a result, artesunate strongly inhibited platelet aggregation induced by collagen, a strong aggregation inducer secreted from vascular endothelial cells, with an IC₅₀ of 106.41 μM. These results suggest that artesunate has value as an effective antithrombotic agent for inhibiting the activation and aggregation of human platelets through vascular injury.

Keywords Artesunate · Granule secretion · Mitogen-activated protein kinases · PI3K/Akt · Platelet aggregation · TXA₂

서론

사람은 혈액을 통해 각 장기와 조직으로 산소와 영양분을 공급 받음과 동시에 폐기물 제거가 이루어지기에 정상적인 혈액순환은 생존에 있어 필수적이다. 만일, 혈관의 손상이 일어나면 우리 몸은 출혈을 최소화하고 정상적인 혈액순환을 유지하고자 지혈 반응이 일어나는데, 혈소판의 활성화 및 응집의 과정이 그 시작점이다. 그러나, 과다하거나 비정상적으로 혈소판의 활성화와 응집이 일어나는 경우, 오히려 뇌졸중, 죽상 동맥 경화증 및 혈전증 등의 심혈관계 질환을 일으키는 원인이 되기도 한다. 그러므로, 혈소판의 활성화와 응집을 적절히 억제할 수 있는 물질의 발굴이 심혈관계 질환에 대한 치료 및 예방에 있어서 중요하다 알려져 있다[1,2]. 혈관이 손상 받았을 경우, 혈소판이 손상된 부위에서 노출된 혈소판 자극유도제(collagen, thrombin 및 ADP 등)에 의해 활성화된다. 특히, collagen은 혈관 손상 시 혈관 내피 세포에서 방출되는 물질로서, 혈소판 막 수용체인 glycoprotein VI (GP VI)에 결합되어 tyrosin kinase 의존성

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

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

기전에 의해 phospholipase C- γ 2 (PLC- γ 2)의 인산화를 유도하여 혈소판을 강력하게 활성화시키는 것으로 알려져 있다[3]. 인산화된 PLC- γ 2는 혈소판의 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate를 diacylglycerol와 inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃)로 가수 분해하여 방출시키고, 세포질 내에 증가된 IP₃는 Ca²⁺ 채널로 작용하는 혈소판 내 dense tubular system의 IP₃ 수용체에 결합하여 Ca²⁺ 채널을 열어줌으로써 세포질 내 Ca²⁺ 농도의 증가를 유도한다[4]. 또한, 혈소판의 활성화 과정에서, phospholipase A₂ (cPLA₂)가 활성화되면 인지질을 가수분해하여 arachidonic acid의 증가를 유도하고, 이는 TXA₂ synthase 및 cyclooxygenase-1의 효소 작용을 거쳐 TXA₂로 만들어져 혈소판 세포 외부로 방출된다[5,6]. 분비된 TXA₂는 주변의 혈소판 막 수용체에 결합함으로써 추가적인 혈소판 응집을 촉발하는 유도제로 기능한다[7]. TXA₂의 유사물질인 U46619가 세포질 내 Ca²⁺ 동원을 유발하여 myosin light chains와 pleckstrin같은 세포골격단백질을 인산화함으로써 혈소판 응집을 일으킨다고 보고되었다[8,9].

세포 내 신호 전달에 작용하는 인산화 효소 중 Mitogen-activated protein kinases (MAPK)의 기능에 대해서 꾸준한 연구가 이루어지고 있다[10], MAPK에 속하는 단백질로 ERK, JNK 및 p38 MAPK로 알려져 있는데 이 신호전달 물질들은 사람 혈소판에서도 확인되고 있으며 혈소판 자극유도제에 의해 인산화됨으로써 활성을 가진다고 보고된 바 있다[11-13]. MAPK의 인산화가 혈소판의 과립 분비를 일으켜 혈소판 응집에도 관여하는 것으로 알려져 있다[14,15]. 그리고, MAPK가 cPLA₂를 인산화를 일으켜 혈소판 막의 인지질로부터 arachidonic acid의 분비를 유도함으로써 TXA₂ 생성 증가를 통해 추가적인 혈소판 응집을 유도한다고도 알려져 있다[16,17]. 인산화 단백질 중에서 PI3K/Akt 경로에 대한 것도 잘 알려져 있는데, 이들의 활성화가 혈소판의 dense 과립 분비를 촉진하여 혈소판 응집을 포함한 혈소판 기능을 조절하는데 역할을 한다고 보고되었다[18].

Artesunate는 *Artemisia* 속 식물의 뿌리에서 유래되는 주요 활성 성분인 artemisinin의 반합성 유도체로 낮은 독성과 내성을 가지는 새로운 항말라리아제로 보고된 바 있다[19]. 또한, artesunate가 항암 활성을 보여 임상에서 전이성 흑색종 환자의 치료에 성공적으로 사용된 바 있다[19]. 앞 선 연구에서 artesunate가 뇌졸중의 범위를 크게 감소시키고 신경학적 회복에 도움을 주어 환자의 생존률을 높인다고 보고된 바도 있다[20]. 그러나, 사람 collagen에 의해 유도한 혈소판 응집에서 artesunate의 기능이나 작용기전에 대해서는 현재까지 알려진 바가 없다. 본 연구는 artesunate가 collagen으로 유도한 혈소판 응집을 억제하는지, 그리고 이 과정에 중요하게 작용하는 PI3K/Akt 및 MAPK의 인산화 단백질 및 TXA₂, 혈소판 과립 분비에 영향을 미치는지 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

시약

Avention Corporation (Incheon, Korea)로부터 artesunate를 입수하였다(Fig. 1). Chrono-Log Corporation (PA, Havertown, USA)에서 collagen을 구입하였다. Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI, USA)가 ATP assay kit, serotonin assay kit,

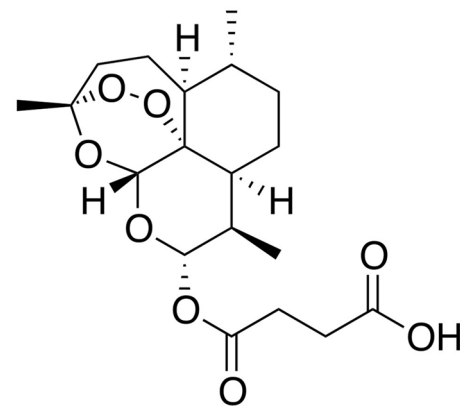


Fig. 1 The structure of artesunate. PIN: 4-oxo-4-[[[(1R, 4S, 5R, 8S, 9R, 10S, 12R, 13R)-1,5,9-trimethyl-11,14,15,16-tetraoxatetracyclo [10.3.1.04, 13.08,13]hexadecan-10-yl]oxy] butanoic acid, Chemical formula: C₁₉H₂₈O₈, Molar mass: 384.425 g/mol

TXB₂ assay kit를 제공하였다. Western blotting을 위한 항체와 lysis buffers를 Cell Signaling (Beverly, MA, USA)에서 구입하였다. Polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane와 Enhanced chemiluminescence solution (ECL)은 Thermo-Fisher Scientific Korea (Seoul, Korea)에서 입수하였다.

세척된 사람 혈소판의 제조

대한 적십자사 경기혈액원(Suwon, Korea)으로부터 사람의 혈소판 풍부 혈장(Platelet Rich Plasma, PRP)을 확보하였다. 세척된 사람 혈소판은 이전에 수행했던 방법에 따라서 준비하였다[21]. PRP를 10분 간 1,300×g에서 원심 분리하여 혈소판만 남기고, 여기에 세척용 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)를 사용하여 2번 세척하였다. 세척된 혈소판은 현탁용 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 부유하여 10⁸ cells/mL의 농도가 되도록 준비하였다. 저온에서 발생할 수 있는 응집을 막기위하여 모든 과정은 실온에서 이루어 졌으며, 남서울대학교의 생명윤리 기관 검토위원회(IRB)가 이 실험에 대해 승인하였다(1041479-HR-201803-003).

혈소판 응집률의 확인

세척한 사람 혈소판(10⁸ cells/mL)에 다양한 농도의 artesunate을 첨가하고 2 mM의 CaCl₂를 처리하여 3분 간 37 °C에서 배양한 후, collagen (2.5 μg/mL)을 첨가함으로써 응집을 유도하였다. Aggregometer에서 5분 동안 응집반응을 확인하였고, 혈소판 응집정도(%)를 빛 투과율의 변화로 측정하였다. Artesunate을 0.1% dimethyl sulfoxide (DMSO)의 용매에 녹여서 사용하였고, artesunate을 처리하지 않은 대조군에는 같은 농도의 DMSO를 첨가하여 DMSO의 영향을 확인하였다.

세포 독성 확인

세포질로부터 분비되어 나오는 lactate dehydrogenase (LDH)를

통해 세포독성을 확인하였다. 세척된 사람 혈소판(10^8 cells/mL)에 다양한 농도의 artesunate를 첨가하여 2시간 동안 실온에서 배양한 다음, 2분 간 $12,000\times g$ 에서 원심분리하여 상층을 분리하였고, 상층액에 분비된 LDH를 LDH assay kit (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA)에 의해 확인하였다.

TXB₂의 확인

세척된 사람 혈소판(10^8 cells/mL)에 다양한 농도의 artesunate을 처리하여 3분 간 37 °C에서 배양한 후, 2 mM의 CaCl₂를 첨가하여 collagen (2.5 µg/mL)으로 5분 간 자극하였다. TXB₂은 TXA₂의 안정적인 대사물질임으로 TXB₂을 확인함으로써 TXA₂의 생성정도를 확인할 수 있다. 따라서, TXB₂ assay kit를 사용하여 synergy HT multi-reader (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA)를 통해 TXA₂의 생성정도를 측정하였다.

ATP 및 serotonin 방출량 측정

세척된 사람 혈소판(10^8 cells/mL)에 다양한 농도의 artesunate을 처리하여 37 °C에서 3분 간 배양한 후, 2 mM의 CaCl₂를 첨가하여 collagen (2.5 µg/mL)으로 5분 간 자극하였다. 이 후, 상층

을 분리하여 분비되어 나온 ATP와 serotonin 정도를 ATP assay kit와 serotonin assay kit를 사용하여 synergy HT multi-reader (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA)를 통해 확인하였다.

Western Immunoblotting

위에서 언급한 혈소판 응집반응을 종결하기 위해 lysis buffer를 첨가하였다. 용해된 혈소판 부유액의 단백질 농도는 BCA protein assay kit Thermo-Fisher Scientific Korea (Seoul, Korea)를 통해 확인하였다. 단백질(15 µg)을 8% SDS-PAGE를 통해 전기영동으로 분리하였고, PVDF 막으로 옮겼다. 희석농도 1:1,000의 1차 항체와 희석농도 1:2000의 2차 항체로 처리하고 나서 ECL 시약으로 반응하여 단백질 인산화 정도를 확인하였다.

통계 분석

수행한 실험들의 결과는 평균 ± 표준편차로 나타내었으며, 통계 분석은 ANOVA 또는 Student's t-test를 통해 수행되었고, 분산 분석에서 그룹 평균간 유의한 차이가 있을 경우, Scheffe의 방법에 따라 그룹을 비교하였다.

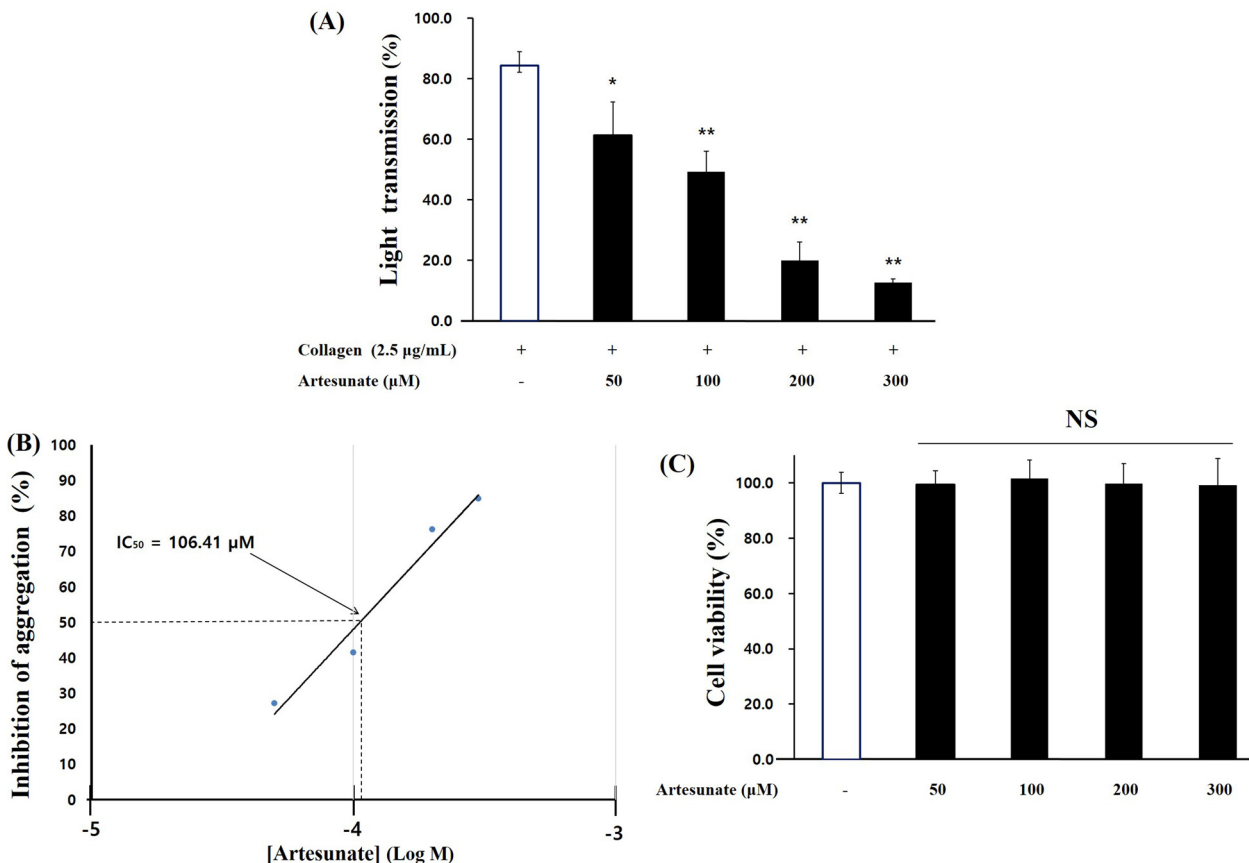


Fig. 2 Effects of artesunate on collagen-induced platelet aggregation. (A) Effects of artesunate pretreatment on collagen-stimulated platelet aggregation. (B) IC₅₀ value of artesunate on collagen-induced platelet aggregation. (C) Cytotoxicity of artesunate on human platelets. Data are expressed as mean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

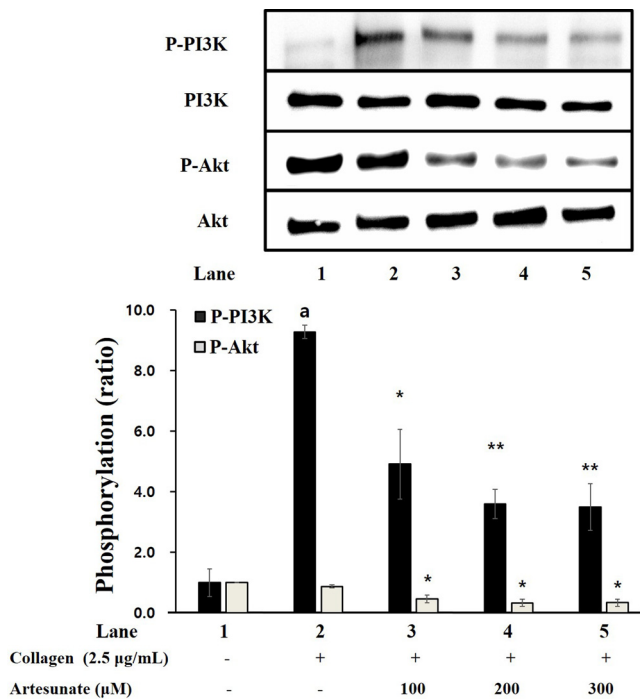


Fig. 3 Effects of artesunate on PI3K and Akt phosphorylation. Western blotting was determined as described in “Materials and Methods” section. Data are expressed as mean \pm SD (n=4). $a_{p}<0.05$ compared with non-stimulated platelets, * $p<0.05$, ** $p<0.001$ compared with the collagen-stimulated platelets

결과 및 고찰

Artesunate가 collagen 유도인 사람 혈소판 응집에 미치는 영향

본 연구에서는 artesunate가 collagen으로 유도한 사람 혈소판 응집억제 효과와 그 기전을 규명하고자 하였다. 혈소판 응집으로 유도하기 위하여 2.5 µg/mL의 collagen를 사용하였고, collagen에 의해 84.3 \pm 4.6%로 혈소판이 강력하게 응집되는 것을 확인하였다. 그러나, 여러 농도의 artesunate (50, 100, 200, 300 µM)을 전 처리하고 응집을 유도하였을 때, artesunate가 농도의존적으로 혈소판 응집을 강하게 억제하는 것을 확인하였다(Fig. 2A). Artesunate의 half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀)를 확인하였을 때 106.41 µM인 것을 알 수 있었으며(Fig. 2B), 혈소판에 대한 artesunate이 혈소판에 대한 세포독성이 있는지 방출되어 나온 LDH를 통해 확인하였다. 그 결과, 사람 혈소판에 artesunate (50, 100, 200, 300 µM)의 처리로 인한 유의한 변화는 확인하지 못하였다(Fig. 2C). 이러한 결과는 artesunate가 혈소판에 대한 세포독성 없이, collagen 유도인 혈소판 응집을 억제하고 효과가 보여준다.

Artesunate가 PI3K/Akt 및 MAPK pathway에 미치는 영향

본 연구에서는 artesunate이 혈소판 내 과립 방출에 관여하는 것으로 알려진 인단백질인 PI3K/및의 인산화에 어떤 영향을 미치는지 살펴보았다. Fig. 3에서 보여지는 바와 같이, artesunate에 의해 PI3K/Akt의 인산화가 농도의존적으로 억제되었다. 이는 artesunate이 collagen으로 유도한 혈소판에서 PI3K/Akt의 인산

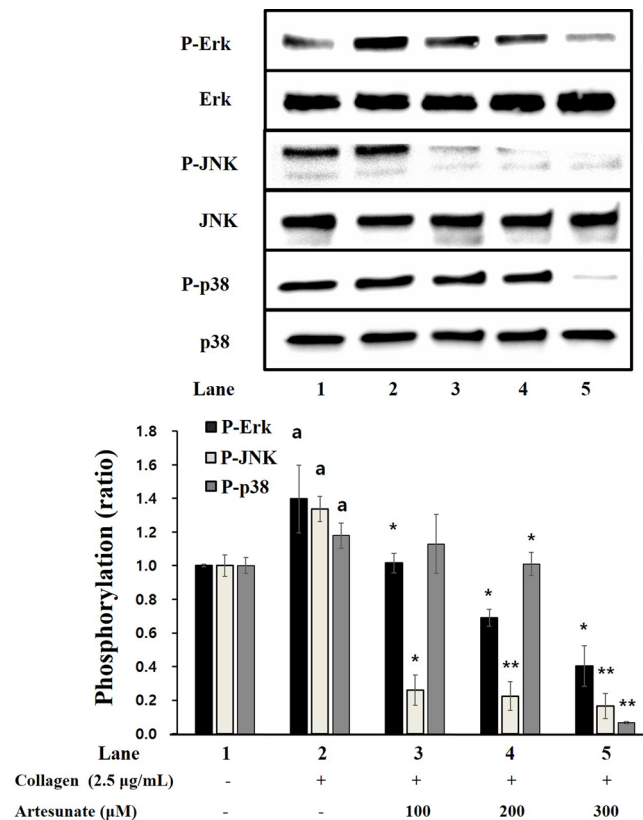


Fig. 4 Effects of artesunate on MAPK phosphorylation. Western blotting was determined as described in “Materials and Methods” section. Data are expressed as mean \pm SD (n=4). $a_{p}<0.05$ compared with non-stimulated platelets, * $p<0.05$, ** $p<0.001$ compared with the collagen-stimulated platelets

화를 조절하는 억제 물질로 사용될 수 있음을 분명히 한 것이다. 또한, artesunate이 MAPK 단백질들의 인산화에 영향을 미치는 지 확인해보았다. Fig. 4에서 보여지는 바와 같이, collagen은 손상받지 않은 세포와 비교했을 때, MAPK 경로의 단백질들(ERK, JNK, p38)의 인산화를 유의하게 증가시켰고, 이들은 100 µM 이상의 artesunate에 의해 농도의존적으로 감소하였다. 이 결과는 artesunate가 ERK, JNK 및 p38와 같은 MAPK 경로 단백질들의 인산화를 억제함으로써 혈소판 내 신호 과정을 조절한다는 것을 나타낸다.

인산화 단백질 중에서 PI3K/Akt 경로에 대한 것도 잘 알려져 있는데, 이들의 활성화가 혈소판의 dense 과립 분비를 촉진하여 혈소판 응집을 포함한 혈소판 기능을 조절하는데 역할을 한다고 보고되었다[18]. 또한, MAPK의 인산화가 혈소판의 과립 분비를 일으켜 혈소판 응집에 관여하는 것으로 알려져 있다[14,15]. 이전 연구들에서 사람 혈소판에도 MAPK가 상당히 존재한다는 것이 확인되고 있으며, 혈소판이 자극유도제에 의해 활성화될 때 이들이 인산화됨으로써 기능한다고 보고된 바 있다[11-13]. 본 연구의 결과를 통해 artesunate가 PI3K/Akt 경로 및 MAPK 경로의 단백질이 인산화되는 것을 저해함으로써 혈소판 과립분비 및 응집을 억제하는 것으로 볼 수 있다.

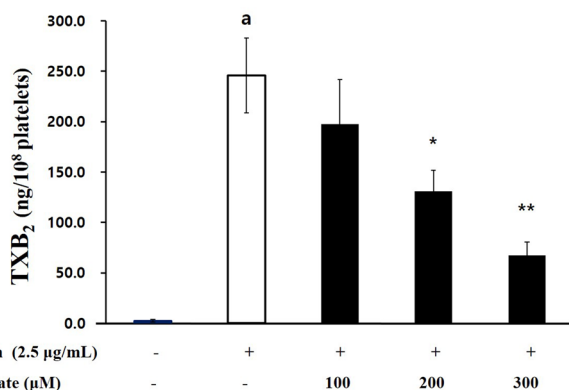


Fig. 5 Effects of artesunate on TXB₂ production. Measurement of TXB₂ production was described in “Materials and Methods” section. Data are expressed as mean ± SD (n=4). ap<0.05 compared with no-stimulated platelets, *p<0.05, **p<0.001 compared with the collagen-stimulated platelets

Artesunate가 TXA₂ 생성에 미치는 영향

이전 연구에 따르면, p38의 인산화가 arachidonic acid 분비 및 TXA₂ 생성에 영향을 주어서 혈소판 응집에 관여한다고 보고된 바 있다[22]. TXA₂는 주변의 혈소판을 추가적으로 활성화하여 응집을 유발하는 강력한 자가유도제로 기능하기 때문에, 항 혈소판 효과를 나타내는 물질을 평가할 때 TXA₂ 생성을 중요한 지표로 확인한다[22]. Aspirin이나 ozagrel 등 TXA₂ 생성을 저해하는 성분물질들이 항혈소판제로 사용되고 있는 것도 같은 이유 때문이다[23,24]. 또한, MAPK가 세포질 내 phospholipase A₂ (PLA₂)를 인산화시키고 이를 통해 혈소판 막의 인지질을 가수분해하여 arachidonic acid의 생성 및 분비에 관여함으로써 TXA₂ 생성을 증가시키는 것으로 보고된 바 있다[16,17]. 따라서, MAPK와 혈소판의 응집을 저해하는 artesunate가 TXA₂ 생성에도 영향을 미치는 지 확인할 필요가 있다.

Fig. 5에서 보여지는 바와 같이, TXA₂의 생성에 미치는 artesunate의 영향을 확인한 결과, 손상받지 않은 세포에서 2.37 ± 1.14 ng/10⁸ cells였던 TXA₂ 생성정도가 collagen을 처리하였을 때 245.91±37.08 ng/10⁸ cells로 가하게 증가되었다. 그러나, 증가된 TXA₂ 생성량이 artesunate (100, 200 및 300 µM)에 의해 각각 197.69±43.84, 130.83±20.77, 및 67.27±13.24 ng/10⁸ cells로 농도의존적으로 크게 감소되었다(Fig. 5). 이는 artesunate에 의해 활성이 감소된 MAPK가 PLA₂의 인산화를 억제함으로써 arachidonic acid의 분비를 저해한 결과인 것으로 보인다.

Artesunate가 혈소판 과립 분비에 미치는 영향

혈소판에서의 과립 방출은 혈소판 응집을 증폭하는데 중요하기에 artesunate가 ATP 및 serotonin의 과립분비에 영향을 미치는 지 살펴보았다. 그 결과, 손상되지 않은 세포에서 0.21±0.02 µM의 ATP 방출량이 collagen (2.5 µg/mL)에 의해 8.86±0.12 µM로 강하게 증가되는 것을 확인하였다. 그러나, 증가된 ATP 방출이 artesunate (100, 200 및 300 µM)에 의해 농도의존적으로 억제되었다(Fig. 6A). 또한, serotonin 방출에 있어서도 손상되지 않은 세포에서 7.38±1.99 ng/10⁸ cells였던 것이 collagen (2.5 µg/mL)에 의해 173.90±10.77 ng/10⁸ cells로 강하게 증가되

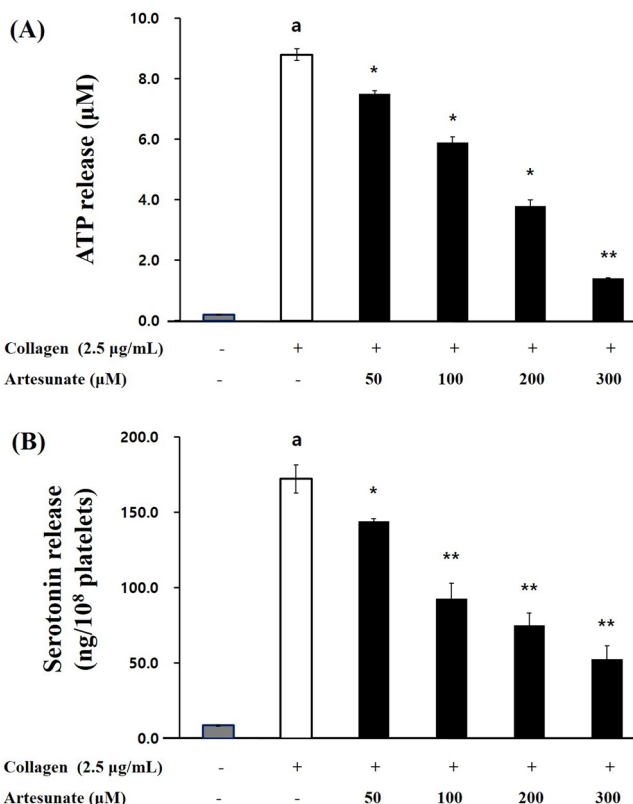


Fig. 6 Effects of artesunate on granule secretion. (A) Effects of artesunate on ATP release. (B) Effects of artesunate on serotonin release. Measurement of ATP and serotonin release was described in “Materials and Methods” section. Data are expressed as mean ± SD (n=4). ap<0.05 compared with no-stimulated platelets, *p<0.05, **p<0.001 compared with the collagen-stimulated platelets

는 것을 확인하였다. 그러나, collagen에 의해 증가된 serotonin 방출량도 artesunate (100, 200 및 300 µM)에 의해 93.70± 10.17, 75.83±8.35 및 49.20±5.22 ng/10⁸ cells로 농도의존적으로 감소되는 것을 알 수 있었다(Fig. 6B). 이 결과들을 통해 artesunate가 혈소판 내 과립 분비를 강하게 억제하며 혈소판 응집을 억제한다는 것을 알 수 있다.

혈소판 내 과립 분비는 혈소판의 활성화를 유도하고 손상된 혈관으로 순환하는 혈소판의 점착 및 응집을 촉진함으로써 혈전 형성에 중요하게 기능한다고 알려져 있다[25]. 이 결과들을 볼 때, artesunate이 collagen의 유도도 혈소판 내 dense 과립에서 방출되는 ATP 및 serotonin을 농도의존적으로 억제함으로써 혈소판 활성화 및 혈소판 응집 억제에 관여한다는 것을 명확히 하였다.

초 록

혈소판의 과도한 활성화 및 응집은 심혈관계 질환의 주요원인이 된다. 따라서, 혈소판 활성화 및 응집을 억제하는 것은 심혈관계 질환을 예방하고 치료하는데 있어서 매력적인 치료 표적으로 여겨진다. 특히, 혈관 내피세포에서 분비되는 collagen에

의한 강력한 혈소판 활성화와 응집이 혈관질환에서 특징적이다. Artesunate는 *Artemisia* 또는 *Scopolia* 속 식물의 뿌리에서 추출한 화합물이며, 항암 및 알츠하이머 병 분야에서 효과가 있다고 보고된 바 있다. 그러나, artesunate가 collagen 유도 혈소판 활성화와 응집에 미치는 영향과 그 기전에 대해서는 규명된 바가 없다. 본 연구에서는 collagen이 유도하는 사람 혈소판 응집에 있어 artesunate이 미치는 영향을 확인하였고, artesunate의 작용 기전을 명확히 하였다. Artesunate은 혈소판가 활성화 될 때 신호 전달 과정에 작용한다고 알려진 인단백질인 PI3K/Akt 및 MAPK의 인산화를 억제하였다. 또한, artesunate는 TXA₂ 생성을 감소시켰고, ATP 및 serotonin 방출 등의 혈소판 내 과립 분비를 감소시켰다. 그 결과, artesunate는 혈관 내피세포에서 분비되는 강력한 응집 유도 물질인 collagen으로 유도된 혈소판 응집을 106.41 μM의 IC₅₀로 강력하게 억제하였다. 이 결과들을 통해, artesunate가 혈관 손상을 통해 일어나는 사람 혈소판의 활성화 및 응집을 억제하는 데 유효한 항혈전 물질로 가치가 있음을 제안한다.

Keywords 과립 분비 · 혈소판 응집 · Artesunate · Mitogen-activated protein kinases · PI3K/Akt · TXA₂

Conflict of interest The authors declare no conflict of interest.

References

- Jackson SP (2011) Arterial thrombosis-insidious, unpredictable and deadly. *Nat Med* 17: 1423–1436. doi: 10.1038/nm.2515
- Schwartz SM, Heimark RL, Majesky MW (1990) Developmental mechanisms underlying pathology of arteries. *Physiol Rev* 70: 1177–1209. doi: 10.1152/physrev.1990.70.4.1177
- Wonerow P, Obergfell A, Wilde JI, Bobe R, Asazuma N, Brdicka T, Leo A, Schraven B, Horejsi V, Shattil SJ, Watson SP (2002) Differential role of glycolipid-enriched membrane domains in glycoprotein VI- and integrin-mediated phospholipase Cγ2 regulation in platelets. *Biochemical Journal* 364: 755–765. doi: 10.1042/bj20020128
- 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
- Morello F, Perino A, Hirsch E (2009) Phosphoinositide 3-kinase signalling in the vascular system. *Cardiovasc Res* 82: 261–271
- Jennings LK (2009) Role of platelets in atherothrombosis. *Am J Cardiol* 103: 4A–10A
- Sabatine MS, Jang IK (2000) The use of glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in patients with coronary artery disease. *Am J Med* 109: 224–237
- Cattaneo M, Tenconi PM, Lecchi A, Mannucci PM (1991) In vitro effects of picotamide on human platelet aggregation, the release reaction and thromboxane B₂ production. *Thromb Res* 62: 717–724. doi: 10.1016/0049-3848(91)90375-7
- Su CY, Shiao MS, Wang CT (1999) Differential effects of ganodermic acid S on the thromboxane A₂-signaling pathways in human platelets. *Biochem Pharmacol* 58: 587–595. doi: 10.1016/s0006-2952(99)00136-7
- Adam F, Kauskot A, Nurden P, Sulpice E, Hoylaerts MF, Davis RJ (2010) Platelet JNK1 is involved in secretion and thrombus formation. *Blood* 115: 4083–4092. doi: 10.1182/blood-2009-07-233932
- Bugaud F, Nadal-Wollbold F, Lévy-Toledano S, Rosa JP, Bryckaert M (1999) Regulation of c-jun-NH₂ terminal kinase and extracellular-signal regulated kinase in human platelets. *Blood* 94: 3800–3805
- Kramer RM, Roberts EF, Striffler BA, Johnstone EM (1995) Thrombin induces activation of p38 MAP kinase in human platelets. *J Biol Chem* 270: 27395–27398. doi: 10.1074/jbc.270.46.27395
- Nadal-Wollbold F, Pawlowski M, Lévy-Toledano S, Berrou E, Rosa JP, 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. doi: 10.1016/s0014-5793(02)03587-1
- Patrono C (1994) Aspirin as an antiplatelet drug. *N Engl J Med* 330: 1287–1294. doi: 10.1056/NEJM199405053301808
- Flevaris P, Li Z, Zhang G, Zheng Y, Liu J, 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. doi: 10.1182/blood-2008-05-155978
- Kramer RM, Roberts EF, Um SL, Börsch-Haubold AG, Watson SP, Fisher MJ (1996) p38 mitogen-activated 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. doi: 10.1074/jbc.271.44.27723
- McNicol A, Shibou TS (1998) Translocation and phosphorylation of cytosolic phospholipase A₂ in activated platelets. *Thromb Res* 92: 19–26. doi: 10.1016/s0049-3848(98)00097-8
- Chuang WY, Kung PH, Kuo CY, Wu CC (2013) Sulforaphane prevents human platelet aggregation through inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Thromb Haemost* 109: 1120–1130. doi: 10.1160/TH12-09-0636
- Thanaketsaisarn O, Waiwut P, Sakurai H, Saiki I (2011) Artesunate enhances TRAIL-induced apoptosis in human cervical carcinoma cells through inhibition of the NF-κB and PI3K/Akt signaling pathways. *Int J Oncol* 39: 279–285. doi: 10.3892/ijo.2011.1017
- Lu H, Wang B, Cui N, Zhang Y (2018) Artesunate suppresses oxidative and inflammatory processes by activating Nrf2 and ROS-dependent p38 MAPK and protects against cerebral ischemia-reperfusion injury. *Mol Med Rep* 17: 6639–6646. doi: 10.3892/mmr.2018.8666
- 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
- Chang MC, Wang TM, Yeung SY, Jeng PY, Liao CH, Lin CC, Lin BR, Jeng JH (2011) Antiplatelet 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. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.09.031
- Cipollone F, Patrignani P, Greco A, Panara MR, Padovano R, Cuccurullo F, Patrono C, Rebuzzi AG, Liuzzo G, Quaranta G, Maseri A (1997) Differential suppression of thromboxane biosynthesis by indobufen and aspirin in patients with unstable angina. *Circulation* 96: 1109–1116
- Patrono C (2001) Aspirin: new cardiovascular uses for an old drug. *Am J Med* 110: 62S–65S. doi: 10.1016/s0002-9343(00)00645-8
- Calderwood DA (2004) Integrin activation. *J Cell Sci* 117: 657–666