

메나디온에 의한 혈소판 내 칼슘 변화측정시 형광 색소 사용의 문제점

정선화 · 이무열 · 이주영 · 정승민 · 정진호*

서울대학교 약학대학

(Received August 25, 1997)

Infeasibility of Measuring Ca^{2+} in Menadione-Exposed Platelets Using Fluorescent Dyes

Sun-Hwa Chung, Moo-Yeol Lee, Joo-Young Lee,
Seung-Min Chung and Jin-Ho Chung*

Seoul National University, College of Pharmacy, Shinrim-dong San 56-1 Seoul 151-742 Korea

Abstract—It has been reported that dose-dependent Ca^{2+} increase by menadione in platelets could be measured by fluorescent dye, quin-2. The problems will be described here relating to measuring Ca^{2+} in menadione-exposed platelets using fura-2 and fluo-3, widely used fluorescent indicators. Additions of menadione to fura-2 loaded platelets and their lysates resulted in marked reductions in fluorescence intensity at both 340 nm (Ca^{2+} -bound form) and 380 nm (Ca^{2+} -unbound form) excitation wavelengths. Fura-2 excitation spectra were overlapped with UV-visible absorption spectra of menadione, suggesting that light absorption by menadione itself could quench fluorescence generated by fura-2. Next approach was to use fluo-3 which has the higher wavelength (490 nm) of excitation. Previous work demonstrated that treatment with probenecid to platelets was required to prevent fluo-3 dye leakage. However, probenecid itself was proven to be inadequate to measure the concentration of intracellular Ca^{2+} by reducing menadione-induced cytotoxicity in platelets. Our results suggest that it is not feasible to measure Ca^{2+} in platelets by using fura-2 and fluo-3 in the presence of probenecid, and cautions should be taken to measure changes of intracellular Ca^{2+} levels by fluorescent dyes following chemical exposure.

Keywords □ Menadione, Platelets, Intracellular Ca^{2+} , Cytotoxicity, Fura-2, Fluo-3, Probenecid.

혈소판은 생체 내에서 지혈 및 혈전의 생성과 각종 혈관 질환에 관여하는 혈액 세포이다.¹⁾ 혈소판은 활성화되지 않은 상태에서 cytosol의 Ca^{2+} 농도($[Ca^{2+}]_i$)를 100 nM 내외로 일정하게 유지하고 있다. 이 농도는 blood plasma의 농도와 비교할 때, 10,000 배 이상 낮은 것으로, 이 농도구배는 세포막과 dense tubular system의 Ca^{2+} -ATPase와 Na^+/Ca^{2+} exchange의 작용으로 유지된다.^{2,3)}

혈소판은 혈액 내의 다양한 자극들, 즉 collagen,

platelet-activating factor, thrombin 등에 의해 활성화되어 shape change, 혈소판 응집 및 혈소판 내 granule의 분비 등을 수행한다.⁴⁾ 이러한 혈소판 활성화($[Ca^{2+}]_i$)의 증가가 보고되어 있는데, 이 증가는 혈소판 cytoskeletal alteration을 포함한 shape change와 혈소판 응집에 중요한 역할을 한다.⁵⁾ 한편, menadione이 분리 간세포를 이용한 연구에서 세포독성을 유발하며, 그 독성이 $[Ca^{2+}]_i$ 의 증가와 관련이 있음은 보고된 바 있다. Orrenius 등은 menadione이 분리 간세포의 세포 괴사를 일으키기 전 단계에서 세포의 cytoskeletal protein에 영향을 주어 bleb의 형성을 야기하며, 이 현상이 $[Ca^{2+}]_i$ 와 관련이 있음을 보고하였

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-880-7856 (팩스) 02-885-4157

다.⁶⁾ 또한, bleb 형성의 기전을 연구하기 위한 목적으로 비교적 cytoskeleton이 복잡하지 않은 세포인 혈소판을 이용하여, menadione이 분리 간세포와 마찬가지로 혈소판에서도 cytoskeletal protein에 영향을 줌을 관찰하고, menadione에 의한 혈소판의 cytoskeletal protein의 변화 또한 유리 Ca^{2+} 에 의존적임을 확인하였다.⁷⁾

따라서 혈소판 내의 $[Ca^{2+}]_i$ 의 변화는 생리학적인 측면 뿐 아니라, 독성학적인 과정에서도 중요한 매개체가 된다. 본 연구에서는 혈소판을 대상으로 하여, 그 생리학적인 기능인 혈소판 응집과, 독성학적인 과정인 menadione에 의한 혈소판 lysis시의 $[Ca^{2+}]_i$ 를 시간의 변화에 따라 연속적으로 측정하고자 하였다.

세포 내에서 일어나는 Ca^{2+} 대사는 다양한 indicator를 이용해 연구되어 왔는데, 그 중 가장 광범위하게 사용되고 있는 것이 형광 dye이다. 형광 dye는 Ca^{2+} 이 결합하면 형광 강도의 변화 및 형광 파장의 전이가 일어나며, 이를 이용해 세포 내 Ca^{2+} 의 농도를 비교적 정확하게 계산할 수 있다. 형광 dye는 세포 내의 dye가 medium으로 빠져 나오는 dye leakage, 세포 자체가 내는 형광인 autofluorescence, ion을 포함한 간섭 물질의 형광 dye와의 상호작용, 세포 내의 Ca^{2+} 을 buffering하는 효과 등의 많은 단점을 가지고 있으나, 방법상의 용이함 및 calibration의 장점으로 널리 사용되고 있다.⁸⁾

본 실험에서는 $[Ca^{2+}]_i$ 의 측정의 방법으로, 현재 혈소판 내의 Ca^{2+} 대사의 연구시 널리 사용되고 있는 형광 dye인 fura-2와 fluo-3를 이용하였다. 실험이 진행되는 동안 fura-2의 형광이 menadione에 의해 영향을 받으며, fluo-3 또한 그 dye leakage를 막기 위해 사용된 probenecid의 존재로 인해, menadione에 의해 유발되는 Ca^{2+} 대사 변화 연구에 사용하는 것이 부적절함을 관찰하고, 본 논문에서는 그에 대해 기술하고자 한다.

실험방법

시약 - Menadione, fura-2/acetoxymethyl ester (fura-2/AM), probenecid, thrombin, anhydrous dimethyl sulfoxide(DMSO)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA)로부터 구입하였다. Fluo-3/acetoxymethyl ester(fluo-3/AM)과 fluo-3/potassium salt(fluo-3 salt)는 Molecular Probes,

Inc. (Eugene, USA)로부터 구입하였다. Fura-2/AM과 fluo-3/AM은 물에 의해 쉽게 그 ester의 특성을 잃으므로, anhydrous DMSO로, fluo-3 salt는 HEPES buffer(145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgPO_4$, 10 mM HEPES, 10 mM dextrose, pH 7.4)로 분주하여, 사용 전까지 $-22^\circ C$ 에서 차광, 보관하였다. Thrombin은 cold saline에 분주하여 사용 전까지 $-70^\circ C$ 이하에서 보관하였다. 그 밖의 시약은 모두 특급시약을 사용하였다.

실험동물 - Sprague-Dawley 암컷 흰쥐를 유한양행(Korea)으로부터 공급받아, 4주 이상 물과 사료(삼양사, Korea)의 제한 없이 사육하였으며, 체중 200 ± 20 g이 되는 것을 실험에 사용하였다. 사육시 밤과 낮의 주기가 각각 12 시간씩 되도록 하였다.

Washed platelet의 분리 및 배양 - 실험의 전 과정에 걸쳐서 유리 용기나 유리 pipette의 사용은 피하였으며, 혈소판 분리의 전 과정을 상온에서 수행하였다. 흰쥐를 diethyl ether로 마취 후 개복하여 복대 동맥으로부터 채혈하였다. 항응고제로는 acid-citrate-dextrose(85 mM trisodium citrate, 71 mM citric acid, 111 mM dextrose)를 1:6의 비율로 사용하였다.

Washed platelets(WP)은 Chung 등⁹⁾과 같은 방법으로 분리한 후, 마지막 pellet을 HEPES buffer(145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgPO_4$, 10 mM HEPES, 10 mM dextrose, pH 7.4)로 재현탁하였다. Albumin은 측정하고자 하는 파장에서 형광을 가지므로, albumin이 없으면서 Ca^{2+} 연구시에 널리 사용되는 buffer인 HEPES buffer를 사용하였다.¹⁰⁾ 이를 광학현미경으로 세어서 그 수가 1×10^8 cells/ml이 되도록 하였다. Ca^{2+} 이 있는 조건을 사용하는 경우에 실험 전 적어도 10분전에 1 mM $CaCl_2$ 를 가한 후 실험하였다.

세포 내 유리 Ca^{2+} 농도($[Ca^{2+}]_i$)의 측정 - 형광 dye의 AM 형태는 지용성이므로, 세포 내로 침투하여 세포 내의 esterase에 의해 분해되면, ester의 특성을 잃게 되어 세포 내에 선택적으로 포획되게 된다. Fura-2/AM과 fluo-3/AM을 세포 내로 loading하기 위하여 아래와 같이 실험하였다. 먼저 위에서 기술한 방법대로 HEPES-Tyrode's buffer에 현탁되어 있는 WP(약 1×10^9 cells/ml)를 분리한 후, 각각 5 M의 fura-2/AM과 3 M의 fluo-3/AM을 가하고 $37^\circ C$ 에서 45분 동안 배양하였다. Fluo-3/AM을 loading하는 경우, 이후 모든 단계의 buffer에 2.5 mM의 probenecid를 포함시켰다. 배양 후, 혈소판을 다시 500 g에서 10 분간

원심분리하여, pellet을 가라앉힌 후, washing buffer를 가하여 재현탁하고 다시 500 g에서 10 분간 원심 분리하였다. 최종 pellet을 HEPES buffer에 현탁하고, 광학현미경으로 세어서 세포수를 1×10^8 cells/ml로 맞추었다. Autofluorescence의 측정을 위해서 형광 dye에 노출되는 것을 제외한 나머지 조작을 동일하게 한 WP를 함께 조제하였다.

형광 측정은 RF-5000 spectrofluorophotometer (Shimadzu Co., Japan)을 이용하여 측정하였다. Fura-2와 fluo-3의 excitation(EX) spectrum을 얻기 위해서 emission(EM) wavelength를 각각 510 nm와 530 nm로 고정하고, spectrum measurement mode를 이용하였다. 세포 내 Ca^{2+} 의 농도를 시간의 변화에 따라 연속적으로 측정하기 위해서 fura-2를 이용하는 경우, alternative scan time mode를 사용하여 EX wavelength는 340 nm와 380 nm를 2 초 간격으로 교체되게 하였으며, EM wavelength는 510 nm를 고정하여 사용하였다. Fluo-3를 이용하여 Ca^{2+} 의 농도를 측정하기 위해서는 fixed time scan mode를 이용하여, EX 및 EM wavelength를 각각 490 nm와 530 nm를 선택하였다. EX과 EM bandwidth는 5 nm, high sensitivity를 이용하였다. 형광 dye가 loading된 혈소판 sample은 폭 1 cm의 fluorimeter cuvette(Sigma Chemical Co., USA)에 담아 37°C에서 일정하게 교반 하면서 연속적으로 형광을 측정하였다. UV-Visible

spectrum은 DMSO에 녹인 menadione stock을 HEPES buffer에 현탁하여 농도를 100, 250 uM로 각각 맞추후 UV-2201 spectrophotometer (Shimadzu Co., Japan)을 사용하여 측정하였다.

결 과

혈소판 내에서 menadione에 의해 일어나는 Ca^{2+} 대사의 변화를 관찰하기 위해, 세포 내 Ca^{2+} 농도의 측정시 널리 사용되어지는 형광 dye인 fura-2/AM를 사용하였다. Fura-2는 Ca^{2+} 이 결합되어 있지 않은 상태에서는 380 nm의 excitation(EX) wavelength를 갖으나, Ca^{2+} 이 결합하면 EX wavelength가 340 nm로 변화하므로, 340 nm에서와 380 nm에서의 형광의 비율을 이용하여 세포 내 Ca^{2+} 농도를 계산할 수 있다는 장점이 있다.⁸⁾

Fura-2가 loading된 혈소판에 physiological agonist인 thrombin을 가하였을 때, 이전의 문헌보고와 마찬가지로, 급격하고 빠른 Ca^{2+} 의 증가양상을 보였다.¹⁰⁾ 즉, Ca^{2+} 결합형인 340 nm에서의 형광은 급격히 증가하고, Ca^{2+} 비결합형인 380 nm에서의 형광은 감소하는 양상을 보였다(Fig. 1A). 또한 $CaCl_2$ 1 mM이 있는 buffer하에서 digitonin(50 μ g/ml)으로 혈소판을 lysis시킨 후의 최대 형광강도(F_{max})와 digitonin 처리 후 tris-EGTA(4 mM)를 가한 후의 최소 형광강도

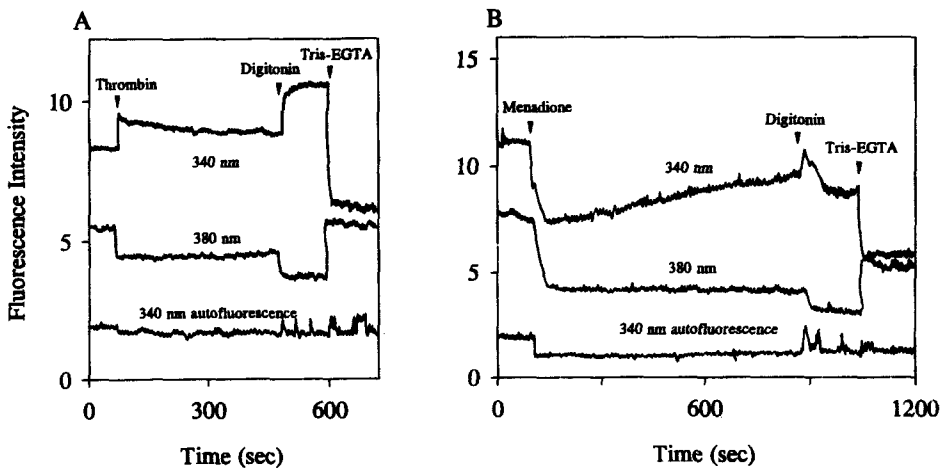


Fig. 1 — Changes of fluorescence intensity in fura-2 loaded platelets after exposed to thrombin (A) and menadione (B). The concentrations of thrombin and menadione used are 0.2U/ml and 250 uM, respectively. The arrowheads were indicated the time of additions for thrombin, menadione, digitonin, and Tris-EGTA, respectively. Data in the figure are from one representative *in vitro* run: two other similar *in vitro* runs were also performed.

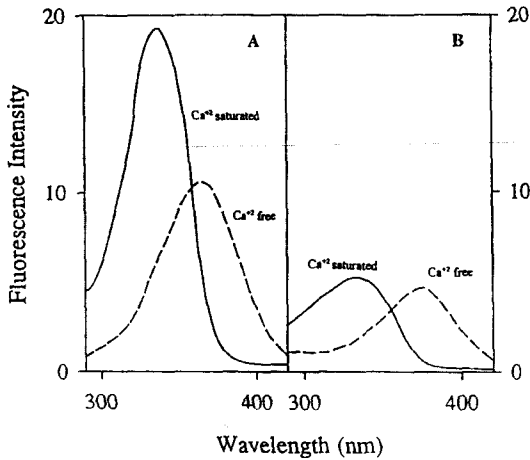


Fig. 2— Changes of fura-2 excitation spectra before (A) and after (B) 250 μM menadione addition in fura-2 loaded platelet lysates. Autofluorescence was subtracted from each measurement. Data in the figure are from one representative *in vitro* run; two other similar *in vitro* runs were also performed.

(F_{min})를 측정하여 Calibration 및 $(\text{Ca}^{2+})_i$ 의 계산을 한 결과 기존의 보고와 유사하였다.^{10,11)} 그러나 menadione을 fura-2가 loading된 혈소판에 가하였을 때, thrombin의 양상과는 달리 340 nm 와 380 nm, 양 EX wavelength에서의 형광이 menadione을 가하자마자 급격히 감소하였다(Fig. 1B). 이러한 형태의 형광의 감소는 menadione에 의한 혈소판 내의 Ca^{2+} 농도의 변화에 기인한 것이라기보다는 menadione 자체에 의한 것으로 추정되었다.

따라서 다음의 실험은 fura-2가 loading된 혈소판의 plasma membrane을 digitonin(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)으로 완전히 파괴하여 혈소판의 정상적인 대사능이 없는 상태인 혈소판 lysate에 menadione을 가하여 수행하였다(Fig. 2). Menadione을 가하기 전, fura-2의 EX spectrum을 4 mM의 Ca^{2+} 존재 하에서(Ca^{2+} -saturated), 4 mM의 EGTA 존재 하에서(Ca^{2+} -free) 측정하였다(Fig. 2A). 그러나 menadione을 가한 후에는 Ca^{2+} -saturated spectrum과 Ca^{2+} -free spectrum 모두에서 fura-2 자체의 형광이 감소하였다(Fig. 2B). 이로부터 menadione 자체가 fura-2의 형광에 영향을 미쳐, 그 강도를 현저히 감소시켰음을 확인하였다.

Menadione에 의한 fura-2의 형광감소의 원인을 규

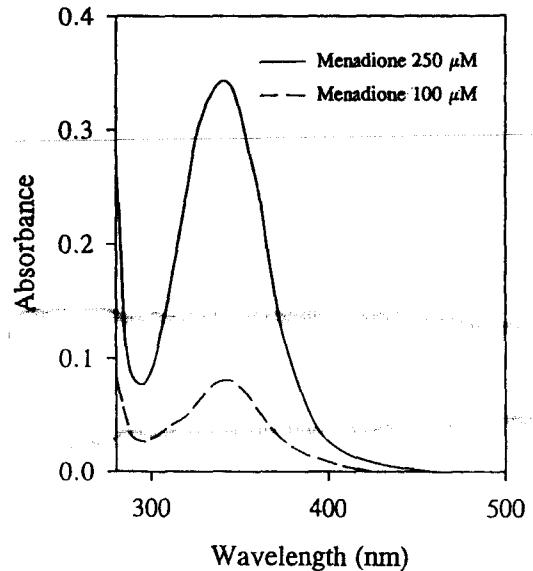


Fig. 3— UV-visible absorption spectra of menadione. Data in the figure are from one representative *in vitro* run; two other similar *in vitro* runs were also performed.

명하기 위해서 일차적으로 menadione의 UV-visible absorption을 조사하였다(Fig. 3). UV-visible absorption을 갖는 물질은 형광 dye에 대한 EX light를 그 물질이 흡수함으로써 형광에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.¹²⁾ Menadione의 UV-visible spectrum을 조사한 결과 340 nm에서 최대의 흡광을 나타내었으며, 이 흡광은 약 400 nm까지 나타났다. Fig. 3에서 관찰된 menadione의 흡광영역은 Fig. 2에서 제시된 fura-2의 EX 영역과 완전히 일치하였다. 따라서 menadione에 의한 fura-2의 형광의 감소는 menadione이 fura-2에 대한 EX light를 흡수함으로써 나타난다고 생각되어진다. 특히, 340 nm에서 최고의 형광을 갖는 Ca^{2+} -saturated spectrum의 menadione에 의한 감소가 현저하였는데, 이는 menadione이 갖는 UV-visible spectrum이 340 nm에서 최대의 흡광을 갖는 것과 잘 일치한다.

Fura-2를 이용하여 menadione의 혈소판 내의 Ca^{2+} 대사를 측정하는 것이 부적절하다는 것을 확인한 후, 다음은 menadione의 UV-visible absorption과 겹치는 않는 EX wavelength(490 nm)를 갖는 형광 dye인 fluo-3를 이용하였다. 혈소판에 fluo-3를 loading하기 전에 menadione이 fluo-3의 형광에 영향을 주는지를

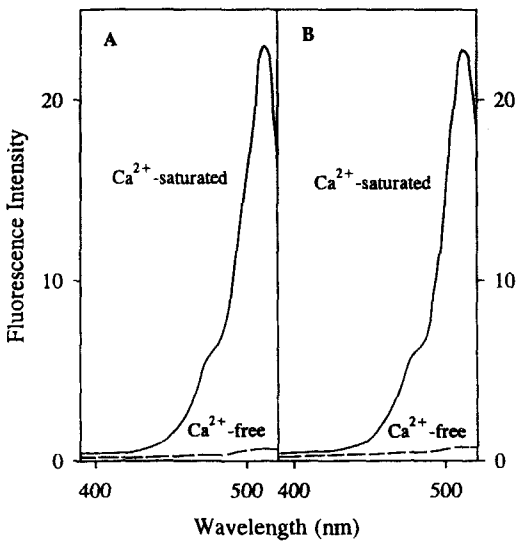


Fig. 4— Effect of menadione on the fluorescence of fluo-3/pentapotassium salt (fluo-3 salt). The excitation spectra of fluo-3 salt were measured before (A) and after (B) 250 uM menadione addition. The concentration of fluo-3 salt was 1 uM. Data in the figure are from one representative *in vitro* run; two other similar *in vitro* runs were also performed.

fluo-3, free acid를 이용하여 확인하였다. 확인 결과, menadione은 fluo-3의 형광강도와 Ca^{2+} 과의 반응성에는 영향을 미치지 않았다(Fig. 4).

Fluo-3를 혈소판에 loading하는 과정에서 fluo-3의 dye leakage가 현저하여, 이를 방지하기 위하여 anion channel blocker인 probenecid를 사용하였다. 이러한 현상은 이전의 문헌보고에서도 관찰된 바 있으며, 이 보고에서는 2.5 mM의 probenecid의 농도가 제시되었다.¹³⁾ Fluo-3를 이용하여 혈소판 내의 Ca^{2+} 대사를 관찰하기 이전에 2.5 mM probenecid 자체가 본 실험에서 연구하고자 하는 지표인 menadione의 세포독성에 영향이 있는지를 관찰하였다. 그러나 probenecid 자체가 menadione에 의한 세포 독성을 감소시키기 때문에(결과 제시 없음) fluo-3를 사용한 menadione에 의한 Ca^{2+} 대사 연구도 부적절함을 제시하고 있다.

고 찰

이상의 결과에서 혈소판에서 menadione에 의해 변화하는 세포 내 Ca^{2+} 을 형광 dye를 사용하여 측정하고

자 할 때, 1) fura-2의 경우는 menadione의 UV-visible absorption이 fura-2의 excitation(EX) light에 영향을 미침으로써 적절하지 못하며, 2) fluo-3의 경우는 그것의 leakage를 막는 probenecid가 menadione에 의한 혈소판 세포독성을 유의적으로 감소시킴으로써, Ca^{2+} 대사의 연구에 probenecid의 사용이 부적절함을 확인하였다.

Tsien 등¹⁴⁾에 의해서 최초로 세포의 viability에는 영향을 미치지 않고 세포 내의 Ca^{2+} 을 측정할 수 있는 형광 dye인 quin-2, acetoxymethyl ester(quin-2/AM)가 개발된 이래로, 많은 형광 dye의 AM이 개발되어 세포 내 Ca^{2+} 의 측정에 사용되어 왔다. 그 중 대표적으로 사용되는 것이 fura-2로서, Ca^{2+} 결합시 excitation(EX) wavelength의 전이가 일어나는 장점이 있으므로 Ca^{2+} 측정에 가장 널리 사용되고 있다. 그러나 본 실험에서 menadione에 의한 세포독성을 측정하고자 하였을 때, menadione의 흡광이 fura-2의 형광에 영향을 미침을 확인하였다. UV-visible absorption이 fura-2의 형광에 영향을 미치는 경우는 suramin이라는 물질이 혈소판의 Ca^{2+} 대사에 미치는 영향을 연구한 연구자들에 의해 보고된 바 있다.¹⁵⁾ 이 보고에 따르면, suramin이 360 nm까지 UV-visible absorption을 가지므로, 형광 dye로 fura-2를 사용할 때, fura-2의 가장 큰 장점인 340 nm와 380 nm의 비율을 이용한 Ca^{2+} 농도의 계산을 포기하고, EX wavelength로 380 nm만을 사용하여 측정하였다. Menadione의 경우 Fig. 3에서 보였듯이 450 nm정도까지 이르는 UV-visible absorption을 가지므로, fura-2를 이용한 Ca^{2+} 의 측정은 실행가능하지 못한 것으로 추정된다.

Menadione에 의한 혈소판 내 Ca^{2+} 의 측정은 Orrenius 등에 의해 수행된 바 있다.⁷⁾ 이들은 quin-2/AM을 이용하여 Ca^{2+} 을 측정하였는데, quin-2의 EX wavelength(339 nm)와 menadione의 흡광영역(Fig. 3)이 겹쳐지는 사실을 고려할 때, 실험상의 문제가 의심된다. Orrenius와 그 공동연구자들의 Ca^{2+} 측정시의 문제에 관한 논문은 이미 보고된 바 있다. Orrenius 등은 quin-2를 이용하여 acetaminophen의 대표적인 대사체이며, 그로 인한 간독성에 중요하다고 알려져 있는 N-acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI)에 의한 세포 내 유리 Ca^{2+} 의 증가를 분리 간 세포에서 보고하였다.¹⁶⁾ 그러나, 그 후의 다른 group의

연구자들은 NAPQI가 배양 중 그 물질 자체가 형광을 내는 물질로 변하여, 형광 dye의 형광에 영향을 미침을 확인하였다. 이 사실로부터 그들은 Orrenius 등에 의해 확인된 Ca^{2+} 대사가 측정상의 문제가 있음을 제시하였다.¹⁷⁾ Orrenius 등은 실험방법 등에서 quin-2 등의 형광 dye와 menadione 등의 quinone의 상호작용에 대해 전혀 기술하지 않고 있어, 방법상의 문제에 관한 상세한 정보는 없다. 따라서, 형광 dye를 사용한 Ca^{2+} 측정시, 화학물질 자체가 형광 dye의 형광에 미치는 영향은 반드시 고려되어야 할 것으로 보인다.

세포 내의 Ca^{2+} 대사 연구시 형광 dye가 광범위하게 사용되고 있음은 서론에서 언급한 바 있다. 이러한 형광 dye 사용시 문제 중의 하나로 제기되어 온 것이 세포 내에 포획되어 있던 형광 dye가 다시 medium 중으로 유리되는 dye leakage 현상이다. 이러한 현상은 일차적으로는 세포 내에서 일어나는 유리 Ca^{2+} 농도에 대한 형광 signal을 낮추게 될 뿐 아니라, 본 실험에서 사용한 실험계와 같이 일정한 부피 안에서(예를 들면 cuvette 내) 실험이 수행되는 경우에는 medium 중으로 유리된 형광 dye는 medium 중에 존재하는 Ca^{2+} 과 결합하여 형광 signal을 증가시키게 된다. 따라서, 형광 dye의 leakage 현상은 정확한 세포 내 Ca^{2+} 농도의 측정에 장애가 된다고 할 수 있다.¹⁸⁾

형광 dye leakage 현상은 본 실험에서와 같이 혈소판 뿐 아니라, 그 외의 다양한 세포들에서 관찰되고 있으며, 이를 방지하기 위해서 anion channel blocker인 probenecid의 사용이 제안되었다.^{13, 19)} 그러나 본 실험에서는 probenecid가 그 기전이 세포 내 Ca^{2+} 의 조절과 관련된다라고 보고되어 있는 혈소판에서 일어나는 현상인 menadione에 의한 세포독성²⁰⁾에 유의적으로 영향을 미침을 확인하였다.

과거에 probenecid를 이용한 실험은 혈소판이 가지고 있는 anion channel의 역할을 규명하기 위해서 수행되었다.²¹⁾ 여러 anion channel blocker들이 혈소판의 정상적인 기능이라 할 수 있는 agonist에 의한 혈소판 응집, 세포 내의 Ca^{2+} 증가 및 arachdonate 대사에 영향을 줌이 보고되어 있으며²²⁾, 최근에도 이와 유사한 보고가 있다.²³⁾ 이러한 사실은 agonist에 의한 Ca^{2+} 대사의 연구시에 probenecid의 사용이 혈소판의 기능에 영향을 줄 수 있음을 시사하고 있다.

본 실험에서는 menadione에 의한 세포내 Ca^{2+} 의 변화를 측정하는 것이 fura-2와 probenecid의 존재 하

에서의 fluo-3를 이용하여 측정하는 것은 부적절함을 보였다. 그러나 probenecid가 없는 상태에서 flow cytometry와 CHRONYSTM이라는 software를 이용하여 thrombin에 의해 변화하는 혈소판 내의 Ca^{2+} 농도를 연속적으로 측정한 실험이 보고되었다.²²⁾ 본 실험에서 fluo-3의 형광은 menadione에 의해 영향을 받지 않는다는 것을 확인하였으므로, 상기방법을 이용한다면, menadione에 의한 혈소판 내의 Ca^{2+} 변화를 측정하는 것이 가능하리라 생각된다.

이상에서 혈소판에서 menadione에 의한 Ca^{2+} 변화를 형광 dye를 이용해 측정할 때 파생되는 문제점에 대해 기술하였다. 세포 내의 Ca^{2+} 이 엄격하게 조절되어지고, 생리학적 및 독성학적인 반응시 Ca^{2+} 이 중요한 signal이 됨을 고려해 볼 때, 본 실험에서 관찰한 실험 방법상의 문제는 이 후 세포 내 Ca^{2+} 측정시 정확한 결과를 얻기 위해 반드시 고려되어야 할 것이다.

감사의 글

이 논문은 1997년도 서울대학교 발전기금 포항제철 학술연구비에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) Mustard, J. F., Perry, D. W., Ardlie, N. G. and Packham, M. A. : Preparation of suspensions of washed platelets from humans. *Br. J. Haematol.* **22**, 193 (1972).
- 2) Brass, L. F. : Ca^{2+} homeostasis in unstimulated platelets. *J. Biol. Chem.* **259**, 12563 (1984).
- 3) Rink, T. J. and Sage, S. O. : Calcium signalling in human platelets. *Annu. Rev. Physiol.* **52**, 431 (1990).
- 4) Siess, W. : Molecular mechanism of platelet activation. *Physiol. Rev.* **69**, 58 (1989).
- 5) Scharff, O. and Forder, B. : Regulation of cytosolic calcium in blood cells. *Physiol. Rev.* **73**, 547 (1993).
- 6) Jewell, S. A., Bellomo, G., Thor, H. and Orrenius, S. : Bleb formation in hepatocytes during drug metabolism is caused by disturbances in thiol and calcium ion homeostasis. *Science* **217**, 1257 (1982).

- 7) Mirabelli, F., Salis, A., Vairetti, M., Bellomo, G., Thor, H. and Orrenius, S. : Cytoskeletal alteration in human platelets exposed to oxidative stress are mediated by oxidative and Ca^{2+} -dependent mechanisms. *Arch. Biochem. Biophys.* **270**, 478 (1989).
- 8) Thomas, A. P. : The use of fluorescent indicators for measurement of cytosolic-free calcium concentration in cell populations and single cells, in Cellular Calcium(McCormack, J. G. and Cobbold, P. H., eds.) pp. 1-54, Oxford Press, Oxford, (1991).
- 9) Chung, J. H., Seo, D. C., Chung, S. H., Lee, J. Y. and Seung, S. A. : Metabolism and cytotoxicity of menadione and its metabolites in rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **142**, 378 (1997).
- 10) Rao, G. H. R., Peller, J. D. and White, J. G. : Measurement of ionized calcium in blood platelets with a new generation calcium indicator. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **132**, 652 (1985).
- 11) James-Kracke, M. R., Sexe, R. B. and Shukla, S. D. : Picomolar platelet-activating factor mobilizes Ca^{2+} to change platelet shape without activating phospholipase C or protein kinase C: simultaneous fluorometric measurement of intracellular free Ca^{2+} concentration and aggregation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **271**, 824 (1994).
- 12) Wehry, E. L. : Effects of molecular structure and molecular environment on fluorescence, in Practical Fluorescence: Theory, Methods and Technique(Gilbault, G. G., ed.) pp. 79-136, Dekker, New York, (1973).
- 13) Merritt, J. E., McCarthy, S. A., Davies, M. P. A. and Moores, K. E. : Use of fluo-3 to measure cytosolic Ca^{2+} in platelets and neutrophils. *Biochem. J.* **269**, 513 (1990).
- 14) Tsien, R. Y., Pozzan, T. and Rink, T. J. : Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator. *J. Cell Biol.* **94**, 325 (1982).
- 15) Hall, D. A. and Hourni, S. M. O. : Effects of suramin on increases in cytosolic calcium and on inhibition of adenylate cyclase induced by adenosine 5'-diphosphate in human platelets. *Biochem. Pharmacol.* **47**, 1013 (1994).
- 16) Nicotera, P., Rundgren, M., Porubek, D. J., Cotgreave, I. and Moldeus, P. : On the role of Ca^{2+} in the toxicity of alkylating and oxidizing quinone imines in isolated hepatocytes. *Chem. Res. Toxicol.* **2**, 46 (1989).
- 17) Riley, R. J., Leeder, J. S., Dosch, H. -M. and Spielberg, S. P. : Interactions between N-acetyl-p-benzoquinone imine and fluorescent calcium probes: implications for mechanistic toxicology. *Anal. Biochem.* **191**, 253 (1990).
- 18) Hoyland, J. : Fluorescent probes in practice-potential artifacts, in Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity(Mason, W. T., ed.) pp. 223-228, Academic Press, London (1993).
- 19) Arkhammar, P., Nilsson, T. and Berggren, P. : Glucose-stimulated efflux of fura-2 in pancreatic β -cells is prevented by probenecid. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **159**, 223 (1989).
- 20) Kim, K. A., Lee, J. Y., Park, K. S., Kim, M. J. and Chung, J. H. : The mechanism of menadione induced cytotoxicity in rat platelets. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **138**, 12 (1996).
- 21) Kay, M. M., Tracey, C. M., Goodman, J. R., Cone, J. C. and Bassel, P. S. : Polypeptides immunologically related to band 3 are present in nucleated somatic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 6882 (1983).
- 22) Ozaki, Y., Matsumoto, Y., Yatomi, Y., Higashihara, M., Kariya, T. and Shoji, K. : Effects of five anion channel blockers on thrombin- and ionomycin-activated platelet functions. *Biochem. Pharmacol.* **38**, 2147 (1989).
- 23) El-Nageh, N. and Harrington, M. G. : Effect of probenecid and pyridoxal-5'-phosphate on the aggregation of rat blood platelets. *Biochem. Soc. Transact.* **23**, 368S (1995).