

臺北醫學大學 醫學院 醫學科學研究所碩士論文

Taipei Medical University

Collage of Medicine

Graduate Institute of Medical Science

Master Thesis

Xanthohumol 抑制血小板凝集作用之機轉探討

Mechanisms involved in the antiplatelet activity of

xanthohumol

研究生：張瓊分 (Chiung-Fen Chang)

指導教授：許準榕博士 (Joen-Rong Sheu, Ph. D)

中華民國九十八年七月

July, 2009

目錄

中文摘要	1
英文摘要	3
縮寫表	5
一. 緒論	
1-1 研究背景	8
1-2 研究動機	29
1-3 研究範圍	30
二. 實驗材料與方法	
2-1 實驗材料	31
2-2 實驗方法	36
2-3 數據分析	47
三. 結果	48
四. 討論及未來展望	58
五. 結論	68
六. 表	69
七. 圖	70
八. 參考文獻	92

中文摘要

黃腐醇(xanthohumol)是啤酒花(*Humulus lupulus*)的類黃酮類成分之一，由目前的研究指出 xanthohumol 有神經鎮定、抗癌、抗氧化、抗菌以及腸胃道反應等藥理作用；而 xanthohumol 可以有效抑制細胞啟始(initiation)和增生(proliferation)，目前的研究都集中在其抗癌和抗氧化方面的活性，然而 xanthohumol 在血小板上的藥理學功效尚未明確，因此我們有意探討 xanthohumol 在血小板活化過程中，對於訊息傳遞方面的抑制作用。

研究結果顯示，xanthohumol 隨著濃度的增加(0.5-10 μM)，能有效抑制collagen (1 $\mu\text{g/ml}$)、arachidonic acid (60 μM)所引發的血小板凝集反應；xanthohumol (1.5和3 μM)可顯著抑制collagen (1 $\mu\text{g/ml}$)引起的細胞內鈣離子移動和ATP釋放反應。Xanthohumol (1.5和3 μM)會抑制collagen (1 $\mu\text{g/ml}$)誘發的PLC γ 2蛋白磷酸化反應。Collagen (1 $\mu\text{g/ml}$)和PDBu (150 nM)可以誘發細胞內protein kinase C的活化，並且將47 kDa位置的蛋白磷酸化，實驗發現xanthohumol (1.5和3 μM)只可抑制collagen (1 $\mu\text{g/ml}$)引起的p47 protein的磷酸化，對於PDBu (150 nM)所引起的p47 protein磷酸化則沒有抑制作用。另外xanthohumol (1.5和3 μM)可抑制collagen (1 $\mu\text{g/ml}$)引起的mitogen-activated protein

kinases，如p38、ERK與JNK protein的磷酸化以及Akt的蛋白磷酸化。Xanthohumol (1.5和3 μ M)可抑制collagen (1 μ g/ml)所引起的自由基產生。此外，xanthohumol (1.5和3 μ M)並不會增加細胞內nitric oxide產生量，也不會透過vasodilator-stimulated phosphoprotein(VASP)磷酸化反應而抑制血小板凝集反應。

實驗結果證實，xanthohumol抑制血小板活化的作用可能涉及以下路徑：xanthohumol會抑制PLC γ 2與protein kinase C的活性及47 kDa protein的磷酸化。Xanthohumol會抑制 mitogen-activated protein kinases，如p38、ERK與JNK protein的磷酸化；xanthohumol會抑制Akt的蛋白磷酸化。同時，xanthohumol可有效抑制血小板活化時產生的hydroxyl radical。以上這些結果會導致xanthohumol抑制血小板細胞內鈣離子的移動以及濃度的增加，最後抑制血小板的凝集反應。此研究意味著xanthohumol的研究可應用在治療與血小板過度活化相關之疾病。

Abstract

Xanthohumol is one of the major constituents of *Humulus lupulus*. Xanthohumol has been reported to have sedative property, estrogenic activity, cancer-related bioactivities, antioxidant activity, stomachic effect, antibacterial and antifungal effects in recent studies. However, the pharmacological functions of xanthohumol on platelets were not yet understood, we are interested in investigating the inhibitory effects of xanthohumol on cellular signal transduction during the process of platelet activation.

In this study, xanthohumol concentration-dependently (0.5-10 μM) inhibited collagen (1 $\mu\text{g/ml}$)- and arachidonic acid (60 μM)-induce platelet aggregation in washed human platelets. In addition, xanthohumol (1.5 and 3 μM) markedly inhibited collagen (1 $\mu\text{g/ml}$)-induce intracellular Ca^{2+} mobilization and ATP release. Phosphorylation of p47, a marker of protein kinase C activation, was triggered by collagen (1 $\mu\text{g/ml}$) and PDBu (150 nM). In our experiments, xanthohumol (1.5 and 3 μM) significantly inhibited phosphorylation of p47 stimulated by collagen (1 $\mu\text{g/ml}$) but not by PDBu (150nM). In addition, xanthohumol

(1.5 and 3 μM) reduced phosphorylation of MAPK and Akt stimulated by collagen (1 $\mu\text{g/ml}$) in human platelets. On the other hand, xanthohumol (1.5 and 3 μM) also inhibited collagen (1 $\mu\text{g/ml}$)-induced hydroxy radicals in human platelets. Neither nitric oxide formation nor vasodilator-stimulated phosphoprotein was induced by xanthohumol in platelets.

In conclusion, our study suggested that the possible pathways of anti-platelet activity of xanthohumol may involve in the following : xanthohumol may regulate the PLC γ 2-PKC pathway and inhibit the MAPK and Akt protein phosphorylation. Xanthohumol may inhibit hydroxyl radicals induced by collagen (1 $\mu\text{g/mL}$). Taken together, xanthohumol regulated these pathways to inhibit the intracellular Ca^{2+} mobilization and platelet aggregation. Therefore, xanthohumol may be used as an effective tool in treating pathological disorder associated with platelet hyperaggregability.

縮寫表

AA : arachidonic acid

AC : adenylate cyclase

A.C.D. : citric acid / sodium citrate / glucose

ADP : adenosine 5'-diphosphate

ATP : adenosine 5'-triphosphate

BSA : bovine serum albumin

cyclic AMP : cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate

cyclic GMP : cyclic 3', 5'-guanylate monophosphate

COX : cyclooxygenase

cPLA₂ : cytosolic phospholipase A₂

CYP450 3A4 : cytochrome P450 3A4

DAG : 1, 2-diacylglycerol

DPH : diphenylhexatriene

EDTA : ethylenediamine tetraacetic acid

ERK : extracellular signal regulated kinase

FITC : fluorescein iso-thiocyanate

Fura 2-AM : Fura 2-acetoxymethyl ester

GC : guanylate cyclase

IP₃ : inositol 1,4,5-trisphosphate

JNK : c-Jun-NH₂-terminal kinase

LDL : low-density lipoprotein

MAPK : mitogen activated protein kinase

PAF : platelet-activating factor

PAGE : polyacrylamide gel electrophoresis

PC : phosphatidylcholine

PDBu : phorbol-12,13-dibutyrate

PDE : phosphodiesterases

PE : phosphatidylethanolamine

PGD₂ : prostaglandin D₂

PGE₁ : prostaglandin E₁

PGE₂ : prostaglandin E₂

PGH₂ : prostaglandin H₂

PGI₂ : prostaglandin I₂

PKC : protein kinase C

PLC : phospholipase C

PPP : platelet-poor plasma

PRP : platelet-rich plasma

PS : platelet suspension

SDS : sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE : sodium sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

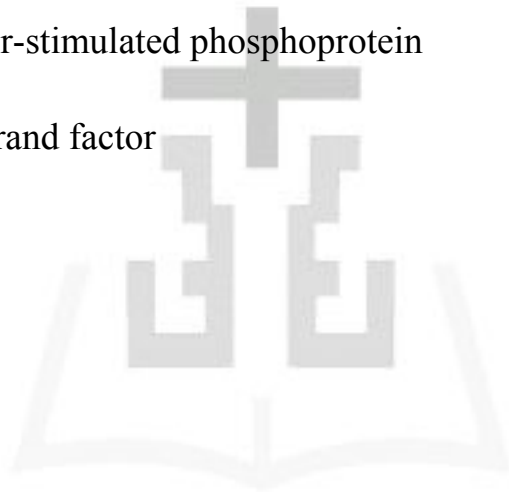
TxA₂ : thromboxane A₂

TxB₂ : thromboxane B₂

U46619 : 9,11-dideoxy-9 α ,11 α -methanoepoxy PGF_{2a}

VASP : vasodilator-stimulated phosphoprotein

vWF : von Willebrand factor



一. 緒論

1-1 研究背景

啤酒花(*Humulus lupulus*)

啤酒之生產，可追溯到四千年前埃及的古文明，是一種具長遠歷史而廣為接受的一種飲料。啤酒的主要原料是大麥芽、啤酒花、酵母、水。適度飲酒對心血管的保護作用已經被許多研究證實(Rayo Llerena and Marin Huerta, 1998; Samanek, 2000)，抗粥狀動脈硬化與提高高密度脂蛋白(HDL)被認為是飲用酒類可保護冠狀動脈硬化的最可能機轉。其他可能的機轉還有抑制血小板的活性，包含抑制凝血功能和血栓形成，以達心血管的保護作用(Constant, 1997; de Gaetano et al., 2003)。

啤酒花(Hop)，又名忽布子，學名為 *Humulus lupulus*，是一種蔓藤性植物，啤酒花的雌株花序在製造啤酒的過程中是必備的成分，用來增加啤酒的風味和穩定製程中的泡沫產生(Vanhoecke et al., 2005)。在啤酒的製程中，啤酒花與麥汁混合物被煮沸以吸取啤酒花的味道，其所含的軟性樹脂和精油能賦予啤酒特殊的芳香和苦味，再起色和消毒。在煮沸後，加入啤酒花的麥汁被泵入迴旋沉澱槽以去除不需要的啤酒花剩餘物和不溶性的蛋白質。

啤酒花的成分由一群複合物組成，苦味由苦味質(bitter acid; soft resin)： α -acid (humulones： $C_{21}H_{30}O_5$)及 β -acid (lupulone： $C_{26}H_{38}O_4$)及其多種異構物所構成。香味則由啤酒花之精油(essence oil)主要含 $(C_5H_8)_n$ 之 terpene 成份如：myrcene($C_{10}H_{16}$)、linalool($C_{10}H_{18}O$)、humulene($C_{15}H_{24}$)，酮類成分如：luparone($C_{13}H_{22}O$)與醇類成分如：curcumol($C_{15}H_{24}O_2$)與 luparol($C_{16}H_{26}O_2$)等多種化合物所組成。

啤酒花曾用作中草藥治療睡眠障礙、當作輕微鎮定劑或健胃劑。在過去的十年間有許多的藥理研究都想藉由 *in vitro* 或 *in vivo* 的方法找出傳統醫療中使用啤酒花的科學證據。目前研究 *Humulus lupulus* 的藥理作用有神經鎮定、類雌性素活性、抗癌、抗菌以及腸胃道反應等方面。隨著啤酒花的研究，啤酒花的成分中研究最多的莫過於 xanthohumol 和 8-prenylnaringenin，xanthohumol 具有廣效的抗癌效果 (Zanoli and Zavatti, 2008)和抗氧化作用(Yamaguchi et al., 2009)，而 8-prenylnaringenin 被認為是最強效的植物雌激素(phytoestrogen)。

黃腐醇(Xanthohumol)

啤酒花的成分中除了提供苦味和香味的苦味質(bitter acid)和精油(essence oil)之外，尚有一群異戊二烯類黃酮(phenylflavonoids)的化合物，其中最重要的成分便是xanthohumol，占有乾燥啤酒花成分的

1 %，比其他類似結構化合物多了10~100倍(Stevens et al., 1999b)。
xanthohumol 在適當加熱與提高 pH 的環境下會轉變成
isoxanthohumol(異黃腐醇)，因此黃腐醇和異黃腐醇是啤酒中最主要的
異戊二烯類黃酮類化合物，而在人類的小腸微生物群(intestinal
microflora)(Possemiers et al., 2006)或肝臟細胞色素(cytochrome P450
enzymes)(Guo et al., 2006)作用下 isoxanthohumol 會再轉變成
8-prenylnaringenin。因此，沒有類雌性素活性的xanthohumol可轉變成
有類雌性素活性的 isoxanthohumol 和 8-prenylnaringenin(Zanoli and
Zavatti, 2008)。

Xanthohumol (3'-[3,3-dimethylallyl]-2',4',4'-trihydroxy-6'-methoxy-
chalcone)(Figure.1)，啤酒花的類黃酮類成分之一，化學式為 $C_{21}H_{22}O_5$ ，
分子量354.40，是黃色的偏酸性粉末，可溶於所有的有機溶劑。過去
十年來的研究都集中在其抗癌方面的活性，因為xanthohumol可有效
抑制啟始(initiation)和增生(proliferation)，抑制癌細胞的發展歷程和表
現(Colgate et al., 2007)，在目前的研究中，xanthohumol (2-200 μ M)可
以抑制老鼠的血管增生(angiogenesis);在治療xanthohumol (20 μ M)二
十天後，可有效抑制KS-IMM tumors(Kaposi's sarcoma cell line)的生長
速率。目前的研究顯示xanthohumol與抗癌和抗氧化有關，但只限於
實驗室內的研究，尚未應用到臨床上。

黃腐醇和它的相關化合物為了鑑定它的細胞毒性使用 sulforhodamine B assay 分析方法和四種不同的人類癌細胞株：A549(肺細胞)、SK-OV-3(卵巢細胞)、SK-MEL-2(黑色素細胞瘤)和 HCT-15(結腸細胞)。在 xanthohumol、Isoxanthohumol、8-prenylnaringenin、xanthohumol 4'-O-beta-D-glucopyranoside 和 (2S)-5-methoxy-8-prenyl naringenin 7-O-beta-D-glucopyranoside 之中，xanthohumol 有最強的細胞毒性，也在抗癌方面是最有研究價值的。Xanthohumol 具有抑制 DNA topoisomerase I 的活性，此外 drug efflux genes 也被研究來預測抗藥性，實驗結果證實 xanthohumol 具有抑制 topoisomerase I 的抗癌效果，也可與其他抗癌藥併用，藉由抑制 efflux drug transporters 來減少抗藥性(Lee et al., 2007)。

巨噬細胞是一級免疫作用中主要反應的細胞，它們可以被葛蘭氏陰性菌所產生的 lipopolysaccharide(LPS)或宿主免疫細胞的干擾素 interferon-gamma 所活化，研究顯示 xanthohumol 可有效抑制 IL-1beta、TNF-alpha 以及 iNOS 等發炎因子引起的巨噬細胞，猜測 xanthohumol 可能透過許多訊息路徑調控發炎訊息(Zhao et al., 2003; Cho et al., 2008)。由研究顯示從啤酒花萃取之類黃酮成分化合物有抑制 peroxynitrite 引起的氧化作用，人類攝食類黃酮大多透過啤酒，每公升的啤酒含有四毫克的類黃酮化合物，啤酒中含有的 xanthohumol

具有抑制 peroxynitrite 引起的氧化作用(Yamaguchi et al., 2009)，意外地發現 xanthohumol 經熱度和酸度轉換的化合物 isoxanthohumol 則不具有抗氧化作用(Stevens et al., 2003)。因此，xanthohumol 是啤酒中含量最多的類黃酮類抗氧化物質。

血小板(platelet)

血小板在循環系統中扮演很重要的生理角色，主要是參與凝血反應。有許多不同物質都可以造成血小板的活化，當血小板和這些物質接觸幾秒之內就可以發揮活化反應。血小板在 *in vitro* 的環境中利用血小板凝集器可以觀察到許多不同的反應，例如：吸附(adhesion)、外型改變(shape change)、凝集反應(aggregation)以及分泌作用(secretion)，這些現象與 *in vivo* 環境下所發生的凝血反應都很類似，因此我們可以藉由離體實驗預測藥物在人體的作用效果。一般生理狀態下血小板的活化指的是細胞外的刺激訊息與血小板表面的受體(receptor)結合，這些訊息透過細胞膜上 GTP-binding proteins 轉換成另一種型式繼續傳遞到細胞膜內側動器(effector)並活化特異性 effector system，例如：ion channels 或 phospholipase C-induced inositol phospholipids hydrolysis，接著調控二次訊息的強弱，包括：IP₃ (inositol-1,4,5-trisphosphate)、Ca²⁺、DAG、cAMP 與 cGMP，藉由蛋

白質磷酸化、酵素活化以及蛋白質結構的改變來引發多變的機轉路徑。每一個受體活化所引起的訊息傳遞都有一定的前後順序並且每個路徑之間都有複雜的交互反應。

血小板在生理和病理情況下扮演的角色

血小板在止血(haemostasis)過程中扮演非常重要的角色，當人體受傷時會自動啟動血小板活化路徑，在幾分鐘之內達到凝血的止血保護效果，血小板功能不全的疾病，如：glanzmann thrombasthenia 是一種先天性凝血異常疾病，患者受傷時血液無法正常凝結，血流不止會有生命危險。

當血管壁受傷時，內皮下層(subendothelium)會暴露出 collagen，當血小板與 collagen 結合後就會引發血小板活化反應，血小板活化後使細胞內分泌型胞器：Dense granules、 α granules 釋放 ADP 和 thromboxane A₂，促使血小板活化加劇，最後在受傷的地方形成血栓，而達止血效果。

另一方面，血小板過度地活化可能是造成許多血栓和栓塞現象(thrombo-embolic phenomena)的原因，尤其是在動脈部位，不正常的血小板活化可能導致心肌梗塞和中風的危險。血小板的凝集反應(aggregation)可以使用抗血小板藥物來預防，例如：aspirin(acetyl

salicylic acid)是一個使用最久，運用最廣的藥物。Aspirin 目前當作是腦血管病變(cerebrovascular accident)及心肌梗塞(myocardial infarction)的預防用藥。短暫性缺血的發作(transient ischaemic attacks)、心絞痛(angina pectoris)與跛行(claudication)這些急性栓塞的併發症都可藉由規律地服用 aspirin 來改善。抗血小板療法可有效的降低不穩定型心絞痛、急性心肌梗塞與短暫局部缺血發作的死亡率(Cavallari and Momary, 2009)。

血小板的超顯微結構

正常血液循環中的血小板是圓盤狀無核的細胞，源自於骨髓內的巨核細胞(megakaryocyte)，寬約 3 μm ，厚約 1 μm ，是人體最小的血液細胞，細胞膜由兩層磷脂質構成，上面佈滿連結細胞內部細管系統(canalicular system)的通道(channel)，帶負電的 PI(phosphatidyl)和 PS(phosphatidylserine)位在膜上靠近細胞質的一側，作為 phospholipase 的受質(substrates)，雙層磷脂質上鑲嵌有許多 glycoproteins，如:GP Ia/IIa、GP Ib、GP IIb/IIIa 與 GP IV，並且突出細胞膜外作為活化劑或抑制劑的受體。他們位在細胞質的一端會與血小板的內縮系統(contractile system)的成分連接，例如 GP Ib 會和 actin-binding protein 連接(Fox, 1985);而 GP IIb/IIIa 則與 actin filaments

連接(Paintner et al., 1985)。

血小板的細胞骨架主要由 actin 組成，約占全部血小板的 15~20%。Actin filaments 主要是由 tropomyosin、 α -actin 與 actin-binding protein 組成。當血小板活化，myosin 會和 actin 結合以提供 granule centralization 所需的張力(Fox and Phillips, 1982)。另外，血小板另有一些細胞膜骨架，由 short actin filament 與 actin-binding protein 組成，連接到細胞膜上的 GP Ia/IIa 與 GP Ib，主要功能是穩定細胞膜以及調整細胞膜的形狀。除此之外，細胞膜下方還存在由 tubulin 組成之 microtubular coil，用來維持未受刺激之血小板成圓盤狀(Maxwell et al., 2006)。

Dense tubular system 和其他種類細胞內的平滑內質網(smooth endoplasmic reticulum)相同，用來儲存鈣離子以及合成 prostaglandin 所需要的酵素，它們的位置接近 open canalicular system channel 並形成 membrane complex。

血小板細胞質內有許多胞器，包括：粒線體(mitochondriae)、醣原顆粒(glycogen particles)、溶媒體(lysosomes)與過氧化體(peroxisomes)。 α granules 和 dense granules 內含有大部分的蛋白質，例如：platelet factor 4、 β -thromboglobulin、platelet derived growth factor、fibrinogen、fibronectin、thrombospondin、plasminogen activator、

inhibitor-1 與 vWF。Dense granules 則富含 serotonin、ADP (adenosine diphosphate) 與鈣離子。α granules 內尚存在著很少量的抗原： α_2 -antiplasmin(Plow and Collen, 1981)。

當血小板活化時，會改變原本的圓盤狀，變得相當圓而延長且伸出偽足。所有的胞器會集中並且被 microtubules 與 microfilaments 剛形成之環狀結構圈在細胞中央。最後分泌型胞器的內容物會釋放出來。在分泌的過程中，granule membrane 會連接到 canalicular system 的開口處，並且和 internal granular membrane proteins，例如：P-selectin 一起融入細胞膜內。很容易就可以引起 dense granules secretion，但α granules secretion 必須受到高濃度的致效劑刺激才會釋放出內容物；而且只有在受到 thrombin 或高濃度 collagen 刺激下才會引起 lysosomal granules secretion。此外，血小板受到強的致效劑刺激時也會產生並釋放出 TxA_2 (thromboxane A_2) 與 PAF (platelet activation factor) 作為一種 positive feedback 的機制。

血小板活化的機轉

Platelet receptor

血小板可藉由生理性(thrombin、 TxA_2 、collagen、ADP、PAF、serotonin 及 epinephrine 等)及藥理性(calcium、ionophores 及 cyclic

endoperoxide analogues 等)的刺激而活化。這些致效劑可透過血小板細胞膜上專一性的受體發揮作用，所有致效劑的受體都會和 guanine-nucleotide binding regulatory protein 或 G protein 產生交互作用。這些蛋白由三個部分的單鏈聚勝肽(single polypeptide)所組成：細胞外作為 activator-binding domain 的 N-terminal domain；七個疏水性的 transmembrane domains；細胞內連接產生二次訊息酵素的 C-terminal domain。致效劑引起的初期反應通常藉由 arachidonic acid 分解後的 TxA_2 和 ADP 的釋放作用來引起的二次反應以加強血小板凝集。

vWF receptor

vWF 由巨核細胞合成，存在血小板的 α granule、血漿及內皮組織下層中。成熟的 vWF 分子量為 260 kDa，並且會組成分子量 500-10,000 的多聚體(multimers)。最大的多聚體通常存在內皮下層，也最能引發血小板凝集(aggregation)與吸附反應(adhesion) (Meyer and Girma, 1993)。當血小板吸附到內皮下層上的 type VI collagen 時，vWF 會產生結構上的改變以致於能夠和血小板上的 GP Ib 結合。在 *in vitro* 的環境中，外加 ristocetin 或 botrocetin 可引起 vWF 的結構改變；在 *in vivo* 的環境中，高度的剪應力(shear forces)是 vWF 結構改變所必須的。

vWF 和 thrombin 在 GP Ib 上的結合位置位在 α chain 的 N-terminal，並且在細胞質內之 β chain 的尾端可發生磷酸化。vWF 和 GP Ib 發生作用後，會產生一個 GP IIb/IIIa 活化所需要的訊息，當 GP IIb/IIIa 活化後會回過頭來與 vWF C-terminal 上的 RGD (arginine-glycine-aspartic acid) 序列結合，造成血小板不可逆的吸附在血管壁上藉以抵抗血流的高切應力，並且造成凝集反應。

Thrombin Receptor

Thrombin 是很強的血小板的刺激劑，它可以造成血小板形狀改變(shape change)、凝集反應、以及 dense granules、 α granules 與 lysosomal granules secretion。每個血小板細胞上約有 1,700-1,800 個 thrombin 受體，主要由 N-terminal、transmembrane 與 C-terminal domains 構成。Thrombin 將受體 N-terminal 上 arginine 41 與 serine 42 之間的位置切斷，形成一段新的 tethered ligand，藉此活化 thrombin 受體(Vu et al., 1991)。受到 thrombin 活化後，thrombin 受體會發生去敏感化(desensitization)及內在化(internalization)，並且由 endosomes 將其送至 lysosomes 被降解。去敏感化的發生主要是透過 protein kinase C、 β -adrenergic receptor 或是 cAMP-dependent protein kinase 將 serine 和 threonine 磷酸化(Brass et al., 1993)。當 thrombin 受體活化後

會造成 G protein couple receptor 的磷酸化以及 phospholipase C 的活化。Thrombin 對於 GP Ib 有很高的親和力，但除了加速血小板活化外並沒有其他功能(Yamamoto et al., 1991)。

Collagen Receptor

血小板受到 collagen 刺激後會發生形狀改變及 dense granules release。Collagen 的四級結構是由三條聚胜肽形成一個 helix 單體，這些單體再聚合成纖維，而此一結構對於血小板的活化是很重要的。血小板吸附在 collagen 上的作用可藉由 magnesium、vWF 或 fibronectin 來加強。當血管受傷時，血小板換藉由許多物質與血管產生吸附作用，其中最主要的媒介就是 collagen 與 vWF，血小板的 GP Ia/IIa、GP IV 和 GP VI 都是 collagen 的受體，因此 collagen 可以作用在血小板表面上許多的位置，吸附上的血小板會活化細胞內訊息傳遞以及最終的 GP α IIb β III，導致血小板的凝集(Kralisz and Stasiak, 2007)。其中 collagen 受體的活化和 phospholipase C 的活化與細胞內鈣離子的增加非常相關。。

ADP Receptor

血小板中的 ADP 受體主要有兩個：P2Y₁ 與 P2Y₁₂(P2T_{AC})。P2Y₁

屬於 Gq-couple receptor，它能活化 phospholipase C，造成細胞內鈣離子濃度增加；P2Y₁₂ 屬於 Gi-coupled receptor，它能夠抑制 adenylate cyclase，降低細胞內 cAMP 的含量。分別活化各個 ADP 受體都可引起血小板內不同的反應，但若要引起血小板凝集反應則必須同時活化 P2Y₁ 與 P2Y₁₂ 受體(Jin et al., 2002)。

TxA₂ and Cyclic Endoperoxide Receptor

血小板受到較強的活化劑刺激，例如：thrombin 和 collagen，或在發生凝集反應的過程中，會活化 phospholipase A₂，接著便會將 arachidonic acid 自細胞質上的磷脂質分解出來，再進一步的被合成為 prostaglandin endoperoxides：PGG₂ 與 PGH₂，最後再轉變為較強力的 TxA₂。PGG₂ 的半衰期約為五分鐘；而 TxA₂ 約為一分鐘，就會再轉變為不具活性的 TxB₂。TxA₂ 會藉由活化細胞膜上 G protein couple receptor 活化 phospholipase C，接著引起血小板形狀改變、granule 釋放以及凝集反應(Hirata et al., 1991)。

受體的活化和二次訊息的產生

Guanine Nucleotide Binding Regulatory Proteins and Effectors

血小板上有許多致效劑和拮抗劑的受體都經由鳥嘌呤核苷酸調

節蛋白(guanine nucleotide regulatory proteins)或 G proteins 連接到產生二次訊息的酵素，這些酵素包括：adenylate cyclase (AC)、phospholipase C (PLC)、phospholipase A₂ (PLA₂)。G proteins 通常由三個次單元組成：α subunit，是一個鳥嘌呤核苷酸的結合位置，負責受體(receptor)與動器(effector)之間的相互作用；β subunit 和γ subunit 形成一個異質二聚體(heterodimer)，主要是幫助 G proteins 固定在細胞膜上，離子通道和 PLA₂ 的活化以及 AC 的抑制也受到β-γ subunit 的調控。每個 G protein 都具有特異性的α subunit，而β-γ subunit 則大多相似，目前已知有二十二種 Gα、四種 Gβ及七種 Gγ，互相搭配產生數以百計的 G proteins (Brass et al., 1993)。當 GTP 分子結合到 G proteins 時，β-γ subunit 會和α subunit 分離，使得二次訊息產生酵素被α-GTP subunit 活化，接著α-GTP subunit 內生性的 GTPase 活性會終止這個相互作用，轉變回α-GTP subunit 並且再次與β-γ subunit 連結在一起(Spiegel, 1987)。

AC 可將 ATP 轉變成 cAMP，它可藉由 adenosine、PGI₂、PGD₂ 或 PGE₁ 刺激 G_s 而被活化，增加 cAMP 的濃度；β-γ subunit 似乎調節著許多由α₂-adrenergic 致效劑所導致抑制 AC 的作用(Spiegel, 1987)。G_s 和 G_i 也可以調節離子通道的活性；G_s 可以抑制 Na⁺ channels 與刺激 dihydropyridine-sensitive Ca²⁺ channels；G_i 可以抑制 Na⁺ channels

與刺激 K^+ channels (Manning and Brass, 1991)。

PLC β 可受到 Gq 的刺激，將 PIP₂ [phosphatidylinositol (4,5) biphosphate]分解成 IP₃ 與 DAG。而 cAMP 和 cGMP 都可藉由影響 G proteins 而抑制 PLC β 的活性。

當細胞內鈣離子受到由 PLC 產生的 IP₃ 刺激而濃度增加時，或是直接受到 G proteins β - γ subunit 刺激，會活化並且將細胞膜與 dense tubular system 內的 AA 釋放出來，而 AA 會再被合成 TxA₂。

Second Messengers Involved in Platelet Activation and Inhibition

(1) IP₃ 與 Ca²⁺

TxA₂ 和 thrombin 的受體經由 G proteins 連接到 PLC β ，再將 PIP₂ 水解成 IP₃ 與 DAG，在其他種類細胞中 PLC γ 1 可直接被 tyrosine kinase-linked receptor，例如：platelet growth factor receptor 活化，不需經由 G proteins 的作用(Berridge, 1993)。PLC γ 1 也曾發現存在於細胞質中(Banno et al., 1992)。IP₃ 可作用在其受體上造成內鈣離子的移動以及外鈣離子的流入(Irvine, 1990)。位在 dense tubular system 上的 IP₃ 受體在 C-terminal 的部分具有典型的 membrane-spanning domains，可將受體固定在膜上，並且在四個次單元體結合形成一個

IP₃-sensitive Ca²⁺ channel；其 N-terminal 則游離在細胞質中成為與 IP₃ 結合的位置(Mignery and Sudhof, 1990)。位在血小板外膜上的鈣離子通道可受 IP₃ 與 IP₄ 一起調節。

鈣離子的移動可導致 PLA₂ 活化和 TxA₂ 產生，而鈣離子的移動 (Siffert and Akkerman, 1987) 與 PLA₂ 的活化 (Sweatt et al., 1985)，都需要鈉鈣離子交換所導致細胞內 pH 值增加才能發生。ADP 所引發的外鈣離子流入，主要是經由其受體操控的鈣離子通道來完成 (Sage et al., 1989)。

(2) DAG (diacylglycerol)

DAG 會促使 PKC (protein kinase C) 由細胞質移動到細胞膜上並且活化，PKC 的大小約是 80 kDa，它能在 phosphatidylserine 與鈣離子在的情況下將 ATP 上的磷酸轉移到受體蛋白上 serine 或 threonine 的位置 (Nishizuka, 1984)。DAG 可引起凝集反應與 serotonin 釋放，但只能稍稍引起血小板形狀改變。PKC 主要受質的分子量約 47,000 Da 的蛋白質，稱為 p47 或 pleckstrin (Sano et al., 1983)，目前認為它和血小板的分泌作用有關 (Haslam and Lynham, 1977)。另一個被 PKC 磷酸化的蛋白質就是分子量 20 kDa 的 myosin light chain，但它主要還是鈣離子與 calmodulin-regulated myosin light chain kinase 的受質

(Hathaway and Adelstein, 1979)。PKC 的活化與鈣離子的增加必須同時發生才能達成理想的血小板活化反應。而 PKC 的活化可阻斷 epinephrine 所抑制的 AC 活性(Katada et al., 1985)。此外 PKC 對於血小板也存著一些抑制性的功能，因此建立一套負回饋系統(negative feedback system)。

(3) Prostaglandins 與 TxA₂

PLA₂ 會以 phosphatidylcholine 和 phosphatidylethanolamine 作為受質，分解出 AA (McKean et al., 1981)。IP₃ 所引起的細胞內鈣離子增加或透過與 G proteins 直接作用的 Ca²⁺-independent 的機轉接可活化 PLA₂。AA 可被 cyclooxygenase 轉變成不穩定的 prostaglandin，PGG₂ 與 PGH₂，它們皆可引起血小板的凝集反應。接著迅速地 thromboxane synthase 合成 TxA₂。PGH₂ 和 TxA₂ 在二次凝集反應與分泌作用中扮演非常重要的角色，並且也是放大凝集反應機轉的一部分。

PGH₂ 可以轉變成抑制性的 PGD₂、抑制性較弱或沒有活性的 PGF_{2α} 或是 PGI₂ (Armstrong et al., 1985)。PGE₂ 也會由血管上的細胞釋放出來(Gimbrone and Alexander, 1975; Dumonde et al., 1977)，或是在一些病理狀態下過度的產生，例如：糖尿病及血栓(Schafer et al., 1984)。

(4) cAMP

增加 cAMP 的濃度可以阻止鈣離子的移動並且將之隔離在 dense tubular system 內，並且可以逆轉凝集反應。此外，增加 cAMP 也可以影響 PLC，抑制 PIP₂ 水解形成 IP₃。cAMP-dependent kinase 可將 PLC 磷酸化，使其不再受到血小板致效劑的刺激(Lapetina, 1990)。AC 可被 G_s 所刺激，被 G_i 所抑制。降低 cAMP 的濃度並不足以直接造成血小板發生凝集反應。cAMP 會被 PDE(phosphodiesterase)分解為不具活性的 AMP。

(5) cGMP

cGMP 抑制血小板活化的作用被視為一種回饋性的抑制。內皮細胞包含有的以及一些血管擴張劑產生的 NO(nitric oxide)可刺激 cGMP 產生。cGMP 也會被 PDE(phosphodiesterase)分解為不具活性的 GMP。

血小板內重要的訊息傳遞

血小板上有許多 agonists 與 antagonists 的受體都經由鳥嘌呤核苷酸調節蛋白(guanine nucleotide regulatory proteins)或 G proteins 連結到產生二次訊息的酵素，血小板要發生凝集反應會涉及 PLC、PKC 與

MAPKs等訊息傳遞路徑：

Phospholipase C (PLC)/PKC

PLC受到Gq的刺激，將細胞膜上的PIP₂轉變成DAG和IP₃。DAG會促使PKC由細胞質移動到細胞膜上並活化之。DAG可引起凝集反應和serotonin的釋放，但只能稍稍造成血小板的形狀改變。PKC主要的受質是分子量47,000 Da的蛋白質，稱為p47或pleckstrin(Sano et al., 1983)，被認為和血小板的分泌作用有關(Haslam and Lynham, 1977)。PKC的活化和細胞內鈣離子的流動增加具有非常密切的相關性，進而造成血小板的活化反應。IP₃可作用在其受體上造成內鈣離子的移動和外鈣離子的流入(Irvine, 1990)。另外，促使PIP₂轉變成IP₃的cAMP和使於血小板活化的回饋型抑制劑cGMP(Haslam et al., 1978)都可藉由影響G proteins而抑制PLC的活性。

Mitogen-activated protein kinases (MAPKs)

Mitogen-activated protein kinases (MAPKs)為細胞對外界刺激反應作用後的重要訊息介質，在體內訊息傳遞的路徑中扮演很重要的角色。血小板內的MAPKs包括p38 MAPK、ERK、JNK三種(Papkoff et al., 1994; Nadal et al., 1997; Bugaud et al., 1999)。

(1) p38 MAPK

它分為 α 、 β 、 γ 、 δ 四種類型，分子量為43 kDa，p38 MAPK會因為許多種的刺激而活化，包括內分泌、壓力和cytokines，並且會參與發炎反應和apoptosis(New and Han, 1998)。在人類血小板中p38 MAPK以 α 類型存在(Kramer et al., 1995)。血小板中的p38 MAPK會因thrombin、collagen、U46619、LDL和vWF的刺激而產生(Borsch-Haubold et al., 1995; Kramer et al., 1995; Saklatvala et al., 1996; Hackeng et al., 1999)。目前發現p38 MAPK在血小板內主要的功能是将cPLA₂上的Ser⁵⁰⁵位置磷酸化(Borsch-Haubold et al., 1997)。然後進入cPLA₂-AA-TxA₂ pathway。使用p38 MAPK的抑制劑SB203580可以抑制collagen引起的血小板凝集(Saklatvala et al., 1996)。代表collagen會透過p38 MAPK的路徑活化血小板。

(2) ERK

它可分為ERK1和ERK2，分子量分別為44和42 kDa。其主要的功能是細胞的增生(proliferation)和分化(differentiation) (Wilkinson and Millar, 2000)。在人類血小板中ERK1和ERK2均會出現，其中ERK2較為顯著(Bugaud et al., 1999)。ERKs會因collagen的刺激而產生(Borsch-Haubold et al., 1995)並且可調控血小板內鈣離子的流入(Rosado and Sage, 2001)。另外，ERKs也會因為thrombin、vasopressin、

collagen、pokeweedmitogen agglutinin (PMA)、TxA₂ 以及vWF的剌激而產生 (Papkoff et al., 1994; Borsch-Haubold et al., 1995; Borsch-Haubold et al., 1997)。

(3) JNK

有JNK1和JNK2兩種類型，分子量分別在46和54 kDa。而JNK又稱為stress-activated protein kinases，會因為壓力、幅射以及growth factors 等因素而活化(Kyriakis et al., 1994)。在一般細胞中JNK的主要功能是將DNA-binding domain c-Jun 磷酸化，進而對apoptosis 造成影響(Tournier et al., 2000)。在人類血小板細胞中JNK1會受到collagen的剌激而產生，進而影響血栓的形成(Kauskot et al., 2007)。另外，JNK1也會受到thrombin、vasopressin和vWF的剌激而產生(Borsch-Haubold et al., 1995)。

Phosphoinositide 3'-kinase (PI3K)/Akt

Phosphoinositide 3'-kinase(PI3K)/Akt 訊息路徑調控了許多細胞功能，例如：細胞凋亡(apoptosis)或細胞增生(proliferation)(Jiang and Liu, 2008)。熱休克(heat shock)和自由基(reactive oxygen species)等壓力的剌激都會活化 PI3K/Akt cascade(Barthel et al., 2007)。Akt family

有三種已知的型式：Akt1、Akt2、和 Akt3 (Lawlor and Alessi, 2001)。其中 Akt1、Akt2 是出現在人類和老鼠的血小板中(Kroner et al., 2000)，會影響 GP Ib-IX 調節的血小板活化反應，經由實驗可以證明 GP Ib-IX 活化的訊息會向下調控細胞表面組合蛋白(integrin)，接著活化 PI3K/Akt 訊息路徑(Yin et al., 2008)。有研究指出 Akt1 和 Akt2 在 G protein-coupled receptors 和 collagen receptors 誘發的血小板凝集反應終扮演著很重要的角色(Woulfe et al., 2004)。

1-2 研究動機

前文提到有文獻證明啤酒中含有的 xanthohumol 具有抗氧化的作用(Yamaguchi et al., 2009)。目前有許多抗氧化方面的研究指出，類黃酮(flavonoids)的抗氧化結構，具有降低低密度脂蛋白氧化和抑制血小板凝集的能力(Kwasniewska et al., 2000; Pignatelli et al., 2000; Freedman et al., 2001; Han, 2005; Leifert and Abeywardena, 2008)。但對於 xanthohumol 抑制血小板凝集的路徑機轉尚未明確，因此本實驗想進一步探討 xanthohumol 抑制血小板活性的作用和機轉，以提供藥理或臨床應用之依據。

1-3 研究範圍

本研究主要是探討在*in vitro*的環境下，xanthohumol抑制血小板活化過程中所扮演的角色以及其參與的作用機轉。首先巨觀的看外加xanthohumol是否會抑制collagen、thrombin、U46619和arachidonic acid所活化的血小板凝集程度，接著再細步探討xanthohumol在血小板活化過程中對細胞內訊息傳遞的影響，了解xanthohumol和血小板之間的作用機轉。



二. 實驗材料與方法

2-1 實驗材料(Materials)

實驗藥物試劑

xanthohumol購自Sigma Chem. Co. USA公司

實驗藥品

1. 以下藥品購自Sigma Chem. Co. USA 公司

Acrylamide

Ammonium formate

Bovine serum albumin (BSA)

Bromophenol blue

Collagen (Type I, bovine achilles tendon)

Commassie brilliant blue

Dimethyl sulfoxide (DMSO)

Diphenylhexatriene (DPH)

Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA, disodium salt)

Glucose

Heparin

Luciferin-luciferase

Phorbol-12, 13-dibutyrate (PDBu)

SQ22536

Sodium citrate

Sodium formate

Sodium pyruvate

Thrombin

Tris-HCl

U46619 (9, 11-dideoxy-9 α , 11 α -methanoepoxy PGF₂ α)

2. 以下藥品為 Amersham, UK 之產品

Protein molecular weight markers (Prestain markers)

3. 以下藥品為Bio-rad公司之產品

Ammonium persulfate (APS) Protein assay dye reagent concentrate

4. 以下藥品為Amerdamlife Science公司之產品

Glycerin

Sodium dodecylsulfate (SDS)

Tris (hydroxymethyl)-aminomethane (Tris-base)

Triton X-100

5. 以下藥品為Pharmacia Biotech.公司之產品

Glycerol

Polyoxyethylenesorbitan monolaurate (Tween 20)

N,N,N,N,-Tetramethylethylenediamine (TEMED)

6. 以下藥品為日本Wako公司之產品

Acetic acid

Calcium chloride, Dihydrate

Ethanol

Methanol

Sodium Hydrogen Carbonate

Sodium Hydroxide

7. 以下藥品為MDBio Inc.公司之產品

40% Acrylamide / Bis solution

8. 以下藥品為其他公司之產品

99.5% Alcohol, absolute (工研院)

抗體

Anti-mouse Ig horseradish peroxidase linked whole antibody

(Amersham, UK)

Anti-rabbit IgG horseradish peroxidase linked whole antibody

(Amersham, UK)

Phospho-p38 MAP kinase(Thr180/Tyr182) antibody(Cell signaling technology)

p38 MAP Kinase mouse monoclonal antibody(Cell signaling technology)

Phospho-p44/42 MAP kinase (T202/Y204) E10 monoclonal antibody
(Cell signaling technology)

P44/42 MAP kinase monoclonal antibody (Cell signaling technology)

Phospho-(Ser) PKC substrate antibody (Cell signaling technology)

Phospho-SAPK/JNK(Thr183/Tyr185) (G9) mouse monoclonal antibody
(Cell signaling technology)

SAPK/JNK antibody(Cell signaling technology)

Phospho-PLC γ 2 (Tyr759) rabbit polyclonal antibody (Cell signaling

technology)

PLC γ 2 (Tyr759) rabbit polyclonal antibody (Cell signaling technology)

Phospho-Akt(Ser473) antibody(Cell signaling technology)

Tubulin alpha Ab-2 (DMIA) monoclonal antibody (Sigma, USA)

ECL Anti-mouse IgG peroxidase-linked species-specific whole antibody

(from sheep) (Amersham, UK)

套組試劑 (Kit)

Enhanced chemiluminescence (ECL) Western blotting detection

Reagent

耗材

Blotting paper (Amersham, UK)

Cassette (Okamoto, Japan)

Developer and replenisher (Kodak, USA)

Fixer and replenisher (Kodak, USA)

Polyvinylidene fluoride microporous membrane

(PVDF ; Hybond-P, Amersham, UK)

Scientific Imaging film (Kodak, USA)

2-2 實驗方法(Methods)

1. 人類血小板懸浮液(platelet suspensions, PS)的製備

主要是依據 Mustard 等人和 Kornecki 等人的方法(Mustard et al., 1972; Kornecki et al., 1981)。將抗凝血劑 citric acid / sodium citrate / glucose(A.C.D.)與健康志願者之全血以 1:9 (v/v)的比例混合，在室溫下，立即以 1000 g 離心 10 分鐘，取上層富含血小板血漿，加入 heparin (6.4 IU/ml)、EDTA (2 mM)混合後，於 37°C 下溫浴 5 分鐘；再進一步用 2700 g 離心 8 分鐘，除去上層血漿，下層即為血小板顆粒(platelet pellet)，用 5 ml 的 tyrode 溶液 [NaCl (11.9 mM)、KCl (2.7 mM)、MgCl₂ (2.1 mM)、NaH₂PO₄ (0.4 mM)、NaHCO₃ (11.9 mM)、glucose (11.1 mM)、BSA (3.5 mg/ml)，pH 7.28]將血小板顆粒打散，使均勻分佈在 tyrode 溶液中，加入 heparin (6.4 IU/ml)、EDTA (2 mM)，於 37°C 下溫浴 8 分鐘，再以 2100 g 離心 8 分鐘，除去上層液，再用 tyrode 溶液將血小板顆粒打散，加入 EDTA (2 mM)，於 37°C 下溫浴 10 分鐘，接著以 1300 g 離心 5 分鐘，清除上層液，最後用 tyrode 溶液配製成血小板懸浮液，再以 coulter counter (COULTER A^c.T)計數，使血小板懸浮液的濃度約為每毫升含 3.5×10^8 個血小板。此時，血小板懸浮液中鈣離子濃度調整為 1 mM。

2. 血小板凝集與 ATP 釋放反應的測定

根據 O'Brien 等人和 Born 等人(O'Brien J, 1962; Born and Cross, 1963)之混濁測定法，以 Lumi-aggregometer (Payton, Canda)測之。將製備好的人類血小板懸浮液 400 μ l 置入經 silicone 包衣的小玻璃管中，並以小磁棒做每分鐘 1000 轉的攪拌。人類血小板懸浮液中加入 xanthohumol(1.5 和 3 μ M)溫浴 3 分鐘後再加入各種血小板活化劑並觀察其凝集的情形。凝集程度的計算，是以 PRP 或 PS 的吸光度做為 0 % 的血小板凝集，以 PPP 或 Tyrode 溶液的吸光度作做為 100 % 的血小板凝集，使用下列公式計算：

凝集(%) =

(加凝集劑前的吸光度 - 加凝集劑後的吸光度) \times 100 %

加凝集劑前的吸光度 - Tyrode's solution (或 PPP)的吸光度

Xanthohumol 抑制血小板凝集程度的表示法係在加入 xanthohumol 後的凝集程度和未加入 xanthohumol (對照組)的凝集程度的相對百分比。

ATP 釋放反應的測定，則是根據 DeLuca 等人的方法(DeLuca and McElroy, 1974)。以 10 μ l 的 luciferase/luciferin 混合物和 ATP 反應後所產生的冷光，來測定血小板釋放反應的大小，其程度以相對值表示。

3. 血小板內鈣離子濃度的測定

參照 Gryniewicz 等人的方法(Gryniewicz et al., 1985)，以 A.C.D.為抗凝劑與健康人血以 1：9 (v/v)之比例混合，在室溫下立即以 1000 g 離心 10 分鐘，所得上層液，加入 heparin (6.4 IU/ml)、EDTA (2 mM)混合後，於 37°C 下溫浴 5 分鐘，再以 2700 g 離心 8 分鐘，而後，除去上清液，將下層的血小板以 Tyrode 溶液懸浮之，並加入 Fura 2-AM (5 μ M)、heparin (6.4 IU/ml)、EDTA (2 mM)，於 37°C 下避光溫浴 60 分鐘後，再依照製備血小板懸浮液的方法製備懸浮液。

經 Fura 2-AM 處理過之血小板懸浮液，在加入凝集劑後與鈣離子作用所產生的螢光以螢光分光儀(CAF-110 Intracellular Ion Analyzer, JASCO, Japan)記錄之 excitation wavelength(339 和 380 nm)及 emission wavelength(505 nm)，然後利用 Gryniewicz 等人(1985)及 Sato 等人(1988)之方法(Gryniewicz et al., 1985; Sato et al., 1988)，計算細胞內鈣離子濃度。

$$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}} = \frac{\text{Kd} \times s \times (F_{339}/F_{380} - F_{339 \text{ min}}/F_{380 \text{ min}})}{(F_{339 \text{ max}}/F_{380 \text{ max}} - F_{339}/F_{380})}$$
$$= \text{Kd} \times s \times (R - R_{\text{min}}) / (R_{\text{max}} - R)$$

Kd = 224 nM，即 Fura 2 之解離常數(Kd) F_{339} 為 excitation 339 nm 時，細胞外存在 1 mM Ca^{2+} 時所測之值 F_{380} 為 excitation 380 nm 時，

細胞外存在 1 mM Ca^{2+} 時所測之值, s 為一常數, 即以 excitation 380 nm 偵測, 溶液中不含 fura-2 時的值/含鈣離子溶液中加入 Triton X-100 之值, 一般用 1 來代表, R 為 F_{339}/F_{380} 之比值, R_{\max} 為血小板以 Triton X-100 溶解後, 所測的螢光值, 然後再加入 10 mM EDTA 所測得之螢光值定為 R_{\min} (Cobbold et al., 1987)。

4. FITC 接合到 triflavin 的方法

參考 Sheu 等人的方法 (Sheu et al., 1992b), 將 triflavin (3.25 mg/ml) 溶解在 0.2 ml 的 sodium bicarbonate (0.1 M) 中; 另外, 將 FITC (1 mg) 溶在 DMSO (0.1 ml) 中, 取 20 μl 的 FITC 溶液加入至 triflavin 溶液內, 在室溫下反應 1 小時, 並不時地搖動, 而後再加入 20 μl 現調配好的 hydroxylamin (1.5 M; pH 8.0-8.5) 使反應 30 分鐘; 最後將 FITC-triflavin 的濃度調整為 1 mg/ml。

5. FITC-triflavin 與血小板上 glycoprotein IIb/IIIa complex 結合的測定

將抗凝血劑 sodium citrate 與健康志願者之全血以 1:9 (v/v) 的比例混合, 在室溫下, 立即以 1000 g 離心 10 分鐘, 取上層富含血小板血漿 (PRP), 取 0.9 ml 的 PRP 置入試管中, 分別加入不同濃度

xanthohumol (1.5 和 3 μ M)或 EDTA (5 mM)，再以 normal saline 將最後各管體積都調整為 1 ml，在 37 $^{\circ}$ C 下溫浴 3 分鐘後，避光加 FITC-triflavin (3.25 μ g/ml)反應 2 分鐘後以 flow cytometer (Beckman coulter, Epics XL)測定，且每次收集 10,000 個血小板分析。

6. 蛋白質磷酸化(protein phosphorylation)的測定

參照 Sheu 等人(2000)的方法(Sheu et al., 2000)，將人血與抗凝劑 A.C.D.以 9 : 1 (v/v)混合，在室溫下，立即以 1000 g 離心 10 分鐘，取上層富含血小板血漿(PRP)，加入 heparin (6.4 IU/ml)、EDTA (2 mM)混合後，於 37 $^{\circ}$ C 下溫浴 5 分鐘；再進一步用 2700 g 離心 8 分鐘，除去上層血漿，下層即為血小板顆粒(platelet pellet)，把 tyrode 溶液[NaCl (11.9 mM)、KCl (2.7 mM)、MgCl₂ (2.1 mM)、NaH₂PO₄ (0.4 mM)、NaHCO₃ (11.9 mM)、glucose (11.1 mM)、BSA (3.5 mg/ml)，pH 7.28]將血小板顆粒打散，使均勻分佈在 tyrode 溶液中。將血小板懸浮液在 37 $^{\circ}$ C 下溫浴時間依實驗設計而定先與 xanthohumol(1.5 和 3 μ M)反應，而後加入 PDBu (150 nM)或 collagen (1 μ g/ml)溫浴及反應時間依實驗設計而定。

將上述處理後之血小板細胞顆粒，以外加 protease inhibitor (10 μ l/ml aprotinin、10 μ l/ml leupeptin、1 mM PMSF、1 M NaF 及 0.5 M

Na₃VO₄)及 2 mM dithiothreitol (DTT)之 lysis buffer (50 mM HEPES、5 mM EDTA, 50 mM NaCl 及 1 % Triton X-100)將細胞溶破，靜置冰上 40 分鐘，隨後以 4°C 轉速 7000 r.p.m. 離心 5 分鐘，取上清液定量蛋白質。蛋白質定量時，先 2 mg/ml 之 albumin bovine (BSA)以 1 : 1 的體積比例與 0.2 N NaOH 充分混合，靜置 10 分鐘後。此時 BSA 的濃度為 1 mg/ml，再以二次水分別稀釋成濃度為 0.7 mg/ml、0.5 mg/ml、0.2 mg/ml、0.1 mg/ml，做為 standard。並取蛋白質樣品 5 µl 與二次水 45 µl 充分混合，以 1 : 1 的體積比例再與 0.2 N NaOH 混勻。靜置 10 分鐘後，連同標準品全數加入 Dye reagent concentrate (Bio-Rad)充分混合，再靜置 10 分鐘後，取 1 ml 至 cuvette 中，用 UV/VIS Spectrophotometer V530 以 595 nm 之波長來偵測樣品吸光值。所得之吸光值以線性迴歸方式換算成濃度。測定後，樣品分裝保存於-80°C 以備用。

7. 蛋白質磷酸化西方墨點法(Western Blot)

將實驗處理取得之已定量的細胞內蛋白質成份以 5 : 1 的體積比例加入 6X sample loading dye (350 mM Tris-base、30 % glycerol、350 mM SDS、175 µM bromophenol blue、600 mM DTT, pH 6.8)充分混勻後，100°C 加熱 10 分鐘，使蛋白質 denature 後，快速置於冰上至少 5 分

鐘，以免回溫過程中酵素影響蛋白質，最後在4°C下以轉速10,000 r.p.m. 離心5分鐘後備用。再以10 % polyacrylamide gel於running buffer (25 mM Tris-base、192 mM glycine、0.1 % SDS, pH 8.3)下，每行分析150-200 µg之蛋白質，並以80 V / 30 mA進行電泳分離3~4小時。隨後將膠片置於transfer buffer (1 M Tris-base、20 % methanol、150 mM glycine, pH 8.3)中，以20 V進行電泳轉漬30分鐘，使膠片上之蛋白質轉移至 polyvinylidene fluoride microporous membrane (PVDF ; Hybond-P)表面，隨後將轉漬膜浸潤於blocking buffer (5 % non-fat milk、10 mM Tris-base、100 mM NaCl、0.1 % Tween 20, pH 7.5)中，約1小時後，以TBST (10 mM Tris-base、100 mM NaCl、0.1 % Tween 20, pH 7.5)清洗轉漬膜三次，每次10分鐘，之後加入一級抗體(primary antibody)，如VASP、 α -tubulin、PKC(Taisuke O et al., 2003)、p38、ERK等，於室溫中搖晃作用2小時。再用TBST清洗轉漬膜三次，每次10分鐘，之後再加入標記有 horseradish peroxidase(HRP)的二級抗體(secondary antibody)，於室溫下反應1小時，再以TBST清洗轉漬膜三次，每次10分鐘。最後使用冷光反應劑Enhanced chemiluminescence (ECL)Western blotting detection reagent使底片感光，以用來偵測蛋白質含量的表現情形。最後將成像後的底片掃瞄輸入電腦，以影像分析軟體(Bio-1D version 99)做分析處理。

8. 血小板細胞內 Phospholipase C γ 2 磷酸化的測定

根據 Keely 與 Parise 等人的方法(Keely and Parise, 1996)，將血小板懸浮液在 37°C 溫浴，並以小磁棒每分鐘 1,000 轉的攪拌，1 分鐘後加入不同濃度 xanthohumol (1.5 和 3 μ M)反應三分鐘後再加入 collagen (1 μ g/ml)反應三分鐘；或是加入 collagen (1 μ g/ml)反應三分鐘；每一管之後都隨即加入 EDTA (10 mM)終止反應，最後經由離心機 Sigma-201 M 在 7,000 r.p.m.下離心 5 分鐘，除去上清液，保留下層沉澱的血小板細胞顆粒。將上述處理後的血小板細胞顆粒，利用「蛋白質磷酸化」及「西方點墨法」來測定。

9. 血小板細胞內MAPKs family磷酸化

根據 Ilaria Canobbio 等人(2004)的方法(Canobbio et al., 2004)，將血小板懸浮液在 37°C 溫浴，並以小磁棒每分鐘 1,000 轉的攪拌，1 分鐘後加入不同濃度 xanthohumol (1.5 和 3 μ M)反應三分鐘後再加入 collagen (1 μ g/ml)反應三分鐘；或是加入 collagen (1 μ g/ml)反應三分鐘；每一管之後都隨即加入 EDTA (10 mM)終止反應，最後經由離心機 Sigma-201 M 在 7,000 r.p.m.下離心 5 分鐘，除去上清液，保留下層沉澱的血小板細胞顆粒。將上述處理後的血小板細胞顆粒，利用「蛋

白質磷酸化」及「西方點墨法」來測定。

10. 血小板細胞內 Akt 蛋白磷酸化的測定

將血小板懸浮液在 37°C 溫浴，並以小磁棒每分鐘 1,000 轉的攪拌，1 分鐘後加入不同濃度 xanthohumol (1.5 和 3 μ M) 反應三分鐘後再加入 collagen (1 μ g/ml) 反應三分鐘；或是加入 collagen (1 μ g/ml) 反應三分鐘；每一管之後都隨即加入 EDTA (10 mM) 終止反應，最後經由離心機 Sigma-201 M 在 7,000 r.p.m. 下離心 5 分鐘，除去上清液，保留下層沉澱的血小板細胞顆粒。將上述處理後的血小板細胞顆粒，利用「蛋白質磷酸化」及「西方點墨法」來測定。

11. 血小板細胞內 vasodilator-stimulated phosphoprotein 的測定

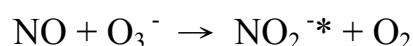
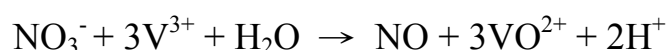
根據 O'Brien 和 Born 等人(O'Brien J, 1962; Born and Cross, 1963) 之混濁測定法，以 Lumi-aggregometer(Payton, Canda) 測之。根據 Barbara Coles 等人(2002) 的方法，將血小板懸浮液在 37°C 溫浴，並以小磁棒每分鐘 1,000 轉的攪拌，1 分鐘後加入 xanthohumol (3 μ M) 反應三分鐘後再加入 collagen (1 μ g/ml) 反應三分鐘；或是先加入 ODQ、SQ22536 應三分鐘後再加入 xanthohumol (3 μ M) 三分鐘後再加入

collagen (1 µg/ml) ，使用血小板凝集器觀察其凝集的情形。

12. 血小板細胞內 NO 的含量測定

根據 Fang 等人(1998)的方法(Fang et al., 1998)，將的不同濃度 xanthohumol (1.5 和 3 µM)與血小板懸浮液反應 3 分鐘後，立即煮沸 2 分鐘，再置入冰浴中冷卻 1 小時。之後以 14,000 r.p.m.離心 8 分鐘，取上清液 100 µl 加入兩倍體積的無水酒精，均勻搖盪攪拌，接著再冰浴 30 分鐘，再離心 14,000 r.p.m. 8 分鐘，取上清液待測，此目的為除去待測物中的蛋白質。取 10 µl 打入反應槽中，以 VCl₃ 當還原劑，將待測物中的 nitrate、nitrite 還原成 NO，利用氫氣將 NO 帶入一氧化氮分析儀(NO Chemiluminescence Analyzer, Model 280, Sievers Co. Ltd.) 中與臭氧反應，並偵測反應後釋出 600 nm 以上的螢光，並以 NaNO₃ 做 standard curve，藉此可推算待測物的濃度。

一氧化氮分析儀其原理是利用還原劑(VCl₃)將 nitrate 還原成 NO，再由 O₃ 與 NO 反應，即：



當氣體中有一氧化氮存在時，反應式會向右進行，而得到受激

發之 NO_2 ，由此受激發之 NO_2 可放出螢光光譜，而一氧化氮分析儀即偵測此種電流之變化。

13. 血小板細胞內自由基釋放反應的測定

根據 Iuliano 等人(1994)的方法(Iuliano et al., 1994)，本實驗以電子順磁共振儀(ESR)直接分析血小板受 collagen 刺激所釋放之 hydroxy radical (OH^\bullet)與 xanthohumol (1.5 和 3 μM)抑制血小板受 collagen 刺激所釋放之 hydroxy radical (OH^\bullet)。

本實驗以 DMPO 當作電子自旋捕捉劑，DMPO (100 mM)與 3×10^7 platelets/ml 混合，之後加入 xanthohumol (1.5 和 3 μM)。反應後的混合物移入 ESR 的扁平石英管(ER 161FCTM-S-Q)中，置於 Bruker EMX 電子自旋共振儀的 cavity 中測量。共振頻率是 9.76 GHz，其他參數如下: microwave power, 20 mW; modulation frequency, 100 kHz; modulation amplitude 1G; sweep width, 100 G; time constant, 163.84 ms; conversion time, 40.96 ms; sweep time, 41.943 s; receiver gain 2×10^4 ; number of data points, 1024. The inhibition rate of xanthohumol is defined by the following equation: inhibition rate = $1 - [\text{signal-height} (\beta\text{-estradiol} - \text{resting}) / \text{signal-height} (\text{collagen} - \text{resting})]$ 。

14. 研究 PKC、p38 MAPK、Akt 之間蛋白質磷酸化的關係

根據 Coles 等人(2002)的方法，將血小板懸浮液在 37°C 溫浴，並以小磁棒每分鐘 1,000 轉的速度攪拌，1 分鐘後加入不同濃度的 p38 抑制劑 SB203580 (10 μ M)、PKC 抑制劑 Ro318220 (2 μ M)以及 PI3K 抑制劑 Ly294002 (10 μ M)反應 3 分鐘後，再加入 collagen (1 μ g/ml)反應 3 分鐘；或加入 collagen (1 μ g/ml)反應 3 分鐘；之後每一管都隨即加入 EDTA (10 mM)終止反應，最後經由離心機 Sigma-201M 在 7,000 r.p.m.下離心 5 分鐘，除去上清液，保留下層沉澱的血小板細胞顆粒。將上述處理後之血小板細胞顆粒，利用「蛋白質磷酸化」及「西方點墨法」來測定。

2-3 數據分析

實驗數據皆以平均值 \pm 標準誤差(mean \pm S.E.M.)表示，控制組與xanthohumol組之間的比較以one-way ANOVA作統計分析。若 $P < 0.05$ 則表示有意義的差別。

三. 結果

1. Xanthohumol 對血小板凝集和 ATP 釋放反應的影響

在人類血小板懸浮液中，xanthohumol (0.5-10 μM)與人類血小板懸浮液溫浴三分鐘後，會隨著濃度的增加，能有效抑制 collagen (1 $\mu\text{g/ml}$)所引發的血小板凝集反應，其 IC_{50} 和 max concentration 分別是 1.5 和 3 μM ；xanthohumol 也會隨著濃度的增加，能有效抑制 arachidonic acid (60 μM)所引發的血小板凝集反應，其 IC_{50} 和 max concentration 分別是 3.5 和 5 μM ；但是 xanthohumol (0.5-10 μM)對於 U46619 (1 μM)、thrombin (0.05 U/ml)引起的血小板凝集則沒有抑制作用(Figure. 2 與 3)。Xanthohumol 對於 collagen (1 $\mu\text{g/ml}$)的抑制效用較強且對其所引發的 ATP 釋放反應也是呈現濃度相關的抑制作用(Figure. 4)。Xanthohumol (3 μM)與 platelet-rich plasma 溫浴三分鐘後，對於 collagen (1 $\mu\text{g/ml}$)所引發的血小板凝集反應不會有抑制作用，但加大 xanthohumol 濃度到 35-70 μM 後，對於 collagen (1 $\mu\text{g/ml}$)所引發的血小板凝集反應則會有抑制作用(Figure. 5)。

2. Xanthohumol 對血小板細胞內鈣離子濃度變化的改變

當血小板受到活化劑刺激後，可藉由鈣離子內流(influx)以及移動

(mobilization)而使細胞內鈣離子濃度增加。Collagen 是一種很強的血小板活化劑，即具有上述之作用進而增加血小板細胞內鈣離子的濃度。因此本實驗以 collagen (1 $\mu\text{g/ml}$)作為血小板活化劑，當 xanthohumol 以 1.5 和 3 μM 與預先經由 Fura 2-AM 處理的血小板懸浮液溫浴三分鐘後，再投以 collagen (1 $\mu\text{g/ml}$)刺激，均可發現細胞內鈣離子的增加濃度受到抑制(Figure. 6)，xanthohumol (1.5 和 3 μM)的抑制程度分別為 $50.82 \pm 9.51 \%$ 和 $66.49 \pm 9.64 \%$ (Figure. 7)。由此可知，xanthohumol 會抑制 collagen 所引起的血小板細胞內鈣離子濃度的增加。

3. Xanthohumol 對 FITC-triflavin 與血小板 glycoprotein IIb/IIIa complex 結合的影響

Triflavin 為日本屬龜殼花(*Trimeresurus flavoviridis*)的蛇毒原液中純化出來的蛋白，其結構中包含一段 RGD 序列，能與血小板上 glycoprotein IIb/IIIa complex 結合的(Sheu et al., 1992b)。將 triflavin 以 FITC 標定，使用 flow cytometer 測量 FITC-triflavin 發出的螢光強度來評估 xanthohumol 對 triflavin 結合到 glycoprotein IIb/IIIa complex 的影響，結果顯示為刺激的血小板所測得 FITC-triflavin 之螢光值為 26.84 ± 0.5 (Figure. 8A)；當加入 EDTA 徹底影響 glycoprotein IIb/IIIa

complex 構型後，所測得螢光值為 9.68 ± 0.51 (Figure. 8B)；分別加入不同濃度的 xanthohumol (1.5 和 3 μM) 所測得 FITC-triflavin 結合到 glycoprotein IIb/IIIa complex 之螢光值分別為 26.78 ± 0.58 與 27.96 ± 0.65 (Figure. 8C 與 D)，表示 xanthohumol 無法有意義的抑制或干擾 FITC-triflavin 與血小板上 glycoprotein IIb/IIIa complex 的結合，代表 xanthohumol 抑制血小板凝集的作用並非經由活化 glycoprotein IIb/IIIa complex。

4. Xanthohumol 對 PLC γ 2 磷酸化的影響

利用 western blotting 的技術，以及利用抗體認出 PLC γ 2 磷酸化的情形。由實驗結果顯示(Figure. 9)，在血小板未刺激的情況下只有少許 PLC γ 2 磷酸化的發生(lane 1)；若加入 collagen (1 $\mu\text{g/ml}$)可明顯地看到 PLC γ 2 磷酸化(lane 2)；若是分別加入 xanthohumol (1.5 和 3 μM)可觀察到 PLC γ 2 磷酸化明顯的受到抑制(lane 3 與 4)，且呈現與濃度相關的抑制情形。

5. Xanthohumol 對 47 kDa 蛋白質磷酸化(47 kDa protein phosphorylation)的影響

當 protein kinase C(PKC)被活化後，能使其受質(47 kDa protein)

磷酸化，本實驗即利用 Western blot 來測定 xanthohumol 對 47 kDa protein phosphorylation 抑制的情形。由 Figure. 10 可知，未活化的血小板明顯可見在 47 kDa 的位置只有微量的蛋白質磷酸化發生(lane 1)；若以 collagen (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)當作刺激劑活化 PKC，明顯可見在 47 kDa 的位置上有蛋白質磷酸化的情形(lane 2)；當投與 xanthohumol (1.5 和 3 μM)與血小板懸浮液溫浴三分鐘後，再加入 collagen (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)刺激劑，可發現 47 kDa protein phosphorylation 明顯的受到抑制(lane 3 和 4)，且呈現與濃度相關的抑制情形。

6. Xanthohumol 對 protein kinase C 活化劑(PDBu)所引起的 47 kDa 蛋白質磷酸化與血小板凝集反應的影響

PDBu是protein kinase C的活化劑，亦可引起血小板凝集反應(Kraft and Anderson, 1983; Niedel et al., 1983; Siess and Lapetina, 1989)。本實驗中，預先在人類血小板懸浮液中加入xanthohumol (1.5 和 3 μM)溫浴三分鐘，再給予PDBu (150 nM)作為刺激，藉此觀察 xanthohumol是否會抑制PDBu誘發的凝集反應。結果由Figure. 11表示，在未活化的血小板懸浮液中，在47 kDa的位置只有微量的蛋白質磷酸化發生(lane 1)；若以PDBu (150 nM)當作刺激劑活化PKC，明顯可見在47 kDa的位置上有蛋白質磷酸化的情形(lane 2)；若投與

xanthohumol (1.5和3 μM)與血小板懸浮液溫浴三分鐘後，再加入PDBu (150 nM)刺激劑，可發現47 kDa protein phosphorylation不會受到抑制 (lane 3和4)。另外利用PDBu (150 nM)為刺激劑所誘發的血小板凝集反應的結果發現，xanthohumol無法抑制PDBu所誘發的血小板凝集反應，結果由Figure. 12表示，同時也驗證了Figure. 11的結果。

7. Xanthohumol 對 MAPKs family 磷酸化的影響

Mitogen-activated protein kinases(MAPKs)為細胞對外界刺激反應作用後之重要訊息介質，在體內訊息傳遞中扮演相當重要的角色。Collagen 可以引起 mitogen-activated protein kinases(MAPKs)的活化 (Borsch-Haubold et al., 1995)，血小板內的 MAPKs 包括 p38 MAPK、the extracellular signal-regulated kinase(ERKs)與 Jun N-terminal kinase (JNK)(Papkoff et al., 1994; Nadal et al., 1997; Bugaud et al., 1999)。本實驗以西方墨點法(western blotting)的技術，以及利用抗體認出 p38 MAPK、ERKs 和 JNK 的位置來評估 MAPKs family 磷酸化的情形。由 Figure. 13 顯示實驗結果，在血小板未刺激的情況下只有少許 p38 MAPK 磷酸化的發生(lane 1)；若加入 collagen (1 $\mu\text{g/ml}$)可明顯地看到 p38 MAPK 磷酸化(lane 2)；若是分別加入 xanthohumol (1.5 和 3 μM)溫浴三分鐘後再加入 collagen (1 $\mu\text{g/ml}$)，可發現 p38 MAPK 磷酸化明

顯的受到抑制(lane 3 與 4)。由 Figure. 14 顯示，在血小板未刺激的情況下只有少許 ERKs 磷酸化的發生(lane 1)；若加入 collagen (1 $\mu\text{g/ml}$) 可明顯地看 ERKs 磷酸化(lane 2)；若是分別加入 xanthohumol (1.5 和 3 μM)之後用 collagen (1 $\mu\text{g/ml}$)作刺激，可觀察到 ERKs 磷酸化明顯的受到抑制(lane 3 與 4)。由 Figure. 15 顯示，在血小板未刺激的情況下只有少許 JNK 磷酸化的發生(lane 1)；若加入 collagen (1 $\mu\text{g/ml}$)可明顯地看 JNK 磷酸化(lane 2)；若是分別加入 xanthohumol (1.5 和 3 μM)之後用 collagen (1 $\mu\text{g/ml}$)作刺激，可觀察到 JNK 磷酸化明顯的受到抑制(lane 3 與 4)，且呈現與濃度相關的抑制情形。

8. Xanthohumol 對 Akt 磷酸化的影響

利用 western blotting 的技術，以及利用抗體認出 Akt 磷酸化的情形。由實驗結果顯示(Figure. 16)，在血小板未刺激的情況下只有少許 Akt 磷酸化的發生(lane 1)；若加入 collagen (1 $\mu\text{g/ml}$)可明顯地看到 Akt 磷酸化(lane 2)；若是分別加入 xanthohumol (1.5 和 3 μM)可觀察到 Akt 磷酸化明顯的受到抑制(lane 3 與 4)，且呈現與濃度相關的抑制情形。

9. Xanthohumol 對血小板細胞內 vasodilator-stimulated phosphoprotein 的影響

VASP(vasodilator-stimulated phosphoprotein)是一種具有調節性抑制血小板活化作用的內生性蛋白質，它主要的功能是防止過度的凝集反應發生，一些強力的血小板活化劑或是 NO donor 都會造成 VASP 的活化，例如 thrombin 與 nitroglycerin(NTG)。而 VASP 的磷酸化在血小板中主要受到 cGMP 跟 cAMP 的調控，也就是當血小板細胞內 cGMP 或 cAMP 的濃度增加時，會促使 VASP 磷酸化，進而對過度的血小板凝集反應產生抑制作用(Li et al., 2003)。根據 O'Brien 和 Born 等人(O'Brien J, 1962; Born and Cross, 1963)之混濁測定法，以 Lumi-aggregometer (Payton, Canda)測量。由結果發現，血小板懸浮液與 xanthohumol (3 μ M)溫浴三分鐘後用 collagen (1 μ g/ml)作刺激，血小板的凝集會受到抑制；若預先與 guanylate cyclase 抑制劑 ODQ (40 μ M) 和 adenylate cyclase 抑制劑 SQ22536 (200 μ M) 溫浴三分鐘，再加入 xanthohumol (3 μ M)溫浴三分鐘後用 collagen (1 μ g/ml)作刺激，則血小板的凝集反應沒有恢復(Figure. 17)。代表 xanthohumol 抑制血小板凝集的機轉不經由 cGMP 和 cAMP 引起的 VASP 路徑。

10. Xanthohumol 對血小板細胞釋放 NO 的影響

當血小板受到一些活化劑刺激後，會引起 NO 的釋放，繼而活化了 guanylate cyclase 來調控血小板的功能，collagen 可藉由活化細

胞內的 NOS 而引起 NO 釋放之增加(Radomski et al., 1990b; Radomski et al., 1990a; Radomski et al., 1991; Chiang et al., 2001)。由結果(Table. 1)可知, collagen (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)作用於血小板後,可使 NO 的含量由 $0.5 \pm 0.1 \mu\text{M}$ 有意義地增加到 $2.5 \pm 0.6 \mu\text{M}$; 而當我們加入不同濃度的 xanthohumol (1.5 和 3 μM)與血小板懸浮液反應三分鐘,發現 NO 的含量沒有增加,分別為 0.6 ± 0.02 及 $0.9 \pm 0.2 \mu\text{M}$, 代表 xanthohumol 不會刺激血小板細胞產生 NO。

11. Xanthohumol 對血小板細胞內自由基釋放反應的影響

研究指 xanthohumol 具有抑制發炎和血小板活化反應的作用,而發炎反應與血小板活化的過程都與自由基的產生有相當大的關聯,意味著抑制自由基的產生似乎可影響血小板的活化。本實驗就以電子順磁共振儀(electron spin resonance, ESR)直接分析血小板受 collagen 刺激活化後所釋放之 hydroxy radical (OH^\bullet)是否會被 xanthohumol 抑制。由 Figure. 18 可知, resting 狀態下並沒有 hydroxy radical 產生(Figure. 18A); 血小板受到 collagen (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)刺激之後,會釋放出 hydroxy radical(Figure. 18B)。若預先分別加入 xanthohumol (1.5 和 3 μM)反應三分鐘,再以 collagen (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)刺激血小板,可觀察到 hydroxy radical 的產生明顯地被 xanthohumol 抑制(Figure. 18C 與 D)。由結果發現

xanthohumol 具有自由基清除的抗氧化功效。

12. Collagen 引起 p38、PKC、Akt 蛋白活化的訊息路徑

我們已知當血小板活化時，分別會去活化 p38、PKC、Akt 這三個蛋白的表現量，我們想了解這三者之間的訊息路徑關係，測量方法如”實驗材料與方法”中提及。由 Figure. 19 可知，預先與 PKC 抑制劑 Ro318220 (10 μ M) 溫浴三分鐘，再用 collagen (1 μ g/ml) 作刺激，PKC 的蛋白表現量和單純使用 collagen 刺激的情況下相比會大量減少，預先與 p38 抑制劑 SB203580 (2 μ M) 與 Akt 抑制劑 Ly294002 (10 μ M) 溫浴三分鐘，再用 collagen (1 μ g/ml) 作刺激，PKC 的蛋白表現量和單純使用 collagen 刺激的情況下相比沒有大太差異；由 Figure. 20 可知，預先與 PKC 抑制劑 Ro318220 (10 μ M) 溫浴三分鐘，再用 collagen (1 μ g/ml) 作刺激，p38 的蛋白表現量和單純使用 collagen 刺激的情況下相比沒有大太差異，預先與 p38 抑制劑 SB203580 (2 μ M) 與 Akt 抑制劑 Ly294002 (10 μ M) 溫浴三分鐘，再用 collagen (1 μ g/ml) 作刺激，p38 的蛋白表現量和單純使用 collagen 刺激的情況下相比則會有意義的減少；由 Figure. 21 可知，預先與 PKC 抑制劑 Ro318220 (10 μ M) 溫浴三分鐘，再用 collagen (1 μ g/ml) 作刺激，Akt 的蛋白表現量和單純使用 collagen 刺激的情況下相比沒有大太差異，預先與 p38 抑制劑

SB203580 (2 μ M)與 Akt 抑制劑 Ly294002 (10 μ M)溫浴三分鐘，再用 collagen (1 μ g/ml)作刺激，Akt 的蛋白表現量和單純使用 collagen 刺激的情況下相比會有意義的降低。



四. 討論及未來展望

Xanthohumol 大量存在啤酒花(*Humulus lupulus*)植物中，並且獨特地只存在啤酒花當中，xanthohumol 是啤酒花當中含量最多的異戊二烯類黃酮(prenylflavonoid)化合物，占乾燥重量的 0.1-1%。因此，啤酒是人類攝取 xanthohumol 及其相關化合物的主要來源。由富含類黃酮的啤酒花其生化特性推測啤酒花萃取物可以有效應用在癌症和停經後婦女的熱潮紅和骨質疏鬆，有研究指出在啤酒製程中提高 xanthohumol 的含量可能可應用在醫藥方面的療效。(Stevens and Page, 2004)。

2003 根據美國 USDA (US Department of Agriculture, Economic Research Service) 的統計，平均每個成年人每天會飲用 225 mL 的啤酒，等同吸收了 0.14 mg 的異戊二烯類黃酮(prenylflavonoid)，雖然在啤酒花天然生藥中含量最多的異戊二烯類黃酮成分是 xanthohumol，但在啤酒製程中的熱處理會將有抗氧化能力的 xanthohumol 結構轉成沒有抗氧化能力 isoxanthohumol (Stevens et al., 1999a; Miranda et al., 2000)，因此嘗試提高啤酒中的 xanthohumol 含量或是飲用以低溫膜過濾技術製成的生啤酒(draft beer)會比高溫殺菌製成的熟啤酒(beer)獲得較多的 xanthohumol。

自由基會啟始多元不飽和脂肪酸、蛋白質與核酸的衍生作用(modification)，這和動脈硬化、癌症形成和神經退化疾病的早期發展有相關性(Evans and Halliwell, 1999)。啤酒內含有的抗氧化物質有許多種，比起225 ml含有0.14 mg的異戊二烯類黃酮(prenylflavonoid)，啤酒中含有的多酚類(polyphenols)抗氧化物質含量更多，有42 mg之多(Vinson et al., 2003)，從總量看起來似乎啤酒具有抗氧化能力是多酚類(polyphenols)的貢獻較高，然而異戊二烯類黃酮(prenylflavonoid)的結構比多酚類(polyphenols)有更大親脂性，因此雖然含量較少，可是在細胞膜表面與低密度脂蛋白上可能會是更有效的抗氧化劑(Stevens et al., 2003)。

以不同刺激劑誘發HL-60人類前骨髓細胞(human promyelocytic leukemia cells)產生superoxide anion自由基，發現xanthohmol抑制的 IC_{50} 是2.6 μM ，而isoxanthohumol並沒有抑制自由基的作用(Gerhauser et al., 2002)，在本實驗中xanthohmol抑制血小板凝集的 IC_{50} 是1.5 μM ，Max concentration是3 μM ，都可以抑制collagen刺激下所釋放之hydroxy radical (OH^{\cdot})，證實xanthohmol確實有抗氧化的能力。有鑑於適度飲酒有助心血管疾病的預防，啤酒花成分中的xanthohmol有抗氧化的能力，但在血小板細胞中的研究與機轉上未明確，因此本實驗想進一步探討xanthohmol是否有抑制血小板凝集的作用。

結果顯示xanthohmol (0.5-10 μM)可有效抑制由collagen (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)及arachidonic acid (60 μM)引起的血小板凝集，但此濃度範圍內對於U46619 (1 μM)、thrombin (0.05 U/ml)引起的血小板凝集則沒有抑制反應。此外，xanthohmol也明顯抑制collagen (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)引起的ATP釋放反應。由此可知，xanthohmol確實可抑制血小板的活性。接著便進一步探討抑制凝集的機轉，使用collagen當刺激劑，因為1.5-3 μM 的xanthohmol便可明顯的抑制collagen引起的血小板凝集。而且在人體血液中，血管受傷時釋放出來的細胞外基質也是以collagen最多，血管壁另外還釋放了fibronectin和laminin等adhesion proteins，使血管中流動的血小板吸附到受傷的血管壁上，然後在藉collagen活化血小板，活化的血小板會接著釋放 TxA_2 、ADP與serotonin等物質(Dorsam et al., 2002)，造成血小板活化的放大反應，吸引了更多血小板的活化和聚集，而達到止血與修補傷口的功能。

血小板受到活化劑的刺激而造成凝集的過程中，會發生血小板形狀改變(shape change)、細胞骨架重新排列(cytoskeleton rearrangement)以及 granules 分泌作用，這些現象與細胞內蛋白質的磷酸化有很大關連，位在細胞膜下方的 protein kinase C(PKC)及其下游的受質 p47 protein 磷酸化亦有參與(Siess, 1989)。我們想了解 xanthohmol 抑制collagen 引起的血小板凝集反應是否經由 PKC pathway。PDBu 是一

種 PKC 的活化劑，可直接作用在 PKC 的 regulatory site，活化 PKC 後又可繼續活化其下游的受質 p47 protein(Nishizuka, 1984)，於是我們使用 PDBu 當作活化劑，觀察血小板凝集的反應以及 p47 蛋白磷酸化的情形。由 figure. 12 得知，xanthohumol (1.5-3 μ M)不會抑制 150 nM PDBu 引起的血小板凝集，由 Figure. 11 得知，xanthohumol (1.5-3 μ M)不會抑制 150 nM PDBu 引起的 p47 蛋白磷酸化表現，但可以抑制 collagen (1 μ g/mL)引起 p47 蛋白磷酸化表現(Figure. 10)，代表 xanthohumol 不會直接作用在細胞膜上而是藉由其他訊息活化 PKC 及其下游受質 p47 protein。

PLC γ 的活化會使細胞膜上的 PIP₂ 水解成 IP₃ 和 DAG，被認為是參與血小板活化後最初和最重要的路徑，PLC γ 活化後產生的 IP₃ 會使血小板細胞內鈣離子的移動顯著地增加(Berridge, 1983)，DAG 則會促使 PKC 活化接著 p47 protein 蛋白質磷酸化，由 Figure. 9 得知，xanthohumol (1.5-3 μ M)可以抑制 collagen (1 μ g/mL)引起 PLC γ 2 蛋白質磷酸化表現。

有研究指出，血小板受到 collagen 活化的過程當中會促使 hydroxy radical(OH[•]) 自由基的產生，接著會刺激並活化 PLA₂ 與 COX，目的是放大血小板活化反應(Pignatelli et al., 1998)，由於 xanthohmol (2.6 μ M) 抗氧化與抑制自由基的作用(Gerhauser et al., 2002)，於是我們便想觀

察 xanthohmol (1.5-3 μM) 是否可以抑制 collagen (1 $\mu\text{g/ml}$)造成血小板活化過程中產生的 hydroxy radical (OH^\bullet) 自由基。由實驗結果(Figure. 18)發現 xanthohmol (1.5-3 μM)可有效抑制 hydroxy radical(OH^\bullet) 自由基的產生，雖然機轉不明確，但猜測 xanthohmol 清除自由基的作用可能經由 phospholipase A₂-cyclooxygenase pathway，抑制了 TxA₂ 的合成，進而抑制血小板凝集。這樣的猜測也在 xanthohmol 可以抑制 arachidonic acid (60 μM)誘發的血小板凝集反應中得到驗證，IC₅₀ 和 max concentration 為 3.5 和 5 μM 。當血小板受到活化劑的刺激後，會活化 PLA₂，並且將細胞膜上的磷脂質水解成 arachidonic acid，接著藉由 cyclooxygenase 將 arachidonic acid 環化成 PGG₂/PGH₂，再經由 thromboxane synthetase 的作用形成 TxA₂，TxA₂ 釋放到細胞膜外與血小板膜上的 thromboxane receptor 結合，再造成其他路徑的活化，放大了血小板的凝集反應(Puri, 1998)。由 xanthohmol 能夠有意義的抑制抑制 arachidonic acid 誘發的血小板凝集反應可知，xanthohmol 可能透過 PLA₂ 與 COX 路徑，抑制 TxA₂ 形成，達到抗氧化與抑制血小板凝集的作用。

eNOS 已被研究存在於血小板之中，並且是 Ca²⁺-dependent 的活化路徑，當血小板活化後細胞內鈣離子大量且快速的增加，活化了 eNOS 接著產生 NO，NO 的作用在回饋抑制血小板的凝集反應

(Radomski et al., 1990a; Radomski et al., 1990b)。NO 是體內血小板活化的負向調控因子，在血小板活化的同時產生，可避免血小板的過度活化，所以 NO 是一個心血管疾病的保護因子。在 Table.1 當中，溫浴 collagen (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的血小板，可使血小板凝集而且 NO 的含量有意義地增加；而當我們溫浴 xanthohumol (1.5 和 3 μM)，發現 NO 的含量沒有增加，代表 xanthohumol 不會刺激血小板細胞產生 NO，也就是 xanthohumol 不會經由 eNOS 路徑抑制血小板的凝集。值得一提的是，有研究指出在其他的細胞中 xanthohumol 可有效抑制 iNOS 所產生的 NO，而達到抗發炎的作用，而其中可能還牽涉了許多訊息路徑調控發炎訊息(Zhao et al., 2003; Cho et al., 2008)。

有研究指出，p38 MAPK 與 ERK 也會透過 phospholipase A_2 -cyclooxygenase pathway 活化血小板(Borsch-Haubold et al., 1997)。p38MAPK 與 ERK 皆屬於 MAPKs familys。血小板中有表現的 MAPKs 包含 p38 MAPK、ERK 以及 JNK，由 collagen 刺激而產生 (Borsch-Haubold et al., 1995)。血小板中 ERK 的表現會受 collagen、TxA₂ 與 vWF 的刺激所產生(Papkoff et al., 1994; Borsch-Haubold et al., 1995; Borsch-Haubold et al.,1997)。在 collagen 低濃度(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)以下，本實驗中使用的 collagen 為(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)，ERK 的活化主要是經由 collagen receptors(GPVI 與 $\alpha 2\beta 1$) 與 Gq-coupled TxA₂ 的參與

(Borsch-Haubold et al., 1997)。並透過 PLA₂-AA-TxA₂ 路徑去活化 COX pathway 然後促進血小板活化。本實驗中 xanthohumol (1.5 和 3 μM) 可以抑制 collagen 所誘發的 p38 MAPK 磷酸化，也可以抑制其他 MAPKs family：ERK 和 JNK 的磷酸化，同時在這個濃度下也可以抑制血小板活化過程中產生的自由基。由以上結果可知，xanthohumol 可能經由抑制 p38 MAPK 的活性來調控 cytosolic phospholipase A₂ (PLA₂)，當 PLA₂ 活性降低時會減少 TxA₂ 的生成，進而影響血小板凝集反應。

除了 PLA₂ pathway 和 PLC pathway 這兩條路徑外，cAMP 和 cGMP 在血小板中也扮演著很重要的負向調控角色，cAMP 和 cGMP 的生成分別受到 adenylyl cyclase 和 guanylylase 的調控，cAMP 和 cGMP 的分解則會受到不同型的 phosphodiesterases(PDEs)調控，cAMP 和 cGMP 平時在細胞中維持正常的含量，但當 cAMP 或 cGMP 含量增加時會活化 cAMP-dependent protein kinase(CAK)或 cGMP-dependent protein kinase(CGK)，CAK 和 CGK 都可將 vasodilator-stimulated phosphoprotein(VASP)磷酸化(Butt et al., 1994)。VASP 是一種具抑制血小板活化作用的蛋白質，功能是防止過度的凝集反應發生，當 VASP 結構中的 Ser¹⁵⁷、Ser²³⁹ 與 Thr²⁷⁸ 的位置皆可被 CAK 和 CGK 磷酸化而活化。活化後的 VASP 可和血小板細胞中的一些纖維蛋白作用以達到

抑制血小板過度活化之目的(Reinhard et al., 1992)。在實驗中使用 ODQ(GC inhibitor)與 SQ22536(AC inhibitor)去看抑制了抑制血小板過度活化的 VASP 路徑，是否發生逆轉現象而恢復血小板的凝集反應，由 Figure. 16 中可知，xanthohumol 無法逆轉使用 ODQ 與 SQ22536 後的血小板抑制凝集反應，所以 xanthohumol 抑制血小板凝集反應沒有經過 cAMP 和 cGMP 的路徑。此現象與 xanthohumol (1.5 和 3 μ M) 不會產生 NO(Table. 1)相符合，因為 xanthohumol 不會經由 eNOS 產生 NO，也就不會活化 guanyl cyclase 和造成 cGMP 含量的增加。

由 Figure. 19 中，預先與 p38 抑制劑 SB203580 (2 μ M)與 Akt 抑制劑 Ly294002 (10 μ M)溫浴三分鐘，再用 collagen (1 μ g/ml)作刺激，PKC 的蛋白表現量和單純使用 collagen 刺激的情況下相比沒有太大差異，代表 p38 與 Akt 可能在 PKC 的下游或與 PKC 無關，所以使用 p38 抑制劑與 Akt 抑制劑並不會影響 PKC 的蛋白表現。由 Figure. 20 中，PKC 抑制劑 Ro318220 (10 μ M)不會影響 p38 的蛋白表現量，代表 PKC 與 p38 沒有直接關係，而 Figure. 21 中，PKC 抑制劑 Ro318220 (10 μ M)不會影響 Akt 的蛋白表現量，代表 PKC 與 Akt 沒有直接關係。由 Figure. 20 與 21 當中可知 p38 與 Akt 會互相影響蛋白磷酸化，這代表著血小板活化過程中的訊息路徑有 cross-link 的關係。

在血小板受到刺激的過程中，細胞內鈣離子的移動和濃度的增加

是血小板活化的關鍵步驟。當細胞內鈣離子濃度增加會誘發一連串活化反應(Quinton et al., 2002a; Quinton et al., 2002b)。鈣離子也會促使 Ca^{2+} -calmodulin dependent myosin light chain 磷酸化、肌動蛋白聚合化 (actin polymerization) 及纖維絲重新組織 (filament reorganization)，而造成 granule 釋放(Nishikawa et al., 1980; Brass and Joseph, 1985)，進一步導致血小板活化。由實驗結果顯示(Figure. 6 與 7)，xanthohumol 有效的抑制 collagen 引起的細胞內鈣離子移動和濃度的增加。而血小板活化的最終步驟就是 glycoprotein IIb/IIIa 受體的活化，也就是藥物只要能阻斷這個受體，像 triflavin 就有這個作用，就能抑制血小板的凝集 (Sheu et al., 1992b)。因為血小板之間的凝集是以 fibrinogen 為中間橋樑，fibrinogen 是一個二聚物(dimer)，具有 RGD(Arg-Gly-Asp)序列，它就是利用這個 RGD 序列結合到活化的 glycoprotein IIb/IIIa 受體，然後將血小板連結在一起(Sheu et al., 1992a)。實驗結果顯示(Figure. 8)，xanthohumol 無法與 triflavin 競爭 glycoprotein IIb/IIIa 受體，這意味著 xanthohumol 抑制血小板凝集的作用並不是透過 fibrinogen 與 glycoprotein IIb/IIIa 受體的結合，而是經由血小板細胞內一連串的訊息活化路徑造成凝集。

由本實驗結果可證實，在 *in vitro* 環境中 xanthohumol 具有抑制血小板活性的作用。因此在未來的實驗中，還可以運用 xanthohumol 的

這些作用，例如利用 fluorescein sodium 誘導腸繫膜之靜脈栓塞，以及探討 xanthohumol 對中腦動脈阻塞/再灌流(MCA occlusion/reperfusion) 所誘發腦中風的影響等相關實驗。



五. 結論

綜合本研究實驗結果，啤酒花(*Humulus lupulus*)成分中的 xanthohumol 抑制血小板凝集反應的作用主要涉及下列路徑：

- (一) xanthohumol 抑制 PLC γ 2 pathway 與 protein kinase C 的活化以及 47 kDa protein 磷酸化反應；xanthohumol 抑制 mitogen-activated protein kinases pathway 包含 p38 MAPK、ERK、JNK 的磷酸化；xanthohumol 抑制 Akt 的磷酸化反應。
- (二) xanthohumol 可有效抑制血小板活化時產生的 hydroxyl radical。
- (三) 綜合以上的作用，xanthohumol 最終抑制了血小板細胞內鈣離子的移動和濃度的增加，阻斷由鈣離子引起的一連串訊息傳遞反應和最終的血小板凝集反應。

Table 1. Effect of xanthohumol and collagen on nitrate formation in washed human platelets

	Concentration	Nitrate (μM)
resting		0.5 ± 0.1
collagen	$1 \mu\text{g/ml}$	2.5 ± 0.6 **
xanthohumol	$1.5 \mu\text{M}$	0.6 ± 0.02
	$3 \mu\text{M}$	0.9 ± 0.2

Washed human platelets suspensions ($3.5 \times 10^8/\text{ml}$) were preincubated with xanthohumol (1.5 and $3 \mu\text{M}$) for 3 min at 37°C . Addition of collagen ($1 \mu\text{g/ml}$) to platelet suspensions served as positive control. Data are presented as the means \pm S.E.M ($n=4$). ** $P < 0.01$ as compared with the resting group.

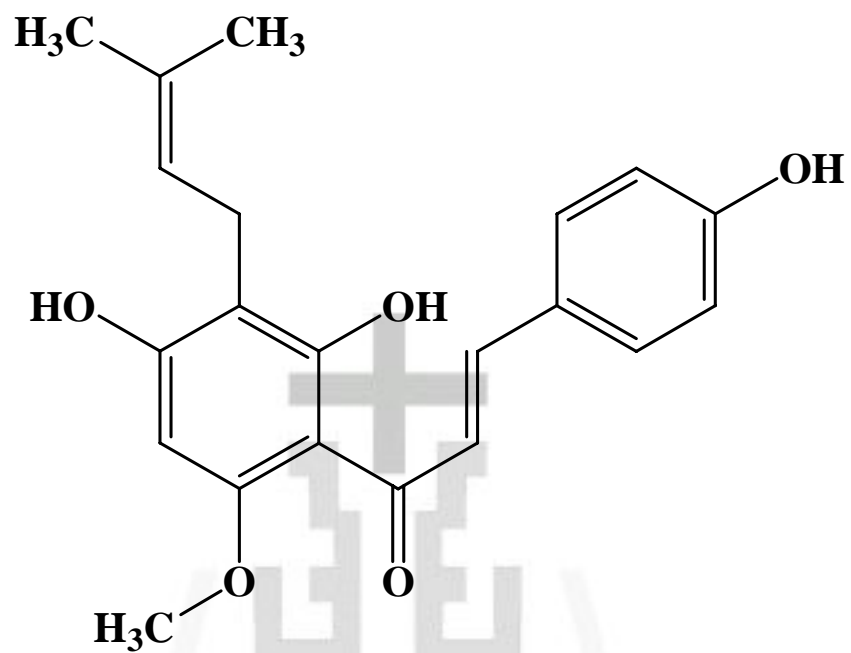


Figure 1. Chemical structure of xanthohumol (C₂₁H₂₂O₅, MW.354.40).

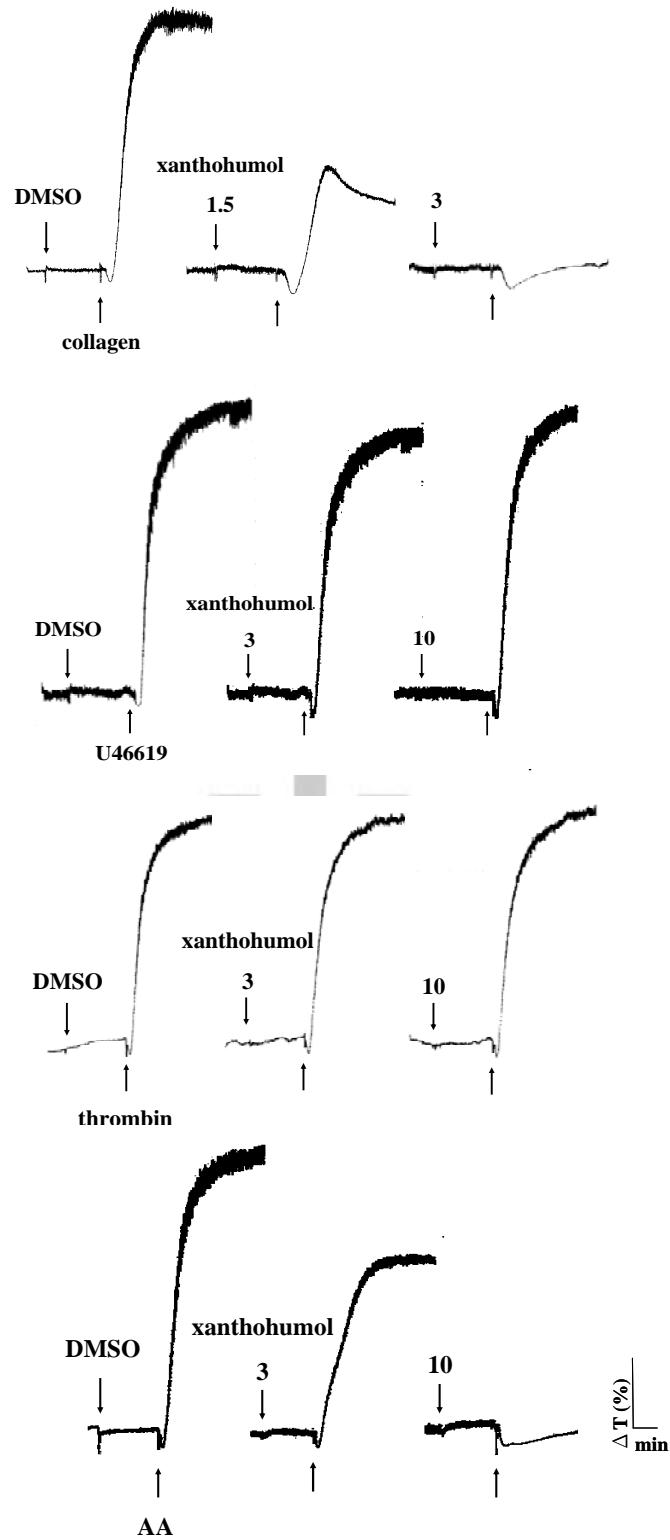


Figure 2. Effect of xanthohumol on various agonists-induced platelet aggregation in washed platelets. Platelets were preincubated with various concentrations of xanthohumol (1.5-10 μM) and stirred for 3 min, then collagen (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), U46619 (1 μM), thrombin (0.05 IU/ml), or AA (60 μM) to trigger platelet aggregation. Data are presented as percent inhibition of the control (means \pm S.E.M., $n=4$).

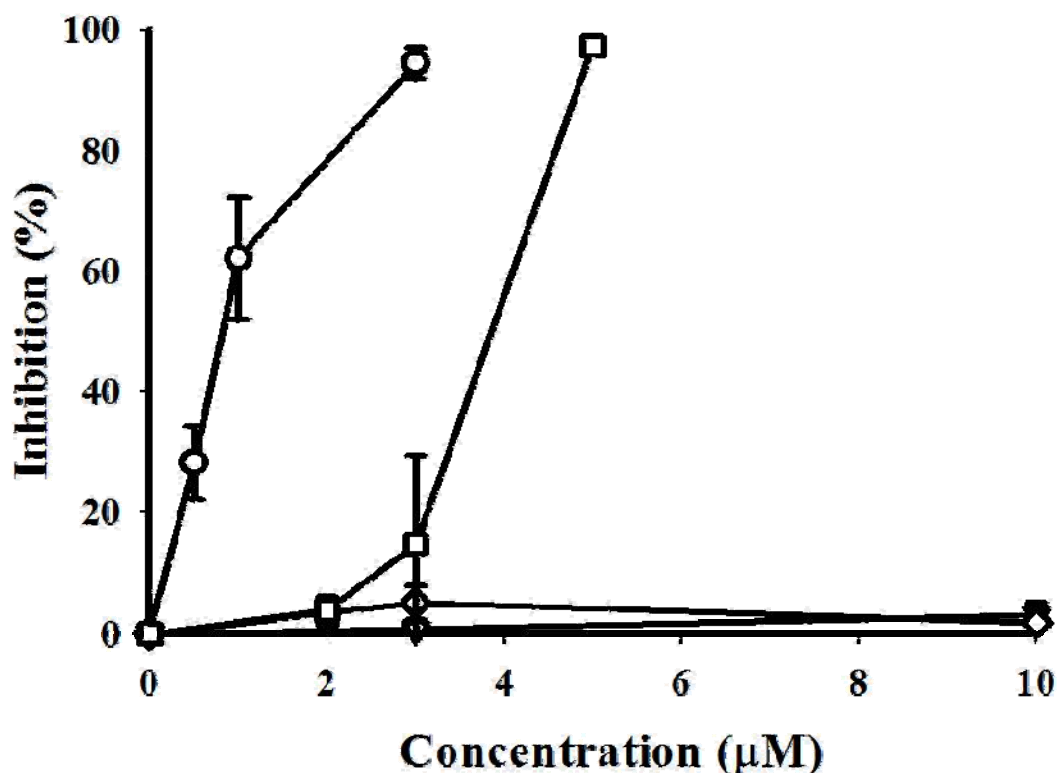


Figure 3. Concentration-inhibition curves of xanthohumol on collagen (1 µg/ml, ○)-, U46619 (1 µM, ▽)-, thrombin (0.05 U/ml, ◇)-, arachidonic acid (60 µM, □)-induced platelet aggregation in human platelet suspensions. Human platelet suspensions were preincubated with various concentrations of xanthohumol (0.5-10 µM) at 37°C for 3 min, and agonists were then added to trigger platelet aggregation. Data are presented as percent inhibition of the control (means ± S.E.M., *n* = 6).

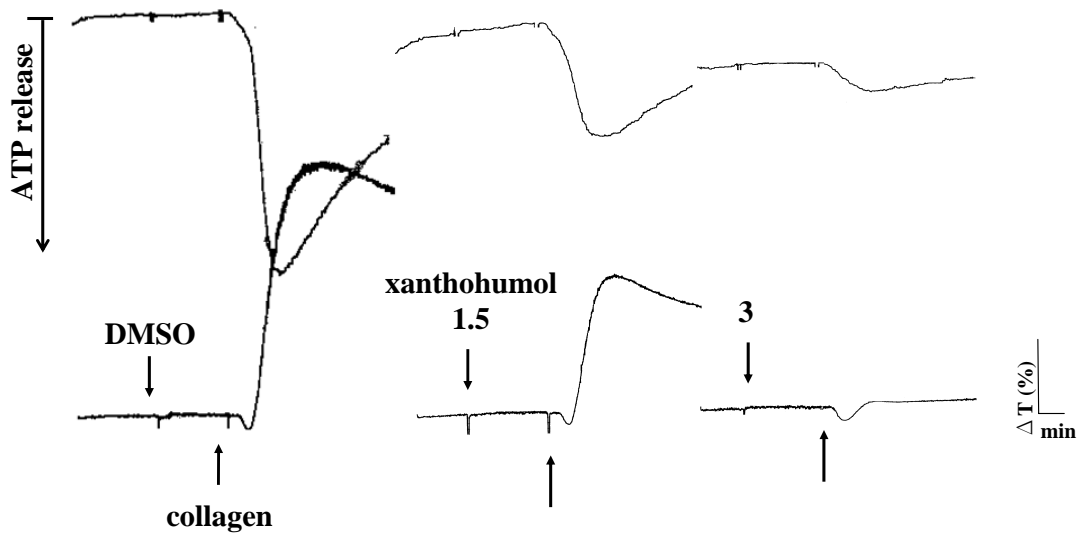


Figure 4. Effects of xanthohumol on collagen-induced aggregation in human platelet suspensions. Platelets were preincubated with xanthohumol (1.5 and 3 μM) and stirred for 3 min, then collagen (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was added to trigger platelet aggregation (lower tracing) and ATP release (upper tracing). Luciferin-luciferase (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was added 1 min before the agonist in order to measure the ATP release reaction. The profiles are representative examples of four similar experiments.

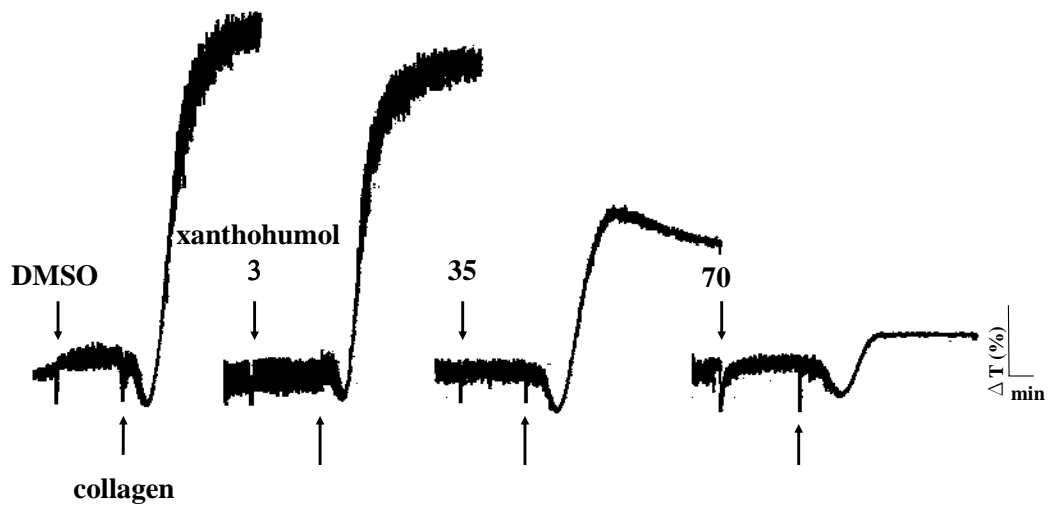


Figure 5. Effects of xanthohumol on collagen-induced aggregation in human platelet-rich plasma. Platelets were preincubated with xanthohumol (3, 35 and 70 μM) and stirred for 3 min, and then collagen (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was added to trigger platelet aggregation. The profiles are representative examples of four similar experiments.

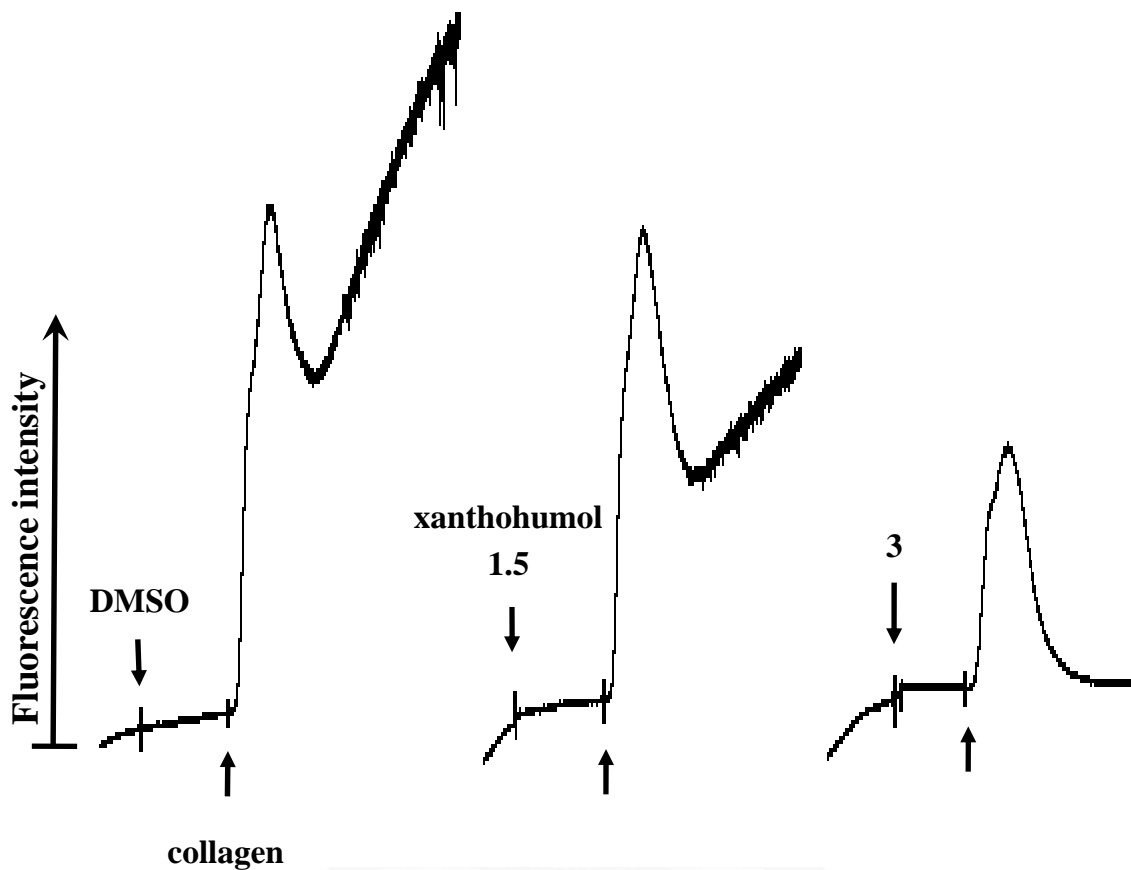


Figure 6. Effect of xanthohumol on collagen-induced intracellular Ca^{2+} mobilization of Fura 2-AM loaded human platelets. Platelet suspensions were incubated with Fura 2-AM ($5 \mu\text{M}$) at 37°C for 60 min, followed by the addition of collagen ($1 \mu\text{g/ml}$) in the absence or presence of xanthohumol (1.5 and $3 \mu\text{M}$), which was added 3 min prior to the addition of collagen. The profiles are representative examples of three similar experiments.

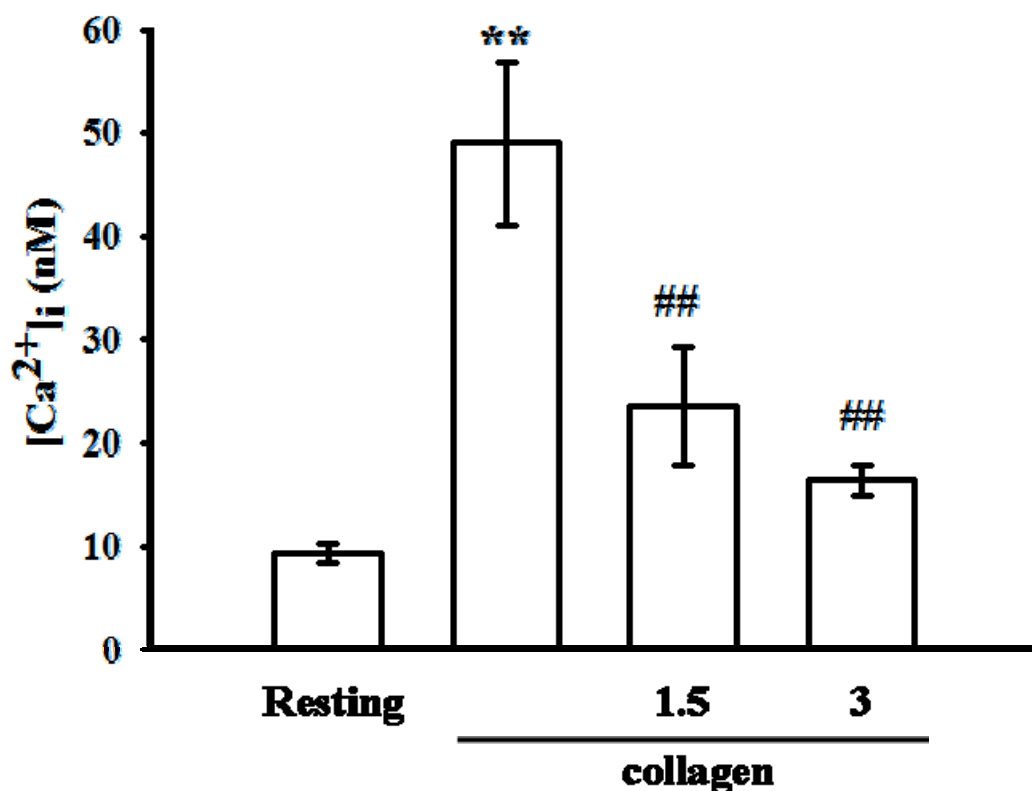


Figure 7. Effect of xanthohumol on collagen-induced intracellular Ca²⁺ mobilization of Fura 2-AM loaded human platelets. Platelet suspensions were incubated with Fura 2-AM (5 μM) at 37°C for 60 min, followed by the addition of collagen (1 μg/ml) in the absence or presence of xanthohumol (1.5 and 3 μM), which was added 3 min prior to the addition of collagen. Data are presented as means ± S.E.M. (*n* = 3). ** *P* < 0.01 as compared with the resting group; ## *P* < 0.01 as compared with the collagen group.

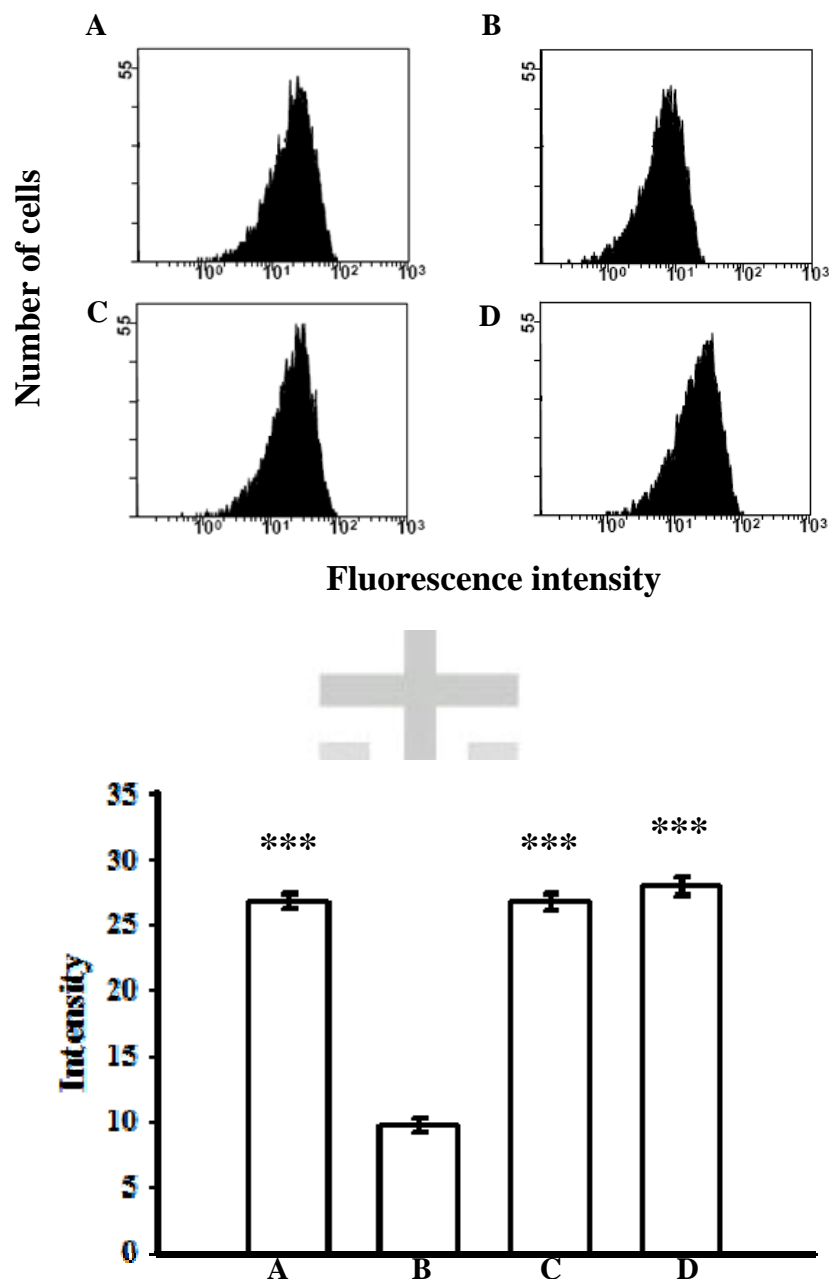


Figure 8. Flow cytometric analysis of FITC-triflavin binding to human platelets in the absence or presence of xanthohumol (1.5 and 3 μM). (A) The solid line represents the fluorescence profiles of only FITC-triflavin (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) the absence of xanthohumol as a positive control; (B) in the presence of EDTA (5 mM) as the negative control; or in the presence of xanthohumol (C) 1.5 μM and (D) 3 μM . Data are presented as means \pm S.E.M. ($n = 5$). *** $P < 0.001$ as compared with the negative group.

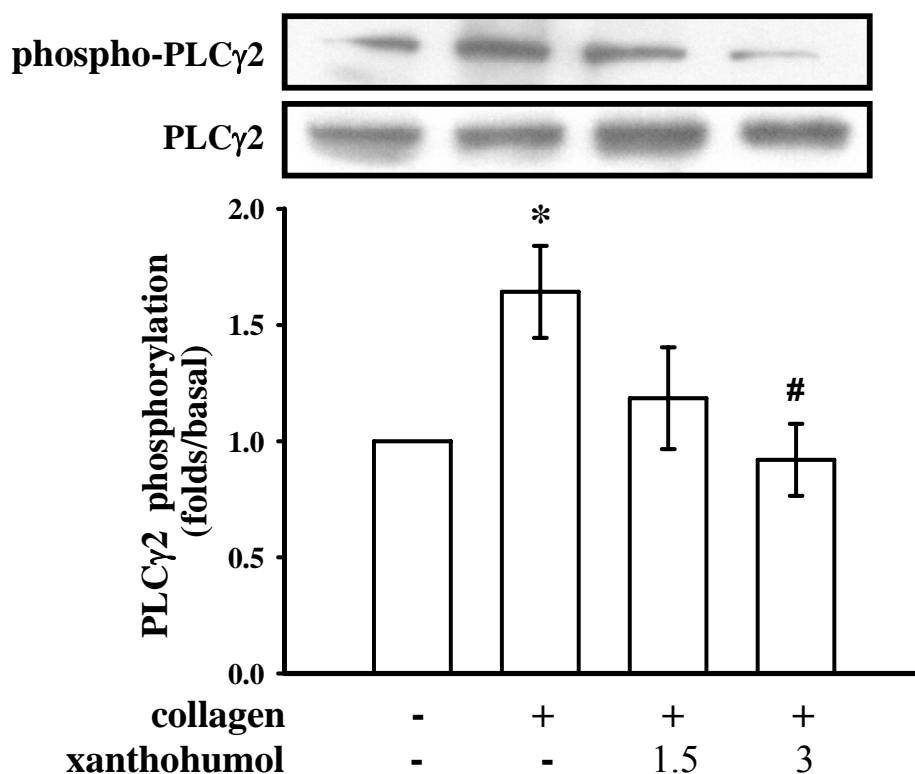


Figure 9. Effect of xanthohumol on protein phosphorylation of PLCγ2 in human platelets challenged with collagen. Platelets were preincubated with Tyrode's solution only (lane 1), or platelets were preincubated with isovolumetric solvent control (0.5 % DMSO, lane 2) or xanthohumol (1.5 μM, lane 3; 3 μM, lane 4) followed by the addition of collagen (1 μg/ml) to trigger PLCγ2 activation. The bar graph depicts the ratios of quantitative results obtained by scanning the anti-phospho-PLCγ2 and anti-PLCγ2 reactive bands and quantify optical density using Bio-1D version 99 image software. Data are presented as means ± S.E.M. ($n = 6$). * $P < 0.05$ as compared with the resting group (lane 1), # $P < 0.05$ as compared with the resting group (lane 2).

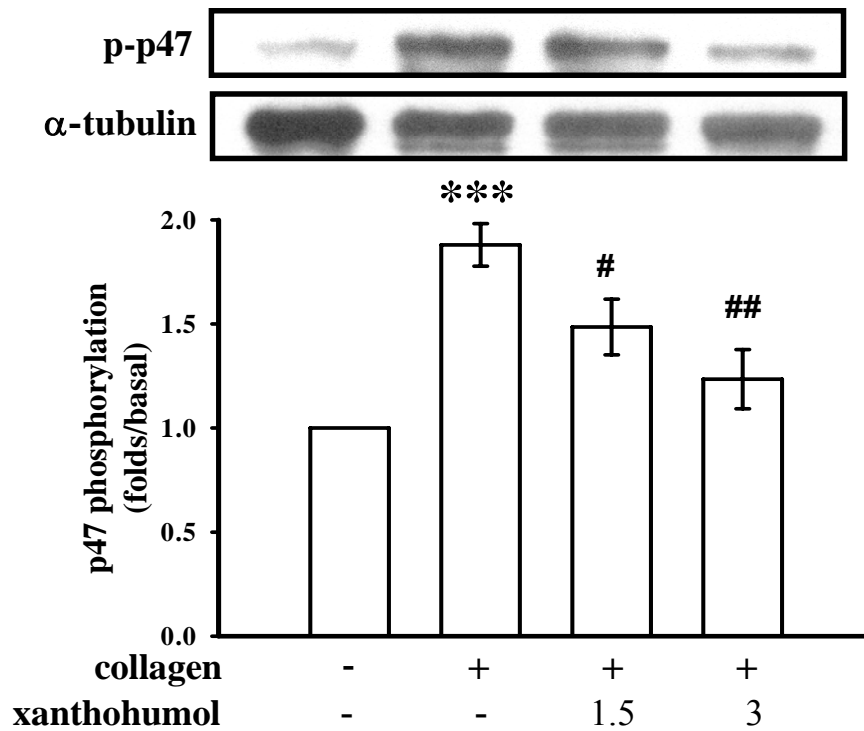


Figure 10. Effect of xanthohumol on protein phosphorylation of *Mw* 47,000 (p47) in human platelets challenged with collagen. Platelets were preincubated with Tyrode's solution only (lane 1), or platelets were preincubated with isovolumetric solvent control (0.5 % DMSO, lane 2) or xanthohumol (1.5 μ M, lane 3; 3 μ M, lane 4) followed by the addition of collagen (1 μ g/ml) to trigger protein kinase C activation. The bar graph depicts the ratios of quantitative results obtained by scanning the anti-phospho-47 kDa and anti- α -tubulin reactive bands and quantify optical density using Bio-1D version 99 image software. Data are presented as means \pm S.E.M. ($n = 5$). *** $P < 0.001$ as compared with the resting group (lane 1); # $P < 0.05$ and ## $P < 0.01$ as compared with the collagen group (lane 2)

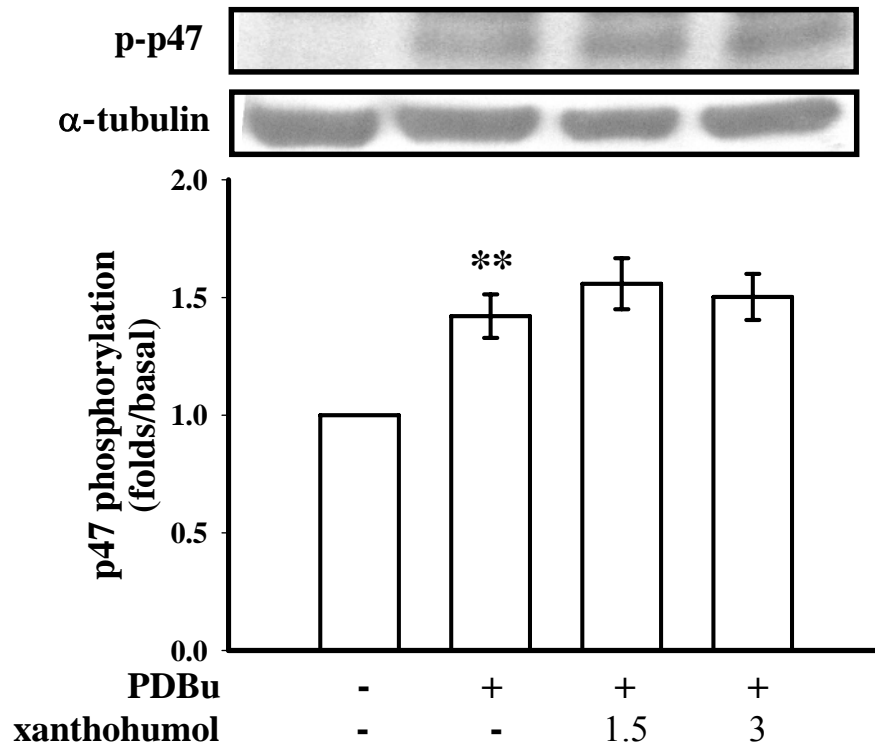


Figure 11. Effect of xanthohumol on protein phosphorylation of *Mw* 47,000 (p47) in human platelets challenged with PDBu. Platelets were preincubated with Tyrode's solution only (lane 1), or platelets were preincubated with isovolumetric solvent control (0.5 % DMSO, lane 2) or xanthohumol (1.5 μM, lane 3; 3 μM, lane 4) followed by the addition of PDBu (150 nM) to trigger protein kinase C activation. The bar graph depicts the ratios of quantitative results obtained by scanning the anti-phospho-47 kDa and anti-α-tubulin reactive bands and quantify optical density using Bio-1D version 99 image software. Data are presented as means ± S.E.M. (*n* = 5). ** *P* < 0.01 as compared with the resting group (lane 1).

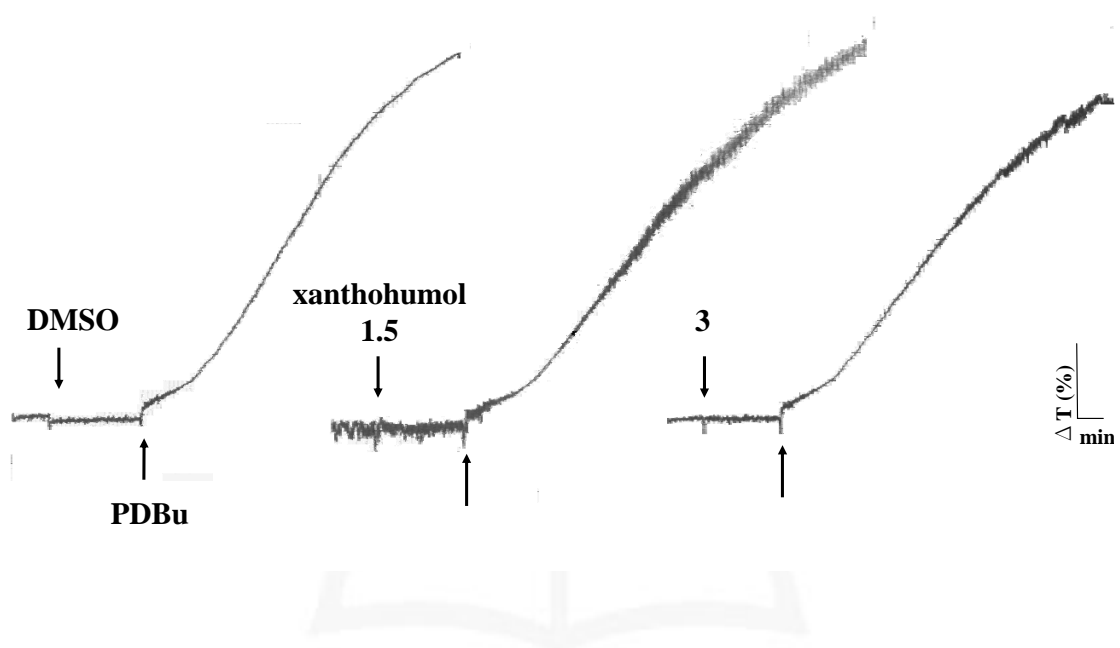


Figure 12. Effect of xanthohumol on PDBu-induced platelet aggregation of human platelet suspensions. Platelets were incubated with xanthohumol (1.5 and 3 μM) for 3 min, the PDBu (150 nM) was added to trigger platelet aggregation. The profiles are representative examples of four similar experiments.

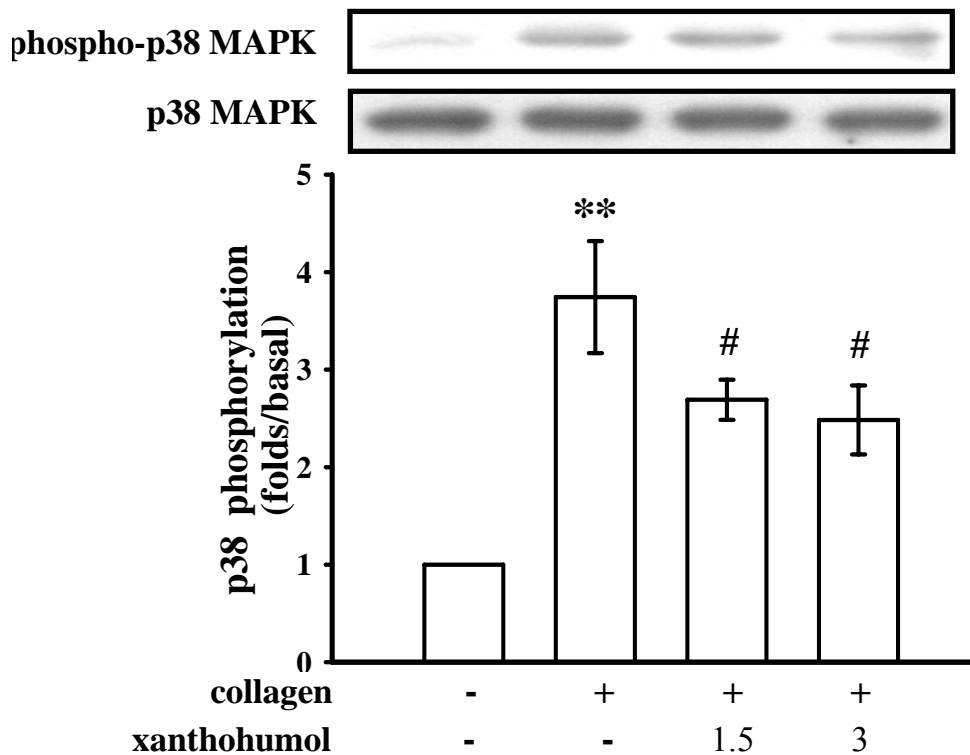


Figure 13. Effect of xanthohumol on protein phosphorylation of p38 MAPK in human platelets challenged with collagen. Platelets were preincubated with Tyrode's solution only (lane 1), or platelets were preincubated with isovolumetric solvent control (0.5 % DMSO, lane 2) or xanthohumol (1.5 μ M, lane 3; 3 μ M, lane 4) followed by the addition of collagen (1 μ g/ml) to trigger p38 MAPK activation. The bar graph depicts the ratios of quantitative results obtained by scanning the anti-phospho-p38 and anti-p38 reactive bands and quantify optical density using Bio-1D version 99 image software. Data are presented as means \pm S.E.M. (n = 3). ** P < 0.01 as compared with the resting group (lane 1), # P < 0.05 as compared with the collagen group (lane 2).

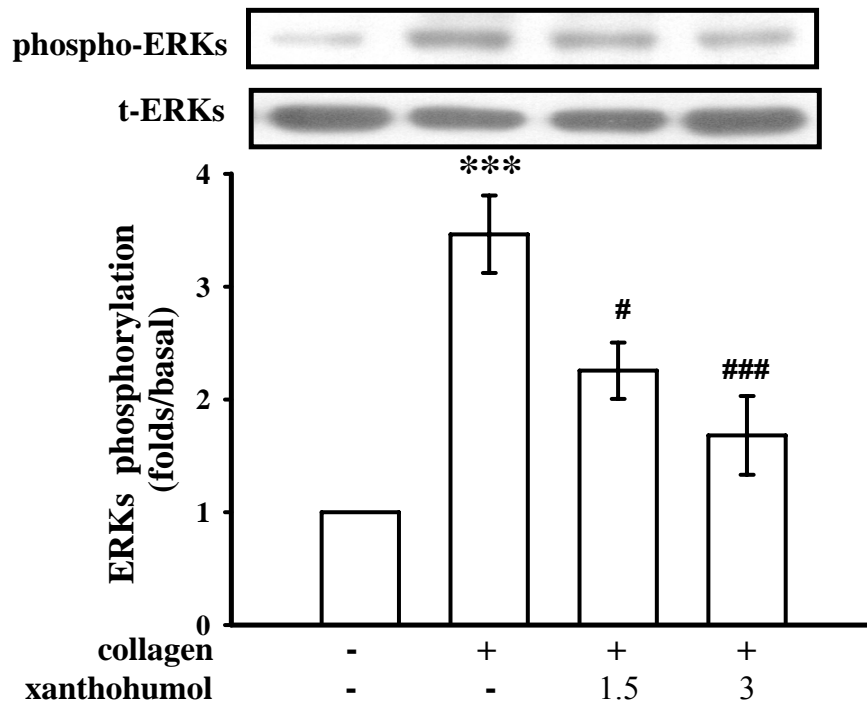


Figure 14. Effect of xanthohumol on protein phosphorylation of ERKs in human platelets challenged with collagen. Platelets were preincubated with Tyrode's solution only (lane 1), or platelets were preincubated with isovolumetric solvent control (0.5 % DMSO, lane 2) or xanthohumol (1.5 μ M, lane 3; 3 μ M, lane 4) followed by the addition of collagen (1 μ g/ml) to trigger ERKs activation. The bar graph depicts the ratios of quantitative results obtained by scanning the anti-phospho-ERK and anti-ERK reactive bands and quantify optical density using Bio-1D version 99 image software. Data are presented as means \pm S.E.M. ($n = 6$). *** $P < 0.001$ as compared with the resting group (lane 1); # $P < 0.05$ and ### $P < 0.001$ as compared with the collagen group (lane 2).

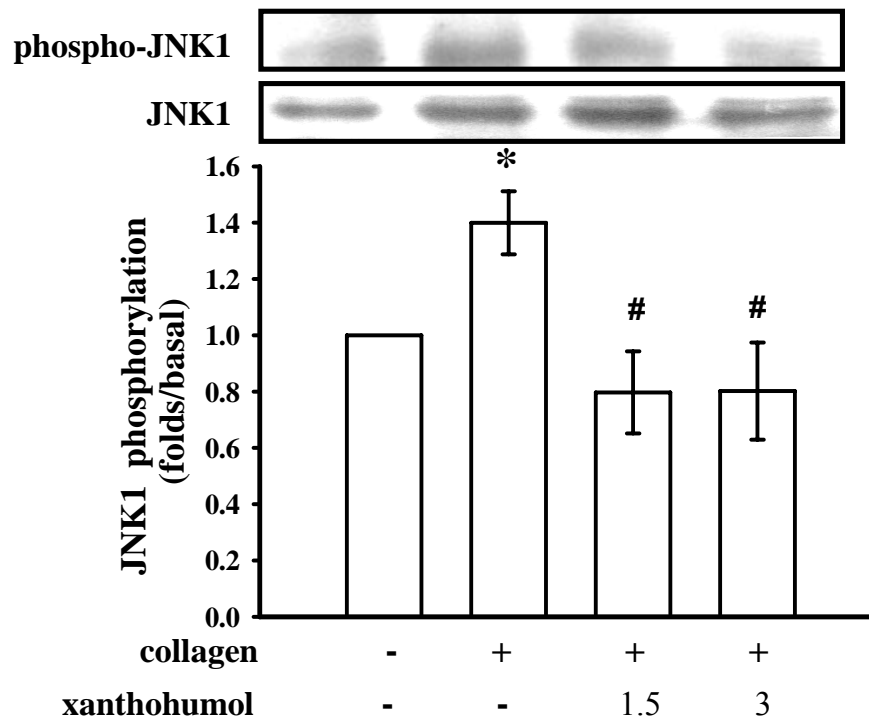


Figure 15. Effect of xanthohumol on protein phosphorylation of JNK1 in human platelets challenged with collagen. Platelets were preincubated with Tyrode's solution only (lane 1), or platelets were preincubated with isovolumetric solvent control (0.5 % DMSO, lane 2) or xanthohumol (1.5 μ M, lane 3; 3 μ M, lane 4) followed by the addition of collagen (1 μ g/ml) to trigger JNK1 activation. The bar graph depicts the ratios of quantitative results obtained by scanning the anti-phospho-JNK and anti-JNK reactive bands and quantify optical density using Bio-1D version 99 image software. Data are presented as means \pm S.E.M. ($n=5$). * $P < 0.05$ as compared with the resting group (lane 1), # $P < 0.05$ as compared with the collagen group (lane 2) .

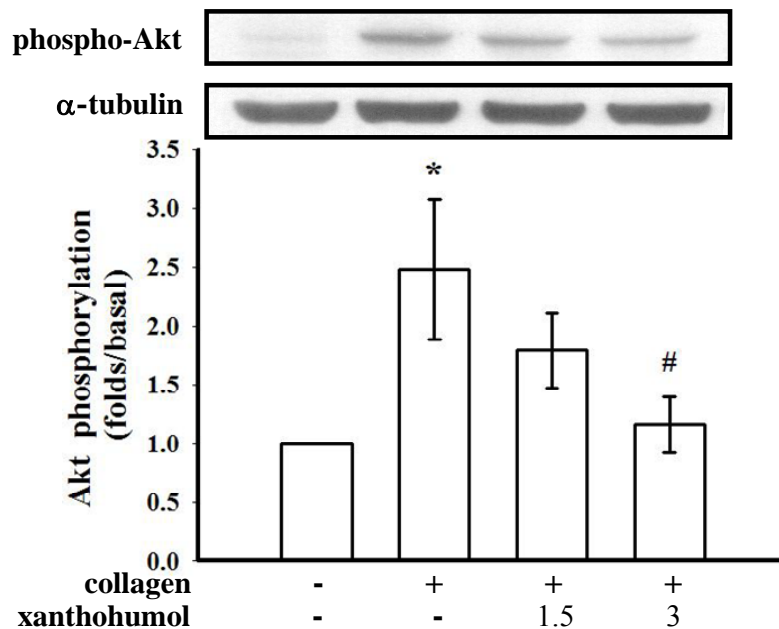


Figure 16. Effect of xanthohumol on protein phosphorylation of Akt in human platelets challenged with collagen. Platelets were preincubated with Tyrode's solution only (lane 1), or platelets were preincubated with isovolumetric solvent control (0.5 % DMSO, lane 2) or xanthohumol (1.5 μ M, lane 3; 3 μ M, lane 4) followed by the addition of collagen (1 μ g/ml) to trigger Akt activation. The bar graph depicts the ratios of quantitative results obtained by scanning the anti-phospho-Akt and anti- α -tubulin reactive bands and quantify optical density using Bio-1D version 99 image software. Data are presented as means \pm S.E.M. ($n = 8$). * $P < 0.05$ as compared with the resting group (lane 1), # $P < 0.05$ as compared with the collagen group (lane 2).

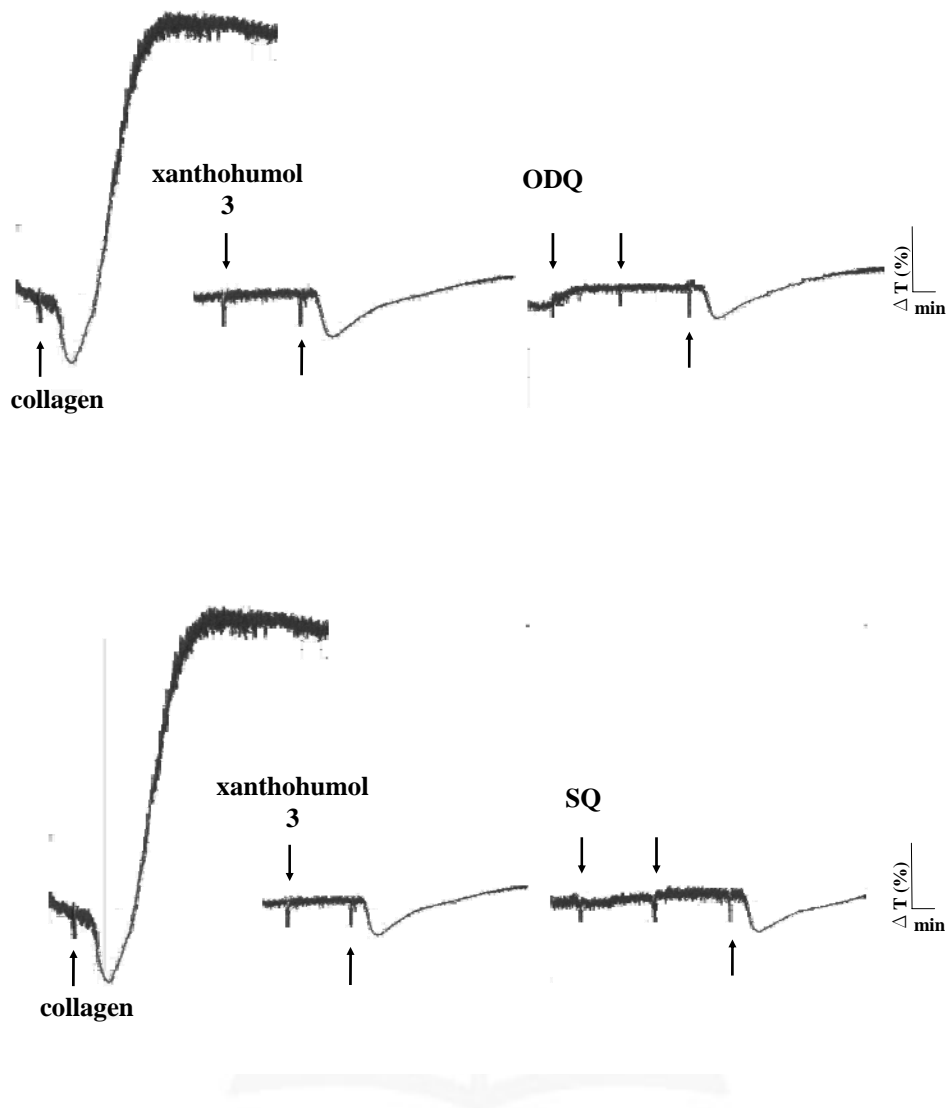


Figure 17. Effects of xanthohumol on collagen-induced aggregation in human platelet suspension. Platelets were preincubated with xanthohumol (3 μ M) and stirred for 3 min, then collagen (1 μ g/ml) was added to trigger platelet aggregation; Platelets were preincubated with ODQ (10 μ M) and SQ (100 μ M) and stirred for 3 min, then preincubated with xanthohumol (3 μ M) and stirred for 3 min, then collagen (1 μ g/ml) was added to trigger platelet aggregation.

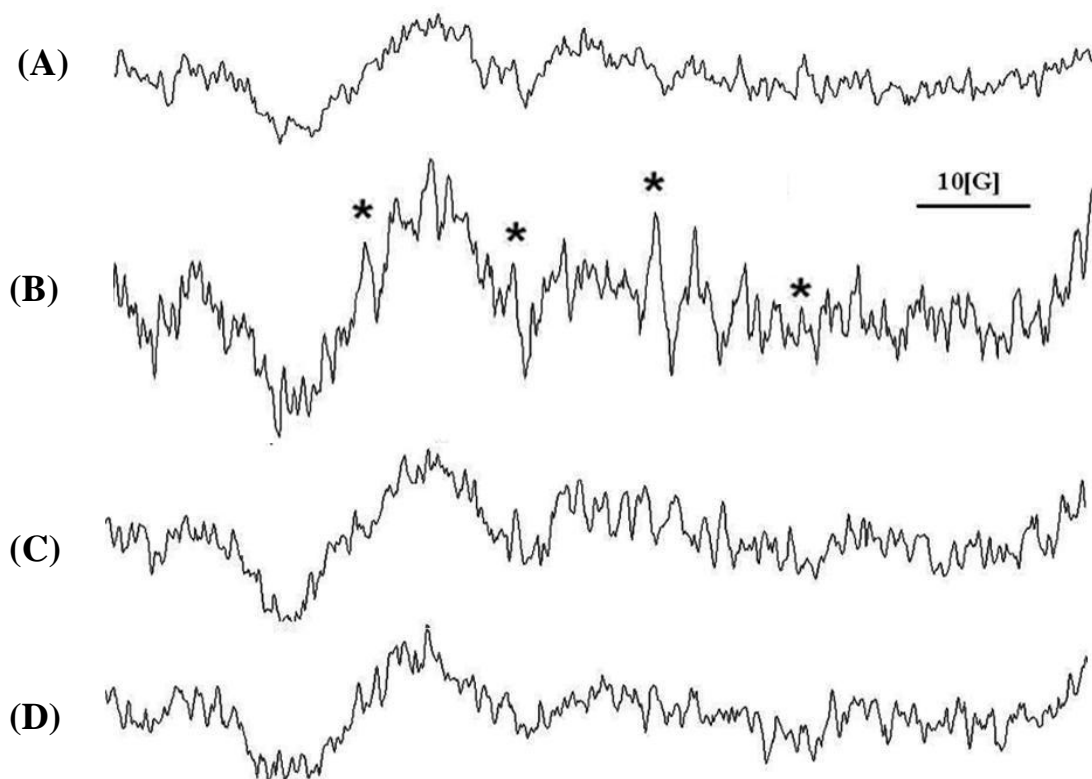


Figure 18. Effect of xanthohumol on collagen-induced free radical-scavenging activity of human platelet suspensions. ESR conditions are described in “material and methods”. Scanning was begun 1 min after the mixing of all reagents. ESR spectra of free radical-scavenging activity of platelet suspensions were follows by the addition of DMPO (100 mM) (A) and the addition of collagen (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in the absence (B) or presence of xanthohumol 1.5 μM (C) and 3 μM (D), which was added 3 min prior to collagen (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). The spectra are representative examples of three similar experiments.

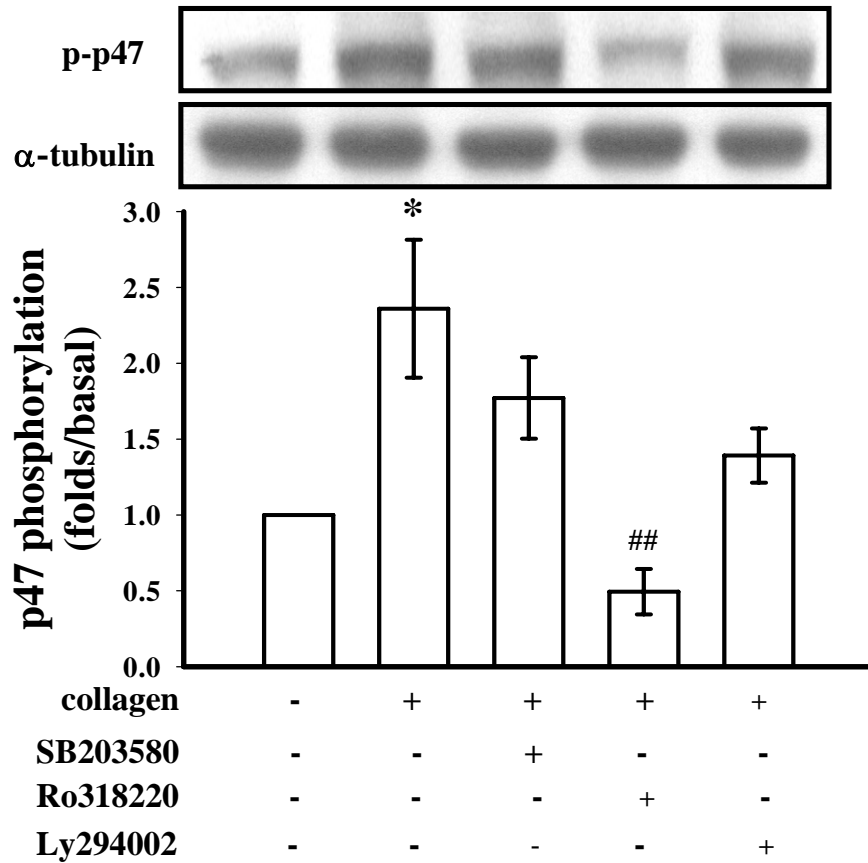


Figure 19. Effects of SB203580 (10 μ M), Ro318220 (2 μ M) or Ly294002 (10 μ M) on p47 phosphorylation stimulated by collagen in human platelets. Platelets were pretreated with SB203580 (10 μ M), Ro318220 (2 μ M) or Ly294002 (10 μ M) followed by the addition of collagen (1mg/ml) ; then the p47 phosphorylation was measured as described in “materials and methods”. Results are expressed as the mean \pm S.E.M ($n = 3$). * $P < 0.05$ as compared with the resting group (lane 1), # $P < 0.05$ as compared with the collagen group (lane 2).

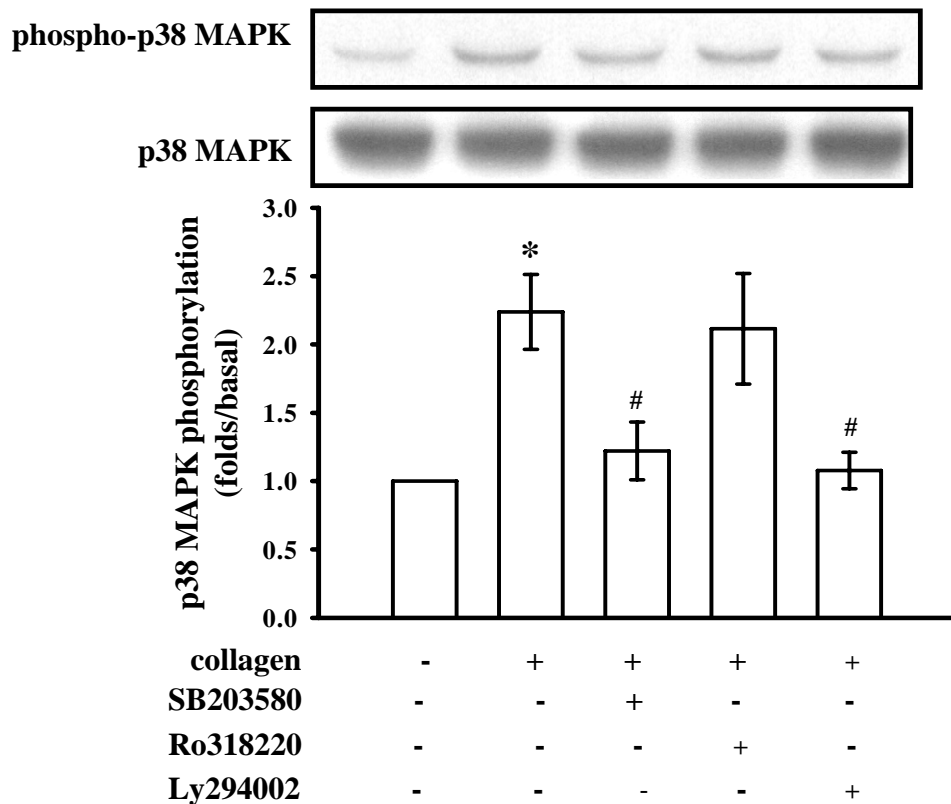


Figure 20. Effects of SB203580 (10 μ M), Ro318220 (2 μ M) or Ly294002 (10 μ M) on p47 phosphorylation stimulated by collagen in human platelets. Platelets were pretreated with SB203580 (10 μ M), Ro318220 (2 μ M) or Ly294002 (10 μ M) followed by the addition of collagen (1mg/ml) ; then the p38 MAPK phosphorylation was measured as described in “materials and methods”. Results are expressed as the mean \pm S.E.M ($n = 3$). * $P < 0.05$ as compared with the resting group (lane 1), # $P < 0.05$ as compared with the collagen group (lane 2).

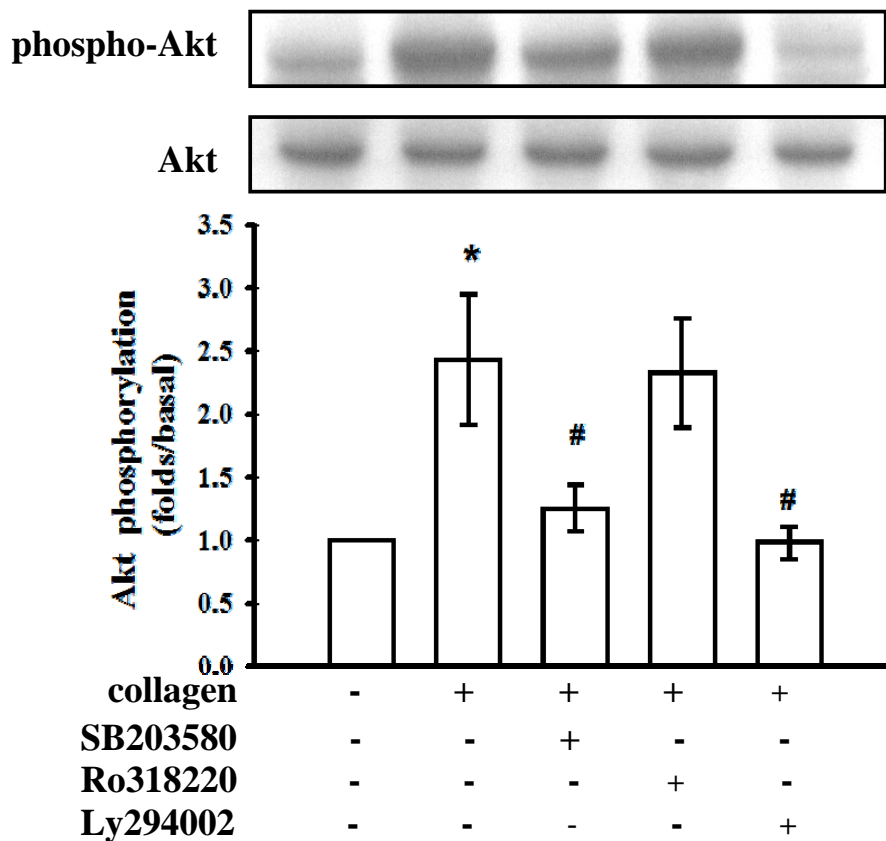


Figure 21. Effects of SB203580 (10 μ M), Ro318220 (2 μ M) or Ly294002 (10 μ M) on p47 phosphorylation stimulated by collagen in human platelets. Platelets were pretreated with SB203580 (10 μ M), Ro318220 (2 μ M) or Ly294002 (10 μ M) followed by the addition of collagen (1mg/ml) ; then the Akt phosphorylation was mwasured as described in “materials and methods”. Results are expressed as the mean \pm S.E.M ($n = 6$). * $P < 0.05$ as compared with the resting group (lane 1), # $P < 0.05$ as compared with the collagen group (lane 2).

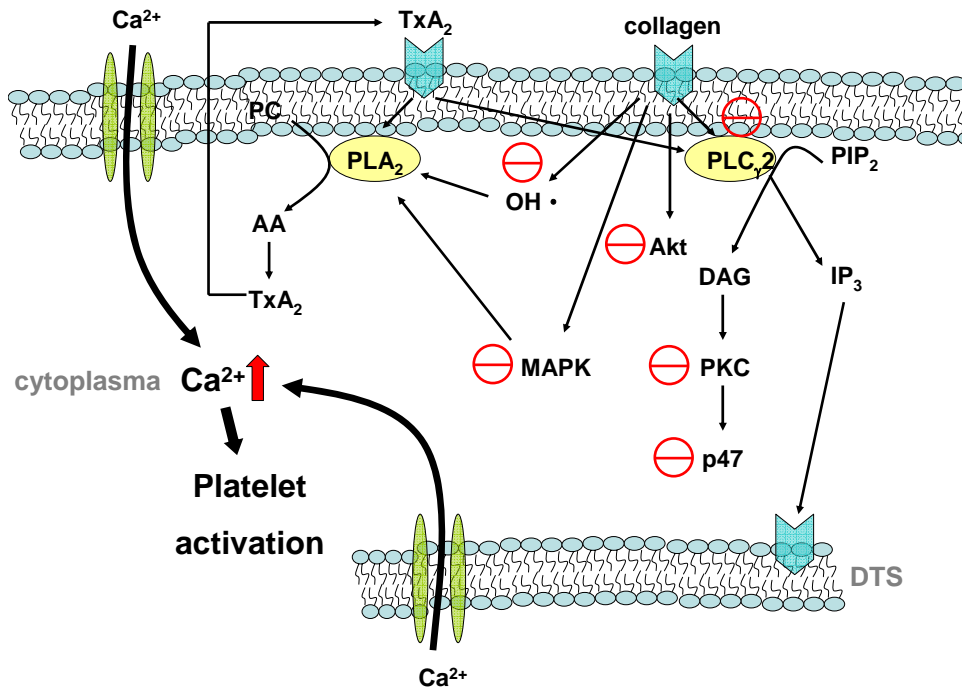


Figure 22. Signal transduction of platelet aggregation. Agonists can activate several phospholipase, including phospholipase C (PLC) and phospholipase A₂ (PLA₂). The products of the action of phospholipase C on phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) include 1,2-diacylglycerol (DAG) and inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃). DAG stimulates protein kinase C (PKC), followed by phosphorylation of a 47 kDa protein. IP₃ induces the release of Ca²⁺ from dense tubular systems (DTS). The major metabolite of arachidonic acid (AA) in platelet is thromboxane A₂ (TxA₂).

六. 參考文獻

- Armstrong, R. A., Jones, R. L. and Wilson, N. H. Mechanism of the inhibition of platelet aggregation produced by prostaglandin F₂ alpha. *Prostaglandins* 1985;**29**:601-610.
- Banno, Y., Nakashima, T., Kumada, T., Ebisawa, K., Nonomura, Y. and Nozawa, Y. Effects of gelsolin on human platelet cytosolic phosphoinositide-phospholipase C isozymes. *J Biol Chem* 1992;**267**:6488-6494.
- Barthel, A., Ostrakhovitch, E. A., Walter, P. L., Kampkotter, A. and Klotz, L. O. Stimulation of phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling by copper and zinc ions: mechanisms and consequences. *Arch Biochem Biophys* 2007;**463**:175-182.
- Berridge, M. J. Rapid accumulation of inositol trisphosphate reveals that agonists hydrolyse polyphosphoinositides instead of phosphatidylinositol. *Biochem J* 1983;**212**:849-858.
- Berridge, M. J. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 1993;**361**:315-325.
- Born, G. V. and Cross, M. J. The Aggregation of Blood Platelets. *J*

Physiol 1963;**168**:178-195.

Borsch-Haubold, A. G., Kramer, R. M. and Watson, S. P. Cytosolic phospholipase A₂ is phosphorylated in collagen- and thrombin-stimulated human platelets independent of protein kinase C and mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1995;**270**:25885-25892.

Borsch-Haubold, A. G., Kramer, R. M. and Watson, S. P. Phosphorylation and activation of cytosolic phospholipase A₂ by 38-kDa mitogen-activated protein kinase in collagen-stimulated human platelets. *Eur J Biochem* 1997;**245**:751-759.

Brass, L. F. and Joseph, S. K. A role for inositol triphosphate in intracellular Ca²⁺ mobilization and granule secretion in platelets. *J Biol Chem* 1985;**260**:15172-15179.

Brass, L. F., Hoxie, J. A. and Manning, D. R. Signaling through G proteins and G protein-coupled receptors during platelet activation. *Thromb Haemost* 1993;**70**:217-223.

Bugaud, F., Nadal-Wollbold, F., Levy-Toledano, S., Rosa, J. P. and Bryckaert, M. Regulation of c-jun-NH₂ terminal kinase and extracellular-signal regulated kinase in human platelets. *Blood*

1999;**94**:3800-3805.

Butt, E., Abel, K., Krieger, M., Palm, D., Hoppe, V., Hoppe, J. and Walter, U. cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets. *J Biol Chem* 1994;**269**:14509-14517.

Canobbio, I., Reineri, S., Sinigaglia, F., Balduini, C. and Torti, M. A role for p38 MAP kinase in platelet activation by von Willebrand factor. *Thromb Haemost* 2004;**91**:102-110.

Cavallari, L. H. and Momary, K. M. Genomics and the efficacy of aspirin in the treatment of cerebrovascular disease. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 2009;**11**:191-200.

Chiang, T. M., Cole, F., Woo-Rasberry, V. and Kang, E. S. Role of nitric oxide synthase in collagen-platelet interaction: involvement of platelet nonintegrin collagen receptor nitrotyrosylation. *Thromb Res* 2001;**102**:343-352.

Cho, Y. C., Kim, H. J., Kim, Y. J., Lee, K. Y., Choi, H. J., Lee, I. S. and Kang, B. Y. Differential anti-inflammatory pathway by xanthohumol in IFN-gamma and LPS-activated macrophages. *Int*

Immunopharmacol 2008;**8**:567-573.

Colgate, E. C., Miranda, C. L., Stevens, J. F., Bray, T. M. and Ho, E. Xanthohumol, a prenylflavonoid derived from hops induces apoptosis and inhibits NF-kappaB activation in prostate epithelial cells. *Cancer Lett* 2007;**246**:201-209.

Constant, J. Alcohol, ischemic heart disease, and the French paradox. *Clin Cardiol* 1997;**20**:420-424.

de Gaetano, G., Di Castelnuovo, A., Donati, M. B. and Iacoviello, L. The mediterranean lecture: wine and thrombosis--from epidemiology to physiology and back. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003;**33**:466-471.

DeLuca, M. and McElroy, W. D. Kinetics of the firefly luciferase catalyzed reactions. *Biochemistry* 1974;**13**:921-925.

Dorsam, R. T., Kim, S., Jin, J. and Kunapuli, S. P. Coordinated signaling through both G12/13 and G(i) pathways is sufficient to activate GPIIb/IIIa in human platelets. *J Biol Chem* 2002;**277**:47588-47595.

Dumonde, D. C., Jose, P. J., Page, D. A. and Williams, T. J. Production of prostaglandins by porcine endothelial cells in culture [proceedings]. *Br J Pharmacol* 1977;**61**:504P-505P.

- Evans, P. and Halliwell, B. Free radicals and hearing. Cause, consequence, and criteria. *Ann N Y Acad Sci* 1999;**884**:19-40.
- Fang, K., Ragsdale, N. V., Carey, R. M., MacDonald, T. and Gaston, B. Reductive assays for S-nitrosothiols: implications for measurements in biological systems. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;**252**:535-540.
- Fox, J. E. and Phillips, D. R. Role of phosphorylation in mediating the association of myosin with the cytoskeletal structures of human platelets. *J Biol Chem* 1982;**257**:4120-4126.
- Fox, J. E. Hydrolysis of cytoskeletal proteins by the Ca²⁺-dependent protease during platelet activation. *Adv Exp Med Biol* 1985;**192**:201-213.
- Freedman, J. E., Parker, C., 3rd, Li, L., Perlman, J. A., Frei, B., Ivanov, V., Deak, L. R., Iafrafi, M. D. and Folts, J. D. Select flavonoids and whole juice from purple grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release. *Circulation* 2001;**103**:2792-2798.
- Gerhauser, C., Alt, A., Heiss, E., Gamal-Eldeen, A., Klimo, K., Knauff, J., Neumann, I., Scherf, H. R., Frank, N., Bartsch, H. and Becker, H. Cancer chemopreventive activity of Xanthohumol, a natural

- product derived from hop. *Mol Cancer Ther* 2002;**1**:959-969.
- Gimbrone, M. A., Jr. and Alexander, R. W. Angiotensin II stimulation of prostaglandin production in cultured human vascular endothelium. *Science* 1975;**189**:219-220.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R. Y. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985;**260**:3440-3450.
- Guo, J., Nikolic, D., Chadwick, L. R., Pauli, G. F. and van Breemen, R. B. Identification of human hepatic cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of 8-prenylnaringenin and isoxanthohumol from hops (*Humulus lupulus* L.). *Drug Metab Dispos* 2006;**34**:1152-1159.
- Han, C. [Studies on the antioxidant properties of tea]. *Wei Sheng Yan Jiu* 2005;**34**:234-237.
- Haslam, R. J. and Lynham, J. A. Relationship between phosphorylation of blood platelet proteins and secretion of platelet granule constituents. I. Effects of different aggregating agents. *Biochem Biophys Res Commun* 1977;**77**:714-722.
- Hathaway, D. R. and Adelstein, R. S. Human platelet myosin light chain

kinase requires the calcium-binding protein calmodulin for activity.

Proc Natl Acad Sci U S A 1979;**76**:1653-1657.

Hirata, M., Hayashi, Y., Ushikubi, F., Yokota, Y., Kageyama, R., Nakanishi, S. and Narumiya, S. Cloning and expression of cDNA for a human thromboxane A₂ receptor. *Nature* 1991;**349**:617-620.

Irvine, R. F. 'Quantal' Ca²⁺ release and the control of Ca²⁺ entry by inositol phosphates--a possible mechanism. *FEBS Lett* 1990;**263**:5-9.

Iuliano, L., Pedersen, J. Z., Pratico, D., Rotilio, G. and Violi, F. Role of hydroxyl radicals in the activation of human platelets. *Eur J Biochem* 1994;**221**:695-704.

Jiang, B. H. and Liu, L. Z. AKT signaling in regulating angiogenesis. *Curr Cancer Drug Targets* 2008;**8**:19-26.

Jin, J., Quinton, T. M., Zhang, J., Rittenhouse, S. E. and Kunapuli, S. P. Adenosine diphosphate (ADP)-induced thromboxane A₂ generation in human platelets requires coordinated signaling through integrin alpha(IIb)beta(3) and ADP receptors. *Blood* 2002;**99**:193-198.

Katada, T., Gilman, A. G., Watanabe, Y., Bauer, S. and Jakobs, K. H. Protein kinase C phosphorylates the inhibitory

guanine-nucleotide-binding regulatory component and apparently suppresses its function in hormonal inhibition of adenylate cyclase.

Eur J Biochem 1985;**151**:431-437.

Kauskot, A., Adam, F., Mazharian, A., Ajzenberg, N., Berrou, E., Bonnefoy, A., Rosa, J. P., Hoylaerts, M. F. and Bryckaert, M. Involvement of the mitogen-activated protein kinase c-Jun NH₂-terminal kinase 1 in thrombus formation. *J Biol Chem* 2007;**282**:31990-31999.

Keely, P. J. and Parise, L. V. The alpha2beta1 integrin is a necessary co-receptor for collagen-induced activation of Syk and the subsequent phosphorylation of phospholipase Cgamma2 in platelets. *J Biol Chem* 1996;**271**:26668-26676.

Kornecki, E., Niewiarowski, S., Morinelli, T. A. and Kloczewiak, M. Effects of chymotrypsin and adenosine diphosphate on the exposure of fibrinogen receptors on normal human and Glanzmann's thrombasthenic platelets. *J Biol Chem* 1981;**256**:5696-5701.

Kraft, A. S. and Anderson, W. B. Phorbol esters increase the amount of Ca²⁺, phospholipid-dependent protein kinase associated with

- plasma membrane. *Nature* 1983;**301**:621-623.
- Kralisz, U. and Stasiak, M. [Involvement of platelet collagen receptors in primary hemostasis]. *Postepy Biochem* 2007;**53**:344-355.
- Kroner, C., Eybrechts, K. and Akkerman, J. W. Dual regulation of platelet protein kinase B. *J Biol Chem* 2000;**275**:27790-27798.
- Kwasniewska, M., Kostka, T. and Drygas, W. [Red wine in medicine: panacea, fashion or ... risk factor?]. *Przegl Lek* 2000;**57**:300-304.
- Kyriakis, J. M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E. A., Ahmad, M. F., Avruch, J. and Woodgett, J. R. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 1994;**369**:156-160.
- Lapetina, E. G. The signal transduction induced by thrombin in human platelets. *FEBS Lett* 1990;**268**:400-404.
- Lawlor, M. A. and Alessi, D. R. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J Cell Sci* 2001;**114**:2903-2910.
- Lee, S. H., Kim, H. J., Lee, J. S., Lee, I. S. and Kang, B. Y. Inhibition of topoisomerase I activity and efflux drug transporters' expression by xanthohumol. from hops. *Arch Pharm Res* 2007;**30**:1435-1439.
- Leifert, W. R. and Abeywardena, M. Y. Cardioprotective actions of grape

- polyphenols. *Nutr Res* 2008;**28**:729-737.
- Li, Z., Ajdic, J., Eigenthaler, M. and Du, X. A predominant role for cAMP-dependent protein kinase in the cGMP-induced phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein and platelet inhibition in humans. *Blood* 2003;**101**:4423-4429.
- Manning, D. R. and Brass, L. F. The role of GTP-binding proteins in platelet activation. *Thromb Haemost* 1991;**66**:393-399.
- Maxwell, M. J., Dopheide, S. M., Turner, S. J. and Jackson, S. P. Shear induces a unique series of morphological changes in translocating platelets: effects of morphology on translocation dynamics. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;**26**:663-669.
- McKean, M. L., Smith, J. B. and Silver, M. J. Formation of lysophosphatidylcholine by human platelets in response to thrombin. Support for the phospholipase A₂ pathway for the liberation of arachidonic acid. *J Biol Chem* 1981;**256**:1522-1524.
- Meyer, D. and Girma, J. P. von Willebrand factor: structure and function. *Thromb Haemost* 1993;**70**:99-104.
- Mignery, G. A. and Sudhof, T. C. The ligand binding site and transduction mechanism in the inositol-1,4,5-triphosphate receptor. *EMBO J*

1990;**9**:3893-3898.

Miranda, C. L., Stevens, J. F., Ivanov, V., McCall, M., Frei, B., Deinzer, M. L. and Buhler, D. R. Antioxidant and prooxidant actions of prenylated and nonprenylated chalcones and flavanones in vitro. *J Agric Food Chem* 2000;**48**:3876-3884.

Mustard, J. F., Perry, D. W., Ardlie, N. G. and Packham, M. A. Preparation of suspensions of washed platelets from humans. *Br J Haematol* 1972;**22**:193-204.

Nadal, F., Levy-Toledano, S., Grelac, F., Caen, J. P., Rosa, J. P. and Bryckaert, M. Negative regulation of mitogen-activated protein kinase activation by integrin α IIb β 3 in platelets. *J Biol Chem* 1997;**272**:22381-22384.

Niedel, J. E., Kuhn, L. J. and Vandenbark, G. R. Phorbol diester receptor copurifies with protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983;**80**:36-40.

Nishikawa, M., Tanaka, T. and Hidaka, H. Ca²⁺-calmodulin-dependent phosphorylation and platelet secretion. *Nature* 1980;**287**:863-865.

Nishizuka, Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* 1984;**308**:693-698.

- O'Brien J, R. Platelet aggregation: Part I Some effects of the adenosine phosphates, thrombin, and cocaine upon platelet adhesiveness. *J Clin Pathol* 1962;**15**:446-452.
- Painter, R. G., Prodouz, K. N. and Gaarde, W. Isolation of a subpopulation of glycoprotein IIb-III from platelet membranes that is bound to membrane actin. *J Cell Biol* 1985;**100**:652-657.
- Papkoff, J., Chen, R. H., Blenis, J. and Forsman, J. p42 mitogen-activated protein kinase and p90 ribosomal S6 kinase are selectively phosphorylated and activated during thrombin-induced platelet activation and aggregation. *Mol Cell Biol* 1994;**14**:463-472.
- Pignatelli, P., Pulcinelli, F. M., Lenti, L., Gazzaniga, P. P. and Violi, F. Hydrogen peroxide is involved in collagen-induced platelet activation. *Blood* 1998;**91**:484-490.
- Pignatelli, P., Pulcinelli, F. M., Celestini, A., Lenti, L., Ghiselli, A., Gazzaniga, P. P. and Violi, F. The flavonoids quercetin and catechin synergistically inhibit platelet function by antagonizing the intracellular production of hydrogen peroxide. *Am J Clin Nutr* 2000;**72**:1150-1155.
- Plow, E. F. and Collen, D. The presence and release of alpha

2-antiplasmin from human platelets. *Blood* 1981;**58**:1069-1074.

Possemiers, S., Bolca, S., Grootaert, C., Heyerick, A., Decroos, K., Dhooge, W., De Keukeleire, D., Rabot, S., Verstraete, W. and Van de Wiele, T. The prenylflavonoid isoxanthohumol from hops (*Humulus lupulus* L.) is activated into the potent phytoestrogen 8-prenylnaringenin in vitro and in the human intestine. *J Nutr* 2006;**136**:1862-1867.

Puri, R. N. Phospholipase A₂: its role in ADP- and thrombin-induced platelet activation mechanisms. *Int J Biochem Cell Biol* 1998;**30**:1107-1122.

Quinton, T. M., Kim, S., Dangelmaier, C., Dorsam, R. T., Jin, J., Daniel, J. L. and Kunapuli, S. P. Protein kinase C- and calcium-regulated pathways independently synergize with Gi pathways in agonist-induced fibrinogen receptor activation. *Biochem J* 2002a;**368**:535-543.

Quinton, T. M., Ozdener, F., Dangelmaier, C., Daniel, J. L. and Kunapuli, S. P. Glycoprotein VI-mediated platelet fibrinogen receptor activation occurs through calcium-sensitive and PKC-sensitive pathways without a requirement for secreted ADP. *Blood*

2002b;**99**:3228-3234.

Radomski, M. W., Palmer, R. M. and Moncada, S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation.

Proc Natl Acad Sci U S A 1990a;**87**:5193-5197.

Radomski, M. W., Palmer, R. M. and Moncada, S. Characterization of the L-arginine:nitric oxide pathway in human platelets. *Br J Pharmacol* 1990b;**101**:325-328.

Radomski, M. W., Palmer, R. M. and Moncada, S. Modulation of platelet aggregation by an L-arginine-nitric oxide pathway. *Trends Pharmacol Sci* 1991;**12**:87-88.

Rayo Llerena, I. and Marin Huerta, E. [Wine and heart]. *Rev Esp Cardiol* 1998;**51**:435-449.

Reinhard, M., Halbrugge, M., Scheer, U., Wiegand, C., Jockusch, B. M. and Walter, U. The 46/50 kDa phosphoprotein VASP purified from human platelets is a novel protein associated with actin filaments and focal contacts. *EMBO J* 1992;**11**:2063-2070.

Rosado, J. A. and Sage, S. O. Role of the ERK pathway in the activation of store-mediated calcium entry in human platelets. *J Biol Chem* 2001;**276**:15659-15665.

- Sage, S. O., Merritt, J. E., Hallam, T. J. and Rink, T. J. Receptor-mediated calcium entry in fura-2-loaded human platelets stimulated with ADP and thrombin. Dual-wavelengths studies with Mn^{2+} . *Biochem J* 1989;**258**:923-926.
- Samanek, M. [Does moderate alcohol drinking decrease the incidence and mortality rate in ischemic heart disease?]. *Cas Lek Cesk* 2000;**139**:747-752.
- Sano, K., Takai, Y., Yamanishi, J. and Nishizuka, Y. A role of calcium-activated phospholipid-dependent protein kinase in human platelet activation. Comparison of thrombin and collagen actions. *J Biol Chem* 1983;**258**:2010-2013.
- Sato, K., Ozaki, H. and Karaki, H. Changes in cytosolic calcium level in vascular smooth muscle strip measured simultaneously with contraction using fluorescent calcium indicator fura 2. *J Pharmacol Exp Ther* 1988;**246**:294-300.
- Schafer, A. I., Crawford, D. D. and Gimbrone, M. A., Jr. Unidirectional transfer of prostaglandin endoperoxides between platelets and endothelial cells. *J Clin Invest* 1984;**73**:1105-1112.
- Sheu, J. R., Lin, C. H., Chung, J. L., Teng, C. M. and Huang, T. F.

- Triflavin, an Arg-Gly-Asp containing snake venom peptide, inhibits aggregation of human platelets induced by human hepatoma cell line. *Thromb Res* 1992a;**66**:679-691.
- Sheu, J. R., Teng, C. M. and Huang, T. F. Triflavin, an RGD-containing antiplatelet peptide, binds to GpIIIa of ADP-stimulated platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 1992b;**189**:1236-1242.
- Sheu, J. R., Lee, C. R., Lin, C. H., Hsiao, G., Ko, W. C., Chen, Y. C. and Yen, M. H. Mechanisms involved in the antiplatelet activity of Staphylococcus aureus lipoteichoic acid in human platelets. *Thromb Haemost* 2000;**83**:777-784.
- Siess, W. Molecular mechanisms of platelet activation. *Physiol Rev* 1989;**69**:58-178.
- Siess, W. and Lapetina, E. G. Platelet aggregation induced by alpha₂-adrenoceptor and protein kinase C activation. A novel synergism. *Biochem J* 1989;**263**:377-385.
- Siffert, W. and Akkerman, J. W. Activation of sodium-proton exchange is a prerequisite for Ca²⁺ mobilization in human platelets. *Nature* 1987;**325**:456-458.
- Spiegel, A. M. Signal transduction by guanine nucleotide binding proteins.

Mol Cell Endocrinol 1987;**49**:1-16.

Stevens, J. F., Taylor, A. W., Clawson, J. E. and Deinzer, M. L. Fate of xanthohumol and related prenylflavonoids from hops to beer. *J Agric Food Chem* 1999a;**47**:2421-2428.

Stevens, J. F., Taylor, A. W. and Deinzer, M. L. Quantitative analysis of xanthohumol and related prenylflavonoids in hops and beer by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1999b;**832**:97-107.

Stevens, J. F., Miranda, C. L., Frei, B. and Buhler, D. R. Inhibition of peroxynitrite-mediated LDL oxidation by prenylated flavonoids: the alpha,beta-unsaturated keto functionality of 2'-hydroxychalcones as a novel antioxidant pharmacophore. *Chem Res Toxicol* 2003;**16**:1277-1286.

Stevens, J. F. and Page, J. E. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! *Phytochemistry* 2004;**65**:1317-1330.

Sweatt, J. D., Johnson, S. L., Cragoe, E. J. and Limbird, L. E. Inhibitors of Na⁺/H⁺ exchange block stimulus-provoked arachidonic acid release in human platelets. Selective effects on platelet activation

- by epinephrine, ADP, and lower concentrations of thrombin. *J Biol Chem* 1985;**260**:12910-12919.
- Tournier, C., Hess, P., Yang, D. D., Xu, J., Turner, T. K., Nimmual, A., Bar-Sagi, D., Jones, S. N., Flavell, R. A. and Davis, R. J. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* 2000;**288**:870-874.
- Vanhoecke, B., Derycke, L., Van Marck, V., Depypere, H., De Keukeleire, D. and Bracke, M. Antiinvasive effect of xanthohumol, a prenylated chalcone present in hops (*Humulus lupulus* L.) and beer. *Int J Cancer* 2005;**117**:889-895.
- Vinson, J. A., Mandarano, M., Hirst, M., Trevithick, J. R. and Bose, P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: beers and the effect of two types of beer on an animal model of atherosclerosis. *J Agric Food Chem* 2003;**51**:5528-5533.
- Vu, T. K., Hung, D. T., Wheaton, V. I. and Coughlin, S. R. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 1991;**64**:1057-1068.
- Wilkinson, M. G. and Millar, J. B. Control of the eukaryotic cell cycle by

- MAP kinase signaling pathways. *FASEB J* 2000;**14**:2147-2157.
- Woulfe, D., Jiang, H., Morgans, A., Monks, R., Birnbaum, M. and Brass, L. F. Defects in secretion, aggregation, and thrombus formation in platelets from mice lacking Akt₂. *J Clin Invest* 2004;**113**:441-450.
- Yamaguchi, N., Satoh-Yamaguchi, K. and Ono, M. In vitro evaluation of antibacterial, anticollagenase, and antioxidant activities of hop components (*Humulus lupulus*) addressing acne vulgaris. *Phytomedicine* 2009;**16**:369-376.
- Yamamoto, N., Greco, N. J., Barnard, M. R., Tanoue, K., Yamazaki, H., Jamieson, G. A. and Michelson, A. D. Glycoprotein Ib (GPIb)-dependent and GPIb-independent pathways of thrombin-induced platelet activation. *Blood* 1991;**77**:1740-1748.
- Yin, H., Stojanovic, A., Hay, N. and Du, X. The role of Akt in the signaling pathway of the glycoprotein Ib-IX induced platelet activation. *Blood* 2008;**111**:658-665.
- Zanoli, P. and Zavatti, M. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. *J Ethnopharmacol* 2008;**116**:383-396.
- Zhao, F., Nozawa, H., Daikonnya, A., Kondo, K. and Kitanaka, S. Inhibitors of nitric oxide production from hops (*Humulus lupulus*

L.). *Biol Pharm Bull* 2003;**26**:61-65.

