

Sambutoxin이 토끼의 혈소판 응집에 미치는 영향

홍충만** · 조명행¹

식품의약품안전청 독성연구소 병리부 혈액병리과, ¹서울대학교 수의과대학

Effects of Sambutoxin on the Rabbit Platelet Aggregation

Choong Man Hong and Myung Haeng Cho¹

Department of Pathology, National Institute of Toxicology Research, Korea FDA, 5 Nokbun-Dong, Eunpyung-Ku, Seoul 122-704, Korea

¹College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

(Received July 1, 1998)

(Accepted August 2, 1998)

ABSTRACT : Sambutoxin, a newly purified mycotoxin in Korea, caused hemorrhage in the stomach and intestine of rats. To elucidate the mechanism of hemorrhage, effects of sambutoxin on rabbit platelet aggregation were investigated. First of all, the effects of sambutoxin on the platelet aggregation response and ATP release from platelet by various aggregating factors were investigated. And then the role of Ca^{2+} on the platelet aggregation was investigated by flow cytometer. Finally, morphological effect of sambutoxin on platelet ultrastructure was examined by transmission electron microscope. Sambutoxin inhibited aggregation induced by ADP, collagen, thrombin, and arachidonic acid and decreased platelet activating factor-induced disaggregation time in a dose dependent manner. Sambutoxin also decreased thrombin and arachidonic acid-induced ATP release, but increased all factors induced Ca^{2+} release. Sambutoxin showed severe ultrastructural changes of platelet such as appearance of disorganization debris of cellular organelle in intercellular space. Our results indicate that sambutoxin inhibits rabbit platelet aggregation, and it may be partly due to the decrease of ATP release. However, it is not clear whether the antiaggregating effect of sambutoxin is related to Ca^{2+} increase.

Key Words : Sambutoxin, Platelet Aggregation, ATP Release, Ca^{2+} Release

I. 서 론

혈소판 응집은 최초의 지혈과정이며, *Fusarium* 종이 생성하는 T-2 독소(Bondy, 1989)뿐만아니라 *Aspergillus* 종(Omar, 1991)에 의해서 생성되는 오크라톡신과 같은 몇몇의 곰팡이 독소에 의해서 영향을 받는 매우 민감한 반응이다. 혈소판에 영향을 주는 기전은 *in vitro*에서 매우 용이하게 연구할 수 있다(Hwang, 1985). 특히 토끼의 혈소판은 약물을 시험하거나, 지혈 및 출혈과 같은 혈소판의 기능에 영향을 주는 다양한 독성물질을 연구하기 위한 목적으로 흔히 사용한다(Shukla, 1985). 다양한 종의 *Fusarium*은 세계적으로 널리 분포하며 사람과 가축에 영향을 주는 유독한 곰팡이 독소를 생성하기 때문에(Reddy and Hayes, 1994) 지난 수십년간

Fusarium 종은 많은 연구자들의 관심이 되고 있다. 본 실험에서 사용한 곰팡이 독소인 sambutoxin(분자량 453, $C_{28}H_{39}NO_4$)은 최근 한국에서 분리한 균주인 *Fusarium sambucinum* PZF-4로부터 정제한 새로운 출혈성 곰팡이 독소로 랫드에서 체중감소와 위장관 출혈을 유발하고 특히 계태아에 독성(LC_{50} 가 29.6 $\mu\text{g}/\text{egg}$)이 있었다(Kim과 Lee, 1994; Kim 등, 1995). 따라서 본 실험의 목적은 최근 한국에서 세계 최초로 분리되었으나 실험동물에서의 위장관 출혈만이 보고되어 있을뿐 일반적인 연구가 부족한 sambutoxin이 토끼 혈소판의 응집에 미치는 영향을 알아보는 것이다. 이런 실험 목적을 위하여 곰팡이 독소에 의한 토끼 혈소판의 응집 정도 측정, 응집과 관련이 있는 ATP 정량 및 혈소판 세포질내 칼슘을 측정하여 응집과의 관련성을 알아보았으며 전자현미경을 이용하여 곰팡이 독소에 의한 혈소판의 초미세구조 변화를 관찰하였다.

**To whom correspondence should be addressed

II. 재료 및 방법

1. 실험동물 및 시험물질

실험동물은 식품의약품안전청 실험동물자원실에서 분양받은 토끼(수컷, New Zealand White, 2~3 kg)를 사용하였으며 고형사료(신촌사료) 및 물을 자유 급식 시키면서 채혈에 이용하였다. 시험물질인 sambutoxin은 서울대학교 농업생명과학대학 농생물학과 이인원 교수님에게서 기증받아 메탄올에 녹여 사용하였다. 그리고 adenosine diphosphate(ADP) 등과 같은 혈소판 응집인자와 Chrono-Lume®(Luciferin-luciferase)은 Chronolog사(USA) 그리고 fluo-3-acetoxymethyl(fluo-3AM), pluronic F-127은 Sigma(USA)에서 구입하여 실험에 사용하였다.

2. 시험군의 설정

시험군은 용매대조군(메탄올)과 sambutoxin 40, 100 및 150 μM 의 처리군으로 구분하여 혈소판 응집시험, adenosine triphosphate(ATP) 방출량 및 혈소판의 세포질내로 방출되는 칼슘의 변화를 측정하는 실험에 사용하였다. 그러나 전자현미경을 이용한 혈소판의 초미세 구조 변화의 관찰은 최고농도인 150 μM 만을 적용하여 실시하였다.

3. 혈소판의 준비

토끼에서 혈소판의 준비는 Grandoni 등(1990)의 방법을 변형하여 수행하였다. 방법을 간략히 설명하면 항응고제(sodium citrate, 3.8%)를 채운 주사기로 십장 채혈하여 혈액과 항응고제를 9:1(v/v)로 잘 혼합하였다. 이것을 실온에서 원심(200×g, 10분)하여 상층액을 platelet rich plasma(PRP)로 이용하였고, 나머지를 다시 4°C에서 원심하여(1,300×g, 10분) 상층액을 platelet poor plasma(PPP)로 이용하였다. 최종적으로 실험에 사용할 PRP는 자동혈액세포 분석기(H1 system, Technicon, USA)로 혈소판의 수를 측정후, 수가 5×10^5 개/ μl 되게 PPP로 희석하여 혈소판 응집시험과 ATP 측정에 이용하였다.

4. PRP를 이용한 혈소판 응집시험

PRP를 이용한 혈소판 응집시험(Grandoni 등, 1990)에서 사용한 응집인자는 collagen 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 생리식염

수로 녹인 ADP 10 μM , thrombin 1.6 U/ml, 10% bovine serum albumin(BSA)에 녹인 arachidonic acid(A.A) 1 mM, 그리고 platelet activating factor(PAF)를 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 최종 농도되게 tyrode buffer로 희석하여 사용하였다. 혈소판 응집정도는 aggregometer(560Ca, Chronolog사, USA)를 이용하여 측정하였다. 시험 방법은 PRP 240 μl 와 용매대조군, 40, 100과 150 μM 의 농도가 되게 sambutoxin 5 μl 를 stir bar가 회전하는 37°C의 반응 용기에서 2분간 전배양시킨 후 각각의 혈소판 응집인자 5 μl 를 넣어 2분간 응집 곡선을 관찰하여 sambutoxin이 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.

5. Luciferin-luciferase를 이용한 혈소판 내에서 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 곱팡이 독소가 어떤 영향을 주는지 알아보기 위해 aggregometer를 이용하여 측정하였다. 측정은 Wojenski와 Silver의 방법(1984)에 따라 실시하였는데 간략히 설명하면 우선 PRP를 이용하여 ATP 표준량을 측정하기 위해서 stir bar가 회전하는 37°C의 반응 용기에 PRP 238 μl 와 증류수로 녹여 만든 Chrono-Lume® 12 μl 를 넣고 여기에 생리식염수로 녹인 2 nmole의 ATP 표준액을 첨가하여 표준 luminescence를 구하였다. 이렇게 만든 Chrono-Lume®은 냉장 보관하여 8시간 이내에 사용하였고 ATP는 냉장 보관하여 24시간 내에 사용하거나 -20°C에 보관하면서 2주 이내에 사용하였다. 그런 후 PRP 228 μl , Chrono-Lume® 12 μl 와 응집시험과 동일한 농도의 곱팡이 독소 5 μl 를 전 배양시킨 후 혈소판 응집인자인 ADP 10 μM , collagen 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, A.A. 1 mM, thrombin 1.6 U/ml과 PAF 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 최종 농도로 넣어 반응시켰다. 특히 ATP를 측정할 때는 항상 luminescence gain switch로 luminescence를 알맞게 조절하고 그 값을 기록하면서 측정하였으며 표준 ATP luminescence의 값을 이용하여 아래와 같은 계산식에 의해서 혈소판에서 방출된 ATP를 정량하였다.

*토끼 혈소판에서 방출되는 ATP의 양

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

6. Flow cytometer(FCM)를 이용한 혈소판 내 칼슘 이온의 변화 측정

칼슘에 민감한 새로운 형광염색 시약인 fluo-3는 수용성이기 때문에 혈소판내로 들어가지 못하므로 이것의 acetoxymethyl 유도체인 fluo-3AM을 이용하여 Ozaki 등(1992)의 방법에 따라 FCM으로 칼슘을 측정하였다. 본 실험에서는 지질 친화성이 있는 fluo-3AM을 혈소판내로 쉽게 넣기 위하여 표면활성제인 pluronic F-127을 함께 이용하였다. 즉, 최종 농도가 fluo-3AM은 40 μM , dimethyl sulfoxide(DMSO)로 녹인 pluronic F-127은 1.5 $\mu\text{g/ml}$ 되게 잘 섞은 후 소량씩 분주하여 사용시까지 냉동 보관하였다. 실험 방법은 토끼에서 항응고제(sodium citrate, 3.8%)를 채운 주사기로 심장 채혈한 혈액과 항응고제를 9:1(v/v)로 혼합하고 실온에서 원심분리(150 \times g, 15분)하여 PRP를 얻었다. 다음 단계로 fluo-3AM과 pluronic F-127 혼합액을 sonication한 후 이 중 100 μl 를 PRP 900 μl 와 잘 섞어 37°C에서 30분간 배양하여 혈소판내로 fluo-3AM을 넣었다. 이것을 실온에서 원심(850 \times g, 15분)하여 혈소판 pellet을 얻고 NaCl 140 mM, glucose 0.1%, hepes 3.8 mM, BSA 0.1%와 KCl 2.7 mM로 조성된 hepes buffered saline(HBS, pH 7.4)으로 균질화한 후 실온에서 원심분리(850 \times g, 15분)를 통해 3회 세척하여 혈소판 세포외에 존재하는 fluo-3AM을 제거하였다. 이것을 HBS로 재부유시킨 후, 자동혈액분석기로 측정하여 혈소판 수를 5×10^3 개/ μl 로 맞춘다. 이렇게 만들어진 혈소판 부유액을 곰팡이 독소와 함께 37°C에서 5분간 배양한 후 혈소판 응집인자(최종농도)인 ADP(5 μM), collagen(20 $\mu\text{g/ml}$), A.A.(0.1 mM), thrombin(0.5 U/ml)과 PAF(4 $\mu\text{g/ml}$)를 넣었다. 혈소판내 저장부위에서 세포질내로 방출되는 칼슘은 argon laser를 사용하는 FCM(EPICS CS, Coulter Co., USA)으로 1분간 측정하였다. 다른 응집인자에 비해 PAF에 의한 칼슘 방출은 빠르게 시작하고 빨리 끝나므로 20초간 측정하였다. 이때 FCM은 350 mW로 488 nm의 여기파장(excitation wavelength)과 525 nm band pass filter를 이용하여 방출파장(emission wavelength)을 결정하면서 평균 형광 channel의 변화를 알아보았다. 그리고 혈소판의 크기를

측정하는 log forward light scatter를 이용하여 세포 찌꺼기를 제거한 후, green integral fluorescence로 혈소판내 칼슘의 농도 변화를 측정하였다.

7. 전자현미경을 이용한 혈소판의 형태학적 변화

토끼를 3.8%의 sodium citrate로 채워져 있는 주사기로 심장 채혈한 혈액과 항응고제를 9:1(v/v)로 혼합하여 원심분리(200 \times g, 15분)한 후 PRP 층, 백혈구층 및 소량의 적혈구층을 pasteur 피펫으로 조심스럽게 얻어 wintrobe tube(내경 3 mm, 길이 115 mm, Adams, USA)에 넣었다. 여기에 용매인 메탄올과 sambutoxin 150 μM 을 10분간 처리한 후 재원심(1,000 \times g, 15분)하였다. 상층액부터 혈장, 백혈구, 혈소판과 적혈구층으로 구분이 됨을 확인하였고 이것들 중 최상층에 있는 혈장을 버리고 여기에 phosphate 완충액(pH 7.4, 0.1 M)으로 녹인 5% glutaraldehyde를 채워 실온에서 하루밤 1차 고정시켰다. 그 후 유리칼로 혈소판층 바로 아래를 절단하고 면봉으로 밀어내어 반고형의 혈소판 pellet을 얻었다. 다시 이것을 2.5%의 glutaraldehyde에 3시간 실온에서 2차 고정을 하였다. 이것을 1 mm³로 세척하고 phosphate 완충액(pH 7.4, 0.1 M)으로 세척한 후 다시 2% osmium tetroxide로 1시간 동안 후고정(postfixation)하였다. 이후의 방법은 Yamashiro 등(1983)의 방법에 따라 수행한 후, 초박절편기(Ultracut-S, Leica, Austria)로 60-80nm 두께의 절편을 만든 후 uranyl acetate와 lead acetate로 이중염색하여 투과전자현미경(CM12, Philip Ind., Co., Netherlands)을 이용하여 소견을 얻었다.

8. 통계처리

혈소판의 저장 부위에서 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 그 외 모든 실험 결과의 통계학적 처리는 95%와 99% 수준에서 용매대조군과 처리군의 유의성을 Student's t-test를 실시하였다.

III. 결 과

1. 혈소판 응집시험

Sambutoxin이 응집인자에 의해서 유발된 토끼 혈소

판 응집에 미치는 영향을 Table 1에 나타내었다. ADP에 의한 혈소판 응집에서 sambutoxin은 용량의존적으로 대조군에 비해 40, 100과 150 μM 처리군에서 각각 47.8 ± 4.28 , 36.9 ± 3.65 와 30.9 ± 3.40 으로 유의성있게 ($p < 0.05$ 와 $p < 0.001$) 혈소판 응집을 억제하였고, collagen에 의한 혈소판 응집도 대조군에 비해 40, 100과 150 μM 에서 각각 61.7 ± 4.32 , 50.9 ± 3.48 그리고 36.8 ± 3.76 으로 유의성있게 ($p < 0.001$) 혈소판 응집을 억제하였다. 그리고 thrombin에 의한 응집은 대조군 59.5 ± 6.71 에 비해 150 μM 처리군에서만 54.8 ± 6.80 으로 유의성있게 ($p < 0.05$) 혈소판 응집을 억제하였으며, A.A.에 의한 응집은 대조군에 비해 40, 100과 150 μM 처리군에서 각각 61.5 ± 3.74 ($p < 0.01$), 50.7 ± 5.41 그리고 43.9 ± 6.17 로 유의성있게 ($p < 0.001$) 억제하였다. Sambutoxin이 PAF에 유발된 혈소판 응집에 미치는 영향을 Table 2에 나타내었다. 대조군 55.1 ± 4.08 에 비해 모든 처리군에서 매우 유의성있게 ($p < 0.001$) 혈소판 응집을 억제하였다. 그리고 PAF에 의해서 유발된 토끼의 혈소판 응집이 시작하는 시간부터 응집이 분리

Table 1. Effect of sambutoxin on rabbit platelet aggregation by ADP, collagen, thrombin and arachidonic acid

Aggregating factor	Sambutoxin (μM)	Aggregation (%)	Inhibition (%)
ADP	Control	52.3 ± 4.03	-
	40	$47.8 \pm 4.28^*$	8.6
	100	$36.9 \pm 3.65^{***}$	29.5
	150	$30.9 \pm 3.40^{***}$	40.9
Collagen	Control	69.8 ± 4.10	-
	40	$61.7 \pm 4.32^*$	11.6
	100	$50.9 \pm 3.48^{**}$	27.1
	150	$36.8 \pm 3.76^{***}$	47.3
Thrombin	Control	59.5 ± 6.71	-
	40	58.1 ± 4.87	2.4
	100	57.8 ± 6.45	2.9
	150	$54.8 \pm 6.80^*$	7.9
Arachidonic acid	Control	68.7 ± 2.34	-
	40	$61.5 \pm 3.74^{**}$	10.5
	100	$50.7 \pm 5.41^{***}$	26.2
	150	$43.9 \pm 6.17^{***}$	36.1

\bar{x} : Values represent the mean \pm SE (n=10).
 \dagger : Inhibition % of control.
 *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ vs control.

Table 2. Effect of sambutoxin on rabbit platelet aggregation and time to disaggregation by platelet activating factor

Aggregating factor	Sambutoxin (μM)	Aggregation (%) [†]	Inhibition (%) [†]	Disaggregation time (second)
Platelet activating factor (PAF)	Control	55.1 ± 4.08	-	100.8 ± 22.69
	40	$47.5 \pm 4.38^{**}$	13.8	83.7 ± 7.37
	100	$42.7 \pm 5.21^{**}$	22.5	77.8 ± 14.20
	150	$41.3 \pm 4.43^{**}$	25.0	$67.1 \pm 8.20^*$

\bar{x} : Values represent the mean \pm SE (n=10).
 \dagger : Inhibition % of control.
 *: $p < 0.05$, **: $p < 0.001$ vs control.

(disaggregation)될 때까지 소요되는 시간을 측정한 결과, 150 μM 처리군에서만 대조군 100.8 ± 22.69 에 비해 유의성있게 시간을 감소시켰다.

2. 혈소판내에서 방출된 ATP 측정

토끼의 혈소판을 응집인자로 응집시킬 때 유리되는 ATP의 양에 sambutoxin이 미치는 영향을 Table 3에 나타내었다. ADP, collagen과 PAF에 의하여 유리되는 ATP의 양은 sambutoxin을 처리한 경우 대조군과 비교하여 통계학적 유의성이 관찰되지 않았다. Thrombin에 의하여 유리된 ATP의 양은 대조군에 비해 150 μM 처리군에서 1.12 ± 0.26 nmole로 감소시켰으며, A.A.의 경우는 대조군과 비교하여 100과 150 μM 에서 각각 0.73 ± 0.21 과 0.84 ± 0.21 로 통계학적 유의성있게 ($p < 0.05$) 감소시켰다.

3. FCM을 이용한 칼슘이온의 변화

혈소판 응집인자에 의해서 유발된 혈소판의 저장 부위에서 세포질로 방출되는 칼슘에 sambutoxin이 어떤 영향을 미치는지 Table 4에 나타내었다. ADP, thrombin, collagen, A.A.와 PAF에 유발된 혈소판 세포안의 dense granule내에서 세포질내로 방출되는 칼슘에 미치는 영향은 sambutoxin의 모든 처리군에서 대조군에 비해 평균 형광 channel이 통계학적으로 유의성있게 ($p < 0.05$, $p < 0.01$) 증가하였지만 용량의존적이지는 않았다.

Table 3. Effect of sambutoxin on rabbit platelet ATP release by collagen, thrombin, arachidonic acid and platelet activating factor

Aggregating factor	Sambutoxin (μM)	ATP release (nmol) [†]
Collagen	Control	1.06 ± 0.05
	40	1.42 ± 0.49
	100	1.30 ± 0.18
	150	0.88 ± 0.16
Thrombin	Control	1.56 ± 0.44
	40	1.35 ± 0.40
	100	1.16 ± 0.33
	150	$1.12 \pm 0.26^*$
Arachidonic acid	Control	1.14 ± 0.20
	40	1.03 ± 0.21
	100	$0.73 \pm 0.21^*$
	150	$0.84 \pm 0.21^*$
Platelet activating factor	Control	1.97 ± 0.53
	40	2.15 ± 0.35
	100	1.56 ± 0.34
	150	1.58 ± 0.18

\bar{x} : Values represent the mean \pm SE (n=10).
 *: $p < 0.05$ vs control.

Table 4. Effect of sambutoxin on platelet calcium elevation induced by ADP, thrombin, arachidonic acid, PAF and collagen

Aggregating factor	Sambutoxin (μM)	Mean fluorescence ¹
ADP	Control	30.4 \pm 0.35
	40	41.7 \pm 0.42**
	100	41.6 \pm 1.61**
	150	40.1 \pm 0.38**
Thrombin	Control	28.5 \pm 0.20
	40	34.0 \pm 0.93**
	100	34.0 \pm 0.23**
	150	34.4 \pm 0.36**
Arachidonic acid	Control	21.2 \pm 0.29
	40	23.1 \pm 0.24*
	100	23.0 \pm 0.26*
	150	21.9 \pm 0.52*
Platelet activating factor	Control	24.4 \pm 0.37
	40	69.7 \pm 3.35**
	100	60.9 \pm 1.78**
	150	60.0 \pm 2.80**
Collagen	Control	15.2 \pm 0.12
	40	22.2 \pm 0.57**
	100	21.3 \pm 0.89**
	150	21.2 \pm 0.39**

¹: Values represent the mean \pm SE (n=10).

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

4. 전자현미경을 이용한 혈소판의 초미세구조

토끼 혈소판의 미세구조에 미치는 영향에서 대조군에 비해 sambutoxin 처리군은 혈소판의 심한 손상을 유발하였고 세포내 소기관의 손상 물질이 세포와 세포 사이에서 관찰되었다(Plate 2와 3).

IV. 고 찰

곰팡이 중에서 *Fusarium* 종은 전세계에 널리 분포하며 다양한 곰팡이 독소를 생성한다. 이 독소중에서 본 실험에서 이용한 sambutoxin은 한국에서 *Fusarium sambucinum* PZF-4으로부터 분리한 곰팡이 독소로 계태아에 매우 유독하며, LC₅₀은 29.6 $\mu\text{g}/\text{egg}$ 이다(Kim and Lee, 1994). 또한 이 독소를 0.05와 0.1%되게 사료에 혼합하여 랫드에 급여하면 체중감소, 식욕부진 및 위장관의 출혈을 유발하다가 결국 폐사한다고 보고하였다(Kim 등, 1995). 곰팡이에 오염되어 동물이나 사람에게 흡수된 sambutoxin은 순환혈액 중에 존재하여 혈소판 응집과 같은 혈소판의 기능에 영향을 주어 출혈을 유발할 수 있다. 현재까지 일반적으로 혈소판의 기능은 완전히 밝혀지지 않았지만 조직이 손상을 받으면, 혈소판은 응집이 일어나 혈액손실을 막는 중요한 역할을 한다(Vargaftig, 1981). 출혈은 사람과 가축에서 볼 수 있는 곰팡이 중독에 의한 주요 증상 중의 하나로 출혈성 곰팡이독소는 혈소판의 반응에 직, 간접적으로

영향을 준다. 많은 곰팡이 독소 중에서 신장독성을 유발하는 오크라톡신은 혈소판의 응집을 억제하고 혈소판의 세포막을 파괴하며(Omar, 1991) *Fusarium* 종에 의해서 생성되는 2차 대사산물인 T-2 독소는 응집체 형성 및 혈소판 응집체의 안정성에 손상을 준다(Bondy, 1989). Sambutoxin은 근래에 분리된 곰팡이 독소로 현재 물리적인 성질과 일부 실험동물에서의 유해작용(Kim 등, 1995; Kim과 Lee, 1994) 일부만이 알려져 있을 뿐 사람과 동물에서의 독성에 관한 자료는 거의 없는 실정이다. 따라서 본 실험에서는 혈소판 응집 인자를 이용하여 응집과 혈소판에서의 ATP 방출을 정량하여 sambutoxin이 토끼 혈소판에 미치는 영향을 알아보아 출혈의 원인을 이해하고자 하였다.

포유동물의 순환혈액 중에서 가장 작은 세포인 혈소판은 지혈 및 혈전 형성에 중요한 역할을 하며(Vargaftig 등, 1981), 혈소판이 외부 자극에 의해서 활성이 되면 세포막이 변형되어 응집과 세포질내 과립의 방출이 일어나 serotonin, ADP, 칼슘 및 다양한 A.A. 대사산물을 세포 밖으로 내보내며 이것들이 일련의 혈소판 반응을 일으킨다(Holmsen, 1985). 형태학적으로 혈소판은 활성시 위족(pseudopod)을 형성하며(White, 1968), 혈소판이 독성물질에 의하여 영향을 받으면 크고 불규칙한 형태의 과립 및 microtubule의 파괴 등과 같은 변화를 관찰할 수 있다(Bondy 등, 1989). 본 실험에서도 sambutoxin 처리군은 대조군(Plate 1)과 비교하여 혈소판의 심한 형태학적 변화와 혈소판 사이에서 세포질내 소기관의 손상 부산물로 보이는 것들이 많이 관찰되었다(Plate 2와 3).

한편, 현재 세포내 외에 존재하는 칼슘의 역할을 이해하기 위하여 칼슘 지시약으로 사용해왔던 quin 2 혹

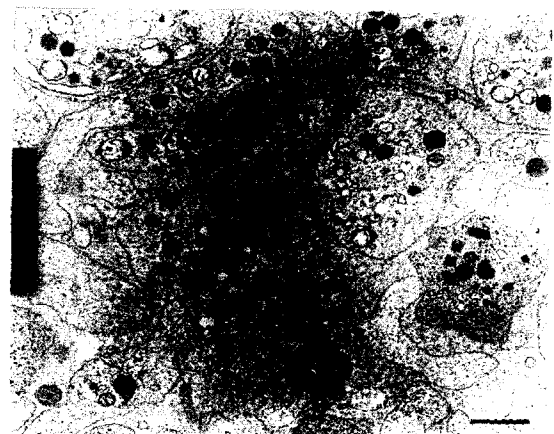


Plate 1. Rabbit platelets treated with vehicle (methanol) control, showing vacuoles (v), pseudopod (p), glycogen (arrows) and dense body (arrowheads). Numerous granule (g) in round are present. $\times 9,600$. Bar represents 1 μm .



Plate 2. Rabbit platelets treated with 150 μM of sambutoxin. Note morphological changes of platelet and disorganization debris of cellular organelle in intercellular space. Glycogen (arrows), granule (g), vacuole (v), mitochondria (open arrow), pseudopod (p), and dense body (arrowheads). $\times 9,600$. Bar represents 1 μm .



Plate 3. Rabbit platelets treated with 150 μM of sambutoxin, showing enlarged vacuoles (v). Disorganization of cellular organelle indicated marked damages of platelet. Mitochondria (open arrows), glycogen (arrows), granule (g), pseudopod (p), and dense body (arrowheads). $\times 16,000$. Bar represents 1 μm .

은 fura 2보다 훨씬 좋은 형광의 해상도를 보이는 잇점 때문에 fluo-3를 가장 많이 이용한다(Minta 등, 1989; Ozaki 등, 1992; Rijkers 등, 1990). 그래서 본 실험에서는 FCM을 이용한 세포내 칼슘 동원의 확인에 많이 이용하는 방법으로 fluo-3AM을 세포 안으로 쉽게 유입시키기 위하여 표면활성제인 pluronic F-127을 병행 처리하여 칼슘을 측정하였다. 그 중에서 collagen에 의한 칼슘의 동원은 비교적 적은 양이었으며 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 혈소판의 칼슘 동원을 확인할 수 없다고 한 결과(Watson 등, 1985)를 본 실험에서도 확인하였는데 즉, collagen에 의한 자극 초기에는 오히려 칼슘의 형광이 일시적으로 감소하였으며 평균 형광 channel도 다른 응집인자로 유도할 때보다 작음을 예비 시험 결과

에서 확인하여 collagen의 적용 농도를 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 정하여 실험하였다. 그리고 thrombin은 0.5 U/ml에서 세포질내 칼슘을 증가시키고 ATP 방출은 4배 많이 일어난다는 보고(Watson 등, 1985)를 참고하여 최종 농도를 정하였다. 또한 sambutoxin에 의한 혈소판의 형태학적 변화를 투과전자현미경으로 관찰하여 혈소판 응집 기전과의 상관관계를 알아보았다. 혈소판 응집시험에서는 thrombin에 의한 혈소판 응집은 sambutoxin 150 μM 처리군에서만 혈소판 응집을 억제시켰지만 나머지 응집인자에 대해서는 모든 농도에서 유의성있게 억제시켰다. PAF에 의한 혈소판 응집시험에서 disaggregation time은 sambutoxin에 의하여 줄었다(Table 2). 이런 결과는 sambutoxin에 의하여 응집을 억제하는 경우는 혈소판 응집체가 안정하지 못하여 빠른 시간 안에 응집인자를 처리하기 전의 응집 정도로 회복되기 때문이다. 이 결과는 T-2 toxin을 처리하면 PAF에 의해 유도된 혈소판 응집 형성의 속도 및 정도에 손상을 주고 응집체가 비교적 불안정한 특징을 가지는 응집 억제 기전과 비교하여 설명할 수 있었다(Grandoni 등, 1992; Bondy 등, 1989). Collagen과 PAF로 유도된 sambutoxin의 혈소판 응집 억제(Table 1)는 ATP 방출과 직접적인 관련은 없었지만(Table 3), sambutoxin 150 μM 처리군에서 thrombin에 의한 혈소판 응집 억제 효과(Table 1)는 ATP 방출을 억제하는 것(Table 3)으로 설명할 수 있었다. 또한 A.A.으로 유도한 ATP 방출 감소와 혈소판 응집 억제 결과는 상관성이 있음을 보이고 있다. 또한 곰팡이 독소가 칼슘의 동원에 미치는 영향을 알아본 실험 결과 sambutoxin은 A.A.로 유도한 경우만 제외하고 다른 응집인자에 의하여 유도된 칼슘의 방출을 현저히 증가시켰다(Table 4). 혈소판이 활성화되는 경로는 칼슘과 관계가 있지만 세포질내 칼슘만이 혈소판 활성을 일으키는 요인은 아니라고 하였으며(Ware 등, 1986) 본 실험에서는 sambutoxin이 혈소판의 응집과 ATP 방출을 억제하였지만 세포질내의 칼슘은 증가시키는 결과를 보였는데 이것은 다른 물질에 의하여 관찰한 혈소판 응집 정도와 칼슘의 양이 비례하는 결과와는 차이를 보였다. 이와 같은 실험 결과를 통해 sambutoxin에 의한 혈소판 응집억제는 ATP 방출 억제와 밀접한 관련이 있으며 혈소판의 초미세구조는 심하게 변형시켰고, 세포질내로 칼슘 방출은 오히려 증가시킴을 알 수 있었다. 이런 결과를 통해 곰팡이 독소에 의하여 유발된 혈소판 응집 억제에서 칼슘의 동원과 역할 그리고 ATP 방출과 역할을 이해하기 위한 연구의 자료로 제시할 수 있으며 향후 sambutoxin에 의한 혈소판 응집 기전에서 칼슘의

정확한 역할을 이해하기 위한 연구가 요구된다.

감사의 말씀

소중한 실험재료인 sambutoxin을 기증하여 주신 서울대학교 농업생명과학대학교 농생물학과 이인원 교수님께 감사드립니다.

참고문헌

- Bondy, G.S., Gentry, P.A. and Basrur, P.K. (1989): Structure-function relationship of the action of T-2 toxin on bovine platelets, *Fund. Appl. Toxicol.*, **12**, 109-116.
- Grandoni, K.M., Gentry, P.A., Holub, B.J. and Yagen, B. (1992): 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.
- Holmsen, H. (1985): Platelet metabolism and activation, *Semin. Hematol.*, **22**, 219-240.
- Hwang, D.H. (1985): Species Variation in Platelet Aggregation (Longenecker, A.M. eds.). Academic Press, New York. pp. 289-303.
- Kim, J.C. and Lee, Y.W. (1994): Sambutoxin, a new mycotoxin produced by toxic *Fusarium* isolates obtained from rotted potato tubers, *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**(12), 4380-4386.
- Kim, J.C., Lee, Y.W., Tamura, H. and Yoshizawa, H. (1995): Sambutoxin, a new mycotoxin isolated from *Fusarium sambucinum*, *Tetrahedron Lett.*, **36**(7), 1047-1050.
- Minta, A., Kao, J.P.Y. and Tsien, R.Y. (1989): Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophore, *J. Biol. Chem.*, **264**(14), 8171-8178.
- Omar, R.F., Randell, E. and Rahimtula, A.D. (1991): *In vitro* inhibition of rat platelet aggregation by ochratoxin A, *J. Biochem. Toxicol.*, **6**(3), 211-220.
- Ozaki, Y., Yatomi, Y. and Kume, S. (1992): Evaluation of platelet intracellular calcium ion concentration with flow cytometry, *Rinsho Byori*, **40**, 282-286.
- Reddy, S. and Hayes, A.W. (1994): Food-Borne Toxicants (Hayes, A.W. eds.). Raven Press, New York, pp. 317-360.
- Rijkers, G.T., Justement, L.B., Griffioen, A.W. and John, C.C. (1990): Improved method for measurement intracellular Ca^{++} with fluo-3. *Cytometry*, **11**, 923-927.
- Shukla, S.D. (1985): Platelet activating factor-stimulated formation of inositol triphosphate in platelets and its regulation by various agents including Ca^{2+} , indomethacin, CV-3988, and forskolin, *Arch. Biochem. Biophys.*, **240**(2), 674-681.
- Vargaftig, B.B., Chignard, M. and Benveniste, J. (1981): Present concepts on the mechanisms of platelet aggregation, *Biochem. Pharmacol.*, **30**, 263-271.
- Watson, S.P., Reep, B.R., McConnel, R.T. and Lapetina, E.G. (1985): Collagen stimulates (3H)-inositol triphosphate formation in indomethacin-treated human platelets, *Biochem. J.*, **226**, 831-837.
- White, J.G. (1968): Effects of ethylenediamine-tetracetic acid (EDTA) on platelet structure, *Scan. J. Haemat.*, **5**, 241-254.
- Wojenski, C.M.I. and Silver, M.J. (1984): A quick method for screening platelet dysfunctions using the whole blood Lumi-aggregometer, *Thromb. Haemostas.*, **51**(2), 154-156.
- Yamashiro, S., Bast, T. and Basrur, P.K. (1983): Rapid method for the examination of platelet morphology, *Res. Vet. Sci.*, **34**, 367-369.