

# Cyclopiazonic acid 및 aflatoxin B<sub>1</sub>이 토끼의 혈소판에서 arachidonic acid 대사, 칼슘 동원 및 초미세구조에 미치는 영향

홍충만\*\*\* · 장동덕\* · 조명행\*\*

식품의약품안전본부 독성연구소 혈액병리과\*  
서울대학교 수의과대학\*\*  
(1996년 7월 10일 접수)

## Effects of cyclopiazonic acid and aflatoxin B<sub>1</sub> on arachidonic acid metabolism, calcium mobilization and ultrastructure in rabbit platelet aggregation

Choong-man Hong\*\*\*, Dong-deuk Jang\*, Myung-haing Cho\*\*

*Division of Hematopathology, Toxicological Research Institute, Korean FDA\**  
*Department of Toxicology, College of Veterinary Medicine, Seoul National University\*\**

(Received July 10, 1996)

**Abstracts** : For better understanding the interrelationship of hemorrhage and aggregation mechanism, cyclopiazonic acid(CPA) known as promoting the aggregation of platelet, aflatoxin B<sub>1</sub>(AFB<sub>1</sub>) inhibiting platelet aggregation were used as toxic mycotoxins in these studies. In order to investigate the potential role of prostaglandin metabolism on the platelet aggregation, a variety of prostaglandin metabolites such as PGF<sub>2α</sub>, PGE<sub>2</sub> and TXB<sub>2</sub> were measured in homogenized rabbit platelets by TLC and LSC. And the role of Ca<sup>++</sup> on the platelet aggregation was investigated by flow cytometer. Finally, the morphological effects of mycotoxins on platelet were determined by transmission electron microscope. The results and conclusions obtained from these studies are: 1) CPA induced no changes but AFB<sub>1</sub> increased PGE<sub>2</sub> and TXB<sub>2</sub>. 2) CPA promoted ADP, collagen, thrombin, A.A., and PAF-induced Ca<sup>++</sup> release. AFB<sub>1</sub>, however, decreased Ca<sup>++</sup> level except collagen-induced Ca<sup>++</sup> release. When the calcium blocker, verapamil, was used, CPA decreased thrombin-induced Ca<sup>++</sup> release and increased collagen, ADP, PAF and A.A.-induced Ca<sup>++</sup> release. AFB<sub>1</sub> in contrast decreased the all factors induced Ca<sup>++</sup> release. 3) AFB<sub>1</sub> did not induce any ultrastructural changes except large vacuole formation in a few platelets. And CPA also did not induce any changes except moderate shape change, indicator of platelet activation. In conclusion, CPA promoted platelet aggregation by the increases of Ca<sup>++</sup> release but had no changes in A.A. metabolites. Antiaggregating effects of AFB<sub>1</sub> may be due to decreases of Ca<sup>++</sup> release and increases of PGE<sub>2</sub> and PGF<sub>2α</sub> formation.

Address reprint requests to Dr. Choong-man Hong, Division of Hematopathology, Toxicological Research Institute. KFDA. Korea.

These data provide the basis for the future study of mobilization and function of  $Ca^{++}$  in platelet aggregation.

**Key Words** : cyclopiazonic acid(CPA), aflatoxin B<sub>1</sub>(AFB<sub>1</sub>), arachidonic acid metabolism, calcium mobilization, platelet ultrastructure.

## 서 론

혈소판이 여러가지 자극에 의해서 활성화될 때 세포내 칼슘농도의 증가, arachidonic acid(A.A.) 대사산물의 생성 및 혈소판 세포내 저장부위에서 다양한 물질을 분비하여 응집을 일으킨다고 하였다<sup>1</sup>. 다양한 자극에 의하여 발생하는 혈소판의 응집기전은 매우 복잡하여 아직까지 완전히 규명되지 않았지만 대개 3가지 경로에 의해 발생하는 것으로 알려져 있으며  $PLA_2$ (phospholipase A<sub>2</sub>) 억제제는 이런 기전 모두를 봉쇄할 수 있다고 하였다<sup>2</sup>.

A.A. 대사산물과 혈소판의 응집기전은 매우 밀접한 관련이 있는데 모든 동물에서  $PGE_1$ 과  $PGI_2$ 는 ADP에 의한 혈소판 응집을 완전히 억제하는 것으로 알려져 있고 또한 혈소판의 cyclooxygenase를 억제하여 A.A.의 대사를 방해하고 혈소판 응집을 억제한다고 하였다<sup>3</sup>. 이와 같이 혈소판의 응집반응은  $PGE_{2\alpha}$ ,  $PGF_{2\alpha}$  및  $TXB_2$ ( $TXA_2$ 의 안정된 대사산물)와 같은 A.A. 대사산물의 유용한 bioassay 수단으로 사용될 수 있다<sup>4</sup>. 또한 A.A. 대사산물인  $TXA_2$ 는 혈소판의 방출반응을 조절하는데 중요한 역할을 한다<sup>5</sup>. 그리고 현재 혈소판에서 PG의 정량은 방사선 동위원소가 표지된 3H-A.A.를 이용하여 박층크로마토그래피와  $\beta$ -counter로 측정하는 방법<sup>3</sup>을 많이 이용하고 있다.

PAF,  $TXA_2$  (inositol-1,4,5-triphosphate) 그리고 thrombin과 같은 혈소판 응집인자는 특정한 수용체와 결합하여 PLC(phospholipase C)를 활성화시켜  $IP_3$ 의 생성을 촉진시키고 이것이 혈소판의 dense tubular system에서 칼슘을 유리시켜 응집을 일으키며, ADP는  $PLA_2$ 를 활성화시켜  $TXA_2$ 를 형성하고 이것이 PLC를 활성화시키는 것으로 알려져 있다<sup>6</sup>.

정상적으로 혈소판은 외부자극에 대하여 혈소판 세포의 반응을 조절하는 신호인 칼슘의 농도를 일정하게 유

지시키기 때문에 세포내 칼슘농도의 변화와 혈소판의 응집기전은 밀접한 관계가 있다. 즉, 혈소판 반응을 조절하는데 중요한 칼슘은 세포내 저장부위나 세포밖으로부터 유입되어 DG(diacylglycerol)나  $IP_3$ 와 같은 second messenger와 작용하여 직·간접적으로 혈소판의 반응을 조절하며, 세포질내 낮은 칼슘농도는 dense granule에서의 칼슘분비보다 혈소판의 형태변화에 더 관련이 있는 것으로 보아 혈소판 응집시 일어나는 반응들은 칼슘에 대해서 서로 다른 역할을 가진다고 하였다<sup>1</sup>. 또한 세포질내의 칼슘은 세포내 과립에서 방출되거나 세포 밖에서 유입하여 증가하는데 세포 밖에 있는 칼슘이 세포 안으로 들어오는 것은 A.A.의 방출 및  $PLA_2$ 의 활성화와 기능적으로 밀접한 관계가 있음이 확인되었다<sup>7</sup>.

많은 연구자들은 혈소판 응집에서 매우 중요한 역할을 하는 칼슘을 정확하게 측정하여 혈소판의 응집기전을 연구하기 위하여 다양한 방법을 시도하였다. 초기의 연구에서 Indo-1으로 측정하였으며<sup>8</sup>, 현재 많이 사용하는 새로운 칼슘의 형광염색시약인 fluo-3는 혈소판내로 쉽게 들어갈 수 있는 fluo-3AM의 형태로 사용하며 세포막의 투과도를 증가시키기 위해 표면활성제인 pluronic F-127을 함께 이용하여 flow cytometer(FCM)으로 세포질내 칼슘의 양을 효율적으로 측정할 수 있게 되었다<sup>9,10</sup>. 많이 알려진 곰팡이 독소인 aflatoxin B<sub>1</sub>은 사람의 혈소판에서 PKC를 활성화시켜  $PIP_2$ 를 DG와 세포내 저장부위에서 세포질내로 칼슘을 매우 빠르게 방출시키는  $IP_3$ 로 가수분해시킨다<sup>11</sup>.

한편 cyclopiazonic acid(CPA)는 세포내 저장부위의 칼슘 uptake와 관련이 있는  $Ca^{++}$  pump ATPase 억제제로서 세포내 칼슘 저장부위의 막 투과성을 증가시켜 세포질내 칼슘을 증가시키는 특징을 갖는다<sup>12</sup>.

한편 voltage dependent  $Ca^{++}$  influx blocker인 verapamil은 PAF에 의한 A.A.의 방출을 억제한다<sup>13</sup>. 그리고 세포내 칼슘유입과 PAF의 합성경로에서 중요한 효소인  $PLA_2$ 와 acetyltransferase의 활성을 억제하여 thrombin에

의한 PAF의 합성을 막는 것으로 알려져 있으며<sup>14</sup>, 칼슘 억제경로와는 다른 기전으로 PAF에 의한 혈소판 활성을 억제할 수 있다고 하였다<sup>15</sup>. 그리고 verapamil은 ADP에 의한 혈소판내 칼슘의 증가를 억제한다고 하였다<sup>8</sup>. 이런 사실을 바탕으로 본 실험에서는 곰팡이 독소가 토끼 혈소판 세포 밖에서가 아닌 세포질내의 dense granule에서 혈소판 응집인자에 의하여 방출되는 칼슘의 농도에 미치는 영향을 좀 더 정확히 이해하기 위해서 verapamil을 전처리하여 실험하였다.

따라서 본 실험의 목적은 세포질내 칼슘의 양을 증가시키며 혈소판 응집을 촉진하는 CPA와 혈소판 응집을 억제하며 위장관 등의 출혈을 유발하는 AFB<sub>1</sub>이 A.A.의 대사산물의 생성에 미치는 영향 또한 혈소판의 막 사이의 신호를 이해하는데 매우 중요한 혈소판내 칼슘을 측정하여 응집과의 관련성을 알아보았고 전자현미경적 소견을 관찰하여 곰팡이 독소에 의한 혈소판의 미세구조 변화를 관찰하였다.

## 재료 및 방법

**실험동물 및 시험물질** : 실험동물은 식품의약품안전본부 독성연구소에서 분양받은 토끼(수컷, New Zealand White, 2-3kg)를 사용하였으며 고휘사료(신촌사료) 및 물을 자유급식시키면서 채혈에 이용하였다. 시험물질인 aflatoxin B<sub>1</sub>과 cyclopiazonic acid는 SIGMA(USA)에서 구입하여 DMSO에 녹여 실험에 사용하였다. 그리고 ADP, collagen 등과 같은 혈소판 응집인자와 Chrono-Lume<sup>®</sup> (Luciferin-luciferase)은 Chronolog사(USA), fluo-3AM, pluronic F-127, PGF<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>와 thromboxane B<sub>2</sub>는 SIGMA(USA), verapamil은 RBI(USA) 그리고 <sup>3</sup>H-arachidonic acid(100.0Ci/mole)는 NEN(USA)에서 구입하여 실험에 사용하였다.

**시험군의 설정** : 시험군은 각각의 곰팡이 독소별로 3개의 처리군과 1개의 용매대조군으로 정하였다. 즉, AFB<sub>1</sub>은 용매대조군(DMSO), 50, 100과 200 $\mu$ M 그리고 CPA는 용매대조군(DMSO), 10, 20과 50 $\mu$ M의 처리군으로 구분하여 A.A. 대사산물의 변화와 혈소판의 세포질내로 방출되는 칼슘의 변화를 측정하는 실험에 사용하였다. 그러나 전자현미경을 이용한 혈소판의 초미세구조 변화의 관찰은 최고농도만을 적용하여 실시하였다.

**혈소판에서 A.A. 대사산물의 측정** : A.A. 대사산물의 정량은 Lundholm과 Bartonek<sup>3</sup>의 방법에 따라 방사선 동

위원소가 표지된 <sup>3</sup>H-A.A.의 순도를 실험할 때마다 TLC로 확인하여 95% 이상 되는 것을 곰팡이 독소와 함께 배양하여 추출한 후 박층크로마토그래피하여  $\beta$ -counter로 그 양을 측정하였다. 실험방법은 sodium citrate로 항응고 처리한 주사기를 이용하여 채혈한 혈액을 응집시험과 동일한 방법으로 원심분리하여 platelet rich plasma(PRP)를 얻은후, 이것을 다시 약 1,750xg에서 20분간 원심분리하여 혈소판 pellet을 얻었다. 상층액은 버리고 남은 혈소판 pellet과 1ml의 완충액(100mM Tris-HCl, 1mM Na-EDTA, pH 7.5)을 잘 섞어 균질화시켰다. 각각의 반응시험관에는 100 $\mu$ M의 A.A. 50 $\mu$ l (<sup>3</sup>H-A.A.가 2 $\mu$ Ci/ml 농도로 포함), 10mM의 epinephrine 50 $\mu$ l, 1mM의 reduced glutathione 50 $\mu$ l, 완충액(500mM Tris-HCl, 5mM Na-EDTA, pH 7.5) 100 $\mu$ l, 2차증류수 190 $\mu$ l, 균질화시킨 PRP 50 $\mu$ l와 응집시험에서와 동일한 농도의 곰팡이 독소가 포함되게 한다. 이때 최종농도 5 $\mu$ g/ml 되게 에탄올에 녹인 indomethacin 5 $\mu$ l를 첨가하여 blank 값을 결정하였다. 그리고 반응은 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양한 후, 1mM의 formic acid 30 $\mu$ l를 첨가하여 반응을 종료하였다. 그런후 반응의 생성물을 2ml의 diethyl ether로 격렬하게 섞으면서 3회 추출한 후, 이 추출물을 질소 가스로 건조시켰다. 이것을 50 $\mu$ l의 ethyl acetate로 2회 녹여 박층크로마토그래피 판(GF254, 20 $\times$ 20cm, 0.25mm thickness, SIGMA, USA)에 PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , PGE<sub>2</sub>와 thromboxane B<sub>2</sub> 표준물질과 함께 점적하였다. 이것을 180ml의 diethyl ether, 4ml의 acetic acid와 3ml의 메탄올이 포함된 전개통에서 약 1시간 동안 전개시켰다. 전개가 끝난후 발색시약으로 acetone에 포화시킨 요오드액을 판에 분사시켜 표준물질의 발색위치로부터 시료의 Rf 값을 확인하였다. 그런후 이 부위의 겔을 조심스럽게 긁어 내어 liquid scintillation cocktail을 채운 vial에 넣고 혼합한 후  $\beta$ -counter(Model Tri-carb 2000CA, Packard Instrument Company, USA)로 3분간 측정하여 A.A.의 대사산물을 정량하였다.

**FCM을 이용한 혈소판내 칼슘이온의 변화측정** : 칼슘에 민감한 새로운 형광염색 시약인 fluo-3는 수용성이기 때문에 혈소판내로 들어가지 못하므로 이것의 acetoxymethyl 유도체인 fluo-3AM을 이용하여 Ozaki 등<sup>9</sup>의 방법에 따라 FCM으로 칼슘을 측정하였다. 이 방법은 일반적으로 형광분광광도계를 이용하는 것보다 칼슘의 변화를 측정하기에 더 민감한 방법이다. 본 실험에서는 지질친화성이 있는 fluo-3AM을 혈소판내로 쉽게 넣기 위하여 표면활성제인

pluronic F-127을 함께 이용하였다. 즉, 최종농도가 fluo-3AM은 40 $\mu$ M, DMSO로 녹인 pluronic F-127은 1.5 $\mu$ g/ml 되게 잘 섞은후 소량씩 분주하여 사용시까지 냉동보관하였다. 실험방법은 토끼에서 항응고제(sodium citrate, 3.8%)를 채운 주사기로 심장 채혈한 혈액과 항응고제를 9:1(v/v)로 혼합하고 실온에서 150xg로 15분동안 원심분리하여 PRP를 얻었다. 다음 단계로 fluo-3AM과 pluronic F-127 혼합액을 sonication한 후 이 중 100 $\mu$ l를 PRP 900 $\mu$ l와 잘 섞어 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양하여 혈소판내로 fluo-3AM을 넣었다. 이것을 실온에서 850xg로 15분동안 원심하여 혈소판 pellet을 얻고 NaCl 140mM, glucose 0.1%, Hepes 3.8mM, BSA 0.1%와 KCl 2.7mM로 조성된 Hepes Buffered Saline(HBS, pH 7.4)으로 균질화한 후 실온에서 850g로 15분동안 원심분리를 통해 3회 세척하여 혈소판 세포외에 존재하는 fluo-3AM을 제거하였다. 이것을 HBS로 다시 부유시킨 후 자동혈액세포 분석기로 측정하여 혈소판의 개수를 5,000개/ $\mu$ l로 맞춘다. 이렇게 만들어진 혈소판 부유액을 곰팡이 독소와 함께 37 $^{\circ}$ C에서 5분간 배양한 후 혈소판 응집인자의 최종농도가 ADP는 5 $\mu$ M, collagen은 20 $\mu$ g/ml, A.A.는 0.1mM, thrombin은 0.5U/ml 그리고 PAF는 4 $\mu$ g/ml 되게 넣었다. 혈소판내 저장부위에서 세포질내로 방출되는 칼슘은 5W argon laser를 사용하는 FCM(Model EPICS CS, Coulter Co., USA)으로 1분간 측정하였다. 다른 응집인자에 비해 PAF에 의한 칼슘방출은 빠르게 시작하고 빨리 끝나므로 20초간 측정하였다. 이때 FCM은 350mW로 488nm의 여기파장(excitation wavelength)과 525nm band pass filter를 이용하여 방출파장(emission wavelength)을 결정하면서 평균 형광 channel의 변화를 알아 보았다. 그리고 혈소판의 크기를 측정하는 log forward light scatter를 이용하여 세포 찌꺼기를 제거한 후 green integral fluorescence로 혈소판내 칼슘의 농도변화를 측정하였다. 또 혈소판내 저장부위(storage pool)인 dense granulo로부터의 방출에 의하지 않고 세포외에서 유입되어 칼슘이 증가하는 것을 막기위하여 칼슘이온 channel 봉쇄약물인 verapamil을 최종농도가 10 $\mu$ M 되게 넣어 위와 동일한 분석 조건으로 측정하여 혈소판의 세포질내에서 칼슘변화의 원인을 알아보았다.

전자현미경을 이용한 혈소판의 형태학적 변화 : 토끼를 항응고제(sodium citrate, 3.8%)가 채워져 있는 주사기로 심장채혈한 혈액과 항응고제의 부피가 9:1(v/v) 되게 혼합하여 1,000xg에서 15분간 원심분리한 후 PRP층, 백혈구층 및 소량의 적혈구층을 pasteur 피펫으로 조심스럽

게 얻어 wintrobe tube(내경 3mm, 길이 115mm, Adams, USA)에 넣었다. 여기에 용매인 DMSO와 메탄올, sambutoxin은 150 $\mu$ M, aflatoxin B<sub>1</sub>은 200 $\mu$ M 그리고 CPA는 50 $\mu$ M을 10분간 처리한 후 즉시 1,000xg에서 15분간 다시 원심하였다. 상층액부터 혈장, 백혈구, 혈소판과 적혈구층으로 구분이 됨을 확인하였고 이것들중 최상층에 있는 혈장을 버리고 여기에 0.1M의 phosphate 완충액(pH 7.4)으로 녹인 5% glutaraldehyde를 채워 실온에서 하루밤 동안 1차 고정시켰다. 그후 유리칼로 혈소판층 바로 아래를 절단하고 면봉 막대기로 밀어내어 반 고형의 혈소판 pellet을 얻었다. 다시 이것을 신선한 2.5%의 glutaraldehyde에 3시간동안 실온에서 2차 고정을 하였다. 이것을 1mm<sup>3</sup>의 조각으로 세절하고 0.1M의 phosphate 완충액(pH 7.4)으로 약 20분 정도 조심스럽게 세척한 후 다시 2% osmium tetroxide로 1시간동안 후고정(postfixation)하였다. 그리고 다시 동일한 완충액으로 약 20분 정도 세척한 후 50, 70, 95, 100%와 다시 한번 100% 농도로 에탄올의 농도를 높여 가면서 약 10-15분간 단계적으로 탈수시키고 아세톤으로 10-15분 정도 투명화시킨 후 epon과 아세톤의 1:1 혼합액에서 30분 그리고 epon의 농도를 높여서 2:1 혼합액에 30분정도 담가 조직에 epon을 침윤시키고 난 뒤, 다시 하루밤 동안 epon에 침윤시켰다. 그리고 araldite 502 15ml, epon resin 812 25ml, DDSA (dodesyl succinic anhydride) 55ml와 DMP[2,4,6-tri(dimethylaminomethyl) phenol] 1.5-1.9ml를 공기방울이 생기지 않도록 주의하면서 완전히 섞은 epon resin/araldite 수지에 조직을 포매하였다. 이것을 자동중합오븐(automatic polymerizing oven for EM, Sakura, Japan)으로 37 $^{\circ}$ C에서 12시간, 37-60 $^{\circ}$ C에서 24시간 그리고 60 $^{\circ}$ C에서 24시간 정도 중합하고 이것을 1 $\mu$ m 두께로 박절하여 1%의 toluidine blue로 가운염색한 후, 광학현미경으로 미리 관찰하였다. 그리고 초박절편기(Model Ultracut-S, Leika, Austria)를 이용하여 60-80nm의 두께로 절편을 만든후 uranyl acetate와 lead acetate로 이중염색하여 투과전자현미경(Model CM12, Philip Ind., Co., Netherlands)을 이용하여 80kV에서 소견을 얻었다.

통계처리 : 혈소판의 저장부위에서 세포질내로 유리된 칼슘 평균 channel 결과의 통계학적 처리는 최소 유의성 검정을 이용한 ANOVA(analysis of variance) test를 실시하여 95%와 99% 수준에서 각 군간을 비교하였다. 그리고 그의 모든 실험결과와 통계학적 처리는 95%와 99% 수준

에서 용매대조군과 처리군의 유의성을 Student's t-test를 실시하였다.

## 결 과

혈소판에서 A. A. 대사산물인 PGF<sub>2α</sub>, PGE<sub>2</sub>와 TXB<sub>2</sub>의 정량 : CPA가 혈소판에서 A.A. 대사산물의 생성에 미치는 영향을 Table 1에 나타내었다. TXB<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>와 PGF<sub>2α</sub>의 양은 대조군에 비해서 통계학적 유의성이 관찰되지 않았다. AFB<sub>1</sub>이 혈소판에서 A.A. 대사산물의 생성에 미치는 영향을 Table 2에 나타내었다. TXB<sub>2</sub>는 대조군 5.181±0.97에 비해 200μM 처리군에서 6.723±0.92로 통계학적으로 유의성 있게(p<0.01) 증가시켰다. 그리고 PGF<sub>2α</sub>는 대조군 3.296±0.38에 의해 100과 200μM 처리군에서 각각 4.224±0.56과 4.568±0.76으로 증가시켰지만 PGF<sub>2α</sub>의 양은 대조군에 비해서 통계학적 유의성이 관찰되지 않았다.

FCM을 이용한 칼슘이온의 변화 : ADP와 thrombin에 의해서 유발된 혈소판의 저장부위에서 세포질로 방출되는 칼슘에 곰팡이 독소가 어떤 영향을 미치는지 Table 3에 나타내었다. ADP에 의해서 증가한 칼슘에 CPA의 모든 처리군은 대조군에 비해 평균 형광 channel이 증가하였지만 용량의존적이지는 않았다. 그리고 AFB<sub>1</sub> 처리군은 대조군의 평균 형광 channel이 29.5±0.40인데 비해 50, 100과 200μM에서 각각 25.7±0.32, 24.5±0.25 그리고 23.2±0.33이며 용량의존적으로 통계학적 유의성 있게

(p<0.01) 감소하였다. 곰팡이 독소가 thrombin에 유발된 혈소판 세포안의 dense granule내에서 세포질내로 방출되는 칼슘에 미치는 영향은 CPA의 모든 처리군에서 대조군에 비해 평균 형광 channel이 통계학적으로 유의성 있게(p<0.01) 증가하였지만 용량의존적이지는 않았다. 그리고 AFB<sub>1</sub> 처리군은 대조군의 평균 형광 channel이 21.9±0.13인데 비해 100과 200μM에서 각각 21.2±0.17과 20.8±0.39로 유의성 있게(p<0.01) 감소하였다. 곰팡이 독소가 A.A.와 PAF에 의해서 유발된 혈소판 세포안의 dense granule내에서 세포질내로 방출되는 칼슘에 어떤 영향을 미치는지 Table 4에 나타내었다. A.A.에 의해서 증가한 세포질내 칼슘에 CPA는 대조군에 비해서 유의성 있게 증가하였지만 용량의존적이지는 않았다. 그리고 AFB<sub>1</sub> 처리군은 대조군의 평균 형광 channel이 27.5±1.10인데 비해 50, 100과 200μM에서 각각 17.4±0.30, 15.6±0.06 그리고 14.3±0.16으로 용량이 증가할 수록 칼슘의 평균 형광 channel이 유의성 있게 증가하였다(p<0.01). 곰팡이 독소가 PAF에 의해서 유발된 혈소판 세포 안의 dense granule에서 세포질내로 방출되는 칼슘에 미치는 영향에서 CPA는 대조군에 비해서 유의성 있게 증가하였지만(p<0.05와 p<0.01) 용량의존적이지는 않았다. 그리고 AFB<sub>1</sub> 처리군은 대조군의 평균 형광 channel이 24.0±0.23인데 비해 50, 100과 200μM에서 각각 23.8±0.65, 21.7±0.27 그리고 20.8±0.15로 용량이 증가할 수록 칼슘의 평균 형광 channel이 유의성 있게 감소하였다(p<0.01). 곰팡이 독소가 collagen에 의해서 유발된 혈

Table 1. Effects of cyclopiazonic acid on arachidonic acid metabolite synthesis in rabbit platelet

Metabolites	Concentration(μM)	DPM(×10 <sup>3</sup> )
Thromboxane B <sub>2</sub>	Control	5.181 ± 0.97 <sup>†</sup>
	10	4.951 ± 1.47
	20	5.122 ± 0.89
	50	5.500 ± 1.57
	200	6.723 ± 0.92
Prostaglandin E <sub>2</sub>	Control	3.296 ± 0.38
	10	3.744 ± 0.56
	20	3.924 ± 0.99
	50	3.506 ± 0.65
	200	4.568 ± 0.76
Prostaglandin F <sub>2α</sub>	Control	1.678 ± 0.41
	10	1.825 ± 0.24
	20	1.733 ± 0.26
	50	1.734 ± 0.21
	200	1.734 ± 0.21

† : Values represent the mean±SE(n=10).

Table 2. Effects of aflatoxin B<sub>1</sub> on arachidonic acid metabolite synthesis in rabbit platelet

Metabolites	Concentration(μM)	DPM(×10 <sup>3</sup> )
Thromboxane B <sub>2</sub>	Control	5.181 ± 0.97 <sup>†</sup>
	50	5.644 ± 1.10
	100	6.038 ± 1.18
	200	6.723 ± 0.92 <sup>†</sup>
	200	6.723 ± 0.92 <sup>†</sup>
Prostaglandin E <sub>2</sub>	Control	3.296 ± 0.38
	50	4.103 ± 0.98
	100	4.224 ± 0.58 <sup>*</sup>
	200	4.568 ± 0.76 <sup>*</sup>
	200	4.568 ± 0.76 <sup>*</sup>
Prostaglandin F <sub>2</sub>	Control	1.678 ± 0.41
	50	1.871 ± 0.56
	100	1.740 ± 0.46
	200	1.625 ± 0.49
	200	1.625 ± 0.49

† : Values represent the mean±SE(n=10).

\* : p<0.01 vs control

**Table 3.** Effects of various mycotoxins on platelet [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> elevation induced by ADP and thrombin

Mycotoxins	Concentration(μM)	Mean channel	
		ADP	Thrombin
Cyclopiazonic acid	Control	29.5±0.40 <sup>a</sup>	21.9±0.13
	10	38.1±0.43 <sup>*</sup>	25.9±0.73 <sup>*</sup>
	20	36.4±0.12 <sup>***</sup>	25.3±0.16 <sup>*</sup>
	50	36.4±0.17 <sup>***</sup>	25.6±0.70 <sup>*</sup>
Aflatoxin B <sub>1</sub>	Control	29.5±0.40	21.9±0.13
	50	25.7±0.32 <sup>*</sup>	22.1±0.19
	100	24.5±0.25 <sup>***</sup>	21.2±0.17 <sup>*,†</sup>
	200	23.2±0.33 <sup>*,†,‡</sup>	20.8±0.39 <sup>*,†,‡</sup>

a : Values represent the mean±SE(n=10).

\* : p<0.01 vs control, \*\* : p<0.01 vs CPA 10μM

\*\*\* : p<0.05, † : p<0.01 vs AFB<sub>1</sub> 50μM, ‡ : p<0.05 vs AFB<sub>1</sub> 100μM

**Table 4.** Effects of various mycotoxins on platelet [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> elevation induced by arachidonic acid and PAF

Mycotoxins	Concentration(μM)	Mean channel	
		Arachidonic acid	PAF
Cyclopiazonic acid	Control	27.5±1.10 <sup>a</sup>	24.0±0.23
	10	33.4±0.27 <sup>**</sup>	27.1±0.59 <sup>**</sup>
	20	32.3±0.43 <sup>**</sup>	25.7±0.57 <sup>*</sup>
	50	32.0±0.29 <sup>**</sup>	26.2±0.54 <sup>**</sup>
Aflatoxin B <sub>1</sub>	Control	27.5±1.10	24.0±0.23
	50	17.4±0.30 <sup>**</sup>	23.8±0.65
	100	15.6±0.06 <sup>***</sup>	21.7±0.27 <sup>*,†</sup>
	200	14.3±0.16 <sup>***,†</sup>	20.8±0.15 <sup>***,†</sup>

a : Values represent the mean±SE(n=10).

\* : p<0.05, \*\* : p<0.01 vs control, \*\*\* : p<0.05, † : p<0.01 vs AFB<sub>1</sub> 50μM

‡ : p<0.01 vs AFB<sub>1</sub> 100μM

**Table 5.** Effects of various mycotoxins on platelet [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> elevation induced by collagen

Mycotoxins	Concentration(μM)	Mean channel
Cyclopiazonic acid	Control	15.3±0.15 <sup>a</sup>
	10	19.4±0.16 <sup>*,†</sup>
	20	18.8±0.23 <sup>*</sup>
	50	21.5±0.10 <sup>***,†</sup>
Aflatoxin B <sub>1</sub>	Control	15.3±0.15
	50	15.4±0.13
	100	14.7±0.16
	200	14.6±0.65

a : Values represent the mean±SE(n=10).

\* : p<0.01 vs control, \*\* : p<0.01 vs CPA 10μM

† : p<0.05, ‡ : p<0.01 vs CPA 20μM

**Table 6.** Effects of mycotoxins on verapamil pretreated platelet  $[Ca^{2+}]_i$  elevation induced by PAF and thrombin

Mycotoxins	Concentration( $\mu$ M)	Mean channel	
		PAF	Thrombin
Cyclopiazonic acid	Control	17.6 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	28.3 $\pm$ 0.21
	10	18.5 $\pm$ 0.47 <sup>*</sup>	27.0 $\pm$ 0.05 <sup>**</sup>
	20	18.3 $\pm$ 0.14	24.6 $\pm$ 0.19 <sup>**<math>\clubsuit</math>*</sup>
	50	18.3 $\pm$ 0.29	25.7 $\pm$ 0.23 <sup>**<math>\clubsuit</math>*</sup>
Aflatoxin B <sub>1</sub>	Control	17.6 $\pm$ 0.08	28.3 $\pm$ 0.21
	50	13.5 $\pm$ 0.15 <sup>**</sup>	18.7 $\pm$ 0.21 <sup>**</sup>
	100	13.6 $\pm$ 0.26 <sup>**</sup>	17.3 $\pm$ 0.18 <sup>**<math>\dagger</math></sup>
	200	12.2 $\pm$ 0.19 <sup>**<math>\dagger</math>,<math>\ddagger</math></sup>	15.3 $\pm$ 0.07 <sup>**<math>\dagger</math>,<math>\ddagger</math></sup>

a : Values represent the mean $\pm$ SE(n=10).

\* : p<0.05, \*\* : p<0.01 vs control

$\clubsuit$  : p<0.01 vs CPA 10 $\mu$ M,  $\clubsuit^*$  : p<0.01 vs CPA 50 $\mu$ M

$\dagger$  : p<0.01 vs AFB<sub>1</sub> 50 $\mu$ M,  $\ddagger$  : p<0.01 vs AFB<sub>1</sub> 100 $\mu$ M

**Table 7.** Effects of various mycotoxins on verapamil pretreated platelet  $[Ca^{2+}]_i$  elevation induced by ADP and collagen

Mycotoxins	Concentration( $\mu$ M)	Mean channel	
		ADP	Collagen
Cyclopiazonic acid	Control	13.4 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	17.2 $\pm$ 0.78
	10	15.5 $\pm$ 0.17 <sup>*</sup>	19.6 $\pm$ 0.19 <sup>*</sup>
	20	15.5 $\pm$ 0.09 <sup>*</sup>	19.4 $\pm$ 0.11 <sup>*</sup>
	50	15.1 $\pm$ 0.05 <sup>*</sup>	21.6 $\pm$ 0.23 <sup>**<math>\clubsuit</math></sup>
Aflatoxin B <sub>1</sub>	Control	13.4 $\pm$ 0.21	17.2 $\pm$ 0.78
	50	12.4 $\pm$ 0.15 <sup>*</sup>	15.5 $\pm$ 0.18 <sup>*</sup>
	100	11.6 $\pm$ 0.03 <sup>**<math>\clubsuit</math></sup>	15.2 $\pm$ 0.14 <sup>*</sup>
	200	10.9 $\pm$ 0.05 <sup>**<math>\clubsuit</math>*</sup>	14.3 $\pm$ 0.19 <sup>*</sup>

a : Values represent the mean $\pm$ SE(n=10).

\* : p<0.01 vs control, \*\* : p<0.01 vs CPA 20 $\mu$ M

$\clubsuit$  : p<0.01 vs AFB<sub>1</sub> 50 $\mu$ M,  $\clubsuit^*$  : p<0.01 vs AFB<sub>1</sub> 100 $\mu$ M

**Table 8.** Effects of various mycotoxins on verapamil pretreated platelet  $[Ca^{2+}]_i$  elevation induced by arachidonic acid

Mycotoxins	Concentration( $\mu$ M)	Mean channel
Cyclopiazonic acid	Control	15.7 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>
	10	21.6 $\pm$ 0.13 <sup>**<math>\clubsuit</math></sup>
	20	21.4 $\pm$ 0.32 <sup>**<math>\clubsuit</math></sup>
	50	20.8 $\pm$ 0.11 <sup>*</sup>
Aflatoxin B <sub>1</sub>	Control	15.7 $\pm$ 0.13
	50	13.6 $\pm$ 0.09 <sup>*</sup>
	100	12.9 $\pm$ 0.11 <sup>**<math>\dagger</math></sup>
	200	12.2 $\pm$ 0.18 <sup>**<math>\dagger</math>,<math>\ddagger</math></sup>

a : Values represent the mean $\pm$ SE(n=10).

\* : p<0.01 vs control, \*\* : p<0.05 vs CPA 50 $\mu$ M

$\dagger$  : p<0.01, AFB<sub>1</sub> 50 $\mu$ M,  $\ddagger$  : p<0.01 vs AFB<sub>1</sub> 100 $\mu$ M

소판 세포안의 dense granule내에서 세포질내로 방출되는 칼슘에 미치는 영향을 알아본 결과를 Table 5에 나타내었다. CPA는 대조군  $15.3 \pm 0.15$ 에 비해서 10, 20과  $50 \mu\text{M}$  처리군에서 각각  $19.4 \pm 0.16$ ,  $18.8 \pm 0.23$  그리고  $21.5 \pm 0.10$ 으로 유의성 있게 증가하였다( $p < 0.01$ ). 그러나  $\text{AFB}_1$  처리군은 대조군과 평균 형광 channel의 유의성이 관찰되지 않았다. 곰팡이 독소가 PAF와 thrombin에 의해서 유발된 혈소판 세포안의 칼슘의 변화에 세포 밖에서 유입되는 칼슘의 양을 배제하기 위하여 칼슘 길항제인 verapamil을 처리하였을 때의 영향을 알아본 결과를 Table 6에 나타내었다. PAF에 의해서 세포질에서 증가한 칼슘에 CPA는 대조군  $17.6 \pm 0.08$ 에 비해서 오직  $10 \mu\text{M}$  처리군만 유의성 있게 증가하였다( $p < 0.05$ ). 그리고  $\text{AFB}_1$  처리군은 대조군의 평균 형광 channel이  $17.6 \pm 0.08$ 인데 비해 50, 100과  $200 \mu\text{M}$ 에서 각각  $13.5 \pm 0.15$ ,  $13.6 \pm 0.26$  그리고  $12.2 \pm 0.19$ 로 용량이 증가할수록 칼슘의 평균 형광 channel이 유의성 있게( $p < 0.01$ ) 감소하였다. 곰팡이 독소가 thrombin에 유발된 혈소판 세포질 안의 칼슘의 변화에 세포 밖에서 유입되는 칼슘의 양을 배제하기 위하여 칼슘 길항제인 verapamil을 처리하였을 때의 영향에서 CPA는 대조군에 비해 모든 처리군에서 유의성 있게 증가하였지만( $p < 0.01$ ) 용량의존적이지 않았다. 그리고  $\text{AFB}_1$  처리군은 대조군의 평균 형광 channel이  $28.3 \pm 0.21$ 인데 비해 50, 100과  $200 \mu\text{M}$ 에서 각각  $18.7 \pm 0.21$ ,  $17.3 \pm 0.18$  그리고  $15.3 \pm 0.07$ 로 용량이 증가할수록 칼슘의 평균 형광 channel이 유의성 있게( $p < 0.01$ ) 감소하였다. 곰팡이 독소가 ADP와 collagen에 유발된 혈소판 세포안의 칼슘의 변화에 세포 밖에서 유입되는 칼슘의 양을 배제하기 위하여 칼슘 길항제인 verapamil을 처리하였을 때의 영향을 알아본 실험결과를 Table 7에 요약하였다. ADP에 의하여 증가한 칼슘에서 CPA는 대조군  $13.4 \pm 0.$

21에 비해서 모든 처리군에서 유의성 있게( $p < 0.01$ ) 증가하였다. 그리고  $\text{AFB}_1$  처리군은 대조군의 평균 형광 channel이  $13.4 \pm 0.21$ 인데 비해 50, 100과  $200 \mu\text{M}$ 에서 각각  $12.4 \pm 0.15$ ,  $11.6 \pm 0.03$  그리고  $10.9 \pm 0.05$ 로 용량이 증가할수록 칼슘의 평균 형광 channel이 유의성 있게( $p < 0.01$ ) 감소하였다. 곰팡이 독소가 collagen에 유발된 혈소판 세포안의 칼슘의 변화에 세포 밖에서 유입되는 칼슘의 양을 배제하기 위하여 칼슘 길항제인 verapamil을 처리하였을 때 미치는 영향에서 CPA는 대조군  $17.2 \pm 0.78$ 에 비해서 10, 20과  $50 \mu\text{M}$  처리군에서 각각  $19.6 \pm 0.19$ ,  $19.4 \pm 0.11$  그리고  $21.6 \pm 0.23$ 으로 유의성 있게( $p < 0.01$ ) 증가하였다.  $\text{AFB}_1$  처리군은 대조군의 평균 형광 channel에 비해 용량의존적으로 유의성 있게( $p < 0.01$ ) 감소하였다. 곰팡이 독소가 A.A.에 의해서 유발된 혈소판 세포안의 칼슘의 변화에 세포 밖에서 유입되는 칼슘의 양을 배제하기 위하여 칼슘 길항제인 verapamil을 처리하였을 때의 영향을 알아본 결과를 Table 8에 나타내었다. CPA는 대조군  $15.7 \pm 0.13$ 에 비해서  $10 \mu\text{M}$ 은  $21.6 \pm 0.16$ ,  $20 \mu\text{M}$ 은  $21.4 \pm 0.32$ 이고  $50 \mu\text{M}$  처리군은  $20.8 \pm 0.11$ 로 유의성 있게 증가하였다( $p < 0.01$ ). 그리고  $\text{AFB}_1$  처리군은 대조군의 평균 형광 channel이  $15.7 \pm 0.13$ 인데 비해 50, 100과  $200 \mu\text{M}$ 에서 각각  $13.6 \pm 0.09$ ,  $12.9 \pm 0.11$  그리고  $12.2 \pm 0.18$ 로 용량이 증가할수록 칼슘의 평균 형광 channel이 유의성 있게( $p < 0.01$ ) 감소하였다.

전자현미경을 이용한 혈소판의 초미세구조 : 곰팡이 독소가 토끼 혈소판의 미세구조에 미치는 영향에서 CPA 처리군은 혈소판 세포질내 소기관에는 영향이 없었지만 혈소판 활성화 혹은 응집촉진의 표시인 형태의 변화(shape change)를 관찰할 수 있었다(Fig 1). 그리고  $\text{AFB}_1$ 은 용매대조군과 비교하여 변화가 없었으나 일부 혈소판에서 매우 확장된 공포(vacuole)를 관찰할 수 있었다(Fig 2).



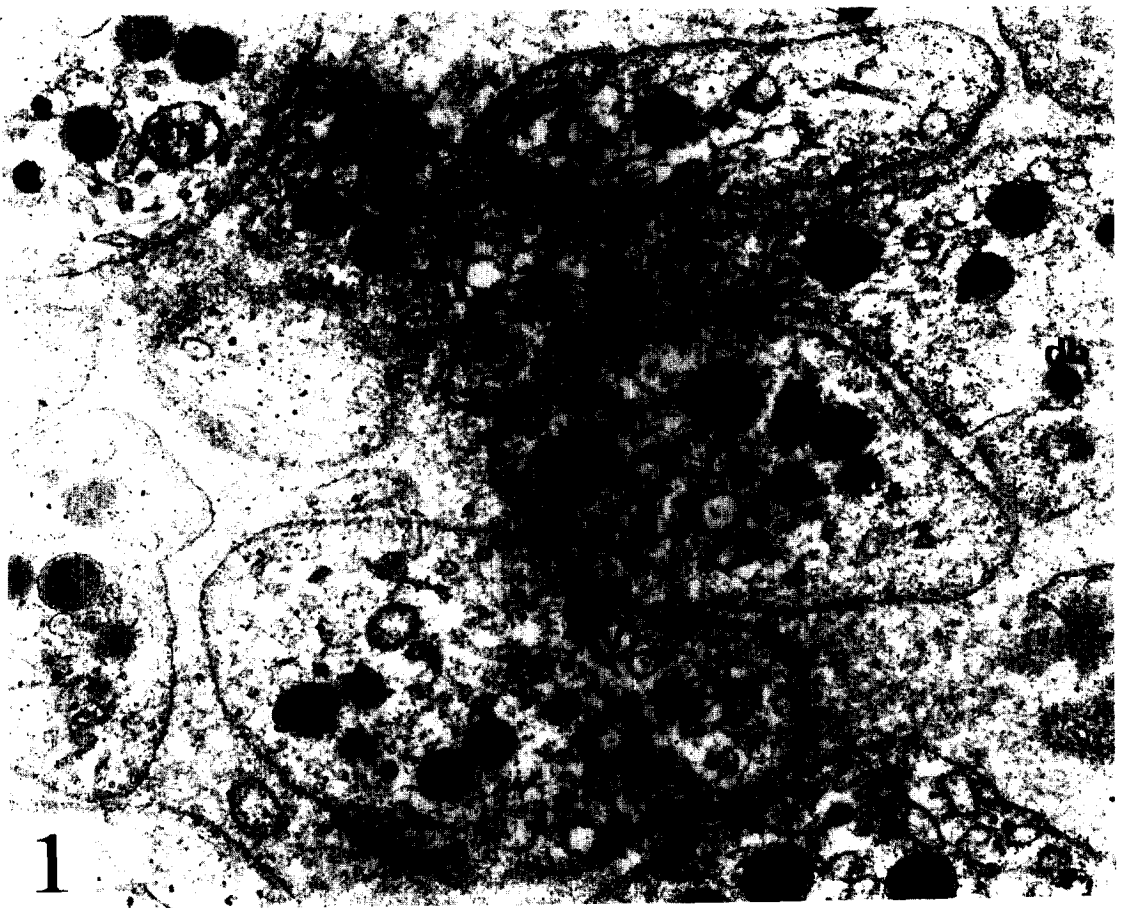


Fig 1. Rabbit platelets treated with 50 $\mu$ M of cyclopiiazonic acid. The presence of pseudopod and evidence of platelet aggregation promotion indicate moderate shape change. Vacuoles(V), mitochondria(m), dense body(db), granules(g),  $\times$  9,600.

## 고 찰

혈소판의 표면에는 세포막의 glycoprotein, glycolipid, mucopolysaccharide와 흡수된 혈장단백질로 구성되어 있는 크기가 14-20nm 정도인 fuzzy coat(glycocalyx)가 있다<sup>16</sup>. 형태는 원판형(discoid) 혹은 매우 평평한 표면과 양철(biconvex) 형태를 가진 수정체 모양(lentiform)이며 지름

은 1.3-4.7 $\mu$ m이고 두께가 0.5 $\mu$ m 정도 된다<sup>17</sup>. 혈소판이 외부 자극에 의해서 활성화 되면 세포막의 빠른 변형으로 세포질내 과립의 방출이 일어나 칼슘 및 다양한 A.A. 대사산물을 세포 밖으로 내보내며 이것들이 일련의 혈소판 반응을 일으킨다<sup>1</sup>. 그래서 혈소판에서 중요한 반응인 secretion에 영향을 줄 수 있는 항혈전약물의 생체내 검색에 유용한 방법<sup>18</sup>이 제시되기도 하였다. 혈소판은 활성화시 형태학적으로 위족(pseudopod)을 형성하며 혈소판 세포막에 있는 수축 단백질의 길이가 짧아져서 세포질



Fig 2. Rabbit platelets treated with 200 $\mu$ M of aflatoxin B<sub>1</sub>. Large vacuoles(V) are detected in a few platelets. Glycogen(arrow), mitochondria(m), dense body(db), granules(g),  $\times$  9,600

내 과립이 세포질 중앙으로 배열하게 된다<sup>19</sup>. 혈소판이 독성물질에 의하여 영향을 받으면 크고 불규칙한 형태의 과립, microtubule의 파괴 및 약간의 응집 등과 같은 초미세구조의 변화를 관찰할 수 있다<sup>20</sup>. 혈소판이 응집되어 과립 감소(degranulation)가 일어나면 형태는 원판형에서 타원형으로 바뀌고 OCS(open canalicular system의 channel)와 분비 소기관의 융합이 일어나며, microtubule의 circumferential band와 hyaloplasmic microfilament mass가 세포의 중심부위로 이동한다. 이것이 계속 진행되어

발생하는 비가역적인 응집시 granular and filamentous elements가 융합되어 dense mass가 형성되며 OCS 안에서 과립과 dense body를 관찰할 수 있다<sup>21</sup>. 본 실험에서 AFB<sub>1</sub> 처리군은 대조군과 비교하여 혈소판의 형태학적 변화는 관찰되지 않았으나 일부 혈소판에서 OCS의 변형 형태인 확장된 공포의 형성을 관찰할 수 있었고(Fig 4) CPA 처리군은 활성화되었음을 나타내주는 약간의 형태변화를 관찰할 수 있었다.

그리고 혈소판 세포막의 인지질 중 A.A. 함량과 혈소

판에서 A.A. pathway는 동물 종간에 많은 차이가 있어서 밭크, 돼지와 소는 A.A.에 의해서 혈소판이 응집되지 않지만, 사람의 혈소판은 A.A. pathway가 잘 발달되어 혈소판을 응집시키는 TXB<sub>2</sub>를 50nM 이상 생성한다<sup>22</sup>. 또한 혈소판 응집은 A.A.의 중간 대사산물들에 대하여 특이하고 민감하게 작용하여 모든 동물에서 그 대사산물중의 하나인 PGE<sub>1</sub>은 3.1μM의 농도에서 ADP에 의한 혈소판 응집을 완전히 억제한다<sup>4</sup>.

이제까지 혈소판 활성화 시 세포내외에 존재하는 칼슘의 역할을 이해하기 위하여 칼슘과 결합시 형광을 띠는 칼슘 지시약으로 aequorin, quin 2 혹은 fura 2 등을 이용하였다. 그러나 칼슘측정시 quin 2는 외부에 칼슘이 존재하지 않을 때 세포내 칼슘을 chelation시켜 혈소판 응집과 칼슘의 방출을 억제한다고 하였다<sup>23</sup>. 또한 혈소판 활성화와 세포질내 칼슘과의 상호작용에 관한 연구는 quin 2보다 aequorin으로 염색하는 것이 좋다고 하였다<sup>24</sup>. 그러나 칼슘측정시 이것들보다 rhodamine, fluo-1, 2나 3로 염색하는 것이 훨씬 좋은 형광의 해상도를 보인다고 하였다<sup>25</sup>. 그중에서도 488nm의 여기파장과 530nm의 방출파장을 가지는 fluo-3는 혈소판 안으로 유입될 때 혈소판 세포내 fluo-3 분포의 차이 때문에 측정에 약간의 어려움이 있음에도 pH에 대하여 덜 민감하고 칼슘과 결합시 다른 것보다 더 많은 형광을 띠는 잇점때문에 현재 fluo-3를 가장 많이 이용한다<sup>9</sup>. 그래서 본 실험에서는 FCM을 이용한 세포내 칼슘동원의 확인에 많이 이용하고 있는 방법으로 fluo-3AM을 세포안으로 쉽게 유입시키기 위하여 표면활성제인 pluronic F-127을 병행처리하여 칼슘을 측정하였다.

최근에 AFB<sub>1</sub>은 PIP<sub>2</sub>를 DG와 IP<sub>3</sub>로 가수분해하는 역할을 하는 PLC를 활성화시킨다고 하였다<sup>11</sup>. 또 CPA는 Ca<sup>++</sup> pump ATPase 억제제로 세포내 칼슘저장부위의 막 투과성을 증가시켜 세포질내 칼슘을 증가시키는 특징을 갖는다고 하였다<sup>12</sup>. 따라서 본 실험에서는 CPA와 AFB<sub>1</sub>이 토끼 혈소판의 응집기전에 미치는 영향을 알아보아 출혈의 원인을 이해하고자 하였다. 또한 AA 대사산물과 혈소판 응집기전의 관련성을 알아보기 위하여 그 대사산물인 PGE<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub>와 PGF<sub>2α</sub>를 정량하였다. 대사산물중 PGE<sub>2</sub>는 혈소판 응집과 과립의 방출을 억제하는 작용이 있는 cAMP 생성을 증가시키며 thrombin과 collagen은 적용된 농도에 따라 ADP 방출 혹은 PG endoperoxides 형성 그리고 TXA<sub>2</sub>와는 독립적으로 혈소판의 형태를 변화시킬 수 있다<sup>26</sup>. 그리고 PGE<sub>2</sub>와 D<sub>2</sub>는 세포질내 칼슘 증가,

ADP에 의한 혈소판 응집 및 cAMP 생성을 억제하며 칼슘을 증가시켜 혈소판 응집을 유발하는 ADP와는 반대 기전을 가진다고 하였다<sup>8</sup>. 또한 세포질내 칼슘저장부위에서 방출된 칼슘은 혈소판의 기능조절에 중요하며 혈소판 활성화시 second messenger로서 역할을 하므로<sup>27</sup> 본 실험에서도 세포질내 칼슘의 동원을 FCM으로 측정하여 그 변화를 알아보았다. 본 실험에서 칼슘을 세포질내로 방출하기 위하여 사용한 혈소판 응집인자 중 ADP는 IP<sub>3</sub>와 혈소판의 세포질내 칼슘을 증가시키며 증가된 칼슘의 일부는 세포 밖에서 유입되기도 한다<sup>24</sup>. 혈소판의 활성화는 칼슘동원물질(mobilizing agent)로서 작용을 하는 IP<sub>3</sub>의 형성과 관련이 있고<sup>28</sup>, PAF는 토끼 혈소판에서 약 5초내에 IP<sub>3</sub>를 4-5배 정도 증가시키고 세포내 칼슘의 동원을 유발하여 혈소판의 형태를 변화시키며 세포외에서 유입한 칼슘이 작용하여 혈소판을 응집시키고 serotonin을 방출시키므로 PAF에 의한 혈소판 응집은 세포외 칼슘이 필수적이라고 하였다<sup>29</sup>. 특히 사람의 혈소판에서 세포질내 칼슘의 증가는 수용체에 의한 기전을 통해서 직접 조절되었고 IP<sub>3</sub>의 생성은 그런 기전과는 관련성이 없었다고 하였다<sup>30</sup>. 또 collagen에 의한 칼슘의 동원은 비교적 적은 양이었으며 10μg/ml의 농도에서는 혈소판의 칼슘 동원을 확인할 수 없다고 한 결과<sup>26</sup>를 본 실험에서도 확인하였는데 즉, collagen에 의한 자극초기에는 오히려 칼슘의 형광이 일시적으로 감소하였으며 평균 형광 channel도 다른 응집인자로 유도할 때보다 작음을 예비 시험결과에서 확인하여 collagen의 적용농도를 20μg/ml로 정하여 실험하였다. 그리고 thrombin은 세포내 저장부위에 기인한 칼슘의 농도를 용량의존적으로 증가시키며 비록 천천히 작용하지만 탈 분극, 알칼리화와 과립감소는 세포외 칼슘을 이용할 수 있을 때에만 발생하며<sup>31</sup>, 0.5U/ml에서 세포질내 칼슘을 증가시킨다는 보고<sup>28</sup>를 참고하여 최종농도를 정하였다. 또한 곰팡이 독소에 의한 혈소판의 형태학적 변화를 투과전자현미경으로 관찰하여 혈소판 응집기전과의 상관관계를 알아보았다. 그리고 CPA는 A.A. 대사산물 생성에 어떤 영향도 미치지 않았지만 AFB<sub>1</sub>은 PGE<sub>2</sub>의 생성을 증가시켜 혈소판 응집억제의 기전으로 제시될 수 있었고 또한 곰팡이 독소가 칼슘의 동원에 미치는 영향을 알아본 실험결과 CPA는 모든 응집인자에 의해서 유도된 혈소판 세포질내 칼슘을 증가시켜(Table 3과 4) 세포내 칼슘저장부위의 막 투과성을 증가시켜 세포질내 칼슘을 증가시킨다는 결과<sup>32</sup>와

일치하였다. AFB<sub>1</sub>은 collagen의 경우만 제외하고 모든 응집인자에 의하여 유도된 칼슘의 방출을 농도의존적으로 감소시켰다. 이 결과로 미루어 보면 AFB<sub>1</sub>이 PKC를 활성화시켜 PIP<sub>2</sub>를 IP<sub>3</sub>로 가수분해하며<sup>11</sup>, 혈소판의 활성화는 칼슘동원물질로서 역할을 하는 IP<sub>3</sub>의 형성과 관련이 있다는 결과<sup>28</sup>와는 달리 혈소판의 응집을 억제하고 칼슘의 방출을 감소시켰으며 이것은 AFB<sub>1</sub>의 혈소판 반응과정에서 IP<sub>3</sub>와는 다른 기전으로 작용할 수 있음을 말해 주고 있지만 보다 뚜렷한 기전을 밝히기 위해서는 추가적인 실험이 요구된다. 한편 voltage dependent Ca<sup>++</sup> influx blocker인 verapamil은 PAF에 의한 A.A.의 방출을 억제하며<sup>13</sup>, ADP에 의해 증가된 세포질내 칼슘과 혈소판 응집은 verapamil의 전처리에 의해서 변화가 없기 때문에 증가한 일부의 칼슘은 칼슘통로를 통해서 증가하는 것은 아니라고 하였다<sup>8</sup>. 이와 비교하여 verapamil을 전처리 한 경우에도 CPA는 모든 응집인자에 의해서 유도된 칼슘의 방출을 증가시켰으며 AFB<sub>1</sub>은 PAF와 collagen을 제외한 응집인자에 의해 칼슘의 방출을 감소시켰다(Table 6, 7과 8). 그래서 verapamil을 전처리한 실험결과로부터 혈소판 응집인자에 의해서 증가한 세포질내 칼슘은 세포질내 저장부위 뿐만아니라 세포외에서도 일부 유입됨을 알 수 있었다. 그리고 칼슘방출실험을 비교하여본 결과 ADP, AA 그리고 PAF에 의한 세포외의 칼슘유입은 칼슘통로와 관련이 있는 것 같았으며 thrombin과 collagen은 관련이 없는 것 같았다. 혈소판이 활성화되는 경로는 칼슘과 관계가 있지만 세포질내 칼슘만이 혈소판 활성을 일으키는 요인은 아니며<sup>24</sup> 세포외에 칼슘이 전혀 없는 조건에서 혈소판의 응집과 방출반응은 세포질내 칼슘의 증가량이 중요하며 또한 세포질내 칼슘의 양에는 변화 없이 응집과 방출을 자극할 수도 있다고 하였다<sup>33</sup>. 또한 최근에는 혈소판내에 칼슘이 증가하면 이곳에 존재하는 constitutive type의 nitric oxide synthase(NOS)를 활성화시켜 nitric oxide의 생성을 증가시키고 이것은 혈소판의 응집을 억제한다고<sup>34</sup> 하면서 이제까지 혈소판 응집기전에서 칼슘의 역할과는 다른 결과를 보고하였다. 이런 모든 결과는 혈소판 응집과 칼슘의 동원 및 기능 그리고 arachidonic acid의 대사산물의 생성과의 관련성을 이해하는데 도움이 될 것이다.

## 결 론

본 실험은 곰팡이 독소가 토끼 혈소판의 응집기전에 어떻게 작용하는지 알아보아 중독시 나타나는 출혈의 원인을 이해하기 위하여 수행하였다. 본 목표의 연구를 위하여 세포질내 칼슘의 양을 증가시키는 것으로 알려져 있는 곰팡이 독소인 CPA, 중독시 위장관 등의 출혈을 유발하는 것으로 알려진 AFB<sub>1</sub>을 이용하여 혈소판의 응집억제 및 촉진에 A.A.의 어떤 대사산물이 중요하게 작용하는지 알아보기 위하여 대사산물을 박충크로마토그래피하여 정량하였다. 그리고 혈소판 활성화시 중요한 세포내 second messenger로 알려진 세포질내 칼슘을 fluo-3AM으로 혈소판을 염색한 후 FCM을 이용하여 세포질내에서 칼슘의 변화를 알아보았다. 또 곰팡이 독소에 의한 혈소판의 미세구조 변화를 확인하기 위하여 전자현미경적 소견을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. A.A.의 대사산물 생성에 CPA는 어떤 영향도 미치지 않았으나 AFB<sub>1</sub>은 PGE<sub>2</sub>의 생성을 증가시켰다.

2. 혈소판의 칼슘저장부위인 dense granule에서 세포질로 방출된 칼슘의 결과를 보면 CPA는 모든 혈소판 응집인자에 의해서 유발된 칼슘의 방출을 증가시켰다. AFB<sub>1</sub>은 collagen을 제외한 혈소판 응집인자에서 칼슘의 방출을 농도의존적으로 감소시켰다. 한편 세포 외에서 유입되는 칼슘을 배제하기 위하여 verapamil을 전처리한 경우에 CPA는 PAF를 제외한 모든 혈소판 응집인자에 의해서 유발된 칼슘의 방출을 증가시켰고, AFB<sub>1</sub>은 PAF를 제외한 혈소판 응집인자에서 칼슘의 방출을 농도의존적으로 감소시켰다. 그래서 verapamil을 전처리한 실험결과에 의해 세포질내에서 증가한 칼슘은 세포 외에서도 많이 유입됨을 알 수 있었다.

3. 곰팡이 독소가 토끼 혈소판의 미세구조에 미치는 영향에서 CPA 처리군은 혈소판이 활성화될 때 나타나는 형태학적 변화를 관찰할 수 있었고 AFB<sub>1</sub> 처리군은 형태학적 변화는 없었으나 일부 혈소판에서 매우 확장된 공포를 관찰할 수 있었다. CPA의 혈소판 응집촉진기전은 A.A.의 대사산물 형성과는 관련이 없이 세포질내로 칼슘의 방출과 관련이 있었고 형태학적으로 혈소판 활성화의 표시인 형태변화를 관찰할 수 있었다. 또 AFB<sub>1</sub>의 혈소판 응집억제는 PGE<sub>2</sub>와 PGF<sub>2</sub>의 생성증가 및 세포질내로 칼슘의 방출억제와 밀접한 관련이 있었으며 일부 혈소판에서 관찰되는 공포를 제외하고는 형태학적으로 변화가 없었다. 이런 결과는 혈소판 응집에서 칼슘의 동원 및 기능을 이해하기 위한 연구의 기초자료로 제

시할 수 있다.

## 참 고 문 헌

1. Holmsen H. Platelet metabolism and activation. *Semin Hematol*, 22: 219-240, 1985.
2. Vargaftig BB, Chignard M, Benveniste J. Present concepts on the mechanisms of platelet aggregation. *Biochem Pharmacol*, 30: 263-271, 1981.
3. Lundholm CE, Bartonek M. A study of the effects of p,p'-DDE and other related chlorinated hydrocarbons on inhibition of platelet aggregation. *Arch Toxicol*, 65: 570-574, 1991.
4. Hwang DH. The platelet physiology and pharmacology. *Academic press*: 289-303, 1985.
5. Shin L, Chen WC, Yang TP, et al. Chlorobutanol, a preservative of desmopressin, inhibits human platelet aggregation and release *in vitro*. *Thromb Haemost*, 64: 473-477, 1990.
6. Gasser JA, Betteridge DJ. Comparison of the effects of carvedilol, propranolol, and verapamil on *in vitro* platelet function in healthy volunteers. *J Cardiovasc Pharmacol*, 18(Suppl. 4): S29-S34, 1991.
7. Stanze M, Lundholm E. The effects of mercury compounds and p,p'-DDE on platelet aggregation. *Pharmacol Toxicol*, 71: 159-160, 1992.
8. Jennings LK, Dockter ME, Wall CD, et al. Calcium mobilization in human platelet a using Indo-1 and flow cytometry. *Blood*, 74: 2674-2680, 1989.
9. Ozaki Y, Yatomi Y, Kume S. Evaluation of platelet intracellular calcium ion concentration with flow cytometry. *Jpn J Clin Pathol*, 40: 282-286, 1992.
10. Rijkers GT, Justement LB, Griffioen AW, et al. Improved method for measurement intracellular  $Ca^{++}$  with fluo-3. *Cytometry*, 11: 923-927, 1990.
11. Heever LHVD, Dirr HW. Effects of aflatoxin B<sub>1</sub> on human platelet protein kinase C *Int J Biochem*, 23: 839-843, 1991.
12. Demarex N, Lew DP, Kruse KH. Cyclopiazonic acid depletes intracellular  $Ca^{2+}$  stores and activates an influx pathway for divalent cations in HL-60 cells. *J Biol Chem*, 267: 2318-2324, 1992.
13. Fernandez B, Balsinde J. Receptor-mediated activation of arachidonic acid release in mouse peritoneal macrophages is linked to extracellular calcium influx. *Biochem Biophys Res Commun*, 180: 1036-1040, 1991.
14. Tolins JP, Melemed A., Sulciner D, et al. Calcium channel blockade inhibits platelet activating factor production by human umbilical vein endothelial cells. *Lipids*, 26: 1218-1222, 1991.
15. Smith IL, Smith EA. Inhibition of PAF-induced activation of human platelets by verapamil. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 3: 759-763, 1992.
16. Beuter E, Lichtman MA, Collier BS, et al. *Williams Hematology*. 5th ed, McGraw-Hill, Inc : 447-462, 1995.
17. Jain CN. Schalm's Veterinary Hematology. Lea & Febiger press, Philadelphia : 447-462, 1986.
18. Smith JB, Burke SE, Lefer AM, et al. Continuous measurement of ATP secretion *in vivo*. *Pharmaceutical Res*, 15: 40-43, 1984.
19. White JG. Effects of ethylenediamine tetracetic acid (EDTA) on platelet structure. *Scan J Haemat*, 5: 241-254, 1968.
20. Bondy GS, Gentry PA, Basrur PK. Structure-function relationship of the action of T-2 toxin on bovine platelets. *Fund Appl Toxicol*, 12: 109-116, 1989.
21. White JG, Estensen RD. Degranulation of discoid platelet. *Am J Pathol*, 68: 289-296, 1972.
22. Meyers KM, Katz JB, Clemmons RM, et al. An evaluation of the arachidonate pathway of platelets from companions and food-producing animals, mink and man. *Thromb Res*, 20: 13-24, 1980.
23. Hatayama K, Kambayashi K, Nakamura T, et al. Fluorescent  $Ca^{2+}$ -indicator quin 2 and intracellular  $Ca^{2+}$  antagonist in platelet reaction. *Thromb Res*, 38: 505-512, 1985.
24. Ware JA, Johnson PC, Smith M, et al. Effect of common agonists on cytoplasmic ionized calcium concentration in platelets. Measurement with 2-methyl-6-methoxy-8-nitroquinoline(Quin 2) and aequorin. *J Clin Invest*, 77: 878-886, 1986.
25. Minta A, Kao JPY, Tsien RY. Fluorescent indicators

- for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophore. *J Biol Chem*, 264: 8171-8178, 1989.
26. Kinlough-Rathbone RL, Packham MA, Reimers HJ, *et al*. Mechanisms of platelet shape change, aggregation, and release induced by collagen, thrombin, or A23, 187. *J Lab Clin Med*, 90: 707-719, 1977.
27. Detwiler TC, Charo IF, Feinman RD. Evidence that calcium regulates platelet function. *Thrombos. Haemostas.(Stuttg.)*, 40: 207-211, 1978.
28. Watson SP, Reep BR, Mcconnel RT, *et al*. Collagen stimulates (<sup>3</sup>H)-inositol triphosphate formation in indomethacin-treated human platelets. *Biochem. J*, 226: 831-837, 1985.
29. Shukla SD. Platelet activating factor-stimulated formation of inositol triphosphate in platelets and its regulation by various agents including Ca<sup>2+</sup>, indomethacin, CV-3988, and forskolin. *Arch Biochem Biophys*, 240: 674-681, 1985.
30. Uemura Y, Sakon M, Kawasaki T, *et al*. The correlation between Ca<sup>2+</sup> influx ( $\Delta[Ca^{2+}]_i$ ) and inositol 1,4,5-triphosphate(IP<sub>3</sub>) formation(IP<sub>3</sub>) in platelet stimulated by various agonists. *Biochemical Internationale*, 20: 853-861, 1990.
31. Davies TA, Drotts DL, Weil GJ, *et al*. Cytoplasmic Ca<sup>++</sup> is necessary for thrombin-induced platelet activation. *J Biol Chem*, 264: 19600-19606, 1989.
32. Singh RS, Sharma MK, Chander H. Incidence of penicillium toxins in milk and milk products. *Indian J Anim Sci*, 62: 285-286, 1992.
33. Berridge MJ. Inositol triphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem J*, 220: 345-360, 1984.
34. Murugandam A, Mutus B. Isolation of nitric oxide synthase from human platelets. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1200: 1-6, 1994.
-