



## Anti-thrombotic effect of artemisinin through regulation of cAMP production and $Ca^{2+}$ mobilization in U46619-induced human platelets

Chang-Eun Park · Dong-Ha Lee

### U46619 유도인 사람 혈소판에서 cAMP 생성 및 $Ca^{2+}$ 동원의 조절을 통한 Artemisinin의 항혈전 효과

박창은 · 이동하

Received: 17 August 2023 / Accepted: 10 October 2023 / Published Online: 27 October 2023

© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2023

**Abstract** The regulation of platelet aggregation is crucial for maintaining normal hemostasis, but abnormal or excessive platelet aggregation can contribute to cardiovascular disorders such as stroke, atherosclerosis, and thrombosis. Therefore, identifying substances that can control or suppress platelet aggregation is a promising approach for the prevention and treatment of these conditions. 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. As a result, cAMP production were increased significantly by artemisinin, as well as phosphorylated VASP and  $IP_3R$  which are substrates to cAMP-dependent kinase by artemisinin in a significant manner. The  $Ca^{2+}$  normally mobilized from the dense tubular system was inhibited due to  $IP_3R$  phosphorylation from artemisinin, and phosphorylated VASP by artemisinin aided in inhibiting platelet activity via

$\alpha IIb/\beta_3$  platelet membrane inactivation and inhibiting fibrinogen binding. Finally, artemisinin inhibited thrombin-induced thrombus formation. Therefore, we suggest that artemisinin has importance with cardiovascular diseases stemming from the abnormal platelets activation and thrombus formation by acting as an effective prophylactic and therapeutic agent.

**Keywords** Artemisinin · Cyclic nucleotide · Fibrinogen binding · Intracellular  $Ca^{2+}$  · Platelet

## 서론

혈소판 응집과 그에 따른 혈전 형성은 지혈 과정에서 중요한 역할을 한다[1]. 그러나 병리학적 상태에서는 혈소판이 비정상적으로 활성화되어 혈전이 될 수 있으며, 순환하는 혈전이 혈관을 차단하여 허혈성 심장 질환 및 뇌졸중과 같은 다양한 심혈관 질환(cardiovascular disease, CVD)을 유발할 가능성이 잘 알려져 있다[2]. 결과적으로 혈소판 활성화의 억제는 동맥 혈전증 및 혈소판 관련 심혈관 질환의 진행을 완화시키는 전략으로 인식되어 왔다[3].

현재 clopidogrel, aspirin 등 여러 항혈소판제가 개발되어 혈전증 예방을 위해 임상에서 흔히 사용되고 있다[4]. 그럼에도 불구하고 이러한 약물은 위장관 출혈 및 심계항진과 같은 잠재적인 부작용으로 인해 사용이 제한된다[5]. 따라서, 보다 안전하고 효과적인 항혈소판제의 개발이 요구되고 있다[6].

Artemisinin은 효과적인 말라리아 치료제로서 오랜 임상 사용 역사를 가진 전통 의약품이다. Artemisinin과 그 파생물은 잘

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

Department of Biomedical Laboratory Science, Molecular Diagnostics Research Institute, Namseoul University, Cheonan-si, Chungcheongnam-do, 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.

알려진 항말라리아 특성 외에도 항암, 항알레르기 및 항염증 활동을 포함한 광범위한 치료 효과를 입증했으며, 이러한 유익한 효과가 수많은 분자 표적의 조절에 기인된다고 보고되었다[7-9]. 또한, 최근 연구에서는 artemisinin과 그 유도체의 신경 보호 특성을 강조하여 다양한 뇌 장애의 예방 및 치료에 잠재적인 유용성을 나타내었다[10-14]. 특히, 한 연구에서는 artemisinin이 ERK1/2/CREB/BCL-2 신호 경로의 활성화를 통해 허혈성 뇌졸중 유발 세포사멸을 억제시킬 수 있음을 입증했다[15].

뇌졸중으로 대표되는 CVD는 혈소판 활성화와 밀접한 관련이 있지만, 혈소판 활성화와 혈전 형성에 대한 artemisinin의 역할과 기전은 아직 밝혀지지 않았다. 따라서, 본 연구에서는 artemisinin이 항혈소판 효과가 있는지, 중요한 신호 조절자인 cyclic nucleotide와 칼슘 동원에 미치는 영향을 확인하였고, 관련된 단백질의 인산화를 조절하는지도 확인하였다. 결과적으로, 본 연구는 artemisinin이 혈소판 응집 및 혈전 형성으로 인해 유발되는 CVD의 억제제로서의 가치를 확인하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 세척 혈소판의 준비

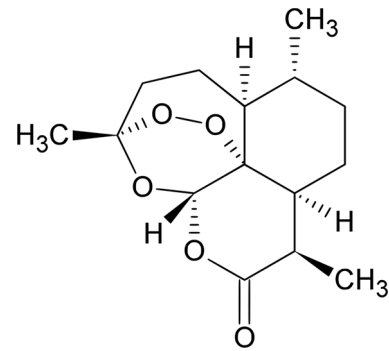
사람의 혈소판 풍부 혈장(Platelets Rich Plasma, PRP)은 대한민국의 수원에 있는 대한적십자 혈액원에서 입수하였다. PRP를 1,300×g에서 10분 동안 원심분리하여 혈소판을 수집한 후, 2.7 mM KCl, 138 mM NaCl, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.49 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.36 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.5 mM glucos, 0.25% 젤라틴을 포함하는 현탁액 완충액(pH 7.4)으로 혈소판을 2회 세척하였다. 그런 다음 혈소판을 10<sup>8</sup> cells/mL의 최종 농도로 완충액에 현탁하였다. 혈소판 응집을 방지하기 위해 모든 과정은 25 °C에서 진행하였다. 실험 방법에 대해 남서울대학교 기관생명윤리위원회(1041479-HR-201803-003)의 승인을 받아 진행하였다.

### cyclic nucleotides (cAMP 및 cGMP) 생성량

현탁된 혈소판(10<sup>8</sup> cells/mL)을 다양한 농도의 artemisinin을 첨가하여 3분 동안 37 °C에서 배양하였다(Fig. 1). 이어서, 2 mM CaCl<sub>2</sub> 및 U46619를 첨가하여 자극하고, 추가로 5분 동안 반응한 후, 1M HCl을 첨가하여 반응을 종결시켰다. cGMP 및 cAMP의 수준은 Synergy HT Multi-Reader (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA)에서 cGMP 또는 cAMP EIA kit를 사용하여 측정되었다.

### 세포질 내 Ca<sup>2+</sup> 동원량

PRP를 Fura 2-AM (5 μM)과 함께 37 °C에서 60분 동안 배양한 후, 현탁된 혈소판을 앞서 언급한 단계에 따라 10<sup>8</sup> cells/mL의 농도로 제조하였다. 이어서, 현탁된 혈소판에 2 mM CaCl<sub>2</sub> 및 U46619를 첨가하여 3분 동안 37 °C에서 반응하였다. Fura 2의 형광은 Fluorescence Spectrophotometer (F7000, Hitachi hightech, Seongnam, Korea)를 이용하여 측정하였다. 여기 파장은 340 nm에서 시작하여 0.5초 간격으로 380 nm까지 점진적으로 증가시켰고, 방출 파장은 510 nm로 설정되었다. 동원된 Ca<sup>2+</sup>의 양은 Grynkiewicz [16]에 의해 기술된 방법을 사용하여 계산되었다.



**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

### Western Immunoblot

반응을 종료하기 위해 1x lysis buffer를 사용하였고, 혈소판 용해물의 단백질 농도를 BCA protein kit(Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)를 사용하여 측정했다. 총 15 μg의 단백질을 8% SDS-PAGE를 통해 전기영동하여 분리하였고, PVDF membrane으로 단백질을 옮겼다. 그런 다음, 1:1000의 희석 배율에서 1차 항체로 처리하였고, 1:2000의 희석 배율에서 2차 항체로 처리하였다. 단백질 band의 시각화는 ECL 시약(Thermo Fisher Scientific, Seoul, Korea)을 사용하여 이루어졌다.

### Fibrinogen과 혈소판 막 αIIb/β<sub>3</sub>의 결합

현탁된 혈소판을 Alexa Fluor 488-사람 fibrinogen (30 μg/mL)으로 처리한 후, 2 mM CaCl<sub>2</sub>를 첨가하여 반응을 시작하였다. Collagen을 첨가하고 혼합물을 5분 동안 incubation함으로써 자극이 일어나게 하였다. 반응을 종결시키기 위해 0.5% 파라포름 알데히드를 포함하는 인산완충식염수(pH 7.4) 용액을 첨가하였고, 모든 과정에서 빛 차단 조치를 하였다. Fibrinogen의 결합은 BD Bioscience (San Jose, CA, USA)의 유세포 분석기(FACS)를 사용하여 측정되었고, 확보된 데이터는 Cell-Quest 소프트웨어(BD Biosciences)를 사용하여 분석되었다.

### 혈소판 매개 fibrin clot 생성량

혈소판이 시험관 벽에 부착되는 것을 방지하기 위해 PRP (500 μL)를 polyethylene 재질의 시험관에 넣고 thrombin (0.05 U/mL)과 2 mM CaCl<sub>2</sub>로 첨가하여 37 °C에서 15분 동안 자극하였다. Fibrin 기반의 혈전이 형성된 정보를 디지털 사진을 카메라를 사용하여 촬영하였다. 소프트웨어 ImageJ (v1.46, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)를 사용하여 촬영된 이미지로부터 응고 영역을 계산하였고, 이 분석은 혈전 형성 정도의 정량적 측정을 제공하였다.

### 통계 처리

모든 실험 결과는 평균±표준편차로 나타내었다. 통계적 유의성은 *p* < 0.05의 유의 수준으로 Student's *t*-test 또는 ANOVA를 사용하여 결정되었다. 분산분석 결과 집단 평균 간에 유의한 차이가 있는 경우에는 Scheffe의 방법을 이용하여 추가 사후분석을 실시하였다. 이를 통해 결과를 포괄적으로 분석하였고, 실험 그룹 간의 중요한 차이점을 식별하였다.

## 결과 및 고찰

### cyclic nucleotides 생성에 대한 artemisinin의 조절능

cGMP 및 cAMP와 같은 cyclic nucleotides는 세포질 내로의  $Ca^{2+}$  동원을 감소시켜 혈소판 응집에 억제 효과를 발휘한다. 이러한 억제는 cGMP 의존성 protein kinase (PKG)와 cAMP 의존성 protein kinase (PKA)의 활성화를 통해 발생하는 것으로 알려져 있다[17].

본 연구를 통해 cyclic nucleotides에 미치는 artemisinin의 영향을 조사하였다. Fig. 2A에 설명된 연구 결과는 artemisinin이 cAMP 생성을 크게 향상시켜 cAMP를  $4.23 \pm 0.16$  pmol/ $10^8$  cells에서  $7.36 \pm 0.45$  pmol/ $10^8$  cells로 높인다는 것을 보여주었다. 그러나, cGMP의 생성은 artemisinin 처리 시 유의한 증가를 나타내지 않았다(Fig. 2B). 이러한 결과는 artemisinin이 cGMP보다 cAMP의 상당한 상향 조절을 통해 혈소판 활성화를 억제한다는 증거를 제공한다.

### 세포 내 $Ca^{2+}$ 동원과 $IP_3R$ 의 인산화에 대한 artemisinin의 조절능

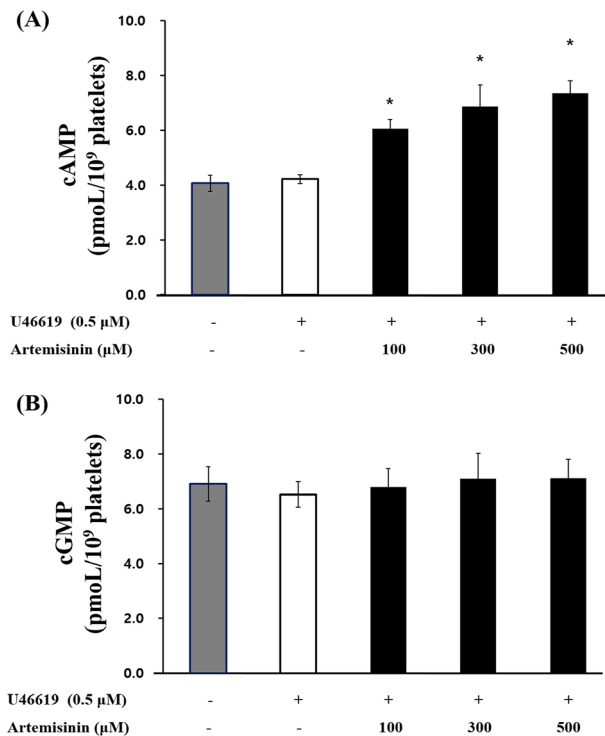
혈소판 막의 Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate ( $PIP_2$ )은 phospholipase  $C-\gamma_2$  (PLC- $\gamma_2$ )에 의해 가수분해되어 diacylglycerol과 inositol 1,4,5-triphosphate ( $IP_3$ )를 생성한다[18].  $IP_3$ 는 dense tubular 시스템의 inositol 1,4,5-triphosphate receptor ( $IP_3R$ )를 통해 세포질로 calcium mobilization ( $[Ca^{2+}]_i$ )을 유발하고 ( $[Ca^{2+}]_i$ )의 상승은 혈소판 응집에 관여하는 calcium/calmodulin 의존성 단백질인 myosin light chain 및 pleckstrin의 인산화를 유도한다[19]. 증가된 cAMP은 PKA를 활성화하고, 이는  $IP_3R$ 를 인산화시킴으로써  $[Ca^{2+}]_i$ 를 감소한다고 알려져 있기에, 우리는 이들에 대한 artemisinin의 조절능을 확인하였다.

그 결과, Fig. 3A에서 나타난 바와 같이, U46619 자극으로  $[Ca^{2+}]_i$ 이  $100.3 \pm 0.5$  nM에서  $714.7 \pm 16.8$  nM로 증가하였고, artemisinin (100-500  $\mu$ M)을 투여했을 때 상승된  $[Ca^{2+}]_i$ 가 효과적으로 약화되었다(Fig. 3A). 또한, 우리 연구는  $[Ca^{2+}]_i$  조절을 담당하는 단백질인  $IP_3R$  인산화에 대한 artemisinin의 영향을 조사하였다. Fig. 3B에 도시된 바와 같이, artemisinin은 U46619로 자극된 혈소판에서  $IP_3R$  인산화를 농도 의존적으로 증가시켰다. 이러한 결과는 artemisinin에 의해 유도된  $[Ca^{2+}]_i$ 의 감소가  $IP_3R$  인산화를 통해 매개됨을 시사한다.

### Artemisinin이 VASP 인산화에 미치는 영향

앞선 연구들에서 VASP는 cAMP/cGMP-의존성 PKA/PKG의 주요 기질 중 하나이며, 혈소판 분비 및 점착을 조절하고 integrin  $\alpha IIb/\beta_3$ 의 비활성화를 통해 혈소판 응집을 막는다고 보고되었다[20,21]. 본 연구에서도 artemisinin이 U46619 유도의 혈소판에서 cAMP 생성을 농도 의존적으로 증가한다는 것을 확인하였다(Fig. 2). 우리는 추가적으로 artemisinin이 U46619로 유도된 혈소판에서 VASP 인산화를 조절하는지 조사하였다.

그 결과, Fig. 4에서 나타난 바와 같이, artemisinin이 VASP Ser157의 인산화를 상당히 증가시켰지만 VASP Ser239에서는 유의한 효과가 관찰되지 않았음을 확인하였다. 특히, 100  $\mu$ M 이상의 artemisinin에서 통계적 유의성이 관찰되었는데, 이는 artemisinin에 의해 강하게 생성 증가된 cAMP가 VASP Ser157의 인산화를 증가시킨다는 것을 나타낸다.

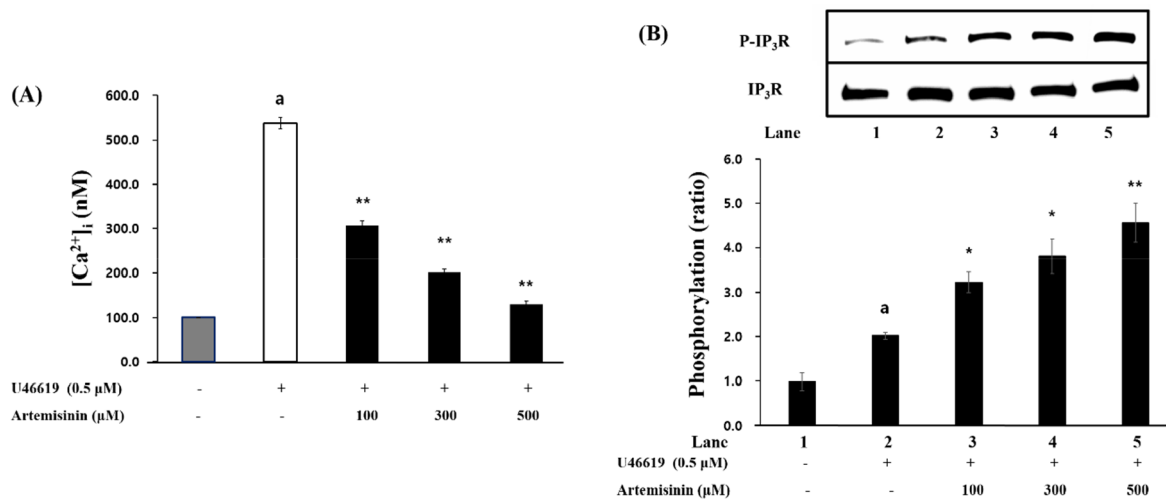


**Fig. 2** The effects of artemisinin on cyclic nucleotides production. (A) Effects of artemisinin on cAMP production. (B) Effects of artemisinin on cGMP production. Incubation of the suspended platelets ( $10^8$  cells/mL) occurred at 37 °C while adding different artemisinin concentrations, then 2 mM  $CaCl_2$  was added with U46619 for stimulation during 5 min. Termination of the reaction occurred by adding 1 M HCl, the cGMP/cAMP were measured using cAMP or cGMP EIA kit. The results 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-induced platelets

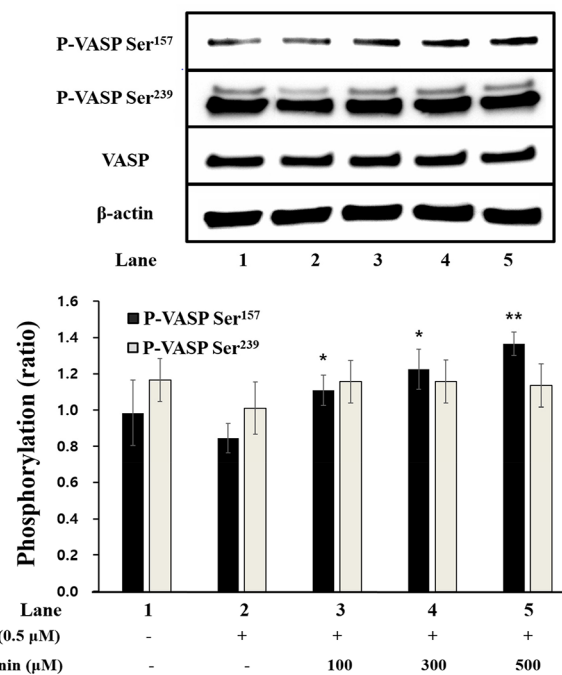
### Artemisinin이 $\alpha IIb/\beta_3$ 에 대한 fibrinogen 결합에 미치는 영향

VASP의 인산화는 integrin  $\alpha IIb/\beta_3$ 의 활성화를 억제하여 혈소판 응집을 억제하는 것으로 알려져 있다[20,21]. Integrin  $\alpha IIb/\beta_3$ 의 활성화를 통해 일어나는 신호 전달은 혈소판 세포 골격의 변형을 유도를 일으키고, 이어서 혈소판 활성화와 혈전 생성을 유발하는 것으로 보고되었다[22]. 휴지기의 혈소판에서는  $\alpha IIb/\beta_3$ 가 낮은 친화도 상태로 있다가, 응집유도제 처리 시 inside-out 신호전달 경로의 활성화로 구조적인 변화가 일어나고  $\alpha IIb/\beta_3$ 의 친화도가 증가되는 것으로 알려져 있다[23].  $\alpha IIb/\beta_3$ 의 친화도가 증가되면, fibrinogen의 결합이 향상됨으로써 추가적인 혈소판 골격의 형태 변화 및 응집이 일어난다.

본 연구에서는 artemisinin에 의해 매개되는 VASP Ser157 인산화의 증가를 고려하여,  $\alpha IIb/\beta_3$  수용체에 대한 fibrinogen 결합에 대한 artemisinin의 효과를 추가로 확인하였다. U46619의 자극은  $\alpha IIb/\beta_3$  수용체에 대한 fibrinogen 결합을  $84.2 \pm 1.0\%$ 로 증가시켰다(Fig. 5A-b, 5B). 그러나, Fig. 5A-f 및 5B에 보여지는 바와 같이, artemisinin은 fibrinogen 결합을 농도 의존적 억제하였다. 특히, 500  $\mu$ M의 농도에서 artemisinin은 fibrinogen 결합을 77.9%까지 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 5A-f, 5B). 이러한 결과는  $\alpha IIb/\beta_3$ 에 결합하는 fibrinogen에 대한 artemisinin



**Fig. 3** The effects of artemisinin on intracellular  $Ca^{2+}$  mobilization and  $IP_3R$  phosphorylation. (A) Effects of artemisinin on intracellular  $Ca^{2+}$  mobilization. (B) Effects of artemisinin on  $IP_3R$  phosphorylation. For 60 min, incubation of PRP occurred with Fura 2-AM (5  $\mu$ M) at 37  $^{\circ}C$ , and the prepared suspended platelets ( $10^8$  cells/mL) based on the steps specified above. And the incubation of washed platelets occurred for 3 min at 37  $^{\circ}C$  with 2 mM  $CaCl_2$  and U46619 stimulation during 5 min. A fluorescence spectrophotometer measured the Fura 2 fluorescence. The results 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-induced platelets



**Fig. 4** The effects of artemisinin on VASP phosphorylation. Termination of the reaction was carried out using a 1x lysis buffer. A BCA protein kit was used to measure protein concentration from platelet lysates. Protein (15  $\mu$ g) was isolated via 8% SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane. The primary antibody was treated with a dilution factor of 1:1,000 and the secondary antibody was treated with a dilution factor of 1:2,000. The results 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

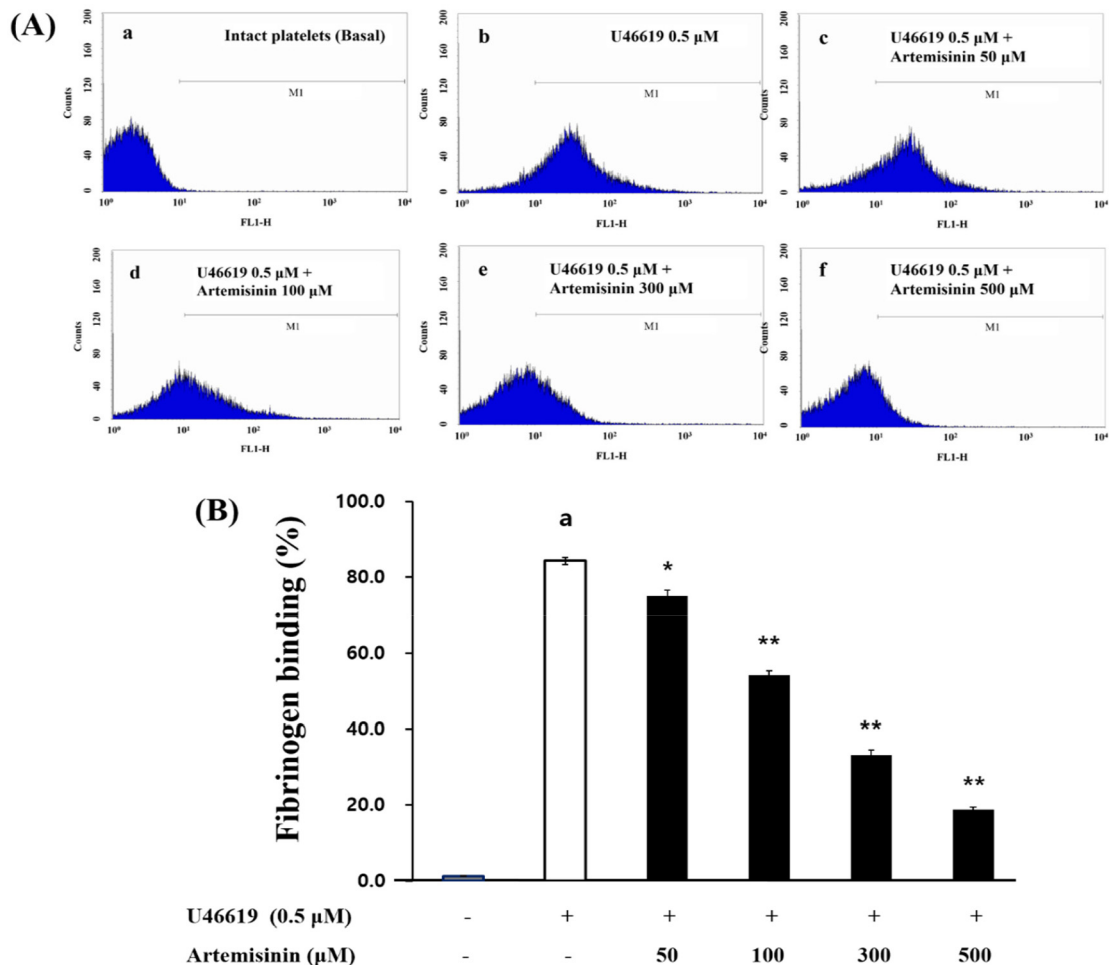
의 억제 효과를 보여주는 것이며, 이는 VASP Ser157 인산화와 관련되었을 것으로 사료된다.

**Artemisinin이 혈소판 매개의 fibrin clot 형성에 미치는 영향**  
 Integrin  $\alpha IIb/\beta 3$  매개 신호 전달은 혈소판 세포골격 재배열, 혈소판 증식 및 혈전 형성에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다[22]. 혈전 형성은 활성화된 혈소판이 축적되어 fibrin과 혈소판의 그물망을 형성하는 손상된 혈관을 복구하는 중요한 단계이고, fibrinogen과  $\alpha IIb/\beta 3$  사이의 상호작용이 혈전 형성에 중요하며  $\alpha IIb/\beta 3$  활성화 억제제가 혈전 형성을 방지하는 것으로 밝혀져 있다[22].

혈소판 활성화 및 응집은 혈소판 활성화제에 의해 촉발되며, 시간이 지남에 따라 fibrin 응고를 형성한다. 혈소판의 효능을 확인한 다른 연구에서, clot retraction에 대한 효과는 thrombin을 유도하였음을 확인하였고[16], U46619보다 thrombin을 사용하는 것이 응고를 유도하는데 효과적이기에 본 연구에서는 thrombin에 의해 유도된 fibrin 응고 형성에 대한 artemisinin의 효과를 조사하였다. Fig. 6A에 도시된 바와 같이, thrombin은 fibrin 응고 형성을 강하게 유도하였다. 그러나 100, 300 및 500  $\mu$ M 농도의 artemisinin은 thrombin 유도의 fibrin 응고 형성을 농도 의존적으로 억제하였다. 각각 농도에서 artemisinin의 억제율은 각각 15.6, 22.3 및 43.5%로 확인되었다(Fig. 6B). 이러한 결과는 혈전 형성을 효과적으로 억제하는 artemisinin의 가치를 보여준다.

## 초 록

혈소판 응집의 조절은 정상적인 지혈을 유지하는 데 중요하지



**Fig. 5** The effects of artemisinin on fibrinogen binding. (A) The flow cytometry histograms on fibrinogen binding. a, Intact platelets (base); b, U46619 (0.5 μM); c, U46619 (0.5 μM) + artemisinin (50 μM); d, U46619 (0.5 μM) + artemisinin (100 μM); e, U46619 (0.5 μM) + artemisinin (300 μM); f, U46619 (0.5 μM) + artemisinin (500 μM). (B) Effects of artemisinin on U46619-induced fibrinogen binding (%). After treatment with Alexa Fluor 488-human fibrinogen (30 μg/mL) by adding 2 mM CaCl<sub>2</sub> to the suspended platelets, U46619 (0.5 μM) was used for stimulation during 5 min. The addition of phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) containing 0.5% paraformaldehyde terminated the reaction. Light blocking was used during this process and a flow cytometer (FACS) measured fibrinogen binding. The results are expressed as mean ± SD (n=4). <sup>a</sup>p<0.05 compared with non-stimulated platelets, \*p<0.05, \*\*p<0.001 compared with the U46619-stimulated platelets

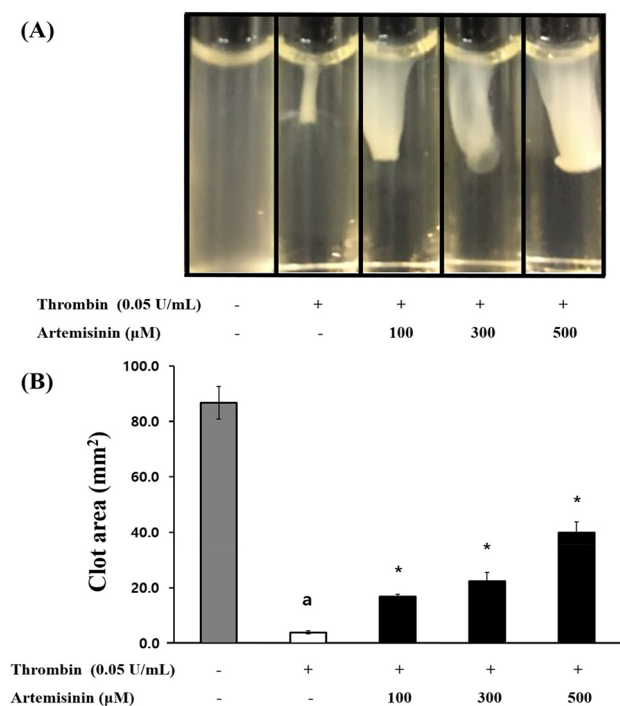
만 비정상적이거나 과도한 혈소판 응집은 뇌졸중, 죽상동맥 경화증 및 혈전증과 같은 심혈관 질환에 기여할 수 있다. 따라서 혈소판 응집을 제어하거나 억제할 수 있는 물질을 식별하는 것은 이러한 상태의 예방 및 치료를 위한 유망한 접근 방식이다. *Artemisia* 또는 *Scopolia* 속 식물에서 추출한 artemisinin은 항암 및 알츠하이머병 연구와 같은 다양한 분야에서 가능성을 보여주었다. 그러나 artemisinin이 혈소판 활성화 및 혈전 형성에 영향을 미치는 구체적인 역할과 메커니즘은 아직 완전히 밝혀지지 않았다. 이 연구는 혈소판 활성화 및 혈전 형성에 대한 artemisinin의 효과를 조사하였다. 그 결과, cAMP 생성과 cAMP 의존성 kinase에 대한 기질인 VASP 및 IP<sub>3</sub>R의 인산화가 artemisinin에 의해 유의미하게 증가되었다. IP<sub>3</sub>R의 인산화는 조밀한 관형 시스템에서 정상적으로 동원되는 Ca<sup>2+</sup>를 억제하였고, VASP의 인산화는 αIIb/β<sub>3</sub> 혈소판 막 불활성화를 통한

fibrinogen 결합을 억제하였다. 마지막으로, artemisinin은 thrombin이 유발하는 혈전 형성을 농도의존적으로 억제하였다. 따라서 우리는 artemisinin이 혈소판 활성화의 효과적인 예방 및 치료제로 작용하여 비정상적인 혈소판 응집 및 혈전 형성으로 인해 유발되는 심혈관 질환의 개선에 기여할 수 있음을 제안한다.

**Keywords** 혈소판 · Artemisinin · Cyclic nucleotide · Fibrinogen binding · Intracellular Ca<sup>2+</sup>

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

**Conflict of interest** No conflict of interest.



**Fig. 6** Effects of artemisinin on platelet-mediated fibrin clot formation. (A) Effects of artemisinin on thrombin-retracted fibrin clot photographs (B) Effects of artemisinin on thrombin-retracted fibrin clot area. To avoid sticking, a polyethylene tube contained the PRP (500 μL) which was then stimulated with thrombin (0.05 U/mL) and 2 mM CaCl<sub>2</sub> at a temperature of 37 °C during 15 min. A digital camera then took photographs of the fibrin-based clots. The results are expressed as mean ± SD (n=4). \**p* < 0.05 compared with no-stimulated platelets, \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.001 compared with the thrombin-induced platelets

## References

- Xia Q, Wang X, Xu DJ, Chen XH, Chen FH (2012) Inhibition of platelet aggregation by curdione from *Curcuma wenyujin* essential Oil. *Thromb Res* 130: 409–414. doi: 10.1016/j.thromres.2012.04.005
- Lee DS, Kim TH, Jung YS (2014) Inhibitory effect of allyl isothiocyanate on platelet aggregation. *J Agric Food Chem* 62: 7131–7139. doi: 10.1021/jf4041518
- Ruggeri ZM (2002) Platelets in atherothrombosis. *Nat Med* 8: 1227–1234. doi: 10.1038/nm1102-1227
- Bassand JP (2013) Current antithrombotic agents for acute coronary syndromes: focus on bleeding risk. *Int J Cardiol* 163: 5–18. doi: 10.1016/j.ijcard.2011.10.104
- Vaiyapuri S, Ali MS, Moraes LA, Sage T, Lewis KR, Jones CI, Gibbins JM (2013) Tangeretin regulates platelet function through inhibition of phosphoinositide 3-kinase and cyclic nucleotide signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33: 2740–2749. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.301988
- 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
- Yao Y, Guo Q, Cao Y, Qiu Y, Tan R, Yu Z (2018) Artemisinin derivatives inactivate cancer-associated fibroblasts through suppressing TGF-β signaling in breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 37: 282. doi: 10.1186/s13046-018-0960-7
- Wong YK, Xu C, Kalesh KA, He Y, Lin Q, Wong WSF (2017) Artemisinin as an anticancer drug: Recent advances in target profiling and mechanisms of action. *Med Res Rev* 37: 1492–1517. doi: 10.1002/med.21446
- Wang KS, Li J, Wang Z, Mi C, Ma J, Piao LX, Xu GH, Li X, Jin X (2017) Artemisinin inhibits inflammatory response via regulating NF-κB and MAPK signaling pathways. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 39: 28–36. doi: 10.1080/08923973.2016.1267744
- Xu G, Huang YL, Li PL, Guo HM, Han XP (2017) 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. *J Pharm Pharmacol* 69: 684–697. doi: 10.1111/jphp.12704
- Zeng Z, Xu J, Zheng W (2017) Artemisinin protects PC12 cells against beta-amyloid-induced apoptosis through activation of the ERK1/2 signaling pathway. *Redox Biol* 12: 625–633. doi: 10.1016/j.redox.2017.04.003
- Das SS, Nanda GG, Alone DP (2014) Artemisinin and curcumin inhibit *Drosophila* brain tumor, prolong life span, and restore locomotor activity. *IUBMB life* 66: 496–506. doi: 10.1002/iub.1284
- Zhao X, Fang J, Li S, Gaur U, Xing X, Wang H (2019) 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* 20: 2680. doi: 10.3390/ijms20112680
- Fang J, Zhao X, Li S, Xing X, Wang H, Lazarovici P, Zheng W (2019) 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 Res Ther* 10: 312. doi: 10.1186/s13287-019-1419-2
- Peng T, Li S, Liu L, Yang C, Farhan M, Chen L, Su Q, Zheng W (2022) 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* 18: 4578–4594. doi: 10.7150/ijbs.69892
- Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260: 3440–3450
- 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 Nat Acad Sci* 77: 7039–7043. doi: 10.1073/pnas.77.12.7039
- Berridge MJ, Irvine RF (1989) Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 341: 197–205. doi: 10.1038/341197a0
- Nishikawa M, Tanaka T, Hidaka H (1980) Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent phosphorylation and platelet secretion. *Nature* 287: 863–865. doi: 10.1038/287863a0
- 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
- Napeñas J, 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
- Calderwood DA (2004) Integrin activation. *J Cell Sci* 117: 657–666. doi: 10.5483/bmbrep.2014.47.12.241
- Phillips DR, Nannizzi-Alaimo L, Prasad KS (2001) Beta3 tyrosine phosphorylation in alphaIIb beta3 (platelet membrane GP IIb-IIIa) outside-in integrin signaling. *Thromb Haemost* 86: 246–258