



# Inhibitory effects of hydroxygenkwanin on platelets aggregation via regulation of phosphoproteins in collagen-induced human platelets

Chang-Eun Park · Dong-Ha Lee

## Collagen 유도인 사람 혈소판에서 인산화 단백질 조절을 통한 hydroxygenkwanin의 혈소판 응집억제 효과

박창은 · 이동하

Received: 22 February 2023 / Accepted: 17 March 2023 / Published Online: 31 March 2023  
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2023

**Abstract** Cardiovascular disease (CVD) is increasingly increasing as the main cause of death worldwide, and activation of platelet in vascular damage is one of the important causes of CVD. In recent, there is a growing interest in anti-thrombotic materials through platelet suppression, and efforts are being made to reduce side effects by using natural bioactive compounds. Known as one of the Flavonoids, hydroxygenkwanin (HGK) is a purified substance in *Daphne Genkwa*, which is known to have antibacterial, anti-inflammatory and anti-cancer effects, and has been reported to serve as an inhibitor of tissue factor that prevents thrombosis, but its anti-platelet effects and the action mechanisms is not known. In this study, we confirmed that the effects of HGK on the collagen-induced human platelets activation. HGK suppressed phosphorylation of PI3K/AKT and mitogen-activated protein kinases during platelet signaling, and reduced granule secretion in platelets such as ATP and serotonin. In addition, HGK inhibited the phosphorylation of cPLA<sub>2</sub> and strongly undermined the production of TXA<sub>2</sub>, which is a powerful aggregation amplifier. As a result, the platelet aggregation derived by Collagen, a cohesive induced substance, was strongly suppressed by HGK to an IC<sub>50</sub> of 86.36 μM.

Therefore, HGK might be worth the antithrombotic substance that inhibits the activation and aggregation of human platelets that occur through blood vessel damage.

**Keywords** Granule secretion · hydroxygenkwanin · mitogen-activated protein kinases · platelet aggregation · TXA<sub>2</sub>

## 서론

인류의 생명을 위협하는 다양한 질병 중에서도 심혈관 질환 (CVD)은 전세계적으로 주요한 사망 원인으로 손꼽힌다. 최근 미국에서만 전체 사망자 7명당 1명이 관상동맥성 심장병으로 사망하고 9명당 1명은 심부전으로 사망한다는 연구가 보고되었다[1]. 우리가 살아가면서 다양한 이유로 혈관 손상이 발생하는 데, 혈전이 형성되는 기전을 통해 지혈이 일어나는 것이 자연스러운 현상이며, 이를 위해 혈소판의 적절한 활성화 및 응집이 요구된다. 그런데 혈소판 활성화 및 응집이 과도하게 일어나 불필요하게 많은 양의 혈전이 형성되는 경우 동맥경화증, 관상동맥질환, 심부전 및 뇌졸중과 같은 다양한 심혈관계의 질병을 유발하게 된다[2].

근래에 약리학적 화합물을 사용한 혈전 관련 합병증의 치료는 혈소판 억제를 통해 작용하는 것으로 알려져 있으며 현재 CVD 예방 및 치료에 이러한 항혈소판제들을 활용하고 있지만, 불행히도 주요한 합병증과 부작용이 수반되는 문제점들이 있으므로 환자에게 최상의 치료를 제공하기 위해서 더 나은 대안이 필요한 상황이다[3]. 과도한 혈소판 응집과 이로 인한 혈전생성으로 말미암는 질환의 유망한 치료법들 중에 하나는 천연 생물

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

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

활성 화합물을 사용하는 것이다[4]. 지중해의 전통적인 식단에서 발견되는 화합물과 전통적으로 의약 목적으로 사용되는 식물의 섭취는 CVD 예방에서 항혈소판 및 심장 보호 특성의 유효한 효과가 있다고 보고된 바 있다[5-7].

Serotonin과 ATP를 포함하는 혈소판 과립 분비는 혈소판 응집의 과정에서 중요한 단계이며 mitogen-activated protein kinases (MAPK) 및 PI3K/AKT 인산화 단백질이 여기에 관여한다고 알려져 있다[8]. MAPK는 p38 MAPK, c-Jun N-말단 kinase (JNK) 및 세포 외 신호 조절 kinase(ERK)로 구성된 인산화 효소 단백질들로, 지혈 및 혈전 형성 동안 세포 내 신호 전달에 작용한다[9]. MAPK는 사람 혈소판에 존재하며 다양한 작용제와 상호 작용하고 인산화를 통해 활성화를 나타내며[10-12], 신호 전달 분자로 작용하여 혈소판 과립 분비 자극에 중요한 역할을 한다[13,14]. MAPK는 세포막에서 발견되는 cPLA<sub>2</sub>의 인산화를 유발하여 추가적인 작용을 나타낸다. cPLA<sub>2</sub>의 인산화는 TXA<sub>2</sub>의 증가로 이어지는데 TXA<sub>2</sub>는 혈소판의 신호자극을 증폭하는 역할을 하며, 직접적으로 혈소판을 자극하여 더 많은 혈소판의 활성화와 응집을 일으킨다[15,16]. PI3K/AKT의 경로는 혈소판 내 dense 과립 분비 및 응집과 관련이 있으며, PI3K/AKT의 인산화를 억제하는 것이 다양한 화합물의 항혈소판 작용에 있어서 유효하다고 알려져 있다[17].

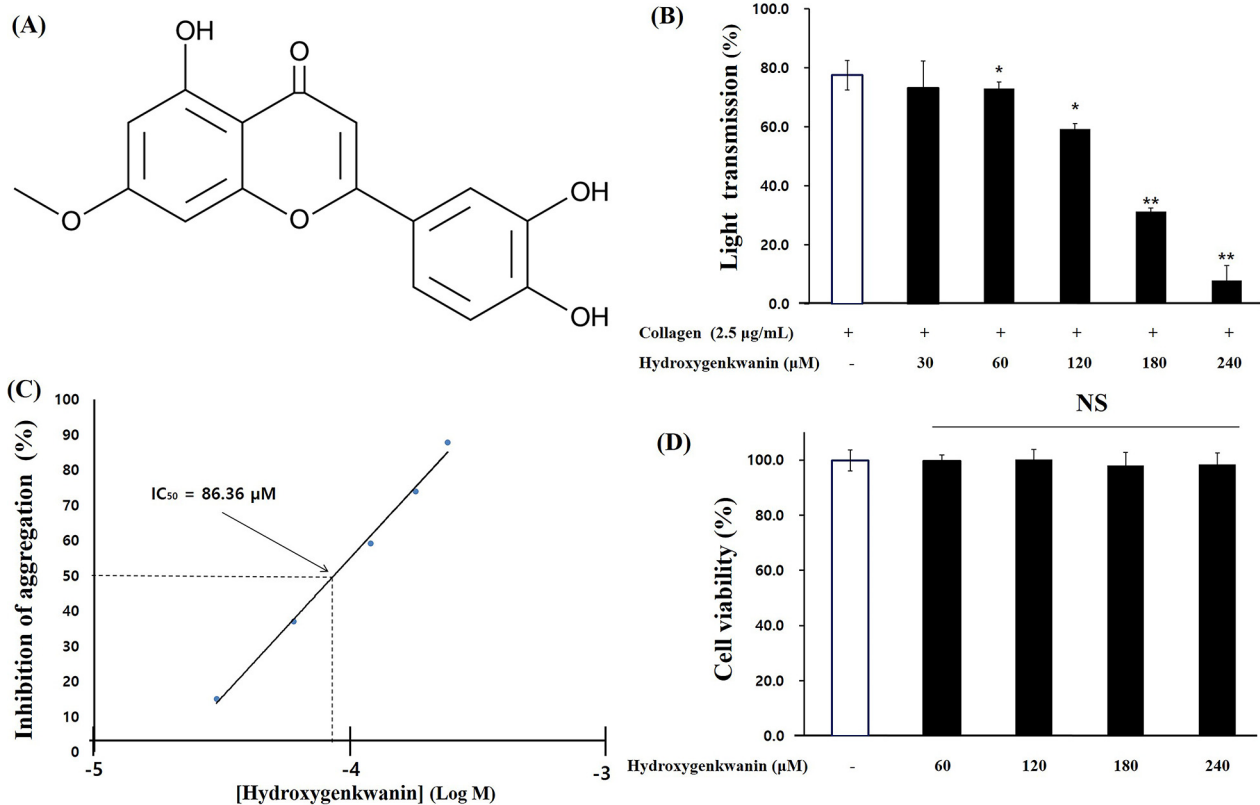
Flavonoid 중 하나로 알려진 Hydroxygenkwainin (HGK)은 팔꽃나무(*Daphne genkwa*)에서 정제되는 물질로서 항균, 항산화

및 자유 라디칼 소거 효과를 포함한 여러 생물학적 효과를 발휘하고 색소 모발 재생을 촉진한다[18-21]. 또한 HGK는 폐암, 신경아교종, 구강편평상피세포암, 간암에 대해 성장 정지를 조절하고 이동을 억제함으로써 항종양 효과를 발휘한다고도 보고되었다[22-25]. 심혈관 질환에서 연구에 따르면 HGK는 항염증 활성을 가지며 혈전증을 예방하는 조직 인자 억제제로서 역할을 한다고 알려져 있다[26]. 그러나, HGK의 항혈소판 효과와 collagen으로 유도한 사람 혈소판에서 HGK의 작용기전은 알려진 바가 없다. 본 연구는 collagen이 유도하는 사람의 혈소판 활성화 과정에서 HGK이 어떤 효과를 가지는지 연구하였다.

### 재료 및 방법

#### 시약

Hydroxygenkwainin은 Avention Co. (Siheung, Korea)로부터 제공받아 사용하였다(Fig. 1A). Collagen은 Chrono-Log Co. (Havertown, PA, USA)를 통해 구입하였고, 항체 및 웨스턴 블롯팅 용해 완충액은 Cell Signaling (Beverly, MA, USA)에 주문되었다. Fibrinogen Alexa Fluor 488 접합체는 Invitrogen Molecular Probes (Eugene, OR, USA)에 주문되었다. TXB<sub>2</sub>, serotonin, ATP enzyme immunoassay kit들은 Cayman Chemical Co. (Havertown, PA, USA)에 주문되었다. polyvinylidene



**Fig. 1** HGK's effect on platelet aggregation. (A) Chemical structure of HGK (Hydroxygenkwainin, MW: 300.26) (B) HGK's effect on collagen-induced human platelet aggregation (C) IC<sub>50</sub> value of HGK on collagen-induced platelet aggregation (D) HGK's effect on cytotoxicity. Platelet aggregation and cytotoxicity were carried out as described in "Materials and Methods" section. The data are expressed as the mean ± standard deviation (n=4). \*p < 0.05, \*\*p < 0.001 versus each collagen-stimulated human platelets. NS, not significant

difluoride membrane과 화학발광 용액은 Thermo Fisher Scientific Korea (Seoul, Korea)에 주문되었다. 위에 나열되지 않은 그 밖의 다른 시약은 sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에 주문되었다.

### 사람 혈소판 세척 및 부유액 준비

CPDA액을 함유한 인간 혈소판 풍부 혈장(PRP)을 대한 적십자사 경기혈액원(Suwon, Korea)에서 구입하여 10분 동안 125 g으로 원심분리하여 적혈구를 제거한 후, 1650 g에서 10분간 원심분리하여 혈소판 pellet을 얻었다. 혈소판 pellet을 세척 완충액으로 2회 세척하였고, 최종농도가  $10^8/\text{mL}$ 가 되도록 현탁 완충액에 재현탁하였다.

### 사람의 혈소판 응집반응 측정

준비된 혈소판 현탁액( $10^8/\text{mL}$ )에 hydroxygenkwanin을 0.1% dimethyl sulfoxide에 녹이고 다양한 농도로 첨가하여 5분 동안 사전 배양하였다. 다음으로 collagen을 작용제로 혈소판 응집을 유도하여 37 °C에서 5분간 측정하였다. 응집정도는 aggregometer (Chrono-Log; Havertown, PA, USA)를 사용하여 혈소판 현탁액의 광투과율을 응집률(%)로 환산하여 나타내었다.

### 세포 독성 측정

준비된 혈소판 현탁액( $10^8/\text{mL}$ )에 hydroxygenkwanin을 0.1% dimethyl sulfoxide에 녹이고 다양한 농도로 첨가하여 5분 동안 사전 배양하였다. 10,000×g에서 2분간 원심 분리하여 상층액을 분리하였다. 세포질로부터 분리된 lactate dehydrogenase (LDH)의 방출량을 확인함으로써 세포 독성을 평가할 수 있다. 분리한 상층액의 LDH를 LDH EIA kit (Cayman Chemical)를 사용하여 ELISA 판독기로 정량 측정하였다. Triton X100으로 완전히 용해된 혈소판을 양성 대조군으로 사용 하였다.

### TXA<sub>2</sub> 생성량 측정

준비된 혈소판 부유액에 다양한 농도의 hydroxygenkwanin을 첨가한 후 collagen을 첨가하여 응집을 유도하였고, indomethacin (0.2 mM)을 첨가하여 반응을 종료시켰다. 반응액을 원심 분리하여 상층액을 획득하였고, TXB<sub>2</sub> EIA kit (Cayman Chemical)를 사용하여 ELISA 판독기로 TXB<sub>2</sub>의 생성량을 측정하였다. TXA<sub>2</sub>는 TXB<sub>2</sub>로 빠르게 변환되기 때문에 TXA<sub>2</sub> 생성량을 확인하기 위해 TXB<sub>2</sub> 생성량을 측정하였다.

### ATP 및 serotonin 방출량 측정

준비된 혈소판 부유액에 다양한 농도의 hydroxygenkwanin을 첨가한 후, collagen을 첨가하여 응집을 유도하였다. 반응을 종결하기 위하여 반응 tube를 얼음 위에 3분 동안 정치하였고, 4 °C에서 2분 동안 10,000 g에서 원심분리하여 상층액을 수집하였다. ATP 및 serotonin의 수준은 ATP 및 serotonin EIA kit (Cayman Chemical)를 사용하여 ELISA 판독기로 측정하였다.

### Western blotting 분석

준비된 혈소판 부유액에 다양한 농도의 hydroxygenkwanin을 첨가한 후, collagen으로 5분 동안 반응하였다. 반응을 종결하기 위해 1x lysis buffer를 첨가해 주었고, 혈소판 용해물의 단백질을

BCA protein assay kit를 사용하여 확인하고 SDS-PAGE으로 전기영동하였다. 이 후, PVDF로 단백질을 옮기고 1차 항체 (4 °C, overnight) 및 2차 항체(실온, 2시간)으로 항원항체 반응을 일으켰다. 화학발광 기질을 사용하여 단백질을 시각화하고 Luminescent Image Analyzer LAS-4000 (Fujifilm, Tokyo, Japan)으로 사진을 찍어 밀도 분석을 통해 정량하였다.

### 통계 분석

결과 값은 다양한 수의 관측치에 대한 평균 ± 표준 편차로 제시하였다. 그룹 간의 유의미한 차이를 결정하기 위해, 분산 분석을 수행한 다음 Tukey-Kramer 방법을 수행 하였다. SPSS 21.0.0.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA)을 사용하여 통계 분석을 수행하였고,  $p < 0.05$ 는 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다.

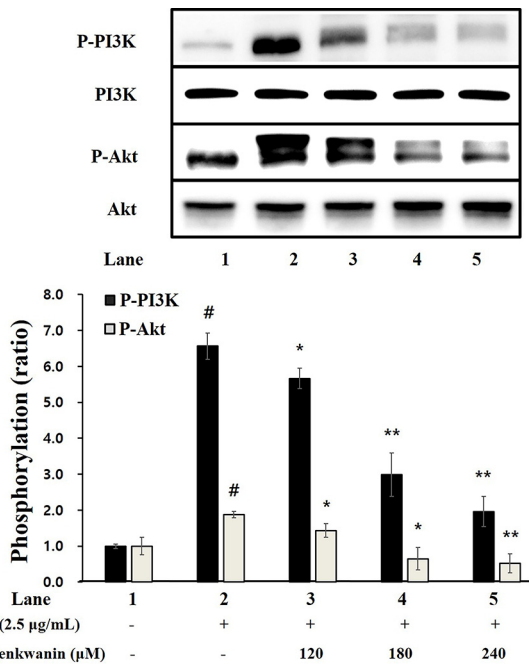
## 결과 및 고찰

### 사람 혈소판 응집 및 세포 독성에 대한 hydroxygenkwanin의 작용

준비된 혈소판 부유액에 다양한 농도의 hydroxygenkwanin을 전처리한 후 collagen으로 자극하여 응집을 유도하였을 때, hydroxygenkwanin가 혈소판 응집에 미치는 효과를 확인하였다. 응집 유도물질로 2.5 µg/mL의 collagen을 사용하였고, collagen이 77.5±1.4%까지 혈소판을 강하게 응집하였다. 그런데, 여러 농도의 hydroxygenkwanin (30-240 µM)를 전처리하고 응집반응을 일으켰을 때, hydroxygenkwanin에 의해 농도 의존적으로 혈소판 응집이 억제되었고, 가장 강한 농도인 120 µM에서 86.5%의 강한 억제율을 확인하였다(Fig. 1B). Hydroxygenkwanin의 half-maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>)를 분석하였고, 86.36 µM의 강한 효과가 있음을 알 수 있었다(Fig. 1C). 또한, 혈소판 세포에 미치는 hydroxygenkwanin의 독성을 평가하기 위해 분비되는 LDH를 측정하였고, 사람 혈소판에 hydroxygenkwanin을 60-240 µM 농도로 처리하였을 때 유의미한 변화가 나타나지 않았다(Fig. 1D). 이는 hydroxygenkwanin가 혈소판에 독성이 없이, collagen 유도의 혈소판에서 응집을 억제하는 물질임을 보여준다.

### PI3K/AKT 및 MAPK pathway에 대한 hydroxygenkwanin의 작용

혈소판 응집을 억제하는 hydroxygenkwanin이 혈소판 활성화 및 응집에 영향을 미치는 과립 방출에 관여하는 PI3K/AKT 및 MAPK 경로의 단백질 인산화에 관여하는지 확인하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이, hydroxygenkwanin가 PI3k/AKT의 인산화를 농도 의존적으로 억제하였고, 이는 hydroxygenkwanin이 collagen 유도의 혈소판에서 PI3K/AKT의 인산화를 조절하는 물질임을 의미한다. 또한, hydroxygenkwanin이 MAPK 경로의 단백질 인산화에 관여하는지도 확인하였고, 그 결과 collagen에 의해 인산화되었던 MAPK 경로의 ERK, JNK 및 p38 단백질들이 hydroxygenkwanin에 의해 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 3). 이를 통해 hydroxygenkwanin가 PI3K/AKT 및 MAPK의 경로 단백질 인산화를 억제하며 혈소판 활성화를 조절한다는 것을 알 수 있었다.

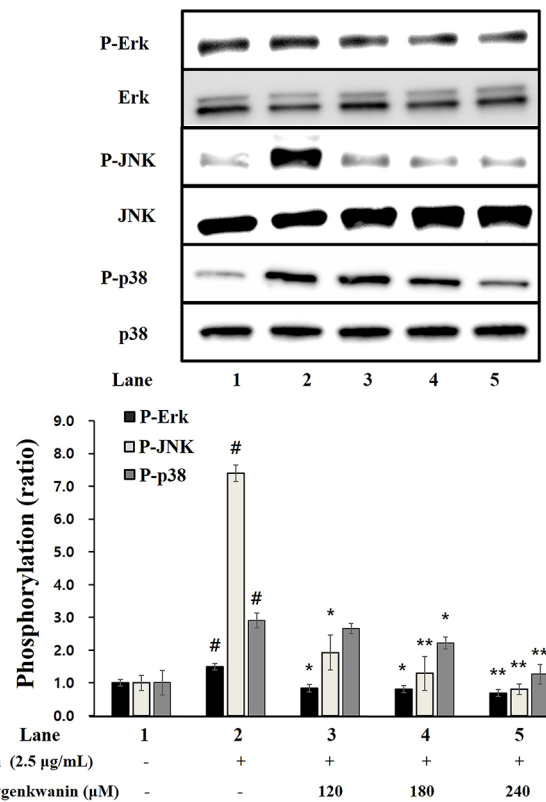


**Fig. 2** HGK’s effect on PI3K & Akt phosphorylation. All experiments were performed as described in “Materials and Methods” section. The data are expressed as the mean ± standard deviation (n=4). #*p* < 0.05 compared with no-stimulated intact platelets, \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.001 versus the collagen-stimulated human platelets

PI3K/AKT 경로가 활성화 되면 혈소판의 dense 과립의 분비가 촉진되고 혈소판 응집을 포함한 혈소판 기능이 활성화 된다고 보고되어 있고[17], MAPK 경로의 활성화도 혈소판의 과립 분비를 촉진하여 혈소판 응집을 증폭하는 것으로 알려져 있다 [14,27]. 이전 연구들에서도 사람 혈소판에 상당한 정도의 MAPK 경로 단백질들이 존재하고 있음이 확인되었고, 혈소판이 유도제들에 의해 자극받을 때 이들 단백질들의 인산화를 통해 기능한다고 보고되어 있다[10-12]. 본 연구의 결과는 hydroxygenkwanin가 PI3K/AKT 경로 및 MAPK 경로의 단백질들의 신호 전달에 관여함으로써 혈소판 활성을 조절한다는 것을 명확히 하였다.

**혈소판 과립 분비에 대한 hydroxygenkwanin의 작용**

혈소판에서의 과립 방출은 혈소판 응집을 증폭하는데 중요한 요소이다. 본 연구에서는 hydroxygenkwanin가 ATP 및 serotonin의 혈소판 내 과립분비에 미치는 영향을 확인하였다. 혈소판 부유액에 collagen (2.5 µg/mL)으로 자극을 주었을 경우 ATP 방출량이 0.24±0.04 µM에서 4.56±0.05 µM로 크게 증가되는 것을 하였고, hydroxygenkwanin가 증가된 ATP 방출량을 농도의존적으로 억제하는 것을 알 수 있었다(Fig. 4A). 또한, serotonin 방출의 경우에서도 collagen (2.5 µg/mL)에 의해 46.10±5.86 ng/10<sup>8</sup> cells로 강하게 증가된 serotonin 방출량을 hydroxygenkwanin (60, 120, 180 및 240 µM)가 29.77±0.41, 27.48±4.07, 22.60±0.96 및 16.53±3.56 ng/10<sup>8</sup> cells로 농도의존적으로 감소시켰다(Fig. 4B). 이를 통해 hydroxygenkwanin가 혈소판 내 과립 분비를 억제시킴으로써 혈소판 응집이 증폭되는 것을 저해시킨다는 것을 알 수 있다.

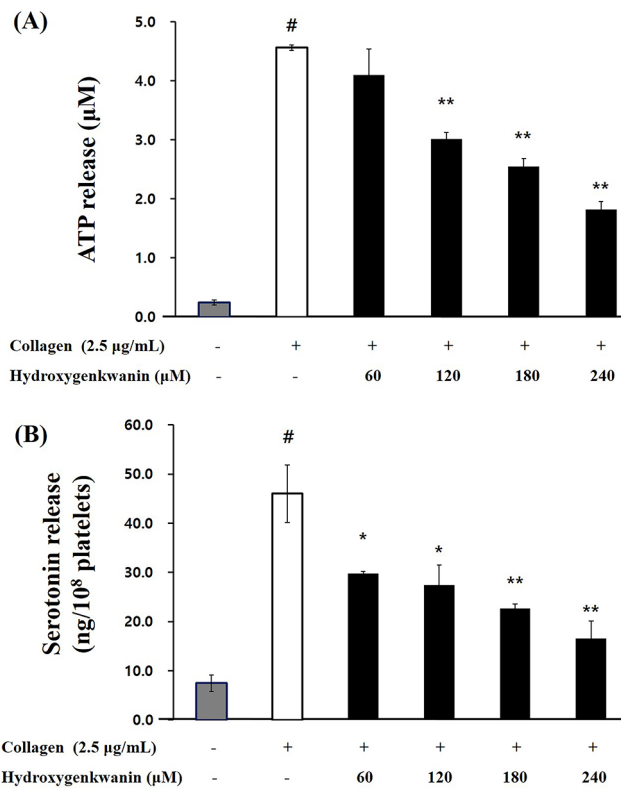


**Fig. 3** HGK’s effect on MAPK phosphorylation. All experiments were performed as described in “Materials and Methods” section. The data are expressed as the mean ± standard deviation (n=4). #*p* < 0.05 compared with no-stimulated intact platelets, \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.001 versus the collagen-stimulated human platelets

혈소판 내에서 과립 분비가 일어나면 혈소판이 활성화되고 손상된 혈관에 대한 혈소판의 점착 및 응집을 촉진되어 혈전 형성을 일으킨다고 알려져 있다[28]. 따라서, 본 연구의 결과들을 통해 hydroxygenkwanin이 collagen이 유도하는 ATP 및 serotonin의 혈소판 내 과립방출을 유의하게 억제함으로써 혈소판 활성화 및 혈소판 응집을 억제하는 물질임을 분명히 하였다.

**Thromboxane A<sub>2</sub> 생성 및 cPLA<sub>2</sub> 인산화에 대한 hydroxygenkwanin의 작용**

발표된 연구에 따르면, MAPK 경로 단백질 중 하나인 p38의 인산화가 arachidonic acid 분비와 TXA<sub>2</sub> 생성에 관여함으로써 혈소판 응집을 유도한다고 보고되어 있다[29]. TXA<sub>2</sub>는 주변 혈소판들의 추가적인 활성화를 촉진하여 혈소판 응집을 유도하는 강력한 autacoid로 기능한다고 알려져 있으므로 물질의 혈소판 억제효과를 평가할 때 확인하는 중요한 지표이다[29]. Aspirin 또는 ozagrel과 같이 TXA<sub>2</sub> 생성을 저해하는 물질들이 항혈소판제로 임상에서 사용되는 것도 같은 이유로 인함이다[30,31]. 또한, MAPK 경로의 단백질이 세포질 내 phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)를 인산화함으로써 혈소판 막의 인지질을 가수분해하는데 이용되며, arachidonic acid의 생성과 분비 뿐 아니라 TXA<sub>2</sub> 생성을 증가시킨다고 보고되어 있다[15,16]. 따라서, 본 연구에서는 hydroxygenkwanin가 TXA<sub>2</sub> 생성 및 PLA<sub>2</sub>의 인산화에 영



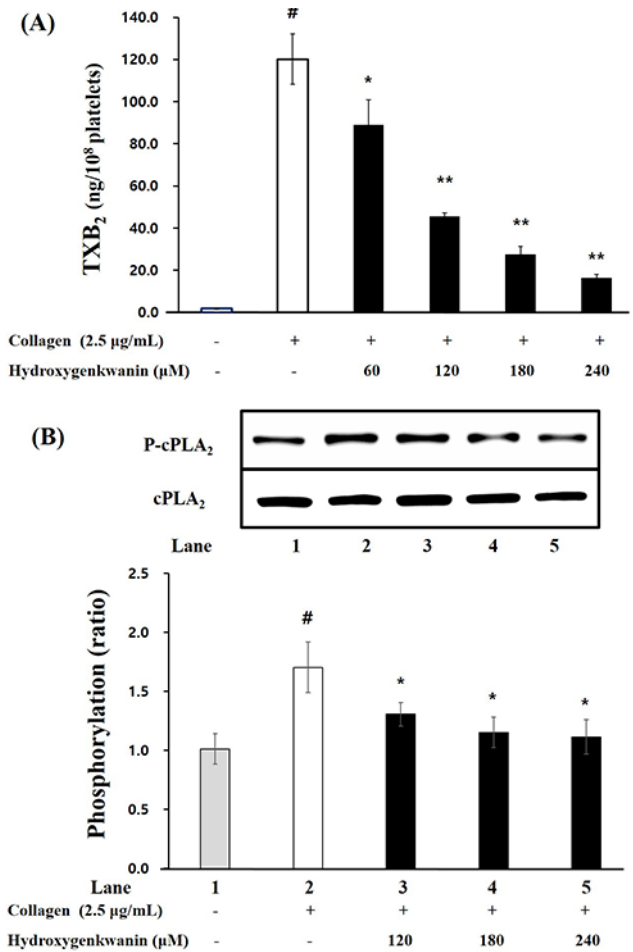
**Fig. 4** HGK's effect on ATP and serotonin release. (A) HGK's effect on ATP release (B) HGK's effect on serotonin release. All experiments were performed as described in "Materials and Methods" section. The data are expressed as the mean ± standard deviation (n=4). #*p* < 0.05 compared with no-stimulated intact platelets, \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.001 versus the collagen-stimulated human platelets

향을 주는 지 확인하였다.

Fig. 5A에서 보는 바와 같이, 손상받지 않은 세포에서 1.83 ± 0.33 ng/10<sup>8</sup> cells였던 TXA<sub>2</sub>가 collagen에 의해 120.09 ± 11.97 ng/10<sup>8</sup> cells까지 크게 증가하였고, 증가된 TXA<sub>2</sub> 생성량이 hydroxygenkwanin에 의해 농도의존적으로 크게 억제되었음을 확인하였다. 또한, collagen에 의해 인산화가 증가된 cPLA<sub>2</sub>가 hydroxygenkwanin을 함께 처리하였을 때 농도의존적으로 억제되었다(Fig. 5B). 이는 hydroxygenkwanin가 MAPK 경로의 조절을 통해 cPLA<sub>2</sub>의 인산화를 억제함으로써 arachidonic acid의 분비를 저해하여 TXA<sub>2</sub> 생성이 감소된 것으로 보인다. 이러한 결과들은 hydroxygenkwanin가 TXA<sub>2</sub> 생성을 저해하는 항혈소판 물질로써 유용하게 이용될 수 있음을 보여주었다.

### 초 록

심혈관 질환(CVD)은 전 세계적으로 주요 사망 원인으로써 갈수록 증가하는 추세이며, 혈관 손상이 발생하였을 때, 혈전이 과도하게 형성되는 것이 그 원인인 중 하나이다. 근래에 혈소판 억제를 통한 항혈전 물질에 대한 관심이 커지고 있으며 천연 생물활성 화합물을 사용함으로써 부작용을 줄이려는 노력이 이루어



**Fig. 5** HGK's effect on TXA<sub>2</sub> production & cPLA<sub>2</sub> phosphorylation. (A) HGK's effect on collagen-induced TXA<sub>2</sub> production (B) HGK's effect on collagen-induced cPLA<sub>2</sub> phosphorylation. All experiments were performed as described in "Materials and Methods" section. The data are expressed as the mean ± standard deviation (n=4). #*p* < 0.05 compared with no-stimulated intact platelets, \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.001 versus the collagen-stimulated human platelets

지고 있다. Flavonoid 중 하나로 알려진 hydroxygenkwanin (HGK)은 팔꽃나무(*Daphne genkwa*)에서 정제되는 물질로서 항균, 항염증 및 항암 효과가 있다고 알려져 있으며, 혈전증을 예방하는 조직 인자의 억제제 역할을 한다고 보고되었지만 항혈소판 효과와 그 작용기전에 대해서는 거의 알려지지 않았다. 본 연구를 통해 HGK가 collagen 유도인 혈소판 응집에 미치는지 확인하였고, 그 작용 기전을 확인하였다. HGK는 혈소판 신호 전달 과정에서 PI3K/AKT 및 MAPK의 인산화를 억제하였고, ATP 및 serotonin 등의 혈소판 내 과립 분비를 감소하였다. 또한, HGK는 cPLA<sub>2</sub>의 인산화를 억제하며 응집 촉진물질인 TXA<sub>2</sub> 생성을 강하게 저해하였다. 결과적으로 응집 유도 물질인 collagen가 유도한 혈소판 응집을 86.36 µM의 IC<sub>50</sub>로 강하게 억제하였다. 그러므로, 본 연구를 통해 HGK가 혈관 손상을 통해 일어나는 사람 혈소판의 활성화 및 응집을 억제하는 항혈전 물질로 가치가 있음을 분명히 하였다.

**Keywords** 과립 분비 · 혈소판 응집 · Hydroxygenkwanin · Mitogen-activated protein kinases · TXA<sub>2</sub>

**Acknowledgment** Funding for this paper was provided by Namseoul University.

## References

- Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, Das SR, de Ferranti S, Després JP, Fullerton HJ, Howard VJ, Huffman MD, Isasi CR, Jiménez MC, Judd SE, Kissela BM, Lichtman JH, Lisabeth LD, Liu S, Mackey RH, Magid DJ, McGuire DK, Mohler ER, Moy CS, Muntner P, Mussolino ME, Nasir K, Neumar RW, Nichol G, Palaniappan L, Pandey DK, Reeves MJ, Rodriguez CJ, Rosamond W, Sorlie PD, Stein J, Towfighi A, Turan TN, Virani SS, Woo D, Yeh RW, Turner MB (2016) Heart disease and stroke statistics-2016 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 133: e38–e48. doi: 10.1161/CIR.0000000000000350
- Andrews RK, Berndt MC (2004) Platelet physiology and thrombosis. *Thromb Res* 114: 447–453. doi: 10.1016/j.thromres.2004.07.020
- Barrett NE, Holbrook L, Jones S, Kaiser WJ, Moraes LA, Rana R, Sage T, Stanley RG, Tucker KL, Wright B, Gibbins JM (2008) Future innovations in anti-platelet therapies. *Br J Pharmacol* 154: 918–939. doi: 10.1038/bjp.2008.151
- Badimon L, Vilahur G, Padro T (2010) Nutraceuticals and atherosclerosis: human trials. *Cardiovasc Ther* 28: 202–215. doi: 10.1111/j.1755-5922.2010.00189.x
- Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, Covas MI, Corella D, Arós F, Gómez-Gracia E, Ruiz-Gutiérrez V, Fiol M, Lapetr J, Lamuela-Raventós RM, Serra-Majem L, Pintó X, Basora J, Muñoz MA, Sorlí JV, Martínez JA, Martínez-González MA (2013) Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *N Engl J Med* 368: 1279–1290. doi: 10.1056/NEJMoa1200303
- Irfan M, Kwon TH, Yun BS, Park NH, Rhee MH (2018) Eisenia bicyclis (brown alga) modulates platelet function and inhibits thrombus formation via impaired P2Y<sub>12</sub> receptor signaling pathway. *Phytomedicine* 40: 79–87. doi: 10.1016/j.phymed.2018.01.003
- Rastogi S, Pandey MM, Rawat A (2016) Traditional herbs: a remedy for cardiovascular disorders. *Phytomedicine* 23: 1082–1089. doi: 10.1016/j.phymed.2015.10.012
- Irfan M, Jeong D, Kwon HW, Shin JH, Park SJ, Kwak D, Kim TH, Lee DH, Park HJ, Rhee MH (2018) Ginsenoside-Rp3 inhibits platelet activation and thrombus formation by regulating MAPK and cyclic nucleotide signaling. *Vascul Pharmacol* 109: 45–55. doi: 10.1016/j.vph.2018.06.002
- Adam F, Kauskot A, Rosa JP, Bryckaert M (2008) Mitogen activated protein kinases in hemostasis and thrombosis. *J Thromb Haemost* 6: 2007–2016. doi: 10.1111/j.1538-7836.2008.03169.x
- 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. doi: 10.1182/blood.V94.11.3800
- Kramer RM, Roberts EF, Strifler 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
- Michelson AD (2010) Antiplatelet therapies for the treatment of cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov* 9: 154–169. doi: 10.1038/nrd2957
- 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, Jakubowski JA (1996) p38 mitogenactivated protein kinase phosphorylates cytosolic phospholipase A2 (cPLA<sub>2</sub>) in thrombin-stimulated platelets. Evidence that proline-directed phosphorylation is not required for mobilization of arachidonic acid by cPLA<sub>2</sub>. *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
- Mohamed TA, Hegazy MF, Abd El Aty AA, Ghabbour HA, Alsaid MS, Shahat AA, Paré PW (2017) Antimicrobial sesquiterpene lactones from *Artemisia sieberi*. *J Asian Nat Prod Res* 19: 1093–1101. doi:10.1080/10286020.2017.1302939
- Zhang CF, Zhang SL, He X, Yang XL, Wu HT, Lin BQ, Jiang CP, Wang J, Yu CH, Yang ZL, Wang CZ, Li P, Yuan CS (2014) Antioxidant effects of Genkwa flos flavonoids on Freund's adjuvant-induced rheumatoid arthritis in rats. *J Ethnopharmacol* 153: 793–800. doi:10.1016/j.jep.2014.03.046
- Ekuadzi E, Dickson R, Fleischer T, Annan K, Pistorius D, Oberer L, Annan K, Gibbons S (2014) Flavonoid glycosides from the stem bark of *Margaritaria discoidea* demonstrate antibacterial and free radical scavenging activities. *Phytother Res* 28: 784–787. doi:10.1002/ptr.5053
- Taguchi N, Yuriguchi M, Ando T, Kitai R, Aoki H, Kunisada T (2019) Flavonoids with Two OH Groups in the B-Ring Promote Pigmented Hair Regeneration. *Biol Pharm Bull* 42: 1446–1449. doi:10.1248/bpb.19-00295
- Leu YL, Wang TH, Wu CC, Huang KY, Jiang YW, Hsu YC, Chen CY (2020) Hydroxygenkwanin Suppresses Non-Small Cell Lung Cancer Progression by Enhancing EGFR Degradation. *Molecules* 25(4). doi: ARTN 94110.3390/molecules25040941
- Wang Y, Xu YS, Yin LH, Xu LN, Peng JY, Zhou H, Kang W (2013) Synergistic anti-glioma effect of Hydroxygenkwanin and Apigenin in vitro. *Chem Biol Interact* 206: 346–355. doi: 10.1016/j.cbi.2013.10.009
- Huang YC, Lee PC, Wang JJ, Hsu YC (2019) Anticancer Effect and Mechanism of Hydroxygenkwanin in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Front Oncol* 9: 911. doi:10.3389/fonc.2019.00911
- Chen CY, Chen CC, Chuang WY, Leu YL, Ueng SH, Hsueh C (2020) Hydroxygenkwanin Inhibits Class I HDAC Expression and Synergistically Enhances the Antitumor Activity of Sorafenib in Liver Cancer Cells. *Front Oncol* 10: 216. doi:10.3389/fonc.2020.00216
- Jiang W, Kou J, Zhang Z, Yu B (2009) The effects of twelve representative flavonoids on tissue factor expression in human monocytes: structure-activity relationships. *Thromb Res* 124: 714–720. doi:10.1016/j.thromres
- Patrono C (1994) Aspirin as an antiplatelet drug. *N Engl J Med* 330: 1287–1294. doi: 10.1056/NEJM199405053301808
- Calderwood DA (2004) Integrin activation. *J Cell Sci* 117: 657–666. doi: 10.1242/jcs.01014
- 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. doi: 10.1161/01.cir.96.4.1109
- 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