

Anti-platelet effects of Artesunate 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

Discovery of new substance that can regulate platelet aggregation or suppress aggregation will aid in the prevention and treatment of cardiovascular diseases. Artesunate is a compound from plant roots of *Artemisia* or *Scopolia*, and its effects have shown to be promising in areas of anticancer and Alzheimer's disease. However, the role and mechanisms by which artesunate affects the aggregation of platelets, and the formation of a thrombus are currently not understood. This study examined the ways artesunate affects platelets activation and thrombus formation induced by collagen. As a result, cAMP and cGMP production were increased significantly by artesunate relative to the doses, as well as phosphorylated VASP and IP₃R, substrates to cAMP-dependent kinase and cGMP-dependent kinase, in a significant manner. The Ca²⁺ normally mobilized from the dense tubular system was inhibited due to IP₃R, phosphorylation from artesunate, and phosphorylated VASP aided in inhibiting platelet activity via αIIb/β₃ platelet membrane inactivation and inhibiting fibrinogen binding. Finally, artesunate inhibited thrombin-induced thrombus formation. Therefore, we suggest that artesunate has importance with cardiovascular diseases stemming from the abnormal platelets activation and thrombus formation by acting as an effective prophylactic and therapeutic agent.

Key Words: Artesunate, Platelet, Cyclic nucleotide, Intracellular Ca²⁺, Fibrinogen binding

서론

혈액은 각 장기와 조직으로 산소와 영양분을 공급하며 노폐물 제거의 기능을 통해 생존에 필수적인 물질이며, 이 역할을 정상적으로 수행하기 위해 원활한 혈액 순환이 이루어져야 한다. 따라서, 혈관이 손상되는 경우 혈액 손실을 최소화할 뿐 아니라 정상적인 순환을 유지하기 위해 빠르게 지혈 반응이 일어나며, 혈소판 활성화 과정이 그 시작점으로 작용한다(Jackson, 2011). 그러나, 혈소판의 비정상적 또는 과도한 활성화는 혈전증, 뇌졸중 및 죽

상 동맥 경화증 등의 심혈관 질환을 일으키는 원인이 된다. 그런 이유로, 혈소판의 활성화를 조절하며 혈전 생성을 저해하는 물질을 발굴하는 것이 심혈관 질환을 예방하고 치료하는데 있어서 중요하다(Schwartz et al., 1990).

혈관이 손상이 일어날 때, 순환하던 혈소판이 손상된 부위로 모여들어 혈관 활성화유도제(collagen, ADP 및 arachidonic acid 등)를 만남으로써 활성화가 일어난다. 이 때, 혈소판 막의 phospholipase C가 활성화되어 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate와 같은 인지질을 inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃)과 diacylglycerol (DG)로 가수 분해되고 하고, 생성이 증가된 IP₃는 혈소판 내의 dense tubular system

Received: December 23, 2022 / Accepted: March 28, 2023

*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: +82-41-580-2932, 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.

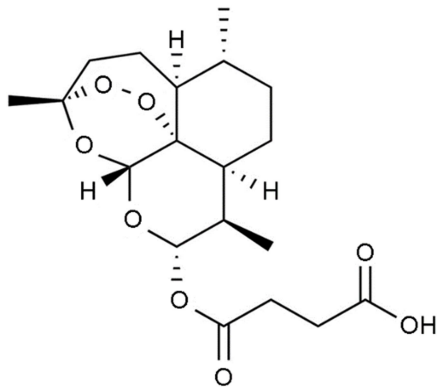


Fig. 1. The structure of artesunate. PIN: 6-hydroxy-7-methoxy-2H-chromen-2-one, Chemical formula: $C_{10}H_{18}O_4$, Molar mass: 192.17 g/mol.

에 위치하는 Ca^{2+} 채널을 열어서 세포질 내 Ca^{2+} 농도가 강하게 증가하게 한다(Payrastra et al., 2000). 또한, 혈소판이 활성화되는 과정에서, 세포질 막의 인지질로부터 arachidonic acid가 가수 분해되어 나오며, 이 과정에서 TXA synthase와 cyclooxygenase-1 효소들에 의해 TXA₂로 전환되어 혈소판으로부터 분비되어 나온다(Morello et al., 2009; Jennings, 2009). 세포 밖으로 분비된 TXA₂는 다른 혈소판 막의 수용체에 결합되어 추가적인 혈소판 활성화를 촉진하는 작용제로 기능한다(Sabatine and Jang, 2000).

정상적으로 혈액 순환이 일어날 때, 혈관 내피세포에서 분비되는 prostaglandin I₂ 및 nitric oxide는 혈소판 내 cAMP 또는 cGMP 생성을 기인한다. cAMP 생성 증가에 의해 활성화되는 Protein kinase A (PKA)와 cGMP 생성 증가에 의해 활성화되는 protein kinase G (PKG)는 vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP)와 IP₃ receptor (IP₃R) 같은 기질 단백질을 인산화한다고 알려져 있다(Schwarz et al., 2001). IP₃R가 인산화될 때 IP₃R을 비활성화가 일어나 dense tubular system로부터 세포질로 동원되는 Ca^{2+} 농도가 억제한다(Quinton and Dean, 1992; Cavallini et al., 1996). PKA 및 PKG의 주된 기질로서 알려진 VASP는 인산화될 때 α IIb/ β_3 의 활성화를 저해하면서 actin filament의 신장을 억제한다(Laurent et al., 1999; Sudo et al., 2003). 따라서, IP₃R 인산화를 통해 일어나는 Ca^{2+} 동원의 억제와 VASP의 인산화를 통해 α IIb/ β_3 활성 억제는 혈소판 활성 조절을 평가하는데 중요하다.

Artesunate는 *Artemisia* 속 식물의 주요 활성 성분 중 항말라리아제로 알려진 artemisinin의 유도체로서 낮은 독성과 내성을 특징으로 하는 새로운 항말라리아제로 알려져

있다(Thanaketspaisam et al., 2011). 또한, artesunate는 항종양 활성을 통해 임상에서 전이성 흑색종 환자에게 성공적인 치료제로 사용되었다(Thanaketspaisam et al., 2011). 앞 선 연구에서 artesunate는 뇌졸중의 양을 크게 줄이고 신경학적 회복을 가능하게 하여 환자의 생존을 향상시키는 것으로 보고된 바 있다(Lu et al., 2018). 그러나, 혈소판 활성화에 대한 artesunate의 역할과 기전은 아직 발견되지 않았다. 본 연구에서는 nucleotide의 조절을 통한 칼슘 동원 및 과립 분비를 통한 artesunate의 항혈소판 효과를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

시약

Artesunate는 Avention Corporation (Incheon, Korea)로부터 확보하였다(Fig. 1). Collagen을 Chrono-Log Corporation (Havertown, PA, USA)으로부터 구입하였다. Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)로부터 cAMP와 cGMP assay kit를 확보하였다. 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 buffer 등을 Cell Signaling (Beverly, MA, USA)로부터 구입하였다. Thermo fisher Scientific Corp. (Middlesex County, MA, USA)로부터 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane를 제공받았고, Invitrogen Molecular Probes로부터 Fibrinogen Alexa Fluor 488 접합체 및 ECL (Enhanced chemiluminescence solution)를 제공받았다.

세척 혈소판의 제조

대한 적십자사 경기혈액원(Suwon, Korea)으로부터 혈소판 풍부 혈장(Platelet Rich Plasma, PRP)을 제공받아 사용하였다. 세척 혈소판은 앞선 연구에서 수행하였던 방법을 참고하여 준비하였다(Shin et al., 2019). 준비된 PRP는 10분간 1,300 ×g에서 원심 분리함으로써 혈소판 분획으로 모으고, 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)에 의해 2번의 세척을 하였다. 이렇게 준비된 세척 혈소판을 현탁 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)에서 10⁸ cells/mL의 농도로 희석하여 부유하였다. 저온에서 유발되는 혈소판 응집을

막기 위한 조치로서 모든 과정을 25°C에서 수행하였으며, 남서울대학교 생명윤리 기관 심의위원회(IRB)의 승인을 받아서 이 실험을 수행하였다(1041479-HR-201803-003).

생성된 cyclic nucleotides (cAMP 및 cGMP) 측정

사람의 세척 혈소판(10^8 cells/mL)을 37°C에서 3분 간 배양하고, 2 mM CaCl_2 를 첨가한 다음 collagen (2.5 $\mu\text{g/mL}$)을 처리하여 5분 간 자극하였다. 1 M HCl를 처리함으로써 반응을 정지하였고, cAMP 또는 cGMP assay kit를 사용하여 ELISA-reader (Molecular Devices, San Jose, CA, USA)를 통해 생성된 cAMP 또는 cGMP를 측정하였다.

세포질 내의 Ca^{2+} 동원량 측정

PRP에 5 μM 의 Fura 2-AM를 첨가하여 37°C에서 60분 간 배양한 후, 위에서 언급 한 방법을 참고해서 세척 혈소판(10^8 cells/mL)을 준비하여 37°C에서 3분 간 배양하였다. 이 후, 2 mM CaCl_2 를 첨가한 다음 collagen (2.5 $\mu\text{g/mL}$)을 처리하여 5분 간 자극하였다. Fura 2이 나타내는 형광을 Hitachi사의 분광 형광 광도계(F7500, Seoul, Korea)를 사용하여 측정하였다. 340 nm의 excitation 파장과 510 nm의 emission 파장을 설정하여 형광도를 측정하였고, Grynkiewicz의 방법을 사용하여 Ca^{2+} 동원량을 분석하였다(Grynkiewicz et al., 1985).

Western Immunoblot 실험

세척하여 준비한 사람 혈소판(10^8 cells/mL)을 37°C에서 3분 간 배양하고, 2 mM CaCl_2 를 첨가한 후 collagen (2.5 $\mu\text{g/mL}$)을 처리하여 자극하였다. 이 후, 1x lysis buffer를 첨가하여 반응을 정지하였다. BCA protein assay kit (Thermo-scientific, IL, USA)를 통해 용해된 혈소판의 단백질 농도를 측정하였다. 단백질(20 μg)으로 8% SDS-PAGE에 전기영동 하였고, PVDF 막에 이동시켰다. 1차 항체로 1:1,000의 희석배수를, 2차 항체로 1:2,000의 희석배수를 사용하여 냉장고에서 하루 동안 처리하였다. ECL 시약(Invitrogen Molecular Probes)에서 반응시킴으로써 단백질을 시각화하였다.

Fibrinogen에 대한 결합 정도 측정

세척하여 준비한 혈소판(10^8 cells/mL)을 37°C에서 3분 간 배양하고, 2 mM CaCl_2 와 30 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 fibrinogen Alexa Fluor 488 접합체와 반응시킨 후, collagen (2.5 $\mu\text{g/mL}$)을 처리하여 5분 간 자극하였다. 이 후, 0.5% paraform-

aldehyde가 함유되어 있는 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4)를 첨가하여 반응을 정지하였다. 빛을 차단한 상태에서 위 과정을 수행하였고, 유세포분석기(FACS, BD Bioscience, San Jose, CA, USA)를 통해 fibrinogen의 결합 정도를 측정 후, Cell-Quest 소프트웨어(BD Bioscience, San Jose, CA, USA)를 통해 분석하였다.

혈소판 매개 fibrin clot 생성량 측정

혈액에서 분리한 PRP (500 μL)에 2 mM CaCl_2 과 thrombin (0.05 U/mL)을 첨가한 후 37°C에서 15분 동안 배양하였다. 형성된 Fibrin clot을 digital camera를 사용하여 촬영하였고, ImageJ 소프트웨어(v1.46, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)를 통해 응고된 영역을 산출하였다.

통계 분석

본 실험의 결과들은 평균 ± 표준편차를 사용하여 통계 처리 하였다. 통계 분석은 ANOVA 또는 Student's *t*-test를 이용하여 분석하여 $P < 0.05$ 인 경우 유의성이 있다고 판단하였고, 분산 분석에 따라 분석하여서 그룹 평균간의 유의성이 나타나는 경우, Scheffe의 방법을 사용하여 그룹 간 유의성을 비교하였다.

결과 및 고찰

Artesunate이 cyclic nucleotides 생성에 미치는 영향

이전 연구를 통해, cyclic nucleotides(cAMP 및 cGMP)는 세포질 내 Ca^{2+} 동원을 억제하며, cAMP 및 cGMP 의존성 단백질 kinase(PKA 및 PKG)를 활성화되게 함으로써 혈소판 응집을 억제한다고 보고되었다(Kuo et al., 1980). 본 연구에서는 artesunate가 cAMP나 cGMP 생성에 있어 어떤 영향을 끼치는지 확인하였다. Fig. 2에 나타난 결과에서 보듯이, collagen을 단독 처리하면 intact cell과 비교하여 cAMP와 cGMP 생성량의 유의적인 변화를 확인할 수 없다. 그러나, artesunate를 첨가하고 collagen을 처리하면 3.92 ± 0.41 pmoL/ 10^8 cells이었던 cAMP 생성량이 5.79 ± 0.42 pmoL/ 10^8 cells로 유의하게 증가 시 되는 것을 확인할 수 있다(Fig. 2A). 또한, cGMP 생성량도 artesunate에 의하여 6.91 ± 0.63 pmoL/ 10^8 cells에서 9.19 ± 1.33 pmoL/ 10^8 cells로 강하게 증가되었다(Fig. 2B). 이러한 결과들을 통해 collagen으로 유도한 혈소판에서 artesunate가 cAMP 및 cGMP의 생성량을 유의하게 증가시키며 혈소판의 기능에 관여함을 알 수 있다.

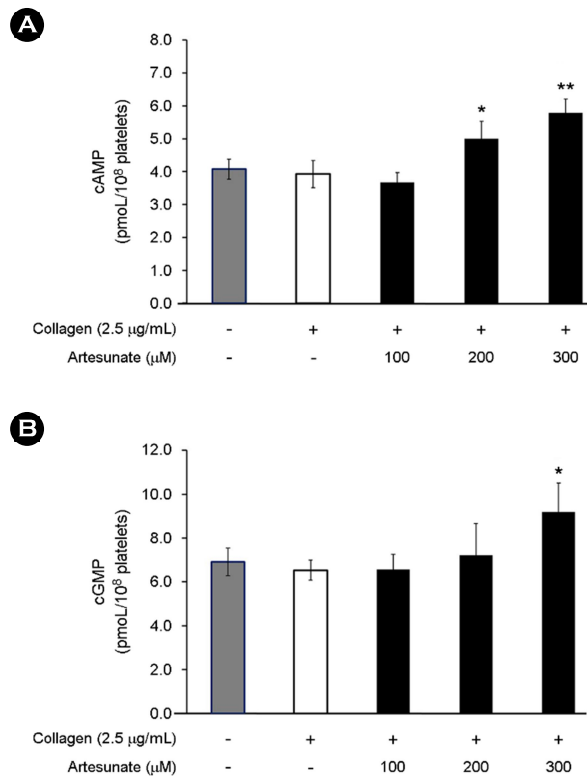


Fig. 2. The effects of artesunate on cyclic nucleotides production. (A) Effects of artesunate on cAMP production. (B) Effects of artesunate on cGMP production. Measurement of cAMP and cGMP production were described in "Materials and Methods" section. The results are expressed as mean \pm SD (n=4). * P <0.05, ** P <0.001 compared with the collagen-induced platelets.

Artesunate이 세포 내의 Ca^{2+} 동원과 IP_3R 의 인산화에 미치는 영향

생성이 증가된 cAMP 및 cGMP는 의존성 kinase인 PKA 및 PKG를 활성화하여 다른 기질들을 인산화한다고 알려져 있고, 그 중 inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor (IP_3R)의 인산화를 유발한다고 보고되었다(Schwarz et al., 2001). 혈소판 내 dense tubular system의 막에 존재하는 IP_3R 는 inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3)이 결합에 의해 열리며, 이 과정에서 세포질 내로의 Ca^{2+} 동원($[Ca^{2+}]_i$)을 유도함으로써 세포골격 단백질의 종류인 myosin light chain 및 pleckstrin의 인산화를 통해 혈소판 내 과립 분비를 촉진하여 혈소판 활성화 및 응집을 유도한다고 보고되었다(VargaSzabo et al., 2009).

본 연구에서는 artesunate가 $[Ca^{2+}]_i$ 에 미치는 영향을 살펴보았다. 그 결과, Fig. 3A에서 나타낸 바와 같이, collagen에 의해 $[Ca^{2+}]_i$ 이 100.1 ± 0.3 nM에서 537.9 ± 12.7 nM로 증

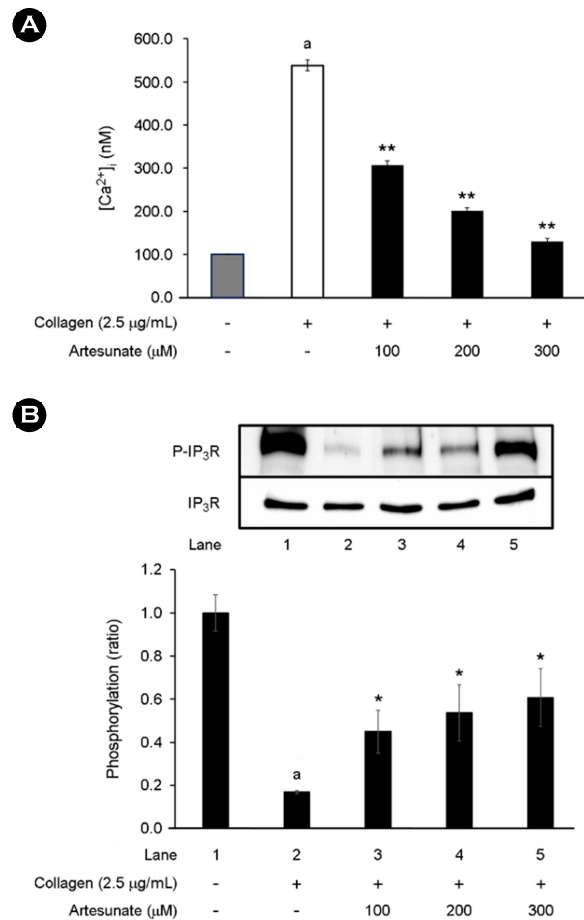


Fig. 3. The effects of artesunate on intracellular Ca^{2+} mobilization and IP_3R phosphorylation. (A) Effects of artesunate on intracellular Ca^{2+} mobilization. (B) Effects of artesunate on IP_3R phosphorylation. Measurement of intracellular Ca^{2+} mobilization and IP_3R phosphorylation were described in "Materials and Methods". The results are expressed as mean \pm SD (n=4). ^a P <0.05 compared with no-stimulated platelets, * P <0.05, ** P <0.001 compared with the collagen-induced platelets.

가하였고, artesunate는 증가된 $[Ca^{2+}]_i$ 를 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 3A). 그리고, 우리는 artesunate가 $[Ca^{2+}]_i$ 조절에 관여하는 IP_3R 에 영향을 미치는지 측정하였다. 그 결과, Fig. 3B에서 나타낸 바와 같이, collagen으로 유도한 혈소판에서 artesunate가 IP_3R 의 인산화를 농도 의존적으로 유도시키는 것을 확인하였다. 이는 artesunate로 인해 증가된 cAMP/cGMP 생성 및 PKA/PKG의 활성화가 IP_3R 의 인산화를 유발함으로써 dense tubular system $[Ca^{2+}]_i$ 를 감소시킨다는 것을 보여준다.

Artesunate가 VASP 인산화에 미치는 영향

이전 연구들에서 VASP가 cAMP/cGMP-의존성 PKA/

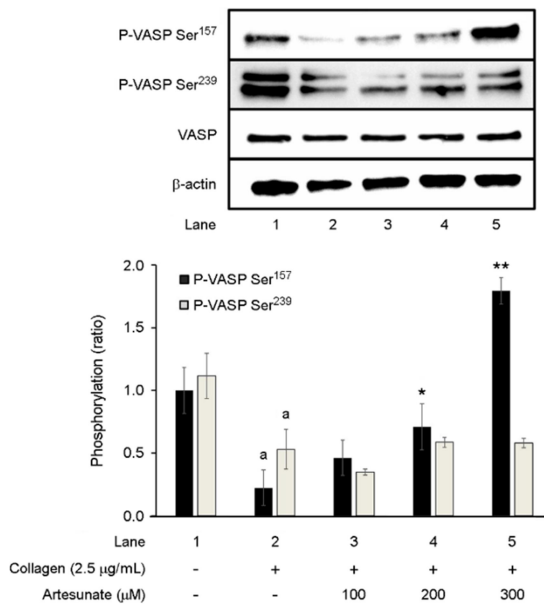


Fig. 4. The effects of artesunate on VASP phosphorylation. Termination of the reaction was carried out using a 1x lysis buffer. A BCA protein kit was used to measure the concentration of proteins from platelet lysates. Measurement of VASP phosphorylation was described in "Materials and Methods". The results are expressed as mean \pm SD (n=4). ^a P <0.05 compared with no-stimulated platelets, ^{*} P <0.05, ^{**} P <0.001 compared with the collagen-stimulated platelets.

PKG의 주요 기질 중 하나로서 혈소판 분비 및 점착을 조절하며, VASP가 인산화되면 integrin α IIb/ β ₃의 활성화가 억제됨으로써 혈소판 응집이 저해된다고 보고되었다 (Wangorsch et al., 2011; Napeñas et al., 2013). 본 연구에서는 artesunate가 collagen 유도 of 혈소판에서 cAMP 및 cGMP 생성을 농도 의존적으로 증가한다는 것을 확인하였고(Fig. 2), 추가적으로 artesunate가 cAMP-의존성인 VASP Ser157 및 cGMP-의존성인 VASP Ser239을 인산화에 관여하는지 살펴보았다. 그 결과, Fig. 4에서 볼 수 있듯이, artesunate는 VASP Ser157 및 VASP Ser239 인산화를 농도 의존적으로 증가시켰다. 특히, VASP Ser239에 비해 VASP Ser157의 인산화가 더 강하게 유발되었는데, 이는 artesunate에 의한 cAMP 및 cGMP의 생성 증가가 VASP의 인산화로 이어진다는 것을 보여준다.

Artesunate가 α IIb/ β ₃에 대한 fibrinogen 결합에 미치는 영향

Integrin α IIb/ β ₃을 매개로 일어나는 신호 전달은 혈소판 세포 골격에 변형을 유도하여 혈소판 활성화와 혈전 생성을 유발한다고 보고된 바 있다(Topol et al., 1999). 휴지

기 혈소판에서 α IIb/ β ₃는 낮은 친화도 상태로 존재하다가, 응집유도제 의해 inside-out 신호전달 경로가 활성화되면, 구조적인 변화가 일어나 α IIb/ β ₃의 친화도가 증가된다고 알려져 있다(Phillips et al., 2001). α IIb/ β ₃의 친화도가 증가될 때, fibrinogen가 수용체인 α IIb/ β ₃에 결합함으로써 추가적인 혈소판 골격의 형태 변화와 점착을 통해 혈소판 응집의 증폭시킨다.

본 연구에서는 α IIb/ β ₃에 대한 fibrinogen의 결합에 하는 데 artesunate가 미치는 영향을 확인하였다. Fig. 5A에서 보여지는 바와 같이, collagen을 첨가를 통해 α IIb/ β ₃에 대한 fibrinogen의 결합 정도가 $1.3 \pm 0.1\%$ 에서 $76.8 \pm 2.5\%$ 로 강하게 증가되었다(Fig. 5A-b, 5B). 그러나, artesunate (50~300 µM)를 전처리 하였을 때, fibrinogen 결합 정도가 농도 의존적으로 억제되었고, 특히 300 µM의 artesunate은 fibrinogen 결합을 $18.2 \pm 0.9\%$ 까지 강하게 억제하였다(Fig. 5A-c~f, 5B). 이러한 결과는, artesunate에 의해 인산화된 VASP가 integrin α IIb/ β ₃의 친화도를 억제한 것으로 보여진다. 또한, artesunate이 혈소판 세포에 독성을 가지는지 LDH (lactate dehydrogenase) 분비를 통해 측정하였고, artesunate (50, 100, 200, 300 µM)이 사람 혈소판에 미치는 유의한 독성은 확인할 수 없었다(data not shown). 이러한 결과는 artesunate이 세포독성을 가지지 않고 혈소판의 활성화를 조절한다는 것을 의미한다.

Artesunate가 혈소판 매개의 fibrin clot 형성에 미치는 영향

우리 몸의 혈전은 손상된 혈관이 회복될 때 필수적으로 만들어지는데, 활성화된 혈소판이 손상된 혈관에 모이면 30~60분이 지나 수축이 일어나고 생성된 plug를 당겨 fibrin clot을 형성한다. 이 과정에서 α IIb/ β ₃과 fibrinogen의 상호 작용이 혈소판이 매개하는 fibrin clot을 형성에 있어 중요한 역할을 하고, α IIb/ β ₃ 활성을 저해하는 물질이 혈전 형성을 강하게 억제한다고 보고되었다(Topol et al., 1999). 혈소판 활성화유도제로 α IIb/ β ₃를 활성화하면 이에 대한 fibrinogen의 결합이 증폭되고 fibrin clot 형성으로 이어진다.

본 연구에서는 artesunate이 thrombin로 유도한 fibrin clot 형성에 미치는 영향을 살펴보았다. Fig. 6A에서 볼 수 있듯이, thrombin 자극에 의해 강하게 형성된 fibrin clot을 100 µM 이상의 artesunate이 농도 의존적으로 억제하였다. Artesunate (100, 200 및 300 µM)에서 27.0%, 69.9% 및 82.6%로 fibrin clot이 각각 억제되었음을 확인할 수 있다

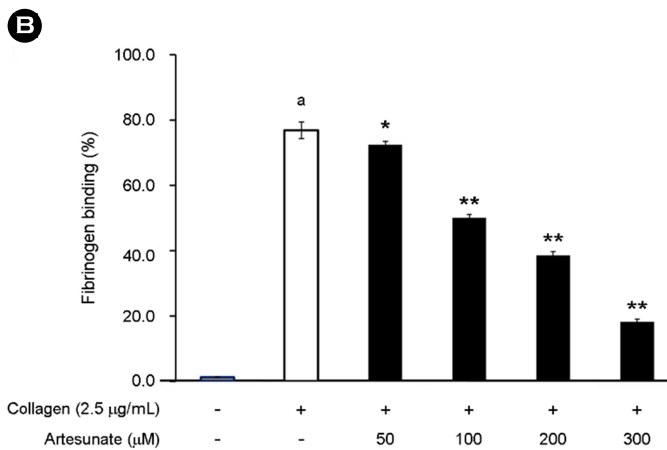
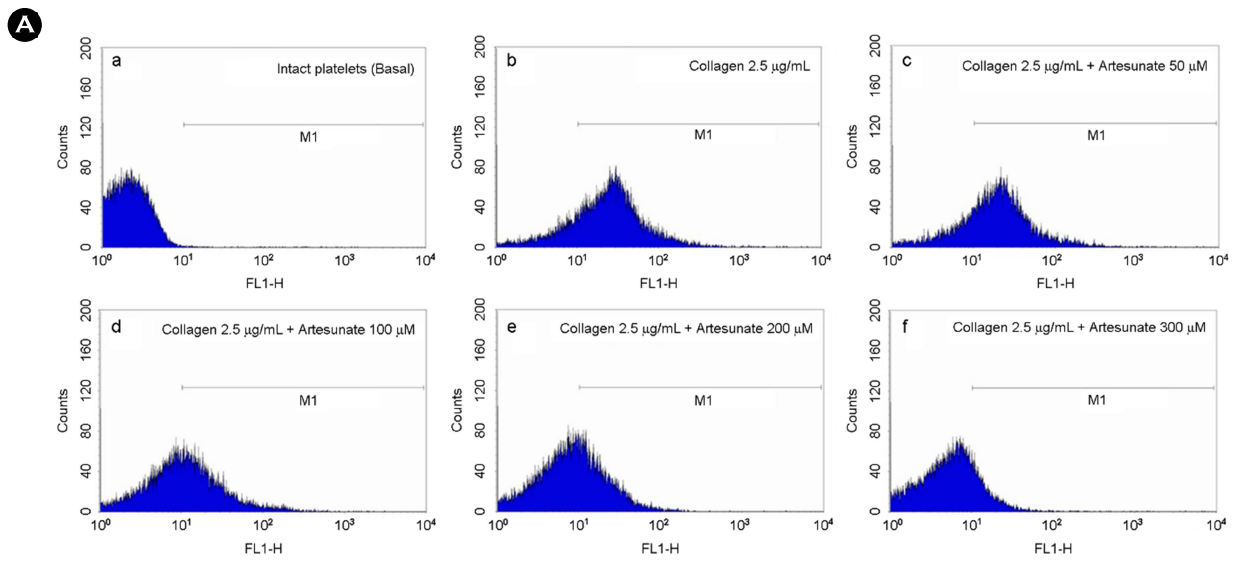


Fig. 5. The effects of artesunate on fibrinogen binding. (A) The flow cytometry histograms on fibrinogen binding. a, Intact platelets (base); b, collagen (2.5 µg/mL); c, collagen (2.5 µg/mL) + artesunate (50 µM); d, collagen (2.5 µg/mL) + artesunate (100 µM); e, collagen (2.5 µg/mL) + artesunate (200 µM); f, collagen (2.5 µg/mL) + artesunate (300 µM). (B) Effects of artesunate on collagen-induced fibrinogen binding (%). Measurement of fibrinogen binding was described in "Materials and Methods". The results 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.

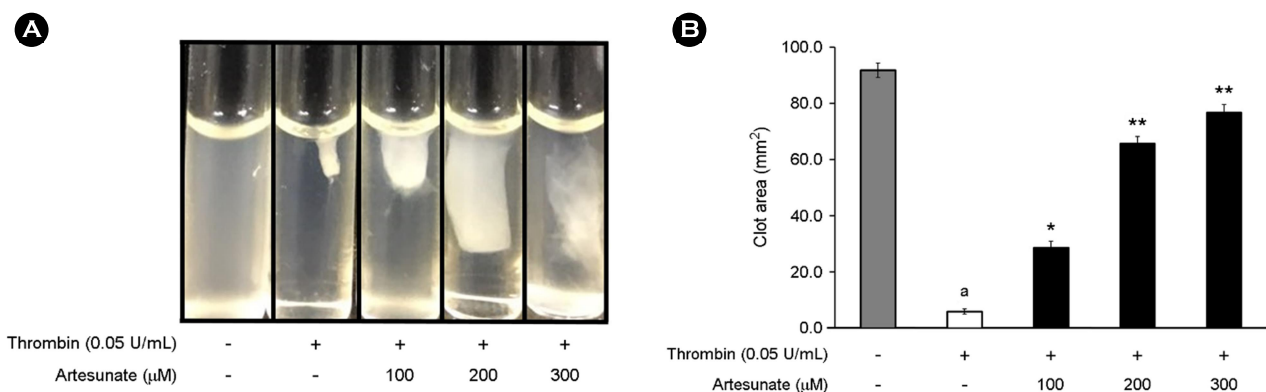


Fig. 6. Effects of artesunate on platelet-mediated fibrin clot formation. (A) Effects of artesunate on thrombin-retracted fibrin clot photographs (B) Effects of artesunate on thrombin-retracted fibrin clot area. Measurement of platelet-mediated fibrin clot formation was described in "Materials and Methods". The results 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 thrombin-induced platelets.

(Fig. 6B). 이러한 결과는 artesunate가 cAMP/cGMP 생성 및 VASP Ser157/VASP Ser239 인산화와 α IIb/ β 3를 친화도 억제제를 통해 fibrin clot 형성을 저해한 것으로 보여진다.

ACKNOWLEDGEMENT

Funding for this paper was provided by Namseoul University year 2022.

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.
- Gryniewicz 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.
- Kuo JF, Andersson RG, Wise BC, Mackerlova L, Salomonsson I, Brackett NL, et al. 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*. 1980. 77: 7039-7043.
- 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.
- Lu H, Wang B, Cui N, Zhang Y. Artesunate suppresses oxidative and inflammatory processes by activating Nrf2 and ROS-dependent p38 MAPK and protects against cerebral ischemia-reperfusion injury. *Mol Med Rep*. 2018. 17: 6639-6646.
- Morello F, Perino A, Hirsch E. Phosphoinositide 3-kinase signalling in the vascular system. *Cardiovasc Res*. 2009. 82: 261-271.
- Napeñas J, Oost FC, DeGroot A, Loven B, Hong CH, Brennan MT, et al. Review of postoperative bleeding risk in dental patients on antiplatelet therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2013. 115: 491-499.
- Payraastre 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.
- Phillips DR, Nannizzi-Alaimo L, Prasad KS. Beta3 tyrosine phosphorylation in alphaIIbbeta3 (platelet membrane GP IIb-IIIa) outside-in integrin signaling. *Thromb Haemost*. 2001. 86: 246-258.
- 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.
- Thanaketspaisarn O, Waiwut P, Sakurai H, Saiki I. Artesunate enhances TRAIL-induced apoptosis in human cervical carcinoma cells through inhibition of the NF- κ B and PI3K/Akt signaling pathways. *Int J Oncol*. 2011. 39: 279-285.
- Topol EJ, Byzova TV, Plow EF. Platelet GPIIb-IIIa blockers. *The Lancet*. 1999. 353: 227-231.
- VargaSzabo D, Braun A, Nieswandt B. Calcium signaling in platelets. *J Thromb Haemost*. 2009. 7: 1057-1066.
- Wangorsch G, Butt E, Mark R, Hubertus K, Geiger J, Dandekar T, et al. Time-resolved in silico modeling of finetuned cAMP signaling in platelets: feedback loops, titrated phosphorylations and pharmacological modulation. *BMC Syst Biol*. 2011. 5: 178.

<https://doi.org/10.15616/BSL.2023.29.1.41>

Cite this article as: DH Lee. Anti-platelet effects of Artesunate through Regulation of Cyclic Nucleotide on Collagen-induced Human Platelets. *Biomedical Science Letters*. 2023. 29: 41-47.