

Cyclopiazonic acid 및 aflatoxin B₁이 토끼의 혈소판 응집 및 ATP 방출에 미치는 영향

홍 충 만*** · 조 명 행**

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

Effects of cyclopiazonic acid and aflatoxin B₁ on rabbit platelet aggregation and ATP release

Choong-man Hong***, 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 : Cyclopiazonic acid(CPA) known as stimulating the release of intracellular calcium, aflatoxin B₁(AFB₁) causing gastrointestinal hemorrhage frequently were used as model toxic mycotoxins in these studies. First of all, the effects of various mycotoxins on the platelet aggregation response were determined. The effects of mycotoxins on the ATP release from platelet by aggregating factors were investigated. The results and conclusions obtained from these studies are : 1) CPA promoted ADP, collagen, thrombin, A.A. and PAF-induced rabbit platelet aggregation. AFB₁ inhibited collagen, A.A. and PAF-induced rabbit platelet aggregation only. 2) CPA increased both aggregation and disaggregation time, whereas AFB₁ decreased in a dose dependent manner. 3) CPA increased ADP, thrombin, A.A. and PAF-induced ATP release. AFB₁ increased A.A.-induced ATP release and decreased PAF-induced release in a dose dependent manner. In conclusion, CPA promoted platelet aggregation by the increase of ATP. Antiaggregating effects of AFB₁ may be due to decreases of ATP. These data provide the basis for the future study of roles of ATP release in platelet aggregation.

Key words : cyclopiazonic acid(CPA), aflatoxin B₁(AFB₁), platelet aggregation, ATP release.

서 론

혈소판의 중요한 작용중의 하나는 생체내에서 외부 자극에 대한 출혈을 방지하는 것이다. 혈소판의 유착과 응집은 외부자극에 의하여 혈관이 손상을 받았을 때 나타나는 최초의 지혈반응이며 혈소판의 다양한 반응이 동맥경화증, 심맥관계 및 뇌혈관 질환과 같은 성인병의 발병과 매우 밀접한 관련이 있다는 것은 널리 알려진 사실이다¹. 사람이나 가축의 건강에 유해한 외인성 물질 및 혈소판의 작용과 관계가 있는 신약 등을 연구하는데 매우 기초적이고 유용한 실험방법인 혈소판 응집반응은 사람이나 동물의 혈액을 이용하여 *in vitro*에서 쉽게 연구할 수 있어 많은 연구자들은 다양한 실험을 수행하였다. 수은 화합물²과 곰팡이 독소인 T-2 독소에 의한 혈소판 응집억제^{3,4}가 그 예이다.

혈소판 응집시험에서 흔히 사용하는 혈소판 응집인자의 특징을 보면 ADP, epinephrine과 collagen은 혈소판이 응집될 때 세포내 cAMP을 감소시키며, PAF와 thrombin은 IP₃(inositol-1,4,5-triphosphate)의 생성을 촉진시키는 것으로 알려져 있다⁵. 그리고 ATP와 반응하여 빛을 내는 Luciferin-luciferase를 이용하여 thrombin과 collagen은 혈소판 응집에 중요한 ATP를 방출하는 것을 밝혀냈다⁶.

많이 알려진 곰팡이 독소인 aflatoxin을 토끼에 투여하면 APTT(activated partial thromboplastin time)와 PT(prothrombin time)가 길어지고 fibrinogen, factor V, VIII과 IX의 활성이 감소한다고 하였다⁷. 그리고 aflatoxin 중독시 혈액응고시간을 연장하였으며⁸, 중독시 보이는 혈액응고 장애의 원인은 주로 간장에서 혈액응고와 관련된 단백질의 합성을 감소시키기 때문이라고 하였다⁹. 한편 세계적으로 널리 분포하며 주로 저장된 곡식 등에서 분리되는 곰팡이 독소인 cyclopiazonic acid(CPA)는 *Penicillium cyclopium* Westling 균주에서 최초로 정제하였다¹⁰. 이외에도 CPA는 *aspergillus*와 *penicillium*의 몇 종에서 생성되는 2차 대사산물로 중독시 소화관의 미만성 충혈(congestion)과 출혈이 특징이다¹¹.

따라서 본 실험에서는 중독시 출혈과 관련이 있는 CPA와 AFB₁을 이용하여 토끼 혈소판의 응집정도를 측정하고 응집과 매우 밀접한 관련이 있는 것으로 알려진 ATP의 정량을 통해서 곰팡이 독소인 CPA와 AFB₁이 토끼 혈소판의 응집기전에 미치는 영향을 알아보았다.

재료 및 방법

실험동물 및 시험물질 : 실험동물은 식품의약품안전본부 독성연구소에서 분양받은 토끼(수컷, New Zealand White, 2-3kg)를 사용하였으며 고형사료(신촌사료) 및 물을 자유급식시키면서 채혈에 이용하였다. 시험물질인 aflatoxin B₁과 cyclopiazonic acid는 SIGMA(USA)에서 구입하여 DMSO에 녹여 실험에 사용하였다. 그리고 ADP, collagen 등과 같은 혈소판 응집인자와 Chrono-Lume[®] (Luciferin-luciferase)은 Chronolog사(USA)에서 구입하여 실험에 사용하였다.

시험군의 설정 : 시험군은 각각의 곰팡이 독소별로 3개의 처리군과 1개의 용매대조군으로 정하였다. 즉 AFB₁은 용매대조군(DMSO), 50, 100과 200 μ M 그리고 CPA는 용매대조군(DMSO), 10, 20과 50 μ M의 처리군으로 구분하여 혈소판 응집시험과 ATP 방출시험에 이용하였다.

혈소판의 준비 : 토끼에서 혈소판의 준비방법을 간략히 설명하면 항응고제(sodium citrate, 3.8%)를 채운 20ml 주사기로 심장에서 채혈하여 혈액과 항응고제의 부피의 비가 9:1(v/v) 되게 잘 혼합하였다. 이 항응고제 처리한 혈액을 실온에서 1,000rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 platelet rich plasma(PRP)로 이용하였고, 나머지를 다시 4℃에서 3,000rpm으로 10분간 원심하여 상층액을 platelet poor plasma(PPP)로 이용하였다. 최종적으로 실험에 사용할 PRP는 자동혈액세포 분석기(H1 system, Technicon, USA)로 혈소판의 수를 측정한 후, 개수가 500,000개/ μ l되게 PPP로 희석하여 혈소판 응집시험과 ATP 측정에 이용하였다.

Platelet rich plasma를 이용한 혈소판 응집시험 : PRP를 이용한 혈소판 응집시험에서 사용한 응집인자는 collagen 20 μ g/ml, 생리식염수로 녹인 adenosine diphosphate (ADP) 10 μ M, thrombin 1.6U/ml, 10% bovine serum albumin (BSA)에 녹인 A.A. 1mM 그리고 chloroform에 20 μ g/10 μ l의 농도로 제품화된 platelet activating factor(PAF)를 에탄올로 20 μ g/100 μ l로 희석한 후, 최종농도가 4 μ g/ml 되게 tyrode buffer(NaCl 138mM, KCl 2.7mM, NaHCO₃ 12mM, NaH₂PO₄ 0.3mM, Glucose 5.5mM, MgCl₂ 2mM, CaCl₂ 1mM, Bovine serum albumin 0.1%)로 다시 희석하여 사용하였다. 용량반응곡선으로 나타나는 응집정도는 Lumi-aggregometer(Model 560Ca, Chronolog사, USA)를 이용하여 측정하였다. 시험 방

법은 PRP 240 μ l와 용매대조군, aflatoxin B₁은 50, 100과 200 μ M 그리고 cyclopiazonic acid는 10, 20과 50 μ M의 농도로 곰팡이 독소 5 μ l를 37 $^{\circ}$ C에서 1,000rpm으로 stir bar가 회전하는 반응용기에서 2분간 전배양시킨 후 각각의 혈소판 응집인자 5 μ l를 넣어 2분간 응집곡선을 관찰하여 곰팡이 독소가 토끼의 혈소판 응집에 미치는 영향을 알아보았다. 특히 collagen은 다른 응집인자와 달리 첨가한 후 응집을 시작하는데 lag phase가 존재하므로 5분간 관찰하였다. 그리고 응집인자인 PAF는 어느 정도의 시간이 지나면 다시 응집이 감소하는 특징이 있기 때문에 PAF를 넣어 응집하기 시작한 시간부터 응집이 감소하기 시작하는 시간을 측정하여 그 차이를 비교 분석하였다.

Luciferin-luciferase를 이용한 혈소판내에서 방출된 ATP 측정 : ATP는 Chrono-Lume[®](Chronolog, USA)과 결합했을 때 luminescence를 방출하는 특징이 있다. 이런 원리를 이용하여 토끼의 혈소판이 응집인자에 의해 응집하는 동안 dense granules에서 분비되는 ATP의 양에 곰팡이 독소가 어떤 영향을 주는지 알아보기 위해 Lumi-aggregometer를 이용하여 측정하였다. 실험방법을 간략히 설명하면 우선 PRP를 이용하여 ATP 표준량을 측정하기 위해서 37 $^{\circ}$ C에서 stir bar가 1000rpm의 속도로 회전하는 반응 용기에 PRP 238 μ l와 증류수로 녹여 만든 Chrono-Lume 12 μ l를 넣고 여기에 생리식염수로 녹인 2nmole의 ATP 표준액을 첨가하여 표준 luminescence를 구하였다. 그런 후 PRP 228 μ l, Chrono-Lume[®] 12 μ l와 응집 시험과 동일한 농도의 곰팡이 독소 5 μ l를 전배양시킨 후 혈소판 응집인자인 ADP 10 μ M, collagen 20 μ g/ml, arachidonic acid 1mM, thrombin 1.6U/ml과 PAF 4 μ g/ml의 최종농도로 넣어 반응시켰다. 그리고 아래와 같은 계산식에 의해서 혈소판에서 방출된 ATP를 정량하였다.

* 토끼 혈소판에서 방출되는 ATP의 양

$$= \frac{\text{Luminescence of test}}{\text{Gain of test}} \times \frac{\text{Gain of standard}}{\text{Luminescence of standard}} \times \text{Quantity of standard}$$

통계처리 : 모든 실험결과의 통계학적 처리는 95%와 99% 수준에서 용매대조군과 처리군의 유의성을 Student's t-test를 실시하였다.

결 과

혈소판 응집시험 : 곰팡이 독소가 ADP와 collagen에 의해서 유발된 토끼 혈소판 응집에 미치는 영향을 Table 1에 나타내었다. ADP에 의한 혈소판 응집은 CPA 10과 20 μ M 처리군에서는 대조군과 비교하여 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았으나 50 μ M 처리군에서는 대조군의 혈소판 응집정도 40.9 \pm 5.96에 비해 55.1 \pm 7.05로 유의성 있게 증가하였다(p<0.001). 그러나 AFB₁ 처리군은 대조군과 비교하여 통계학적 유의성이 관찰되지 않았다. Collagen에 의한 혈소판 응집은 모든 CPA 처리군에서 대조군 57.2 \pm 8.09에 비해 각각 62.7 \pm 5.77, 65.4 \pm 5.84와 68.0 \pm 5.09로 매우 유의성 있게(p<0.01과 p<0.001) 혈소판 응집이 증가하였다. AFB₁ 처리군은 용량의존적으로 대조군 68.3 \pm 4.70, 66.7 \pm 4.86 그리고 61.9 \pm 4.44로 통계학적으로 유의성 있게(p<0.05와 p<0.001) 혈소판 응집을 감소시켰다. 곰팡이 독소가 thrombin과 arachidonic acid에 의해서 유발된 토끼 혈소판 응집에 미치는 영향을 Table 2에 나타내었다. Thrombin에 의한 혈소판 응집은 모든 CPA 처리군에서 대조군 53.5 \pm 6.39에 비해 각각 58.5 \pm 5.54(p<0.01), 60.6 \pm 4.62와 63.9 \pm 5.41(p<0.001)로 매우 유의성 있게 혈소판 응집을 증가시켰다. 그러나 AFB₁ 처리군에서는 대조군에 비해 통계학적 유의성이 관찰되지 않았다. A.A.에 의하여 유발된 혈소판 응집은 모든 CPA 처리군에서 대조군 55.5 \pm 4.04에 비해 각각 60.7 \pm 4.66, 61.6 \pm 2.99와 62.5 \pm 2.21로 매우 유의성 있게(p<0.001) 혈소판 응집을 증가시켰다. 그리고 AFB₁ 처리군은 대조군 62.7 \pm 5.08에 비해 100과 200 μ M 처리군에서 57.9 \pm 4.98(p<0.05)과 49.6 \pm 7.07(p<0.001)로 통계학적으로 유의성 있게 억제시켰다. 곰팡이 독소가 PAF에 유발된 토끼 혈소판 응집에 미치는 영향을 Table 3에 나타내었다. 모든 CPA 처리군에서 대조군 39.5 \pm 4.89에 비해 각각 43.8 \pm 3.85(p<0.001), 48.9 \pm 2.64와 60.3 \pm 3.20으로 매우 유의성 있게(p<0.001) 혈소판 응집을 증가시켰다. AFB₁ 처리군에서 55.8 \pm 3.82와 50.8 \pm 1.83(p<0.001)으로 통계학적 유의성 있게 억제시켰다. PAF에 의해서 유발된 토끼의 혈소판 응집이 시작하는 시간부터 응집이 분리(disaggregation)될 때까지 소요되는 시간에 곰팡이 독소가 미치는 영향은 CPA 20 그리고 50 μ M 처리군에서 대조군 48.8 \pm 5.90에 비해 각각 60.0 \pm 5.89와 84.5 \pm 8.83으로 매우 유의성 있게(p<0.001) 시간을 증가시켰

Table 1. Effects of mycotoxins on rabbit platelet aggregation by ADP and collagen

Mycotoxins	Concentration(μ M)	Aggregation	
		ADP	Collagen
Cyclopiazonic acid	Control	40.9 \pm 5.96 †	57.2 \pm 8.09
	10	40.0 \pm 7.18	62.7 \pm 5.77**
	20	44.0 \pm 6.20	65.4 \pm 5.84***
	50	55.1 \pm 7.05***	68.0 \pm 5.09***
Aflatoxin B ₁	Control	40.9 \pm 4.62	68.3 \pm 4.70
	50	43.2 \pm 5.08	66.7 \pm 4.86
	100	42.5 \pm 3.86	65.0 \pm 5.19*
	200	43.0 \pm 4.59	61.9 \pm 4.44***

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

* : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001 vs control

Table 2. Effects of mycotoxins on rabbit platelet aggregation by thrombin and arachidonic acid

Mycotoxins	Concentration(μ M)	Aggregation	
		Thrombin	Arachidonic acid
Cyclopiazonic acid	Control	53.5 \pm 6.39	55.5 \pm 4.04
	10	58.5 \pm 5.54**	60.7 \pm 4.66***
	20	60.6 \pm 4.62***	61.6 \pm 2.99***
	50	63.9 \pm 5.41***	62.5 \pm 2.21***
Aflatoxin B ₁	Control	69.1 \pm 4.31	62.7 \pm 5.08
	50	71.0 \pm 4.38	
	100	70.0 \pm 4.39	57.9 \pm 4.98*
	200	71.8 \pm 4.54	49.6 \pm 7.07***

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

* : p<0.05, ** : p<0.01, *** : P<0.001 vs control

다. 그리고 AFB₁ 처리군은 대조군에 비해 모든 처리군에서 통계학적으로 유의성 있게(p<0.05) 시간을 시켰다.

혈소판내에서 방출된 ATP 측정 : 토끼의 혈소판을 ADP와 collagen으로 응집시킬 때 유리되는 ATP의 양에 곰팡이 독소가 미치는 영향을 Table 4에 나타내었다. ADP에 의하여 유리되는 ATP의 양에 AFB₁ 처리군에서는 대조군과 비교하여 통계학적 유의성이 관찰되지 않았지만 CPA 50 μ M 처리군에서는 대조군 0.10 \pm 0.02에 비해 0.15 \pm 0.04로 통계학적 유의성 있게(p<0.05) 증가시켰다. 토끼의 혈소판을 collagen으로 응집시킬 때 유리되는 ATP에 곰팡이 독소가 미치는 영향은 CPA와 AFB₁ 처리군에서 모두 대조군과 비교하여 통계학적 유의성이 관찰되지 않았다. 토끼의 혈소판을 thrombin과 arachidonic acid로 응집시킬 때 유리되는 ATP에 곰팡이 독소가 미치는 영향을 Table 5에 나타내었다. Thrombin에 의하여 유리된 ATP에 AFB₁ 처리군은 대조군과 비교하여 통계학적 유의성이 관찰되지 않았다. 그러나 CPA는 대조군 1.

74 \pm 0.31에 비해 20과 50 μ M 처리군에서 각각 농도의존적으로 2.08 \pm 0.09(p<0.05)와 3.51 \pm 0.42(p<0.001)로 통계학적 유의성 있게 증가시켰다. 토끼의 혈소판을 A.A.로 응집시킬 때 유리되는 ATP에 곰팡이 독소가 미치는 영향에서 CPA는 대조군 1.06 \pm 0.16에 비해 20과 50 μ M 처리군에서 각각 1.28 \pm 0.13(p<0.05)과 1.79 \pm 0.34(p<0.001)로 통계학적 유의성 있게 용량의존적으로 증가시켰다. 그리고 AFB₁ 처리군은 대조군에 비해서 100과 200 μ M에서 1.07 \pm 0.42와 1.27 \pm 0.47nmole로 증가시켰다. 토끼의 혈소판을 PAF로 응집시킬 때 유리되는 ATP에 곰팡이 독소가 미치는 영향을 Table 6에 나타내었다. CPA는 대조군 1.22 \pm 0.46에 비해 10, 20과 50 μ M 처리군에서 각각 2.18 \pm 0.50(p<0.01), 2.57 \pm 0.78과 3.83 \pm 0.62(p<0.001)이며 통계학적 유의성 있게 용량의존적으로 증가시켰다. 그리고 AFB₁ 처리군에서는 대조군 1.22 \pm 0.46에 비해 200 μ M에서만 0.88 \pm 0.23으로 유의성 있게(p<0.05) 감소시켰다.

Table 3. Effects of mycotoxins on rabbit platelet aggregation and time to disaggregation by platelet activating factor

Mycotoxins	Concentration(μ M)	Aggregation	Disaggregation time(second)
Cyclopiazonic acid	Control	39.5 \pm 4.89	48.8 \pm 5.90
	10	43.8 \pm 3.85**	52.0 \pm 5.50
	20	48.9 \pm 2.64***	60.0 \pm 5.89***
	50	60.3 \pm 3.20***	84.5 \pm 8.83***
Aflatoxin B ₁	Control	63.5 \pm 1.38	94.0 \pm 4.82
	50	61.2 \pm 2.48	78.2 \pm 5.64†
	100	55.8 \pm 3.82***	69.0 \pm 4.10†
	200	50.8 \pm 1.83***	57.2 \pm 7.20†

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

* : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001 vs control

Table 4. Effects of mycotoxins on rabbit platelet ATP release by ADP and collagen

Mycotoxins	Concentration(μ M)	ATP release(nmole)	
		ADP	Collagen
Cyclopiazonic acid	Control	0.10 \pm 0.02	2.42 \pm 0.75
	10	0.12 \pm 0.04	2.52 \pm 0.56
	20	0.13 \pm 0.04	2.31 \pm 0.80
	50	0.15 \pm 0.04†	2.47 \pm 0.65
Aflatoxin B ₁	Control	0.10 \pm 0.02	2.42 \pm 0.75
	50	0.11 \pm 0.02	2.36 \pm 0.56
	100	0.10 \pm 0.02	2.01 \pm 0.43
	200	0.09 \pm 0.02	2.06 \pm 0.52

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

* : p<0.05, ** : p<0.01, *** : P<0.001 vs control

고찰

포유동물의 순환혈액 중에서 가장 작은 세포인 혈소판은 지혈작용 및 혈전형성에 중요한 역할을 하며¹², 혈소판이 외부자극에 의해서 활성화 되면 세포막의 빠른 변형으로 응집과 세포질내 과립의 방출이 일어나 ATP와 ADP 등을 세포 밖으로 방출한다¹³. 그래서 혈소판에서 중요한 반응인 secretion에 영향을 줄 수 있는 항혈전약물의 생체내 검색에 유용한 방법⁶이 제시되기도 하였다. 생체내에서 혈소판은 혈관의 subendothelium에 유착되어 응집이 일어나는데 그중 낮은 농도의 ADP와 epinephrine에 의해서 발생하는 가역적인 반응이 primary wave aggregation이며 강한 자극, 세포내 혈전생성물질의 방출 및 collagen에 의해서 발생하는 비가역적인 반응을 secondary

wave aggregation이라고 한다¹⁴. 그중 특징적인 것은 혈소판 응집인자인 collagen에 의한 혈소판 활성화 약 10-20초 정도의 lag phase 후에 발생하는데 이것은 본 실험에서도 확인할 수 있었다. 혈소판 세포막에는 sialic acid와 -SH기가 풍부하며¹⁵, 그중 sialic acid는 순환하는 혈소판의 aging과 관련이 있으며¹⁶ 지질 친화도가 높은 물질일수록 혈소판의 막에 잘 분포하는 특징이 있다³⁴. 그리고 혈전형성과 혈소판 응집의 작용기전 연구를 위한 빠르고 효과적인 생체내 모델로서 cyclooxygenase 억제제인 aspirin을 전처리한 후, 혈소판 응집인자인 A.A.를 정맥내로 투여하여 그 결과를 관찰하는 방법을 이용할 수 있었다¹⁷.

AFB₁은 혈액응고 단백질 합성에 미치는 연구⁹, 랫드에서 혈액응고시간 연장¹⁸ 및 혈청 단백질로서의 ³H-amino acid 결합⁹ 등을 통해 중독시 발생하는 출혈의 기전을 설명하였다. 또 CPA는 중독시 소화관에 출혈과 출혈이 특징이며 Ca⁺⁺ pump ATPase 억제제로 세포내 칼슘저장부

Table 5. Effects of various mycotoxins on rabbit platelet ATP release by thrombin and arachidonic acid

Mycotoxins	Concentration(μ M)	ATP release(nmole)	
		Thrombin	Arachidonic acid
Cyclopiazonic acid	Control	1.74 \pm 0.31	1.06 \pm 0.16
	10	1.86 \pm 0.48	1.07 \pm 0.17
	20	2.08 \pm 0.09 [†]	1.28 \pm 0.13 [†]
	50	3.51 \pm 0.42 ^{**}	1.79 \pm 0.34 ^{**}
Aflatoxin B ₁	Control	1.74 \pm 0.02	1.06 \pm 0.16
	50	2.06 \pm 0.30	1.09 \pm 0.26
	100	2.00 \pm 0.26	1.07 \pm 0.42 [†]
	200	1.80 \pm 0.31	1.27 \pm 0.47 [†]

† : Values represent the mean \pm SE(n=10).
 * : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001 vs control

Table 6. Effects of various mycotoxins on rabbit platelet ATP release by platelet activating factor

Mycotoxins	Concentration(μ M)	ATP release(nmole)
Cyclopiazonic acid	Control	1.22 \pm 0.46
	10	2.18 \pm 0.50 ^{**}
	20	2.57 \pm 0.78 ^{***}
	50	3.83 \pm 0.62 ^{***}
Aflatoxin B ₁	Control	1.22 \pm 0.46
	50	1.07 \pm 0.17
	100	1.20 \pm 0.31
	200	0.88 \pm 0.23 [†]

† : Values represent the mean \pm SE(n=10).
 * : p<0.05, ** : p<0.01, *** : P<0.001 vs control

위의 막 투과성을 증가시켜 세포질내 칼슘을 증가시키는 특징을 갖는다고 하였다¹⁹. 따라서 본 실험에서는 CPA와 AFB₁이 토끼 혈소판의 응집기전중 응집정도와 ATP의 상호관련성을 이해하고자 하였다. 실험중 채혈한 혈액과 항응고제의 부피의 비가 정확하게 9:1 되게 잘 혼합해야 하는 점을 항상 주의해야 한다. 그 이유는 항응고제의 양에 약간만 차이가 있어도 응집에 많은 영향을 주기 때문이다. 많은 양의 혈장을 얻기 위해서 혈액을 실온에서 원심분리하여 PRP를 얻었으며 4℃에서 원심분리를 하여 PPP를 얻었다. 그리고 다양한 혈소판 응집인자를 이용하여 응집과 혈소판 세포 밖으로의 ATP 방출을 정량하였다. 이때 사용한 혈소판 응집인자인 ADP와 thrombin²⁰은 cAMP 형성을 억제하여 혈소판 응집을 유도하며 PAF²¹은 ADP 방출과는 다른 기전을 통하여 혈소판의 반응을 일으킨다. Collagen은 적용된 농도에 따라 ADP를 방출시킬 수 있다²². 그리고 thrombin은 0.5U/ml에서 ATP 방출을 4배 많이 일으킨다는 보고²³를 참고

하여 최종농도를 정하였다. 혈소판 응집시험에서는 CPA는 ADP에 의한 혈소판 응집을 50 μ M 농도에서만 촉진시켰고 나머지 응집인자에 대해서는 모든 농도에서 유의성 있게 촉진시켰다. AFB₁은 ADP와 thrombin을 제외한 다른 응집인자에 의한 혈소판 응집을 억제하였다. PAF에 의한 혈소판 응집시험에서 disaggregation time은 CPA 처리군에서는 시간이 늘었고 AFB₁에서는 줄었다 (Table 3). 이런 결과는 대부분의 응집인자에 의한 혈소판 응집을 촉진시키는 CPA는 혈소판 응집체의 안정성을 증가시켜 혈소판 응집체가 disaggregation 되는 시간이 그만큼 길어지는 것이며 AFB₁처럼 응집을 억제하는 경우는 혈소판 응집체가 안정하지 못하여 빠른시간 안에 응집인자를 처리하기 전의 응집정도로 회복되기 때문이다. 이 결과는 T-2 toxin을 처리하면 PAF에 의해 유도된 혈소판 응집형성의 속도 및 정도에 손상을 주고 응집체가 비교적 불안정한 특징을 가지는 응집억제 기전과 비교하여 설명할 수 있었다³⁴. 그리고 CPA 50 μ M 처리군에

서 ADP에 의한 혈소판 응집을 증가시키는 것과 혈소판 내 저장부위에서의 ATP 방출은 관련이 있었다. 그리고 AFB₁은 ADP에 의해서 유도된 혈소판 응집과 ATP 방출에서 모두 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았다(Table 1과 4). Collagen에 의해 유도된 CPA의 혈소판 응집촉진과 AFB₁의 혈소판 응집억제(Table 1)는 ATP 방출과 직접적인 관련은 없었지만(Table 4) CPA 20과 50 μ M 처리군에서 thrombin에 의한 혈소판 응집촉진(Table 2)과 ATP 방출의 증가(Table 5)는 관계가 있음을 알 수 있었다. 그러나 AFB₁은 thrombin에 의한 혈소판 응집과 ATP 방출에는 영향을 주지 않았다. CPA 50 μ M 처리군은 ADP에 의한 ATP 방출을 증가시켜(Table 4) 혈소판의 응집을 촉진시킨다는 결과(Table 1)와 관련성이 있음을 나타내 주고 있었다. 그러나 AFB₁ 100과 200 μ M 처리군에서는 A.A.에 의한 ATP 방출을 증가시켰지만 동일한 농도에서 혈소판 응집은 오히려 감소시켜 두 지표간에 반비례하는 결과를 보였다. PAF에 의하여 유도시 CPA 처리군에서는 혈소판 응집증가와 ATP 방출증가 농도의존적으로 밀접한 관련이 있었고 AFB₁ 처리군에서는 최고농도인 200 μ M에서만 혈소판 응집억제와 ATP 방출억제와의 관련성을 보였다.

결 론

본 연구는 세포질내 칼슘의 농도를 증가시키는 것으로 알려져 있는 곰팡이 독소인 cyclopiazonic acid(CPA)와 중독시 위장관 등의 출혈을 유발하는 것으로 알려진 aflatoxin B₁(AFB₁)을 이용하여 이들 곰팡이 독소가 토끼 혈소판의 응집정도 및 ATP 방출에 미치는 영향을 관찰하여 중독시 나타날 수 있는 출혈의 기전을 이해하기 위하여 수행하였다. 곰팡이 독소가 토끼 혈소판의 응집정도에 미치는 영향을 다양한 혈소판 응집인자 [ADP, thrombin, collagen, arachidonic acid(A.A.)와 platelet activating factor(PAF)]를 이용하여 측정하였으며 혈소판의 응집과 직접적으로 관련이 있는 ATP의 방출을 정량하였다. 본 연구에서 얻어진 주요한 결과는 다음과 같다.

1. 혈소판 응집시험에서 CPA는 모든 혈소판 응집인자에 의해서 유발된 토끼의 혈소판 응집을 촉진하였고 AFB₁은 ADP와 thrombin을 제외한 혈소판 응집인자에 의해서 유발된 혈소판 응집을 억제하였다.
2. PAF에 의해서 유발된 혈소판 응집시험에서 disaggregation time을 측정할 결과 CPA 처리군은 농도의

존적으로 시간이 늘었고 AFB₁은 농도의존적으로 줄었다.

3. 방출된 ATP 정량실험에서 CPA는 collagen을 제외한 모든 혈소판 응집인자에 의한 ATP 방출을 농도의존적으로 증가시켰고 그리고 AFB₁은 A.A.에 의한 ATP 방출은 증가시켰지만 PAF에 의한 방출은 감소시켰다.

이와같은 실험결과를 통해 CPA는 토끼의 혈소판 응집을 촉진하였고 그 기전에 ATP 방출의 촉진이 관련이 되는 것으로 사료된다. 그리고 AFB₁의 혈소판 응집억제는 ATP 방출억제와 밀접한 관련이 있었다. 이런 결과를 통해 혈소판 응집반응에서 ATP 방출의 역할 등의 기전을 이해하기 위한 기초자료로 제시할 수 있다.

참 고 문 헌

1. Krug HF, Berndt J. Inhibition of pesticide of prostaglandin formation in blood platelet. *Blut*, 51: 19-23, 1985.
2. Stanze M, Lundholm E. The effects of mercury compounds and p,p'-DDE on platelet aggregation. *Pharmacol Toxicol*, 71: 159-160, 1992.
3. Grandoni KM, Gentry PA, Holub BJ, et al. Comparative effects of trichothecene mycotoxins on bovine platelet function : Acetyl T-2 toxin, a more potent inhibitor than T-2 toxin. *Mycotoxin Res*, 6: 61-66, 1992.
4. Bondy GS, Gentry PA, Basur PK. Structure-function relationship of the action of T-2 toxin on bovine platelets. *Fund Appl Toxicol*, 12: 109-116, 1989.
5. 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.
6. Smith JB, Burke SE, Lefer AM, et al. Continuous measurement of ATP secretion *in vivo*. *Pharmaceutical Res*, 15: 40-43, 1984.
7. Clark JD, Greene CE, Calpin JP, et al. Induced aflatoxicosis in rabbits : Blood coagulation defects. *Toxicol Appl Pharmacol*, 86: 353-361, 1986.
8. Baker DC, Green RA. Coagulation defects of aflatoxin intoxicated rabbits. *Vet Pathol*, 24: 62-70, 1987.

9. Baker DC, Green RA. 3H-amino acid incorporation into proteins during chronic aflatoxin induced coagulation defects in rabbits. *Toxicol*, 26: 803-808, 1988.
10. Holzapfel CW. The isolation and structure of cyclopiazonic acid, a toxic metabolite of *Penicillium cyclopium* Westling. *Tetrahedron*, 24: 2101-2119, 1968.
11. Gould DJ, Hill CE. Alpha1B-receptors and intracellular calcium mediate sympathetic nerve induced constriction of rat irideal blood vessels. *J Auton Nerv Syst*, 50: 139-150, 1994.
12. Wojenski CMI, Silver MJ. A quick method for screening platelet dysfunctions using the whole blood Lumi-aggregometer. *Thromb Haemostas*, 51: 154-156, 1984.
13. Holmsen H. Platelet metabolism and activation. *Semin Hematol*, 22: 219-240, 1985.
14. Brownlee M, Cerami A. The biochemistry of the complications of diabetes mellitus. *Ann Rev Biochem*, 50: 385-432, 1981.
15. Carty DJ, Gear ARL. Fractionation of platelets according to size : Functional and biochemical characteristics. *Am J Hematol*, 21: 1-14, 1986.
16. Kotzw HF, Van WV, Badenhorst PN, *et al*. Influence of platelet membrane sialic acid and platelet-associated Ig G on ageing and sequestration of blood platelets in baboons. *Thromb Haemost*, 70: 676-680, 1993.
17. Silver MJ, Hoch W, Kocsis JJ, *et al* : Arachidonic acid causes sudden death in rabbits. *Science*, 183: 1085-1087, 1974.
18. Babaruni EA, Bassir O. The effect of aflatoxin on blood clotting in the rat. *Br J Pharmacol*, 37: 497-500, 1969.
19. Demaurex N, Lew DP, Kruse KH. Cyclopiazonic acid depletes intracellular Ca²⁺ stores and activates an influx pathway for divalent cations in HL-60 cells. *J Biol Chem*, 267: 2318-2324, 1992.
20. Brass LF, Laposata M. Diacylglycerol cause Ca⁺⁺ release from the platelet dense tubular system : Comparisons with Ca⁺⁺ release caused by inositol 1,4,5-triphosphate. *Biochem Biophys Res Commun*, 142: 7-14, 1987.
21. Shukla SD. Platelet activating factor-stimulated formation of inositol triphosphate in platelets and its regulation by various agents including Ca²⁺, indomethacin, CV-3988, and forskolin. *Arch Biochem Biophys*, 240: 674-681, 1985.
22. 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.
23. Watson SP, Reep BR, Mcconnel RT, *et al*. Collagen stimulates (3H)-inositol triphosphate formation in indomethacin-treated human platelets. *Biochem J*, 226: 831-837, 1985.