



Ginsenoside Rk3 suppresses U46619-induced human platelets aggregation through regulation of cAMP and PI3K/Akt pathway

Dong-Ha Lee

U46619 유도인 사람 혈소판에서 cAMP 및 PI3K/Akt 경로의 조절을 통한 Ginsenoside Rk3의 응집억제 효과

이 동 하

Received: 22 April 2023 / Accepted: 16 May 2023 / Published Online: 23 May 2023
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2023

Abstract Proper activation and aggregation of platelets are necessary, but excessive or abnormal aggregation can lead to cardiovascular diseases such as stroke, thrombosis, and atherosclerosis. Therefore, identifying a substance that can regulate or inhibit platelet aggregation is important for preventing and treating these diseases. Several studies have shown that certain ginsenoside compounds in *Panax ginseng* can inhibit platelet aggregation. Among these compounds, Rk3 (G-Rk3) from *Panax ginseng* needs to be further explored in order to reveal the mechanisms of action during inhibition. G-Rk3 significantly increased amounts of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and led to significant phosphorylation of cAMP-dependent kinase substrates vasodilator-stimulated phosphoprotein and inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. Furthermore, the effect of G-Rk3 extended to the inhibition of PI3K/Akt phosphorylation resulting in the reduced secretion of intracellular granules. Ultimately, G-Rk3 effectively inhibited platelet aggregation. Therefore, we suggest G-Rk3's potential as a prophylactic or therapeutic agent for cardiovascular diseases caused by faulty platelet aggregation.

Keywords Cyclic AMP · Granule secretion · G-Rk3 · PI3K/Akt · Platelet aggregation

서 론

다양한 질병 중에서 심혈관 질환은 전 세계적으로 주요 사망 원인이며, 미국에서만 관상 동맥성 심장 질환으로 7명 중 1명이, 9명 중 1명이 심부전으로 사망한다고 보고되었다[1]. 혈관 손상 시 발생하는 지혈은 혈전 형성 및 출혈 방지에 있어서 혈소판의 적절한 기능을 요구한다. 그러나, 부적절한 혈소판 활성화 및 응집은 원치 않는 혈전 형성으로 이어져 죽상동맥경화증, 관상동맥 질환, 심부전 및 뇌졸중과 같은 심혈관계 질병을 유발한다[2].

약리학적 화합물을 이용한 혈전성 합병증의 치료는 혈소판 억제를 통해 작용하는 것으로 나타났으며 현재의 심혈관 질환의 예방 및 치료는 이러한 이점을 이용하지만 불행히도 주요 합병증 및 부작용이 수반되므로 더 나은 대안이 필요한 상황이다[3]. 혈전증 및 혈소판 응집과 관련된 장애의 치료에서 유망한 것으로 입증된 한 가지 방법은 천연 생물 활성 화합물을 사용하는 것이다[4]. 지중해의 전통적인 식단에서 발견되는 화합물과 전통적으로 의학 목적으로 사용되는 식물은 심혈관 질환의 예방에서 항혈소판 및 심장 보호 특성을 나타냈다[5-7].

정상적인 혈액 순환 동안 혈관 조직의 내피 세포는 prostaglandin I₂와 산화 질소를 분비하여 혈소판에서 cAMP 및 cGMP 생성을 시작한다. cAMP의 생산은 protein kinase A (PKA)를 활성화하고 cGMP의 생산은 protein kinase G (PKG)를 활성화한다. 이들 모두 vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP)와 inositol

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.

1,4,5-triphosphate receptor (IP₃R)를 인산화한다고 보고되었다[8]. IP₃R의 인산화는 세포질로의 칼슘 동원을 억제하고, VASP는 αIIb/β3 및 액틴 필라멘트의 조절에 관여하여 혈소판 응집을 저해한다고 알려져 있다[9-11]. 또한, serotonin과 ATP를 포함하는 혈소판 과립의 분비는 응집 중 중요한 단계이며 PI3K/Akt 인단백질의 인산화에 영향을 받는 것으로 알려져 있다[12].

인삼에 함유된 ginsenoside 중 홍삼과 백삼의 주요 필수성분인 ginsenoside-Rb1, -Rc, -Rd, -Re, -Rg1에서 다양한 생물학적 반응이 확인되었다[13,14]. Ginsenoside 중 하나인 G-Rk3는 폐암에 대한 항암 효과, 간 손상 시의 염증 억제 및 세포 사멸 억제, 신장 손상에 대한 보호 효과가 있는 것으로 나타났다[15-17]. 그러나 G-Rk3에 의한 항혈소판 작용 기전을 조사한 연구는 거의 없는 상황이기 때문에 우리는 사람 혈소판 응집에 대한 G-Rk3의 조절 작용에 대해 연구하고자 하였다.

재료 및 방법

시약

항체 및 western blotting 용해 완충액은 Cell Signaling (Beverly, MA, USA)에서 주문했다. G-Rk3는 대전(한국)의 Ambo Institute (Dajeon, Korea)에서 주문했다. 혈소판 유도제인 U46619는 Chrono-Log Corporation (Havertown, PA, USA)에서 주문했다. Serotonin, ATP 및 cAMP/cGMP ELISA kit는 Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI, USA)에서 주문되었다. 위에 나열되지 않은 다른 모든 시약은 Avention Corporation (Incheon, Korea)에서 주문하여 사용했다.

사람 세척 혈소판 준비

사람의 혈소판 풍부 혈장(platelet rich plasma, PRP)은 한국 수원에 있는 대한적십자 혈액원으로부터 제공받았다. 혈소판을 얻기 PRP를 1,300 g의 속도로 총 10분 동안 원심분리 했고, 세척을 2회 수행하였다. 세척이 완료된 후 혈소판을 부유액에 10⁸ cells/mL의 최종 농도로 현탁하였다. 불필요한 혈소판 응집을 방지하기 위해 모든 절차에서 온도를 25 °C로 유지했다. 모든 인체유래물의 사용에 대해 남서울대학교 생명윤리위원회 (Institutional Review Board, 1041479-HR-202110-002)로부터 적절한 승인을 받았다.

혈소판 응집반응 측정

10⁸ cells/mL의 농도로 현탁된 혈소판을 다양한 용량의 G-Rk3를 첨가하여 배양하였고, 이 후 2 mM CaCl₂를 주입한 후 자극을 위해 U46619를 첨가하여 5분간 확인하였다. 반응은 Chrono-Log Co.의 혈소판 응집기를 사용하여 교반 속도를 1,000 rpm으로 설정하여 측정하였고, 빛 투과율의 증가를 통해 응집률을 계산하였다.

cAMP 및 cGMP 생성량 측정

10⁸ cells/mL의 농도로 현탁된 혈소판을 다양한 용량의 G-Rk3를 첨가하여 배양하였다. 이 후, 2 mM CaCl₂를 주입한 후, 자극을 위해 U46619를 첨가하여 5분간 반응하고 1M의 HCl을 사용하여 반응을 종결시켰다. 생성된 cAMP 및 cGMP는 cAMP

및 cGMP ELISA kit로 BioTek Instruments (Winooski, VT, USA)의 Synergy HT Multi-Reader를 사용하여 분석하였다.

ATP 및 serotonin 방출 측정

10⁸ cells/mL의 농도로 현탁된 혈소판을 다양한 용량의 G-Rk3를 첨가하여 배양하였다. 이 후, 2 mM CaCl₂를 주입한 후, 자극을 위해 U46619를 첨가하여 5분간 반응하고 2 mM EDTA액을 사용하여 반응을 종결시켰다. 이 시료를 원심분리하여 serotonin 및 ATP를 상층에 모았다. 방출된 serotonin 및 ATP는 serotonin 및 ATP assay kit로 BioTek Instruments의 Synergy HT Multi-Reader를 사용하여 분석하였다.

Western blotting 측정

반응을 정지시키기 위해 1x 용해 완충액을 사용하였다. 용해된 혈소판에서 단백질 농도를 측정하였고, 20 µg의 단백질을 4-20% SDS-PAGE에서 분리하고 PVDF membrane을 사용하여 옮겼다. 1:1000 희석 배율의 일차 항체로 반응하고 1:2000 희석 배율에서 이차 항체로 반응하여 ECL 시약으로 시각화하였다.

통계 분석

실험의 모든 결과를 나타내기 위해 평균 ± 표준편차를 사용하였다. 결과는 Student's t-test 또는 ANOVA를 사용하였고, 그룹 평균이 분산 분석 측면에서 유의미한 차이가 있으면 Scheffe의 방법으로 추가로 조사했다. 통계분석은 SPSS 21.0.0.0 소프트웨어(SPSS, Chicago, IL, USA)를 이용하여 수행하였으며, *p* < 0.05를 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

cAMP 및 cGMP 생성 및 IP₃R 인산화에 대한 G-Rk3의 작용
cAMP와 cGMP는 혈소판 활성화를 억제한다고 알려져 있기에, 이들에 미치는 G-Rk3의 작용을 확인했다. G-Rk3에 의한 cAMP 생성 증가가 유의적으로 나타났으나, cGMP의 증가는 없었다(Fig. 1). 이 결과는 G-Rk3가 U46619로 유도된 혈소판에서 cAMP의 생성만을 상당히 증가시켰으므로 혈소판의 활성화를 억제할 수 있음을 보여주었다.

cAMP의 의존하는 protein kinase에 의해 인산화되는 IP₃R은 또한 세포 내 칼슘 수준에 기여하므로 IP₃R 인산화에 대한 G-Rk3의 효과를 조사하였다. 여기에서도 G-Rk3가 농도의존적으로 IP₃R 인산화를 유도한다는 것을 확인하였고(Fig. 2A), 이러한 결과는 세포 내 칼슘 농도를 감소시키는 G-Rk3의 능력으로 나타날 것이라 예상된다.

VASP 인산화에 대한 G-Rk3의 작용

G-Rk3이 U46619 유도의 혈소판에서 cAMP 생성을 증가시킨다는 결과에 근거하여 G-Rk3가 cAMP 및 cGMP에 의존적으로 인산화되는 VASP에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과, cAMP에 의존하는 VASP Ser157의 인산화는 G-Rk3의 존재 하에서 유의하게 증가하는 반면, cGMP에 의존하는 VASP Ser239의 인산화는 유의한 변화가 없는 것으로 나타났다(Fig. 2B) 이것은 G-Rk3로부터 cAMP의 증가가 cAMP 의존성 VASP Ser157의

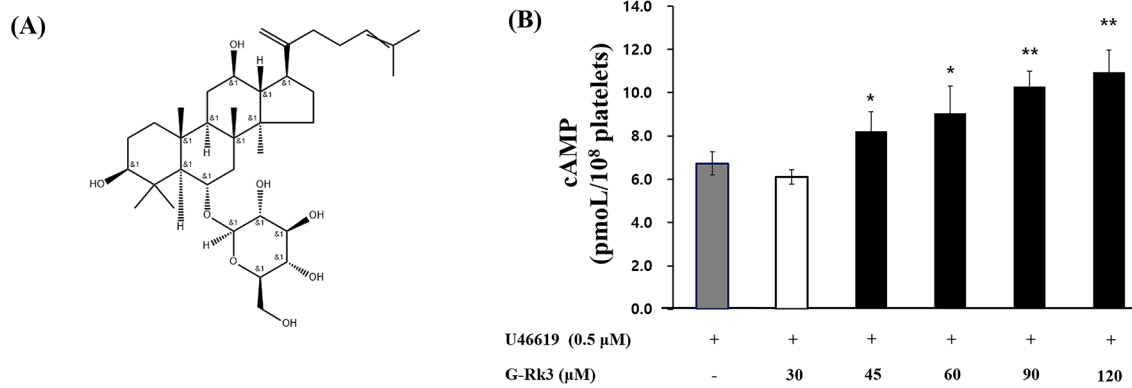


Fig. 1 G-Rk3’s effect on cyclic nucleotides production. (A) Chemical structure of G-Rk3 (MW: 620.9). (B) G-Rk3’s effect on cAMP production. The results are shown as mean ± SD (n=4). **p* < 0.05, ***p* < 0.001 in comparison to the U46619-induced platelets

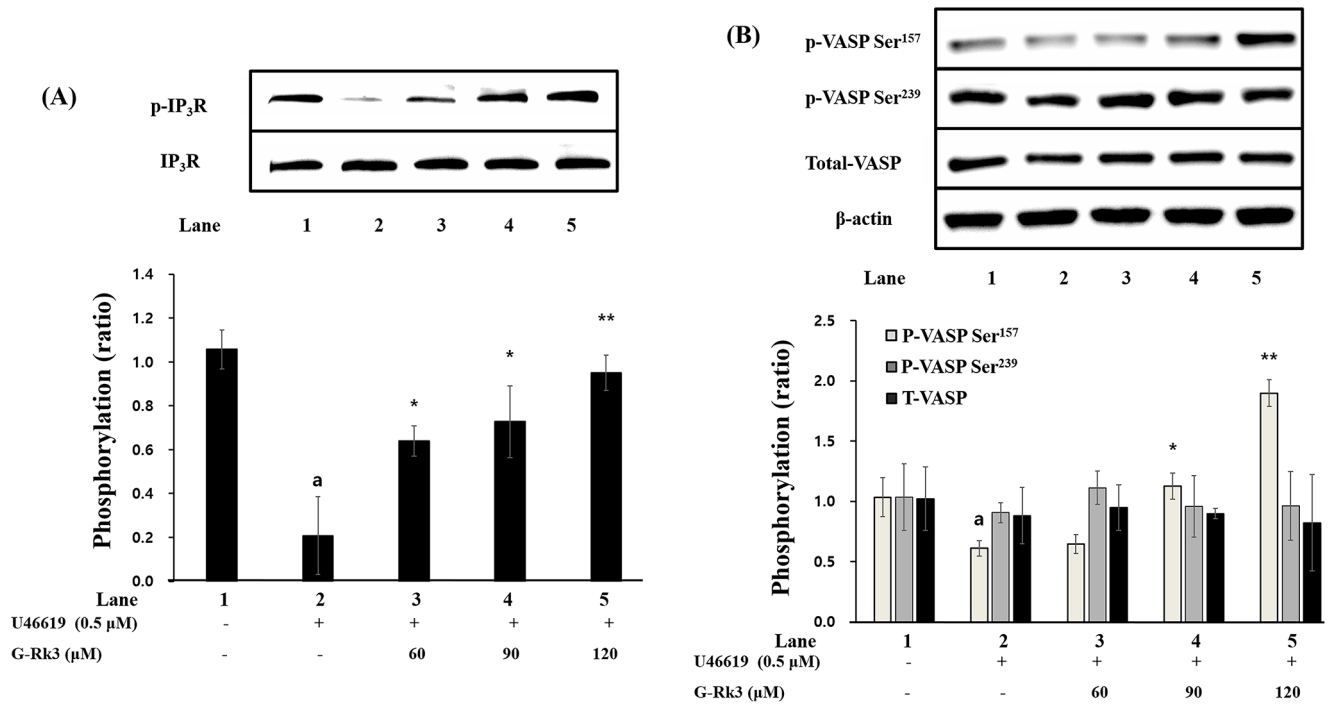


Fig. 2 G-Rk3’s effect on cyclic nucleotides related phosphoproteins. (A) Effects of G-Rk3 on IP₃R phosphorylation. (B) Effects of G-Rk3 on VASP phosphorylation. The results are shown as mean ± SD (n=4). ^a*p* < 0.05 in comparison to no-stimulated platelets, **p* < 0.05, ***p* < 0.001 in comparison to the U46619-induced platelets

인산화를 상당히 증가시킨다는 것을 의미한다.

PI3K/Akt의 인산화에 대한 G-Rk3의 작용

PI3K/Akt는 혈소판 과립의 방출에 관여하여 혈소판을 활성화시킨다고 알려져 있기에 G-Rk3가 PI3K/Akt 인산화에 미치는 영향을 조사하였다. 혈소판 유도제인 U46619에 노출되었을 때 PI3K와 Akt 모두 인산화가 크게 증가한 것으로 나타났습니다. 그러나, G-Rk3의 존재 하에서 U46619 유도의 PI3K/Akt 인산화가 농도의존적으로 감소하였다(Fig. 3). 이 결과는 PI3K/Akt의 인산화를 억제함으로써 혈소판 응집을 조절하는 G-Rk3의 능력을 확인시켜준다.

과립 방출에 대한 G-Rk3의 작용

혈소판 내 과립(ATP 및 serotonin)의 방출은 혈소판 응집에 관여하므로 과립 방출에 영향을 미치는 G-Rk3의 능력을 조사했다. 혈소판 유도제인 U46619에 의해 ATP의 방출은 손상되지 않은 세포와 비교하여 0.34±0.03 μM에서 7.74±0.17 μM로 강하게 증가했다(Fig. 4A). 그러나 다양한 농도(60, 90 및 120 μM)의 G-Rk3는 증가한 ATP를 유의적으로 억제하였다. Serotonin 방출도 U46619에 의해 강하게 증가하였고, G-Rk3 처리에 의해 농도의존적으로 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 4B). 이 결과들을 종합하면, G-Rk3는 ATP 및 serotonin의 과립 방출을 상당히 억제하는 작용을 하며 이는 PI3K/Akt의 인산화 억제와 관

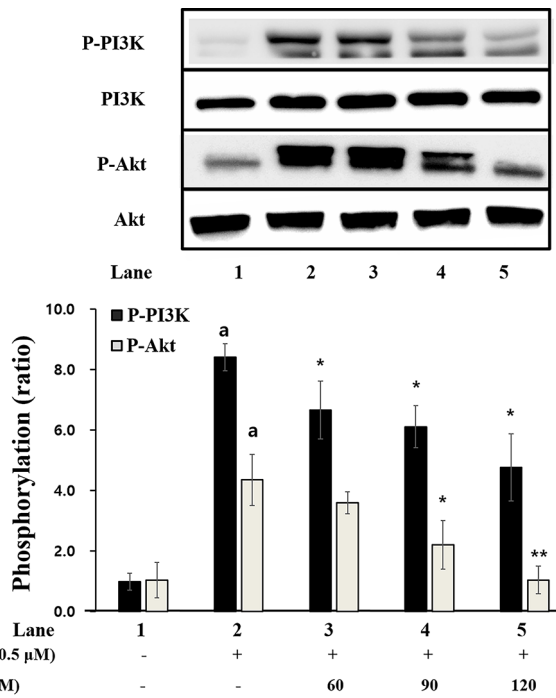


Fig. 3 G-Rk3’s effect on the phosphorylation of PI3K/Akt. The results are shown as mean ± SD (n=4). **p* <0.05 in comparison to no-stimulated platelets, ***p* <0.001 in comparison to the U46619-induced platelets

던되는 것으로 여겨진다.

사람 혈소판 응집에 대한 G-Rk3의 작용

혈소판 유도제인 U46619 (0.5 μM)는 사람 혈소판의 응집을 75.5±1.3%로 강하게 일으켰다(Fig. 5A). G-Rk3의 첨가가 U46619로 유도된 혈소판에서 혈소판 응집에 대한 가장 강력한 억제 효과가 있음이 관찰되었다(Fig. 5B). 응집 억제율은 45, 60, 90 및 120 μM의 G-Rk3에서 각각 18.6, 53.6, 75.5, 94.2%로써 농도의존적이었으며, 69.08 μM의 IC₅₀를 확인할 수 있었다(Fig. 5C). 또한, 세포 독성을 확인하였을 때, G-Rk3에 의해 유독성이 없다는 것을 확인하였다(Data not shown). 이러한 결과는

G-Rk3가 세포독성을 가지지 않고 U46619 유도의 혈소판 응집을 억제하는 강력한 능력을 가지고 있음을 보여준다.

고찰

혈소판이 활성화 될 때, 혈소판 막의 phospholipase C-γ2는 인지질 성분인 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate를 diacylglycerol과 inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃)로 분해한다[18,19]. 이 반응은 IP₃는 혈소판의 세포질로 칼슘이 동원되는 것을 유도하며. 칼슘의 동원증가는 미오신 경쇄와 pleckstrin을 인산화하여 혈소판 응집을 촉진한다고 알려져 있다[18,19].

한편, 세포내 칼슘은 cAMP와 cGMP 모두의 cyclic nucleotide가 존재할 때 감소하는데, 이 과정에서 이들 cyclic nucleotide는 혈소판 응집을 억제하는 cyclic nucleotide 의존성 protein kinase인 protein kinase A (PKA) 및 protein kinase G (PKG)를 활성화한다[20]. 이 연구는 G-Rk3가 cyclic nucleotide 중 cAMP의 생산을 상당히 증가시켰고, cAMP에 의존적인 PKA가 활성화될 때 인산화되는 기질 중 inositol 1,4,5-triphosphate receptor (IP₃R)을 농도의존적으로 증가시켰다. 또한, G-Rk3로부터의 cAMP 생성 증가는 또한 PKA 활성화를 통해 VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein)의 인산화를 촉진하였다. VASP는 PKA와 PKG 모두에 중요한 기질이며 혈소판 분비 및 부착 특성을 조절하여 혈소판 활성화 조절을 돕는다[21,22]. 이 단백질의 인산화는 integrin αIIb/β3 활성화의 억제를 통해 혈소판 간의 응집 억제를 유도한다[21,22].

이러한 결과들을 고려할 때, G-Rk3가 cAMP를 상승시키는 작용기전으로 효과를 나타내는 것으로 보이며, 막 수용체에 결합하여 cAMP 상승에 관여하는 효소인 adenylate cyclase를 활성화한다고 알려져 있는 G-protein를 자극하였을 것이라 예상된다[23]. 앞선 연구 결과들을 종합해 볼 때, G-Rk3가 cAMP 생성 증가와 VASP Ser157의 인산화를 유도하고, 이는 세포질 내 칼슘의 동원과 αIIb/β3의 친화력을 억제하여 하였을 것으로 예상해 볼 수 있다[24].

또한, PI3K/Akt 경로는 혈소판 분비 기능에 관여하는 필수 단백질로 알려져 있다[25,26]. 본 연구에서 G-Rk3는 U46619 유도의 혈소판에서 PI3K/Akt 경로를 유의적으로 차단하였고, 그 결과로 serotonin 및 ATP와 같은 세포 내 과립의 방출을 강하게 감소시켰다. 최종적으로, G-Rk3는 U46619가 유도하는 혈소

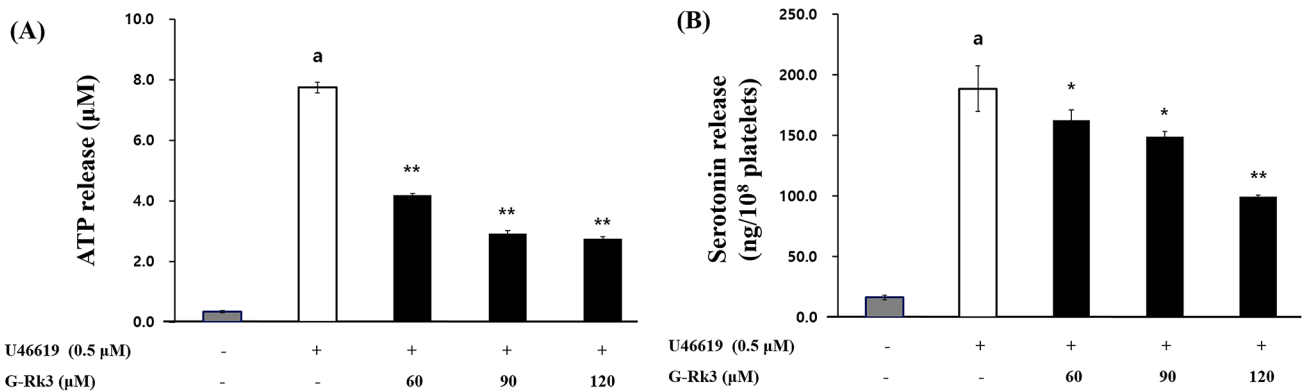


Fig. 4 G-Rk3’s effect on the secretion of granules. (A) G-Rk3’s effect on ATP release. (B) G-Rk3’s effect on the release of serotonin. The results are shown as mean ± SD (n=4). **p* <0.05 in comparison to no-stimulated platelets, ***p* <0.001 in comparison to the U46619-induced platelets

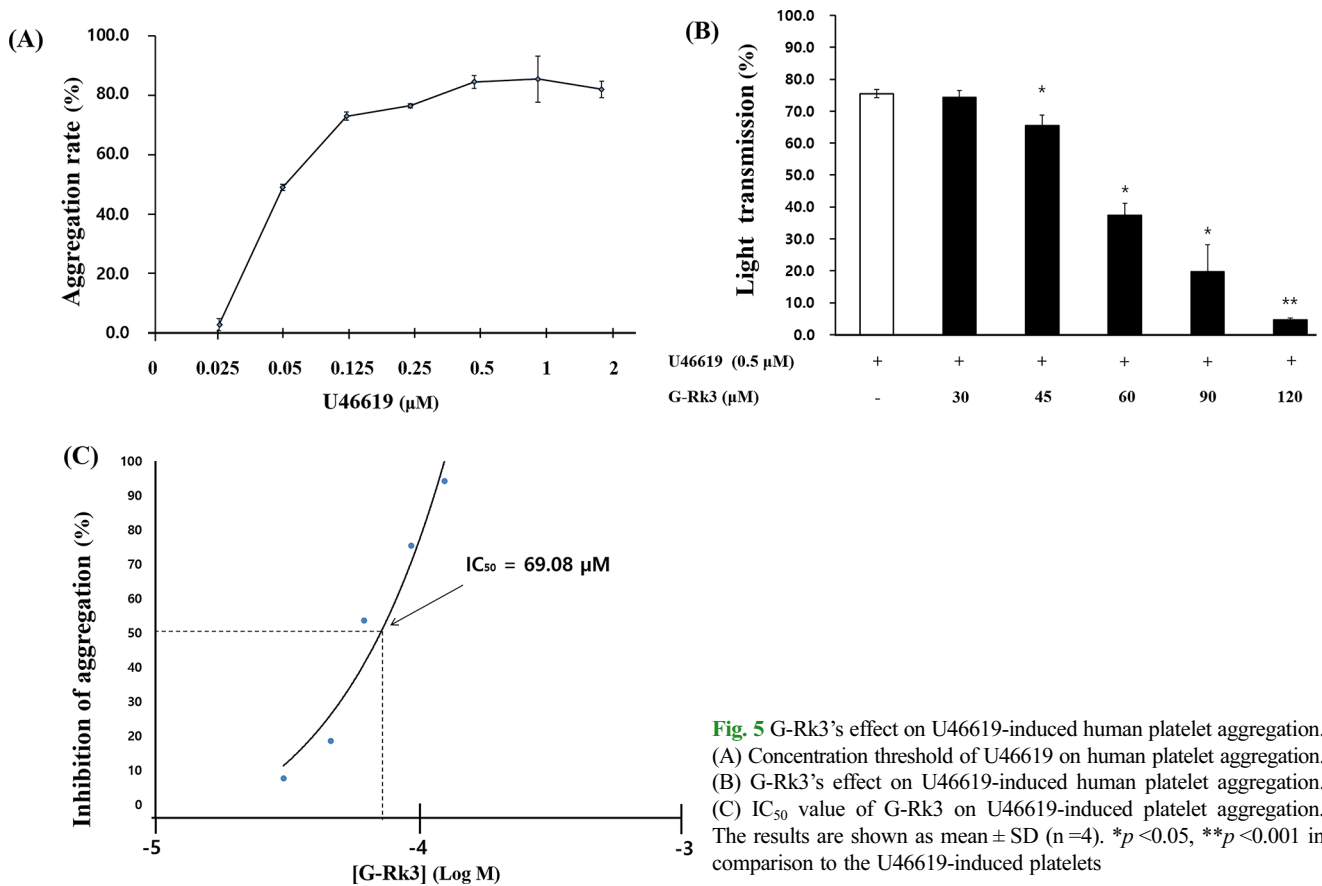


Fig. 5 G-Rk3's effect on U46619-induced human platelet aggregation. (A) Concentration threshold of U46619 on human platelet aggregation. (B) G-Rk3's effect on U46619-induced human platelet aggregation. (C) IC₅₀ value of G-Rk3 on U46619-induced platelet aggregation. The results are shown as mean ± SD (n=4). *p < 0.05, **p < 0.001 in comparison to the U46619-induced platelets

판 응집을 농도의존적으로 강하게 억제하였다.

앞선 연구들에서 G-Rp1, G-Rp3 및 G-Rp4와 같은 홍삼 아래의 ginsenoside에서 항혈소판 효과가 있음을 확인한 바 있다 [13,14]. 또한, Rk3와 유사한 구조를 가진 Rk1이 cAMP를 상승시켜 Ca²⁺의 억제를 유도하고 과립 방출 및 αIIb/β3 활성화를 하향 조절하여 혈소판 매개의 혈전증을 억제한다고 보고되었다 [24]. 본 연구 결과를 통해, Rk3도 Rk1과 유사한 기전을 통해 항혈소판 효과가 있음을 예상할 수 있으며, IC₅₀로 비교하면 Rk1이 5배 정도 강한 혈소판 응집효과를 가지는 것으로 확인되었다[24].

결론적으로, G-Rk3는 사람 혈소판에서 cAMP를 증가시키고, IP₃R 및 VASP 인산화를 유도하며, PI3K/Akt 경로의 인산화를 조절하여 과립 방출을 감소시킴으로써 혈소판 응집을 억제하는 기능을 가진다. 그러므로, 우리는 G-Rk3가 항혈소판 물질로써 혈전성 질환의 예방 및 치료에 가치가 있음을 제시한다.

초 록

혈소판의 적절한 활성화와 응집이 필요하지만 과도하거나 비정상적인 응집은 뇌졸중, 혈전증, 동맥경화증과 같은 심혈관 질환을 유발할 수 있다. 따라서 이러한 질병을 예방하고 치료하기 위해서는 혈소판 응집을 조절하거나 억제할 수 있는 물질을 찾는 것이 중요하다. 여러 연구에서 *Panax* 인삼의 특정 ginsenoside 화

합물이 혈소판 응집을 억제할 수 있음이 알려져 있다. 이들 화합물 중 *Panax ginseng*의 Rk3 (G-Rk3)는 혈소판 응집 억제의 기전이 불확실 하기에 이를 밝히기 위한 연구가 필요하다. G-Rk3는 cAMP의 양을 강하게 증가시켰고 cAMP 의존성 kinase의 기질인 VASP 및 IP₃R의 인산화를 유도했다. 또한, G-Rk3의 효과는 PI3K/Akt 인산화의 억제를 일으켜 세포 내 과립의 분비를 감소시켰다. 궁극적으로 G-Rk3는 혈소판 응집을 효과적으로 억제하였다. 따라서 우리는 과도한 혈소판 응집으로 인한 심혈관 질환의 예방 또는 치료제로서의 G-Rk3의 가능성을 제안한다.

Keywords 과립 방출 · 혈소판 응집 · Cyclic AMP · G-Rk3 · PI3K/Akt

Acknowledgment Funding for this paper was provided by Namseoul University.

Conflict of interest The authors declare no conflict of interest.

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
2. Andrews RK, Berndt MC (2004) Platelet physiology and thrombosis. *Thromb Res* 114: 447–453. doi: 10.1016/j.thromres.2004.07.020
 3. 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.2008.1514.
 4. 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
 5. Estruch R, Ros E, Salas-Salvado J, Covas MI, Corella D, Arós F, Gómez-Gracia E, Ruiz-Gutiérrez V, Fiol M, Lapetr J, Lamuela-Raventos 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
 6. Irfan M, Kwon TH, Yun BS, Park NH, Rhee MH (2018) *Eisenia bicyclis* (brown alga) modulates platelet function and inhibits thrombus formation via impaired P2Y₁₂ receptor signaling pathway. *Phytomedicine* 40: 79–87. doi: 10.1016/j.phymed.2018.01.003
 7. 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
 8. 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
 9. 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
 10. Laurent V, Loisel TP, Harbeck B, Harbeck B, Wehman A, Gröbe L, Jockusch BM, Wehland J, Gertler FB, 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
 11. 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
 12. 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
 13. Nam KY (2005) The comparative understanding between red ginseng and white ginsengs, processed ginsengs (*Panax ginseng* CA Meyer). *J Ginseng Res* 29: 1–18. doi: 10.5142/JGR.2005.29.1.001
 14. Ha YW, Lim SS, Ha IJ, Na YC, Seo JJ, Shin H, Son SH, Kim YS (2007) Preparative isolation of four ginsenosides from Korean red ginseng (steam-treated *Panax ginseng* CA Meyer), by high-speed counter-current chromatography coupled with evaporative light scattering detection. *J Chromatogr A* 1151: 37–44. doi: 10.1016/j.chroma.2007.01.038
 15. Duan Z, Deng J, Dong Y, Zhu C, Li W, Fan D (2017) Anticancer effects of ginsenoside Rk3 on non-small cell lung cancer cells: *in vitro* and *in vivo*. *Food Funct* 8: 3723–3736. doi: 10.1039/c7fo00385d
 16. Qu L, Zhu Y, Liu Y, Yang H, Zhu C, Ma P, Deng J, Fan D (2019) Protective effects of ginsenoside Rk3 against chronic alcohol-induced liver injury in mice through inhibition of inflammation, oxidative stress, and apoptosis. *Food Chem Toxicol* 126: 277–284. doi: 10.1016/j.ftc.2019.02.032
 17. Baek SH, Shin BK, Kim NJ, Chang SY, Park JH (2017) Protective effect of ginsenosides Rk3 and Rh4 on cisplatin-induced acute kidney injury *in vitro* and *in vivo*. *J Ginseng Res* 41: 233–239. doi: 10.1016/j.jgr.2016.03.008
 18. Berridge MJ, Irvine RF (1989) Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 341: 197–205. doi: 10.1038/341197a0
 19. Nishikawa M, Tanaka T, Hidaka H (1980) Ca²⁺-calmodulin-dependent phosphorylation and platelet secretion. *Nature* 287: 863–865. doi: 10.1038/287863a0
 20. 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
 21. Wentworth JK, Pula G, Poole AW (2006) Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is phosphorylated on Ser157 by protein kinase C-dependent and-independent mechanisms in thrombin-stimulated human platelets. *Biochem J* 393: 555–564. doi: 10.1042/BJ20050796
 22. Napeñas JJ, Oost FC, DeGroot A, Loven B, Hong CH, Brennan MT, Lockhart PB, van Diermen DE (2013) Review of postoperative bleeding risk in dental patients on antiplatelet therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 115: 491–499. doi: 10.1016/j.oooo.2012.11.001
 23. Hanoune J, Defer N (2001) Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:145–174. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.41.1.145
 24. Shin JH, Kwon HW, Irfan M, Rhee MH, Lee DH (2021) Ginsenoside Rk1 suppresses platelet mediated thrombus formation by downregulation of granule release and α IIb β 3 activation. *J Ginseng Res* 45: 490–497. doi: 10.1016/j.jgr.2020.11.001
 25. 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
 26. 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