

## Antithrombotic Effect of Artemisinin through Phosphoprotein Regulation in U46619-induced Platelets

Dong-Ha Lee<sup>†,\*</sup>

Department of Biomedical Laboratory Science, Molecular Diagnostics Research Institute,  
Namseoul University, Cheonan 31020, Korea

Normal activation of platelets and their aggregation are crucial during hemostasis process. It appears excessive or abnormal aggregation of platelets may bring about cardiovascular diseases like stroke, atherosclerosis, and thrombosis. For this reason, finding a substance that can regulate platelet aggregation or suppress aggregation will aid in the prevention and treatment of cardiovascular diseases. Artemisinin, a compound derived from *Artemisia* or *Scopolia* plants, has shown potential in various areas such as anticancer and Alzheimer's disease research. However, the specific role and mechanisms by which artemisinin influences platelet activation and thrombus formation are not yet fully understood. This study investigated the effects of artemisinin on platelet activation and thrombus formation. This study examined the effect of artemisinin on regulation of U46619-induced platelet aggregation, granule secretion. In addition, the effects of artemisinin on phosphorylation of PI3K/Akt and MAPK pathway involved in platelet aggregation was studied. As a result, artemisinin significantly downregulated of PI3K/Akt and MAPK pathway. In addition, artemisinin significantly reduced granule secretion, and platelet aggregation was inhibited by artemisinin. Therefore, we suggest that artemisinin is an anti-platelet substance that regulates PI3K/Akt and MAPK pathway and is valuable as a therapeutic and preventive agent for platelet-derived cardiovascular disease.

**Key Words:** Artemisinin, MAPK, PI3K/Akt, Granule secretion, Platelet aggregation

### 서 론

혈소판 응집과 그에 따른 혈전 형성은 지혈 과정에서 중요한 역할을 한다(Xia et al., 2012). 그러나 병리학적 상태에서는 혈소판이 비정상적으로 활성화되어 혈전이 될 수 있으며, 순환하는 혈전이 혈관을 차단하여 허혈성 심장 질환 및 뇌졸중과 같은 다양한 심혈관 질환(CVD)을 유발할 가능성이 잘 알려져 있다(Lee et al., 2014). 결과적으로 혈소판 활성화의 억제제는 동맥 혈전증 및 혈소판 관련 심혈관 질환의 진행을 완화시키는 전략으로 인식되어

왔다(Ruggeri, 2002).

현재 aspirin, clopidorel 등 여러 항혈소판제가 개발되어 혈전증 예방을 위해 임상에서 흔히 사용되고 있다(Bassand, 2013). 그럼에도 불구하고 이러한 약물은 위장관 출혈 및 심계항진과 같은 잠재적인 부작용으로 인해 사용이 제한된다(Vaiyapuri et al., 2013). 따라서, 보다 안전하고 효과적인 항혈소판제의 개발이 요구되고 있다(Barrett et al., 2008).

세포 내 신호 전달에 작용하는 인산화 효소들 중에서 Mitogen-activated protein kinases (MAPK)의 기능에 대한 연구가 꾸준히 이루어져 왔다(Adam et al., 2010). MAPK에 속하는 단백질로 ERK, JNK 및 p38 MAPK이 밝혀져 있고,

Received: August 21, 2023 / Revised: September 12, 2023 / Accepted: September 18, 2023

\*Professor.

<sup>†</sup>Corresponding author: Dong-Ha Lee. Department of Biomedical Laboratory Science, Molecular Diagnostics Research Institute, Namseoul University, Cheonan 31020, Korea.

Tel: +82-41-580-2148, Fax: +82-42-580-2932, 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.

이 단백질들은 사람의 혈소판에서도 확인되고 있으며, 혈소판 자극 유도제에 의해 인산화 됨으로써 활성을 나타낸다고 보고되어 있다(Kramer et al., 1995; Bugaud et al., 1999; Nadal-Wollbold et al., 2002). MAPK의 인산화는 혈소판 내 과립 분비를 유발하여 혈소판 응집에도 관여한다고 알려져 있다(Patrono, 1994; Flevaris et al., 2009). 또한, 인산화 단백질 중 PI3K/Akt 경로에 대한 것도 잘 보고되어 있는데, 이들이 활성화될 때 혈소판의 dense 과립 분비가 촉진되고 이들을 통해 혈소판 응집을 포함한 혈소판 기능이 조절된다고 알려져 있다(Chuang et al., 2013).

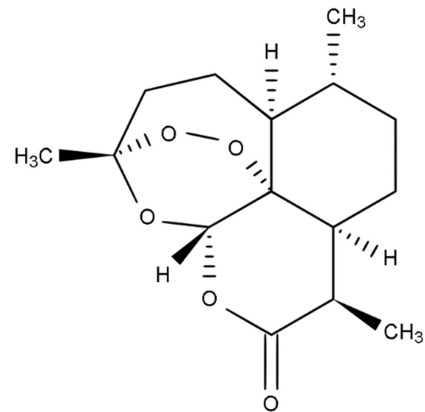
Artemisinin은 효과적인 말라리아 치료제로서 오랜 임상 사용 역사를 가진 전통 의학제입니다. Artemisinin과 그 파생물들은 잘 알려진 항말라리아 특성 외에도 항암, 항염증 및 항알러지 작용을 포함한 광범위한 치료 효과를 입증했으며, 이러한 유익한 효과가 수많은 분자 표적의 조절에 기인된다고 보고되었다(Wang et al., 2017; Wong et al., 2017; Yao et al., 2018). 또한, 최근 연구에서는 artemisinin과 그 유도체의 신경 보호 특성을 강조하여 다양한 뇌 장애의 예방 및 치료에 잠재적인 유용성을 나타내었다(Das et al., 2014; Xu et al., 2017; Zeng et al., 2017; Fang et al., 2019; Zhao et al., 2019). 특히, 한 연구에서는 artemisinin이 ERK1/2/CREB/BCL-2 신호 경로의 활성화를 통해 허혈성 뇌졸중 유발 세포사멸을 약화시킬 수 있음을 입증했다(Peng et al., 2022).

뇌졸중으로 대표되는 CVD는 혈소판 응집과 밀접한 관련이 있지만, 혈소판 응집과 혈전 형성에 대한 artemisinin의 역할과 기전은 아직 밝혀지지 않았다. 따라서, 본 연구에서는 artemisinin의 혈소판 응집억제 효과와 이 과정에서 artemisinin가 PI3K/Akt와 MAPK의 인산화 단백질 및 혈소판 과립 분비에 어떤 영향을 미치는지 연구하였다.

## 재료 및 방법

### 사람 혈소판 부유액 준비

사람 혈소판 풍부 혈장(PRP)은 대한 적십자사 경기혈액원에서 획득하였다. PRP는 혈소판을 수집하기 위해 1,300 ×g의 속도로 10분간 원심 분리되었고, 이후, 2.7 mM KCl, 138 mM NaCl, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.49 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.36 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.5 mM glucose을 함유하는 현탁용 버퍼(pH 7.4)로 2회 세척하였다. 현탁용 버퍼를 이용하여 최종 농도 10<sup>8</sup> cells/mL로 현탁하여 혈소판 부유액을 준비하였고, 저온에서의 혈소판 응집을 방지하기 위해 모든 절차



**Fig. 1.** The structure of artemisinin. Chemical formula: C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>O<sub>5</sub>, Molar mass: 282.33 g/mol.

는 25°C에서 진행하였다. 실험 과정은 남서울대학교 기관생명윤리위원회의 승인(1041479-HR-201803-003)을 받아서 수행하였다.

### 혈소판 응집능

10<sup>8</sup> cells/mL의 혈소판 부유액에 다양한 농도의 artemisinin (Fig. 1)을 첨가하여 37°C에서 3분 동안 배양하였다. 그 후, 2 mM CaCl<sub>2</sub>와 U46619을 자극을 위해 첨가하였고, 추가적으로 5분 동안 반응하였다. 실험은 회전속도가 1,000 rpm인 혈소판 응집기(Chrono-Log Co., Havertown, PA, USA)를 사용하여 진행되었고, 응집율은 빛 투과도의 증가를 기반으로 계산되었으며, 현탁용 버퍼의 투과도를 참조값으로 사용하였다. Artemisinin은 최종 농도 0.1% DMSO에 의해 용해되었으며, 모든 실험에서 동일한 농도의 DMSO가 첨가되었다.

### 세포독성

세포독성을 평가하기 위해 혈소판 세포질로부터의 lactate dehydrogenase (LDH) 방출을 측정하였다. 10<sup>8</sup> cells/mL의 혈소판 부유액을 다양한 농도의 artemisinin과 함께 실온에서 2시간 동안 배양하였다. 이후, 12,000 ×g의 속도로 2분간 원심 분리하여 상층액을 LDH EIA kit를 사용하여 Synergy HT multi-reader (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA)로 측정하여 계산하였다. 방출된 LDH의 양을 측정하여 대조군과 비교하여 나타내었다.

### ATP 및 serotonin 방출량

10<sup>8</sup> cells/mL의 혈소판 부유액에 다양한 농도의 artemi-

sinin을 첨가하여 37°C에서 3분 동안 배양하였다. 그 후, 2 mM CaCl<sub>2</sub>와 U46619을 자극을 위해 첨가하였고, 추가적으로 5분 동안 반응하였다. 반응은 차가운 2 mM EDTA를 첨가하여 중단되었고, 원심 분리를 통해 상층액에 방출된 serotonin과 ATP을 Synergy HT multi-reader (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA로) 및 ATP assay kit와 serotonin assay kit를 사용하여 측정하였다.

### Western Immunoblotting

혈소판 응집반응 후 1X lysis buffer를 첨가하여 반응을 종결하였다. 혈소판 용해액 내 단백질의 농도는 BCA 단백질 kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)를 사용하여 측정하였고, 총 15 µg의 단백질을 전기영동하여 분리하고 8% SDS-PAGE를 통해 PVDF 막으로 이동시켰다. 여기에 1:1,000으로 희석된 1차 항체를 처리하고, 그 후 1:2,000으로 희석된 2차 항체를 처리하였다. 단백질 밴드의 시각화는 ECL 시약(Thermo Fisher Scientific, Seoul, Korea)를 사용하여 수행되었다.

### 통계 분석

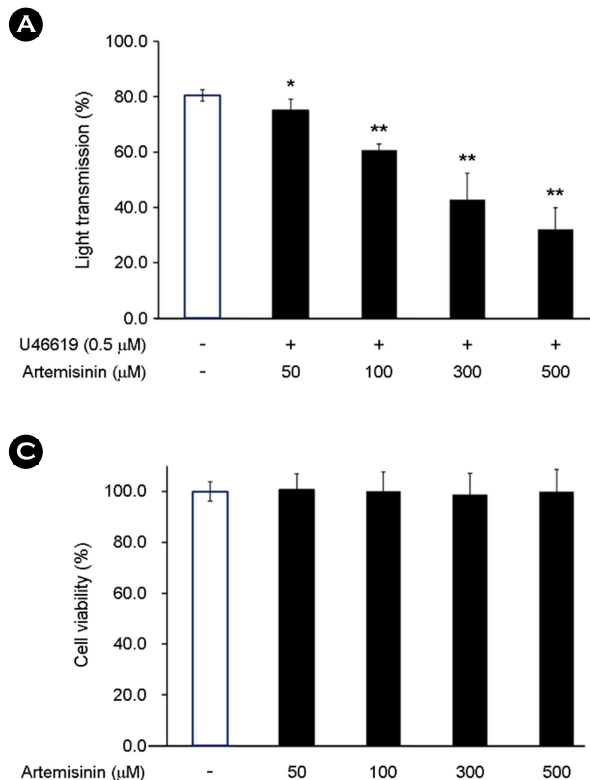
실험 결과는 평균 ± 표준편차 표시되었고, 통계적 유의

성은 Student's *t*-검정 또는 분산 분석(ANOVA)을 사용하여 판정되었으며, 유의수준은  $P < 0.05$ 로 설정되었다. 분산 분석을 통해 그룹 간 평균 사이에 유의한 차이가 있는 경우, Scheffe의 방법을 사용하여 추가 사후 분석이 수행되었고, 이를 통해 실험 그룹간의 유의한 차이를 식별할 수 있는 포괄적인 데이터 분석이 가능하였다.

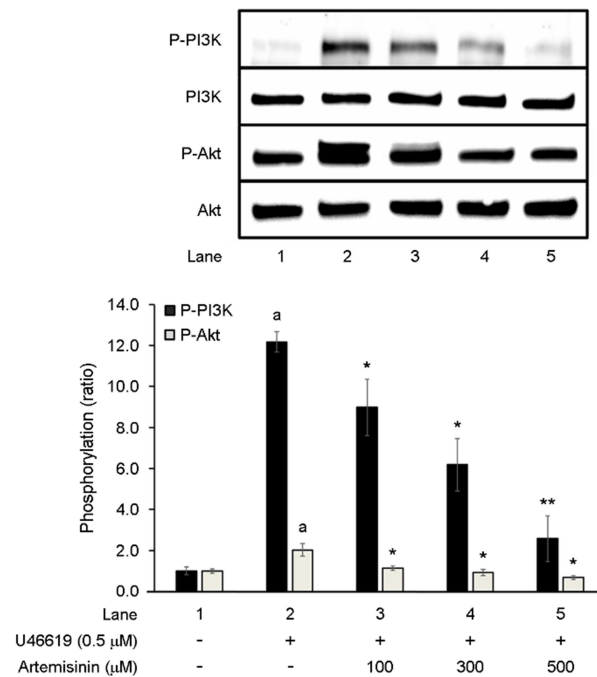
## 결과 및 고찰

### U46619 유도 혈소판 응집에 미치는 artemisinin의 효능

TXA<sub>2</sub> 유사체로 알려진 U46619 (0.5 µM)로 혈소판 응집을 유도하였을 때, 80.5±2.1%의 높은 응집율로 응집이 일어났다(Fig. 2A). 그러나 50~500 µM 범위로 다양한 농도의 artemisinin이 첨가되었을 때, Fig. 2A에 나타난 결과에서 보여지듯이, artemisinin은 혈소판 응집을 효과적으로 억제하였다. Artemisinin의 half-maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>)는 326.31 µM으로 결정되었으며, artemisinin의 첨가로 인한 세포독성은 관찰되지 않았다 (Fig. 2B, C). 이러한 결과는 artemisinin이 세포독성 없이 U46619 유도 혈소판 응집을 억제하는 효과가 있음을 보여준다.



**Fig. 2.** Effects of artemisinin on U46619-induced platelet aggregation. (A) Effects of artemisinin pretreatment on U46619-stimulated platelet aggregation. (B) IC<sub>50</sub> value of artemisinin on U46619-induced platelet aggregation. (C) Cytotoxicity of artemisinin on human platelets. Data are expressed as mean ± SD (n=4). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$  compared with the U46619-stimulated platelets.

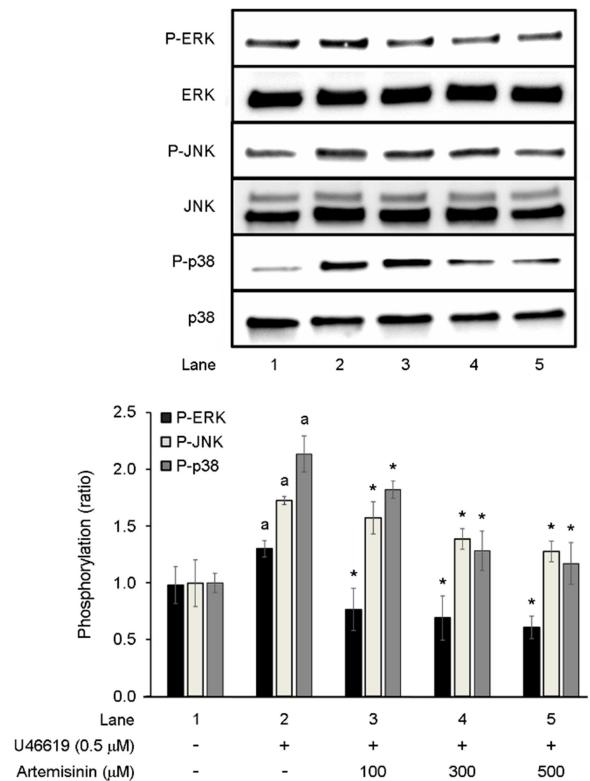


**Fig. 3.** Effects of artemisinin on PI3K and Akt phosphorylation. Western blotting was determined as described in "Materials and Methods" section. Data are expressed as mean  $\pm$  SD (n=4). <sup>a</sup> $P$ < 0.05 compared with no-stimulated platelets, <sup>\*</sup> $P$ <0.05, <sup>\*\*</sup> $P$ <0.001 compared with the U46619-stimulated platelets.

### PI3K/Akt에 미치는 artemisinin의 효능

PI3K/Akt가 혈소판 내 과립의 방출에 관여하는 단백질로 알려져 있으므로, 본 연구에서는 artemisinin이 PI3K/Akt의 인산화에 어떤 영향을 미치는지 확인하였다. 그 결과, Fig. 3에서 나타낸 바와 같이, U46619는 PI3K/Akt의 인산화를 강하게 증가시켰고, artemisinin이 U46619이 증가시킨 PI3K/Akt의 인산화를 농도의존적으로 억제시켰다. 이는 artemisinin가 U46619 유도의 혈소판에서 PI3K/Akt의 인산화를 유의하게 억제할 수 있는 물질임을 분명히 한 것이다.

PI3K/Akt 경로는 혈소판의 활성화 과정에서 세포 내 신호 전달이 일어나는데 작용하며, 이들의 인산화가 혈소판 응집 및 dense 과립 분비를 포함한 혈소판의 기능에서 주요한 역할을 담당한다고 보고되어 있다(Chuang et al., 2013). 본 연구에서 확인한 결과로 볼 때, artemisinin이 PI3K/Akt 경로 인단백질의 인산화를 하향조절 함으로써 혈소판의 과립 분비 및 혈소판 응집을 억제하였을 것이라고 예상된다.

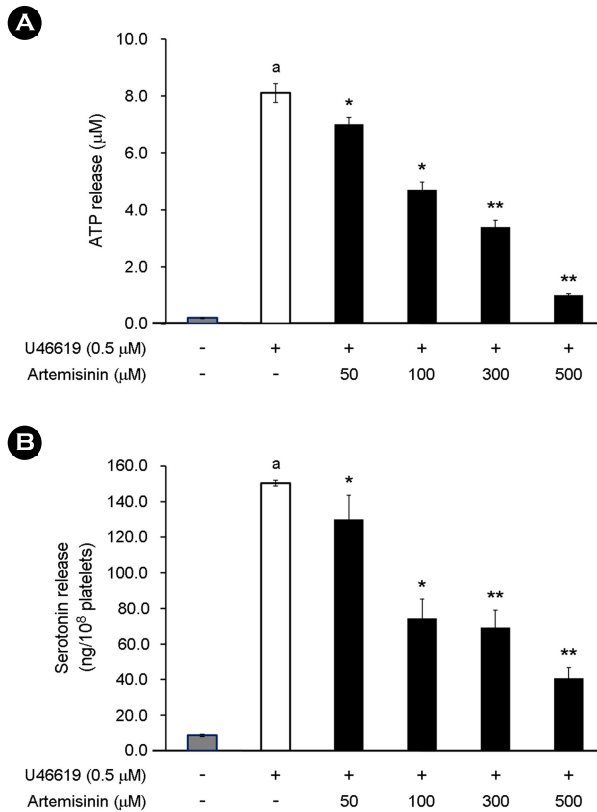


**Fig. 4.** Western blotting was determined as described in "Materials and Methods" section. Data are expressed as mean  $\pm$  SD (n=4). <sup>a</sup> $P$ <0.05 compared with no-stimulated platelets, <sup>\*</sup> $P$ <0.05 compared with the U46619-stimulated platelets.

### MAPK pathway에 미치는 artemisinin의 효능

본 연구에서 artemisinin이 MAPK (mitogen-activated protein kinase) 경로로 알려진 인단백질들이 인산화와 이에 의해 유도되는 혈소판 과립 방출에 미치는 효능을 확인하였다. Fig. 4를 보면 알 수 있듯이, U46619로 유도하였을 때, ERK/JNK/p38의 인산화가 일어났고, artemisinin에 의해 모두 유의적으로 감소되었다. 이는 artemisinin이 MAPK 경로 인단백질들의 인산화를 억제하여 혈소판 응집의 신호 전달 과정을 조절하고 있음을 나타낸다.

앞 선 연구들을 살펴볼 때, 사람의 혈소판에는 MAPK가 다량 존재하고 있고, 여러 작용제들에 의해 혈소판이 활성화될 때, MAPK가 인산화가 일어나면서 혈소판 응집이 촉진되도록 기능한다고 알려져 있다(Kramer et al., 1995; Bugaud et al., 1999; Nadal-Wollbold et al., 2002). 본 연구의 결과를 통해, artemisinin이 MAPK 경로 인단백질의 인산화를 하향조절 함으로써 혈소판 내 과립 분비 및 혈소판 응집을 억제하는데 기여하는 것으로 예상된다.



**Fig. 5.** Effects of artemisinin on granule secretion. (A) Effects of artemisinin on ATP release. (B) Effects of artemisinin on serotonin release. Measurement of ATP and serotonin release was described in "Materials and Methods" section. Data are expressed as mean  $\pm$  SD (n=4). <sup>a</sup> $P$ <0.05 compared with no-stimulated platelets, \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.001 compared with the U46619-stimulated platelets.

### 혈소판 과립 분비에 미치는 artemisinin의 효능

혈소판에서의 과립 방출은 혈소판 응집을 증폭하는데 중요하기에 artemisinin이 ATP 및 serotonin의 과립 분비에 어떤 영향을 주는지 살펴보았다. 그 결과, 손상되지 않은 세포에서의 ATP 방출량이  $0.20 \pm 0.02 \mu\text{M}$ 에서 U46619에 의해  $8.10 \pm 0.33 \mu\text{M}$ 로 강하게 증가되는 것을 확인하였다. 그러나, artemisinin (50~500  $\mu\text{M}$ )에 의해 증가된 ATP 방출이 농도의존적으로 억제되었다(Fig. 5A). 또한, 손상되지 않은 세포에서 serotonin 방출이  $8.65 \pm 0.58 \text{ ng}/10^8 \text{ cells}$ 였던 것이 U46619에 의해  $150.36 \pm 1.30 \text{ ng}/10^8 \text{ cells}$ 로 크게 증가하는 것을 확인하였다. 그러나, U46619에 의해 증가된 serotonin 방출량도 artemisinin (50~500  $\mu\text{M}$ )에 의해  $35.66 \pm 3.57 \text{ ng}/10^8 \text{ cells}$ 까지 강하게 감소되는 것을 알 수 있었다(Fig. 5B). 이 결과들은 artemisinin이 혈소판 내 과립 분비를 강하게 감소시키면서 혈소판 응집을 억제하고 있음을

보여준다.

혈소판 내 과립 분비가 촉진될 때, 혈소판의 활성화가 유도되고 손상된 혈관으로 순환하는 혈소판의 점착 및 응집을 촉발함으로써 혈전 형성이 잘 일어난다고 알려져 있다(Calderwood, 2004). 그러므로, 본 연구를 통해 artemisinin이 U46619이 유도한 혈소판 내 과립의 ATP 및 serotonin 방출을 농도의존적으로 억제하면서 혈소판 활성화 및 혈소판 응집 억제에 기능한다는 것을 명확히 하였다.

이러한 결과는 artemisinin이 PI3K/Akt 및 MAPK의 인산화를 억제함으로써 세포 내 과립 분비(serotonin 및 ATP 방출)를 감소하고 결과적으로 혈소판 응집을 억제하는 물질로써 기능하고 있음을 시사한다. 결론적으로, 우리는 artemisinin이 혈소판 응집 및 혈전 형성과 관련된 심혈관 질환에 대한 예방 또는 치료제로서의 가능성을 가지고 있음을 제안한다.

### ACKNOWLEDGEMENT

Funding for this paper was provided by Namseoul University year 2023.

### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

### REFERENCES

- Adam F, Kauskot A, Nurden P, Sulpice E, Hoylaerts MF, Davis RJ. Platelet JNK1 is involved in secretion and thrombus formation. *Blood*. 2010. 115: 4083-4092.
- Barrett NE, Holbrook L, Jones S, Kaiser WJ, Moraes LA, Rana R, Sage T, Stanley RG, Tucker KL, Wright B, Gibbins JM. Future innovations in anti-platelet therapies. *Br J Pharmacol*. 2008. 154: 918-939.
- Bassand JP. Current antithrombotic agents for acute coronary syndromes: focus on bleeding risk. *Int J Cardiol*. 2013. 163: 5-18.
- Bugaud F, Nadal-Wollbold F, Lévy-Toledano S, Rosa JP, Bryckaert M. Regulation of c-jun-NH2 terminal kinase and extracellular-signal regulated kinase in human platelets. *Blood*. 1999. 94: 3800-3805.
- Calderwood DA. Integrin activation. *J Cell Sci*. 2004. 117: 657-666.
- Chuang WY, Kung PH, Kuo CY, Wu CC. Sulforaphane prevents human platelet aggregation through inhibiting the phosphatidy-

- inositol 3-kinase/Akt pathway. *Thromb Haemost.* 2013. 109: 1120-1130.
- Das SS, Nanda GG, Alone DP. Artemisinin and curcumin inhibit *Drosophila* brain tumor, prolong life span, and restore locomotor activity. *IUBMB Life.* 2014. 66: 496-506.
- Fang J, Zhao X, Li S, Xing X, Wang H, Lazarovici P, et al. Protective mechanism of artemisinin on rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells against apoptosis induced by hydrogen peroxide via activation of c-Raf-Erk1/2-p90(rsk)-CREB pathway. *Stem Cell Research & Therapy.* 2019. 10: 312.
- Flevaris P, Li Z, Zhang G, Zheng Y, Liu J, Du X. Two distinct roles of mitogen-activated protein kinases in platelets and a novel Rac1-MAPK-dependent integrin outside-in retractile signaling pathway. *Blood.* 2009. 113: 893-901.
- Kramer RM, Roberts EF, Strifler BA, Johnstone EM. Thrombin induces activation of p38 MAP kinase in human platelets. *J Biol Chem.* 1995. 270: 27395-27398.
- Lee DS, Kim TH, Jung YS. Inhibitory effect of allyl isothiocyanate on platelet aggregation. *J Agric Food Chem.* 2014. 62: 7131-7139.
- Nadal-Wollbold F, Pawlowski M, Lévy-Toledano S, Berrou E, Rosa JP, Bryckaert M. Platelet ERK2 activation by thrombin is dependent on calcium and conventional protein kinases C but not Raf-1 or B-Raf. *FEBS Lett.* 2002. 531: 475-482.
- Patrono C. Aspirin as an antiplatelet drug. *N Engl J Med.* 1994. 330: 1287-1294.
- Peng T, Li S, Liu L, Yang C, Farhan M, Chen L, Su Q, Zheng W. Artemisinin attenuated ischemic stroke induced cell apoptosis through activation of ERK1/2/CREB/BCL-2 signaling pathway *in vitro* and *in vivo*. *Int J Biol Sci.* 2022. 18: 4578-4594.
- Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med.* 2002. 8: 1227-1234.
- Vaiyapuri S, Ali MS, Moraes LA, Sage T, Lewis KR, Jones CI, Gibbins JM. Tangeretin regulates platelet function through inhibition of phosphoinositide 3-kinase and cyclic nucleotide signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013. 33: 2740-2749.
- Wang KS, Li J, Wang Z, Mi C, Ma J, Piao LX, et al. Artemisinin inhibits inflammatory response via regulating NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathways. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2017. 39: 28-36.
- Wong YK, Xu C, Kalesh KA, He Y, Lin Q, Wong WSF. Artemisinin as an anticancer drug: Recent advances in target profiling and mechanisms of action. *Med Res Rev.* 2017. 37: 1492-1517.
- Xia Q, Wang X, Xu DJ, Chen XH, Chen FH. Inhibition of platelet aggregation by curdione from *Curcuma wenyujin* essential Oil. *Thromb Res.* 2012. 130: 409-414.
- Xu G, Huang YL, Li PL, Guo HM, Han XP. Neuroprotective effects of artemisinin against isoflurane-induced cognitive impairments and neuronal cell death involve JNK/ERK1/2 signalling and improved hippocampal histone acetylation in neonatal rats. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 2017. 69: 684-697.
- Yao Y, Guo Q, Cao Y, Qiu Y, Tan R, Yu Z. Artemisinin derivatives inactivate cancer-associated fibroblasts through suppressing TGF- $\beta$  signaling in breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2018. 37: 282.
- Zeng Z, Xu J, Zheng W. Artemisinin protects PC12 cells against beta-amyloid-induced apoptosis through activation of the ERK1/2 signaling pathway. *Redox Biol.* 2017. 12: 625-633.
- Zhao X, Fang J, Li S, Gaur U, Xing X, Wang H. Artemisinin Attenuated Hydrogen Peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)-Induced Oxidative Injury in SH-SY5Y and Hippocampal Neurons via the Activation of AMPK Pathway. *Int J Mol Sci.* 2019. 20: 2680.

<https://doi.org/10.15616/BSL.2023.29.3.184>

**Cite this article as:** Lee DH. Antithrombotic Effect of Artemisinin through Phosphoprotein Regulation in U46619-induced Platelets. *Biomedical Science Letters.* 2023. 29: 184-189.