J. Fd Hyg. Safety 10(2), 73 - 79(1995)

해양생물독의 혈소판 응집작용에 관한 연구

박 영 현

순천향대학교 자연과학대학 식품영양학과

Effect of Marine Toxins on the Rabbit Platelets

Young-Hyun Park

Department of Food Science and Nutrition, Soonchunhyang University

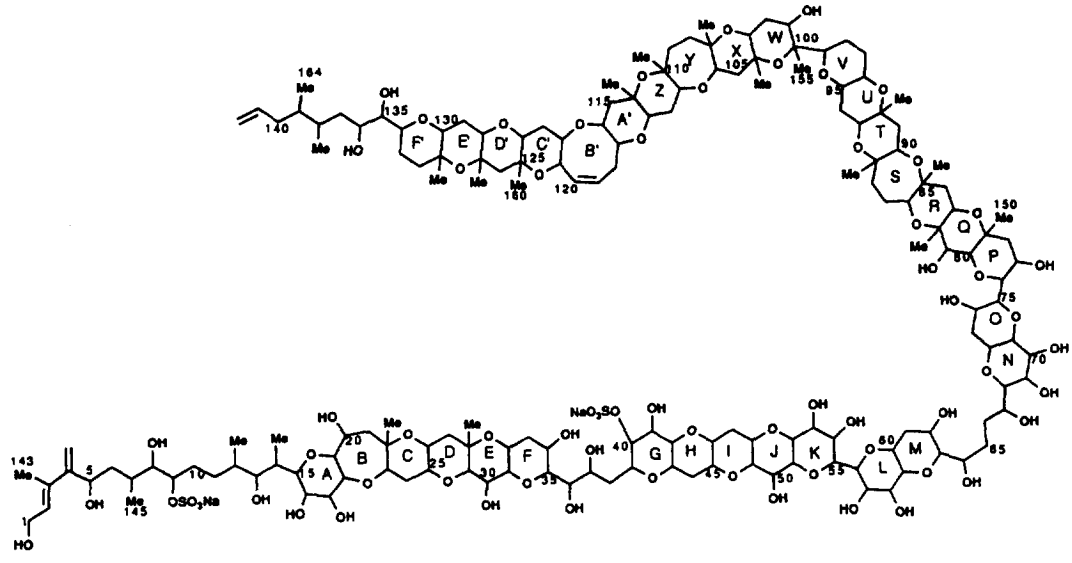
ABSTRACT—Incidents of seafood poisoning and massive fish kills have been rapidly increasing in both frequency and geographical distribution and the socioeconomic impacts brought by those incidents. However, the biological origins of those marine toxins have not been well clarified. Most of the marine organisms investigated are filter-feeders, which accumulate toxins from their food and/or their symbiotic microalgae. We have examined the action on rabbit platelets of marine toxins isolated from cultured dinoflagellates and sponge collected at Okinawa. Maitotoxin (MTX) is a water-soluble toxin isolated from the cultured dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* which causes a seafood poisoning in tropical regions. Zooxanthellatoxin A (ZT-A) was isolated from extracts of cultured symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium* sp. (so-called zooxanthella) from flatworms of the genus *Amphiscolops* collected at Okinawa. Theonezolide A (TZ-A) was isolated from the Okinawan marine sponge *Theonella* sp. MTX caused a disaggregation and a dissolution of large aggregates. ZT-A caused a dissolution of small aggregates followed by a increment of light tranmission. TZ-A caused an initial and transient shape change followed by a sustained aggregation and a increment of large aggregates. In conclusion, marine toxins exert unique patterns on the light trasmission and the size of aggregates in rabbit platelets by their concentrations and kinds

Keyword □ Marine toxin, Rabbit platelets, Platelet aggregation

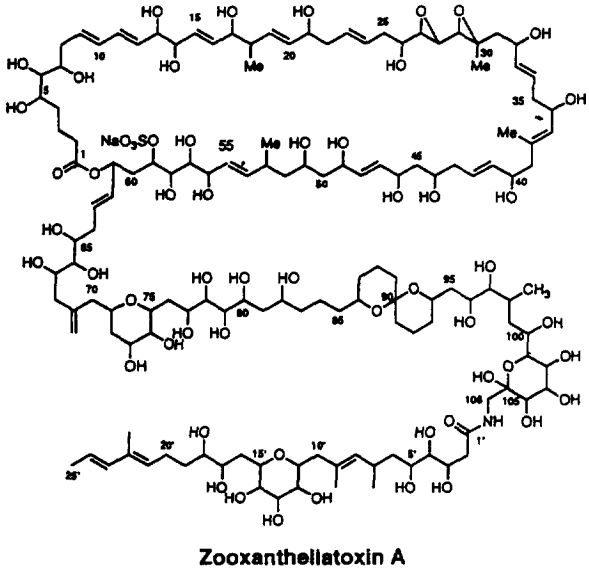
우리가 살고 있는 지구의 표면적은 약 71%는 바다이다. 바다는 생명탄생의 기원이라고 한다. 현재 50만종의 풍부한 종류의 생물이 서식하고 있다. 이 때문에 바다는 미개척 부분이 많고 에너지자원, 광물자원, 식량조달의 창고로 주목받고 있다. 해양생물은 육상생물에 비교하면 매우 다른 환경에 살고 있다. 즉 해수라는 염농도가 높은 폐쇄된 환경에 살고 있고 수심에 의해 높은 압력과 온도 변화가 비교적 적고, 체표면의 대부분이 직접 외계와 접하여 있다. 이러한 특이한 환경에서 서식하는 해양생물이 생산하는 2차대사물질은 새롭고 다채로운 구조를 갖고, 여러가지 생리활성을 갖는 것이 밝혀지고 있다.[1,2,3,4]

해양생물독은 일찍부터 연구되어온 복어독(tetrodotoxin)을 비롯하여 마비성조개독(paralytic shellfish poisoning), ciguatera 등으로 식중독의 원인물질로, 그 독성작용의 기전에 관하여 활발히 연구되고 있다.[5,6] 최근, 이러한 식중독의 진짜 독화원인생물은 해양미소생물의 일종인 와편모조류(dinoflagellate)로 먹이연쇄(food chain)를 통해서 어패류에 축적되고, 적조를 발생하여 어패류의 대량 패사시킨다고 한다.[7,8] 이것은 해양생물독이 해조류, 해면동물, 강장동물 등에 공생 또는 기생하는 해양미소생물에 의해 생산된다는 가능성이 시사되고 있다. 산호초가 발달한 남방해역에서는 어류를 섭취하여 설사나 지각이상을 나타내는 식중독이 빈번히 발생되고 있다. 이것은 ciguatera라 부르는 식중독으로 진짜 원인생물은 대형조류에 부착 공생하는 와편모조 *Gambierdiscus toxicus*로 밝혀졌다고 한다.[9] 그 식중독 원인물질은 ciguatoxin, maitotoxin으로 화학적 구조가 최근에 밝혀졌다.[10] 그 독성작용의 기전은 아직 명확히 밝혀져 있지 않고 있다.

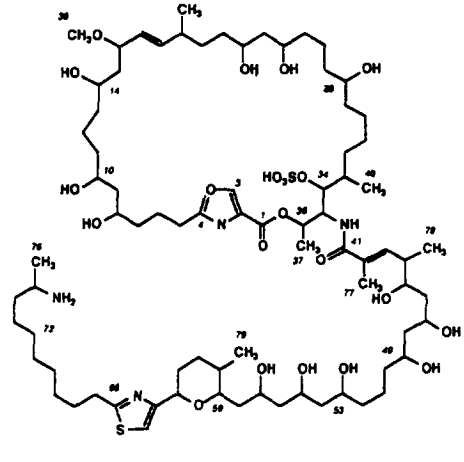
본연구는 해양미소생물에서 유래하는 해양생물독의 혈소판에 대한 작용을 보고자 하였다. 해양생물독은 ciguatera 식중독의 원인생물인 와편모조 *Gambierdiscus toxicus*와 *Amphiscolops*종에 공생하는 와편모조 *Symbiodinium* sp. (zooxanthella)의 배양조체와 *Theonella* sp. 해면동물에서 각각 분리·정제한 maitotoxin, zooxanthellatoxin A, theonezolide A 등에 관한 토끼 혈소판의 응집작용을 관찰하였다.



Maitotoxin



Zooxanthellatoxin A



Theonezolide A

Fig. 1. Chemical structures of marine toxins.

재료 및 방법

해양생물독의 분리 및 정제

Maitotoxin—공생와편모조 *Gambierdiscus toxicus* 조체를 methanol로 추출하고, 잔사를 50% methanol로 추출하였다. 추출물을 80% methanol로 현탁하여 dichloromethan으로 탈지후, n-butanol로 추출하였다. 추출물을 silicagel column에 chloroform : methanol (7 : 3)용매로 세정하고 동 (1 : 1)용매로 용출하였다. 용출액을 80% methanol로 원심분리한 후 상등액을 역상계 column Develosil ODS로 용출하였다. 최종적으로 Develosil TMS을 이용하여 HPLC로 정제하였다.

Zoxanthellatoxin A—공생와편모조 *Symbiodinium* sp. 조체를 70% ethanol로 추출하였다. 추출물을 물에 용해시킨 후, ethylacetate로 추출하였고, 다음 n-butanol로 추출한다. n-Butanol 추출물을 polystyrene column (MCI gel CHP-20P)에 40% ethanol로 용출하였다. 이 용출액을 DEAE Sephadex A-25 (1/30 M phosphate buffer, pH 6.9)로 분리한 후 polystyrene column에 80% ethanol로 용출하였다. 최종적으로 역상계column HPLC (YMC Pack D-ODS-5)을 이용하여 0.2M NaCl함유 75% methanol로 정제하였다.

Theonezolide A—오끼나와산 해면동물 *Theonella* sp.을 methanol로 추출하였다. 추출물을 1 M NaCl 용액에 용해시킨 후, ethylacetate로 추출하였고, 다음 n-butanol로 추출하였다. n-Butanol 추출물을 silicagel column에 chloroform: methanol (8 : 2)용매로 용출하였다. 이 용출액을 Sephadex LH-20 column에 methanol로 용출하였다. 최종적으로 역상계 column HPLC (Develosil Lop ODS 24S)을 이용하여 함유 75% methanol로 정제하였다.

혈소판응집능 측정—토끼혈액을 citrate-dextrose용액(혈액량의 1/6 : 65 mM citric acid, 85 mM trisodium citrate, 2% dextrose, pH 4.5)에 채혈한 후, 250 g로 10분간 원심분리하였다. 상등액 platelet-rich plasma (PRP)을 분리한 후, 다시 650 g로 10분간 원심분리하였다. 침전물 (platelet-rich pellet)을 Tyrode-HEPES (pH 6.35)용액으로 두번 세척한 후, 마지막에 Tyrode-HEPES (pH 7.35)용액으로 혈소판수가 5×10^8 cells/ml 되도록 희석하였다. 모든조작은 실온에서 실시하였다. Tyrode-HEPES 용액의 조성은 138.3 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 1.048 mM $MgCl_2$ $6H_2O$, 4.0 mM $NaHCO_3$, 10 mM HEPES, 0.1% dextrose, 0.35% albumin 등이다. 혈소판 형태변형과 응집작용은 광투과도 변화를 이용한 흡광도 측정장치(PAM-6C Aggregometer, Mebanix, Tokyo)를 사용하였다. 혈소판 응집괴의 크기는 레이저광에 의해서 산란된 소, 중, 대 크기(small : 9um, medium : 30um, large : 50um)의 응집괴 수를 입자계측형응집능 측정장치 (AG10, Kowa)를 통해서 측정하였다. 광투과도는 혈소판부유액(PRP)을 0%로, Tyrode-HEPES용액을 100%로 하였다. Aggregometer cuvette에 혈소판부유액(PRP) 0.3 ml를 넣고 1000 rpm 교반하면서 37도에서 5분간 preincubation한 후, $CaCl_2$ 1 mM를 넣고 5분 후에 해양생물독을 투여하였다.

결과 및 고찰

해양생물독으로 인한 식중독의 원인생물인 와편모조류 (dinoflagellate)나 공생하는 해면에서 분리.정제한 독성물질 구조는 Fig. 1과 같다. Ciguatera 식중독중에서 조식성 어류 (타이티어로 maito라 부르는 어류)에 기인하는 중독증상은 ciguatoxin (CTX)중독과 다른 것이 알려졌다. 어류 내장에서 CTX와 약간 다른 수용성독 maitotoxin (MTX)은 마우스에 대한 LD_{50} 0.05 ug/kg(복강내 투여)로 해양생물독중에 가장 강력하다. 와편모조 *Gambierdiscus toxicus*을 배양한 조체에서 분리한 MTX의 구조는 거대한 측쇄형 polyether로 2개의 황산 ester을 함유한 분자량 3,422(Na염)로 추정되고 있다.[10] 최근 MTX는 Ca channel을 특이적으로 활성화하여 세포내 Ca 유입을 동반한 세포정보전달계에 관여한다고 한다.[11] 오키나와산 *Amphiscolops*속의 수종 flatworm 체내에 공생하는 와편모조 *Symbiodinium* sp.의 배양조체에서 분리한 zooxanthellatoxin A (ZT-A)의 구조는 polyhydroxy polyene으로 epoxide와 황산 ester을 함유한 분자량 2894(Na염)로 추정되고 있다.[12,13,14] 오키나와산 해면 *Theonella* sp.에서 분리한 theonezolide A (TZ-A)의 구조

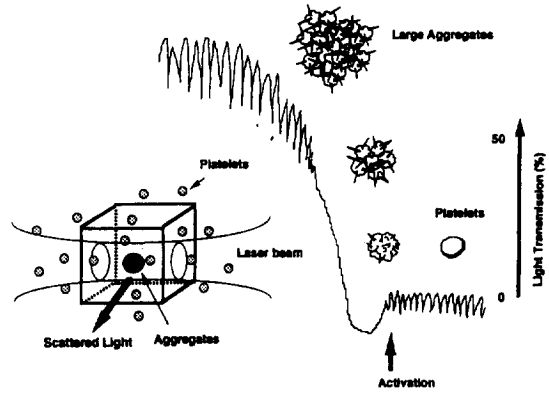


Fig. 2. Platelet aggregation determined by a light transmission and a scattered laser light.

는 polyketide macrolide로 황산 ester, oxazole, thiazole 등을 함유한 분자량 1,560으로 추정되고 있다.[15]

혈소판은 직경이 2 um 정도의 원판형 무핵세포로 혈관벽 손상 등으로 인한 출혈시 지혈작용의 중심적인 역할을 한다. 최근 사망율이 증가되고 있는 심근경색, 뇌혈관장애 등의 혈전형성질환은 혈소판 기능이상의 하나로 보고 있다. 혈소판은 대량분리가 용이하고 생체세포의 모델로써 세포막단백질, 세포내 Ca 동태, arachidonic acid대사에 관한 연구 대상이 되고 있다.[16] 그러나, 혈소판 기능에 대한 해양생물독의 연구는 미비한 실정이다. 혈소판의 생체에서 가장 기본적인 기능은 부착, 응집현상으로, 정량적으로 측정하는 방법은 1962년 Born씨에 의해 고안된 측정법이다.[17] 이 혈소판 응집능 측정법은 Fig. 2에서 처럼 흡광도법 혈소판 응집능측정은 혈소판부유액(PRP)을 0%로, Tyrode-HEPES용

Maitotoxin 10 nM

	< 25>S	< 400>M	<1000>L	TOTAL	T(%)	LEVEL
min	12813	0	0		-0.5	10
max	126940	103362	185131		49.1	2047
S	4248621900	1533784500	2729452050	8511858450		

Zooxanthellatoxin A 1 μM

	< 25>S	< 400>M	<1000>L	TOTAL	T(%)	LEVEL
min	2413	0	0		0.0	10
max	61264	6545	11753		4.7	2047
S	2057114700	23783400	24701400	2105599500		

Zooxanthellatoxin A 2 μM

	< 25>S	< 400>M	<1000>L	TOTAL	T(%)	LEVEL
min	0	0	0		-1.3	10
max	123429	97384	202120		64.1	2047
S	1771128450	2162114100	7030979100	10964221650		

Zooxanthellatoxin A 10 μM

	< 25>S	< 400>M	<1000>L	TOTAL	T(%)	LEVEL
min	7038	0	0		0.0	10
max	225169	7031	8099		73.7	2047
S	2343806100	89982900	102569400	2536358400		

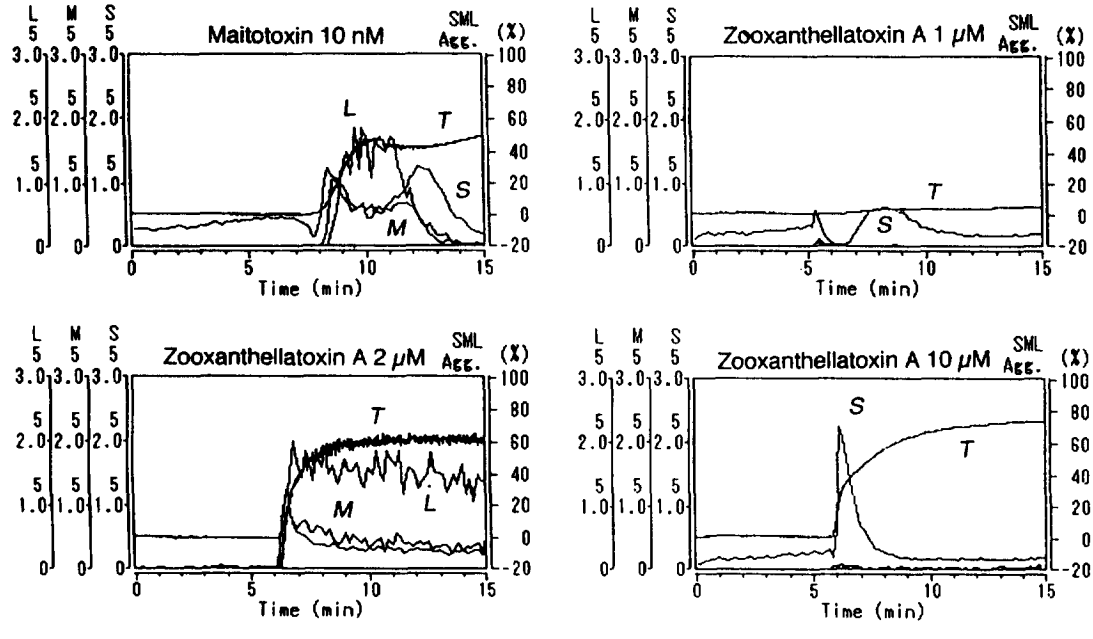


Fig. 3. Effects of maitotoxin (MTX) and zooxanthellatoxin A (ZT-A) on the light transmission (T) and the size of aggregates (S: small, M: medium, L: large) in the rabbit platelets.

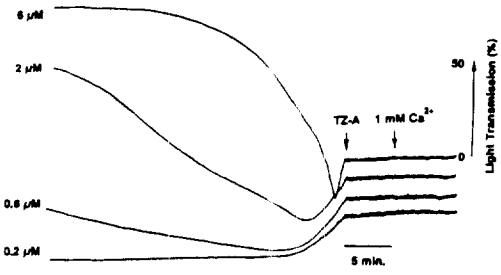


Fig. 4. Effects of theonezolide A (TZ-A)-induced shape change and aggregation in the rabbit platelets.

액을 100%로 하여 광투과도 변화를 측정하는 흡광도법이다.[18] 입자계측형 측정법은 혈소판부유액에 레이저광의 산란광을 검출하여 횡축에 시간을, 종축의 오른쪽에 광투과도(흡광도법에 의한 응집율)를, 왼쪽에 응집괴 크기에 따라 각각의 총산란강도를 표시하고 있다.[19] 총산란강도는 각각의 산란강도에 입자수의 곱에 비례한다. 각각의 산란강도는 소응집괴(S: small) 25, 중응집괴(M: medium) 400, 대응집괴(L: large) 1,000로 설정하였다. 응집괴의 형상은 복잡하지만 구형으로 가정하면 산란강도 25, 400, 1,000은 직경 9 um, 30 um, 50 um에 해당한다. 입자계측형은 응집괴 직경

Theonezolide A 0.2 μM

	< 25>S	< 400>M	<1000>L	TOTAL	T[%]	LEVEL
min	1580	0	0		-4.1	10
max	65681	5317	9749		0.0	2047
S	2476887750	26318250	53632350	2556838350		

Theonezolide A 0.6 μM

	< 25>S	< 400>M	<1000>L	TOTAL	T[%]	LEVEL
min	12724	0	0		-6.1	10
max	135722	2891	6141		0.9	2047
S	4008263400	68809950	80129250	4157202600		

Theonezolide A 2 μM

	< 25>S	< 400>M	<1000>L	TOTAL	T[%]	LEVEL
min	634	0	0		-5.6	10
max	313099	154271	11035		42.8	2047
S	11956666050	2443350600	135416250	14535432900		

Theonezolide A 6 μM

	< 25>S	< 400>M	<1000>L	TOTAL	T[%]	LEVEL
min	2448	0	0		-4.6	10
max	256111	198242	140159		67.7	2047
S	8284389300	6184655100	2617655850	17086700250		

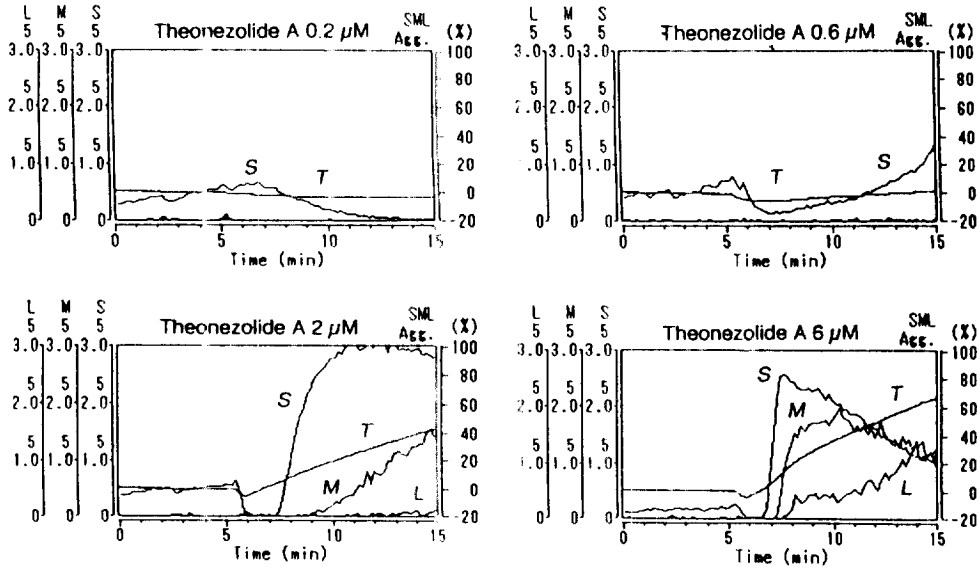


Fig. 5. Effects of theonezolide A (TZ-A) on the light transmission (T) and the size of aggregates (S: small, M: medium, L: large) in the rabbit platelets.

9 um 이상의 응집괴를 고감도로 측정할 수 있다.

Fig. 3의 A, C, D 결과를 보면 똑 같이 광투과도 증가를 나타내고 있지만 소, 중, 대 응집괴 크기는 각각 다르게 나타내고 있다. MTX 10 nM과 ZT-A 2 uM 투여시 소·중 응집괴는 즉시 증가한 후 감소하고 대응집괴가 점차 증가하였다. 이러한 광투과도 증가는 대응집괴 형성으로 기인한다고 하겠다. 그러나, ZT-A 10 uM 투여시 소응집괴는 증가한 후 감소와 동시에 광투과도만 증가하였고. MTX 10 nM 투여 5분 후에 광투과도 증가에도 불구하고 대응집괴는 감소하고 동시에 소응집괴가 증가한 다음 감소하였다. 이러한 광투과도 증가는 대응집괴 형성에 기인하여 나타내기 보다는 응집과 동시에 혈소판이 해리 또는 용해되어 나타난다고 하겠다. Fig. 3의 B 결과를 보면, ZT-A 1 uM 투여시 광투과도 변화없이도 소응집괴의 형성을 볼 수 있다. 이와 같이 흡광도법은 응집괴나 혈소판이 소실되어도 광투과도는 증가된다고 하겠다. 흡광도법으로 측정한 TZ-A 결과는 Fig. 4에서 처럼 용량별로 일시적인 광투과도 감소한 후 지속적인 광투과도 증가를 나타내고 있다. Fig. 5에서 처럼 TZ-A를 입자계측형 응집능측정법으로 측정하면, 0.2 uM 투여시 광투과도 변화없이 소응집괴가 감소하고 0.6 uM 투여시 소응집괴는 감소한 후 증가한다. TZ-A 2-6 uM 투여시 광투과도는 감소한 후 지속적인 증가를 나타내고 소응집괴는 감소 후 급속히 증가하였다. 증가된 소응집괴가 감소시 중응집괴가 증가하고 소·중 응집괴가 감소시 대응집괴와 광투과도가 증가하였다. 이와같이 광투과도(흡광도법)는 소응집괴가 형성하여도 나타내지 않고 있다. 광투과도는 수천개의 혈소판에서 형성된 거대한 응집괴가 형성될 때에만 나타난다고 하겠다. 이와같이 흡광도법은 응집반응 초기나 약한 응집반응시 또는 투여시 희석되어 나타내는 일시적인 광투과도 감소는 응집능 신뢰성에 영향을 주지만, 입자계측형은 응집괴에서의 산란광만 측정하므로 응집초기의 혈소판 변형에 대하여 명확히 나타내고 있다. TZ-A의 응집 초기반응에 나타내는 광투과도 감소는 혈소판 변형에 기인하는 것으로 생각된다. 일반적으로 생리활성물질 투여시 응집초기에 나타나는 일시적인 광투과도 감소는 인위적인 현상인가 생리반응인가에 대하여 논란의 여지가 많지만[20,21] 응집초기의 광투과성 감소에 TZ-A가 특이한 혈소판 변형을 지속적으로 나타낸다고 하겠다. 이상의 결과로 부터 입자계측형 응집능측정법은 흡광도법보다 혈소판이 해양생물독으로 인한 소응집괴 형성, 소응집괴에서 대응집괴 형성, 응집괴의 해리나 용해 등의 다양한 응집작용을 평가할 수 있다고 하겠다. 이와같이 해양생물독의 혈소판응집작용은 종류와 농도에 따라 응집괴 형성에 특이한 차이를 나타낸다고 하겠다.

국문요약

본 연구는 해양미소생물에서 유래하는 행양물독의 혈소판에 대한 작용을 보고자 하였다. 해양생물독은 ciguatera 식중독의 원인생물인 와편모조 *Gambierdiscus toxicus*와 *Amphiscolops* 종에 공생하는 와편모조 *Symbiodinium* sp.의 배양조체와 *Theonella* sp. 해면동물에서 각각 분리·정제한 miaitotoxin, zooxanthellatoxin A, theonezolide A 등에 관한 토끼 혈소판의 응집작용을 관찰하였다. 혈소판 응집작용은 광투과도(흡광도법)와 입자계측법으로 측정하였다. Maitotoxin 투여시 소응집괴에서 형성된 대응집괴는 해리된 후 용해되어 광투과도가 증가되었다. Zooxanthellatoxin A 1 μM 투여시 소응집괴 형성에도 광투과도는 변화가 없고 10 μ 투여시 소응집괴가 증가된 후 곧 감소하고 용해되어 광투과도만이 증가하였다. Theonezolide A (0.2~0.6 μM) 투여시 일시적인 혈소판 형태변형된 후 소, 중, 대 응집괴 순서로 증가되고 광투과도는 지속적으로 증가되었다. 결론적으로 해양생물독의 혈소판 응집작용은 그 종류와 농도에 따라서 응집괴의 크기는 광투과도 변화가 특이한 차이를 나타내었다.

참고문헌

1. Scheuer, P.J.: Bioorganic marine chemistry. Ed. Springer-Verlag, Heiderberg, Vol. 1-6 (1987-1992).
2. Shimizu, H.: Chemical and biological perspectives. *In Marine Natural Products,* Ed. (Scheuer, P.J. ed.) Academic Press, New York, pp. 1-42 (1978).
3. 北川 勳: 海洋天然物化學. 化學增刊, 111, 化學同人,

(1987).

4. Kobayashi J. and Ishibashi M.: Bioactive methabolites of symbiotic marine microdrganism. *Chem. Rev,* **93**, 1753 (1993).
5. 北川 勲: 海洋天然物質の醫療應用. *BIOmedica,* **7**, 1472(1992).
6. 安元 健: 化學で探る海洋生物の謎. 化學增刊, **121**, 化學同人, (1992).
7. Shimizu, Y.: Microalgal methabolites. *Chem. Rev,* **93**, 1685(1993).
8. Yasumoto, T. and Murata, M.: Marine toxins. *Chem. Rev,* **93**, 1897 (1993).
9. Yasumoto, T., Nakajima, I., Oshima, Y., and Bagnis, R.: A new toxic dinoflagellate found in association with ciguatera. *In Toxic Dinoflagellate Blooms.* Ed. (Taylor, D. L., and Seliger, H. eds.) Elsever North Holland Inc, New York, pp. 65-77 (1979)
10. Murata, M., Iwashita, T., Yokoyama, A., Sasaki, M., and Yasumoto, T.: Partial structures of maitotoxin from dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus. J. Am. Chem. Soc,* **114**, 6594 (1992).
11. Watanabe, A., Ishida, Y., Honda, H., Kobayashi, M., and Ohizumi, Y.: Ca^{2+}-dependent aggregation of rabbit platelets induced by maitotoxin, a potent marine toxin, isolated from a dinoflagellate. *Br. J. Pharmacol,* **109**, 29 (1993).
12. Nakamura, H., Asari, T., Ohizumi, Y., Kobayashi, J., Yamasu, T., and Murai, A.: Isolation of zooxanthellatoxins, novel vasoconstrictive substances from the zooxanthella *Symbiodinium* sp. *Toxicon,* **31**, 371 (1993).
13. Nakamura, H., Asari, T., Murai, A., Kondo, T., Yoshida, K., and Ohizumi, Y.: Structure of periodate oxidation products with characteristic partial structures of zooxanthellatoxin-A a potent vasocontrictive polyol from a symbiotic dinoflagellate. *J. Org. Chem,* **58**, 313 (1993).
14. Asai, T., Nakamura, H., and Murai, A.: Structures of periodate oxidation products with a conjugated diene or an exomethylene from zooxanthellatoxin-A. *Tetrahedron Lett,* **34**, 4059 (1993).
15. Kobayashi, J., Kondo, K., Ishibashi, M., Wachli, M.R., and Nakamura, T.: Theonezolide A; a novel polyketide natural product from the okinawan marine sponge *Theonella* sp. *J. Am. Chem. Soc,* 115, 6661 (1993).
16. Rink, T.J., and Sage, S.O.: Calcium signaling in human platelets. *Annu. Rev. Physiol,* **52**, 431 (1990).
17. Born, G.V.R.: Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature,* **194**, 927 (1962).
18. Milton, J.G., and Frojmovic, M.M.: Turbidometric evaluations of platelet aggregation: relative contributions of measured shape change, volume, and early aggregation. *J. Pharmacol. Meth,* **9**, 101(1982).
19. 尾崎 由基男: 望まれる新しい血小板凝集測定法の開發. *Bioscience* と *Industry,* **50**, 1217 (1992).
20. Simpson, A.W.M., Hallam, T., and RinK, T.J.: Low concentrations of the stable prostaglandin endoperoxide U44069 stimulate shape change in quin2-loaded platelets without a measurable increase $[Ca^{2+}]_i$. *FEBS Letters,* **201**, 301 (1986).
21. Siffert, W., Siffert, G., Scheid, P., and Akkerman, J.W.N.: Activation of Na^+/H^+ exchange and Ca^{2+} mobilization start simultaneously in thrombin-stimulated platelets. *Biochem. J,* **258**, 521 (1989).