

흰쥐 대동맥에서 phospholipase C를 경유한 melatonin의 혈관 이완 작용

김상진 · 백성수 · 강형섭 · 김진상*

진북대학교 생체안전성연구소
(계재승인: 2005년 11월 22일)

Phospholipase C-mediated vasorelaxing action of melatonin in rat isolated aorta

Shang-Jin Kim, Sung-Soo Baek, Hyung-Sub Kang, Jin-Shang Kim*

Bio-Safety Research Institute, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea
(Accepted: November 22, 2005)

Abstract : Melatonin, the principal hormone of the vertebral pineal gland, participates in the regulation of cardiovascular system *in vitro* and *in vivo*. However, the effects of melatonin on vascular tissues are still vague. The aim of this study was to assess the relationship between phospholipase C (PLC) and nitric oxide synthase (NOS)/cyclic guanosine 3',5'-monophosphate (cGMP) signaling cascade in the relaxatory action of melatonin in isolated rat aorta. Melatonin induced a concentration-dependent relaxation in phenylephrine (PE)- and KCl-precontracted endothelium intact (+E) aortic rings. In KCl-precontracted +E aortic rings, the melatonin-induced vasorelaxation was not inhibited by endothelium removal or by pretreatment with NOS inhibitors, L-N^G-nitro-arginine (L-NNA) and L-N^G-nitro-arginine methyl ester (L-NAME), guanylate cyclase (GC) inhibitors, methylene blue (MB) and 1H-[1,2,4] oxadiazolo-[4,3-a] quinoxalin-1-one (ODQ). In PE-precontracted +E aortic rings, the melatonin-induced vasorelaxation was inhibited by endothelium removal or by pretreatment with L-NNA, L-NAME, MB, ODQ and 2-nitro-4-carboxyphenyl-n,n-diphenylcarbamate (NCDC). Moreover, in without endothelium (-E) aortic rings and in the presence of L-NNA, L-NAME, MB and ODQ in +E aortic rings, the melatonin-induced residual relaxations and residual contractile responses to PE were not affected by NCDC, a PLC inhibitor. It is concluded that melatonin can evoke vasorelaxation due to inhibition of PLC pathway through the protein kinase G activation of endothelial NOS/cGMP signaling cascade.

Key words : aorta, cGMP, melatonin, NOS, 2-nitro-4-carboxyphenyl-n,n-diphenylcarbamate, vasorelaxation

서 론

Melatonin(N-acetyl-5-methoxytryptamine)은 포유류의 번식, 동면과 같은 계절주기 조절, 조류와 파충류의 일주기 조절 및 명암 반응에 관여하며 [2, 27, 32], 심혈관계 [6, 21, 32, 33]를 비롯한 면역계 [26], 신경·내분비계 [33] 및 체온 조절계 [20] 등을 포함한 다양한 생리학적

기능 [33]을 갖고 있는 indole계 신경호르몬이다. 또한 허혈성 심장과 재관류에 의한 심장의 산화적 손상에 대한 억제 효과가 있다고 하였다 [25]. 이와 같이 melatonin은 생체내 다른 내인성 물질과 마찬가지로 다양한 생리학적 역할을 담당하고 있는데 그 중 심혈관 기능을 직접적으로 조절한다 [18]. 또한 혈압 하강, 심박수, 혈관 수축 및 이완 작용이 보고되었다 [3, 6, 9, 11, 28, 29].

*Corresponding author: Jin-shang Kim
College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Jeonju 561-756
[Tel: +82-63-270-2554, Fax: +82-63-270-3780, E-mail: kimjs@chonbuk.ac.kr]

심혈관계 기능 조절은 생체 항상성 유지를 위해 매우 중요하며 이는 주로 신경계 및 내분비계에 의해 이뤄질 뿐만 아니라 내인성 물질에 의한 신경계 반응으로 이뤄진다. 심혈관계 기능 지표가 되는 혈압 변동은 다양한 생리학적 및 병리학적 인자에 의해 혈관의 직접적인 이완 및 수축 그리고 심근의 수축력 및 심박수 변동에 기인하기 [8] 때문에 melatonin과 같은 내인성 물질의 혈관에 대한 작용기전은 매우 중요시되고 있다. 따라서 melatonin의 혈관에 대한 효과 및 작용 기전에 대하여 많은 연구들이 진행되어 왔다.

일반적인 주요 혈관이완 기전으로 세포내 Ca^{2+} 농도를 감소시켜 혈관을 이완시키는 Ca^{2+} 통로 차단이다. 혈관이완을 야기하는 Ca^{2+} 통로 차단은 세포내에서 두 가지 기전에 의하여 일어난다. 즉, cyclic guanosine 3',5'-monophosphate(cGMP) 활성화에 의한 protein kinase G (PKG) 활성화와 직접적인 Ca^{2+} 통로 차단이다. PKG 활성화는 Ca^{2+} -활성 K^+ 통로 활성화, 원형질막 Ca^{2+} 펌프 활성화, 근형질세망내 Ca^{2+} 펌프 활성화, inositol triphosphate(IP_3) 수용체 억제, IP_3 합성 억제, 근수축계의 Ca^{2+} 감수성 감소 및 protein kinase C(PKC) 활성을 감소시켜 혈관을 이완시킬 수 있다 [4]. 이전 많은 연구 보고에 따르면 melatonin의 혈관 이완기전 역시 상기 다양한 일반적인 혈관이완 기전에 포함되고 있음을 알 수 있다. Melatonin의 혈관 이완 기전 중 혈관내피 의존성 nitric oxide synthase(NOS)/cGMP 경로는 잘 알려져 있다. 그러나 phospholipase C(PLC) 경로 관련성은 물론 NOS/cGMP 경로 활성화와 PLC 경로와의 상호관계는 보고된 바 없다.

따라서 이 연구에서는 melatonin의 주요 혈관 이완 기전인 NOS/cGMP 경로 활성화에 의한 혈관 이완을 재확인함과 동시에 PLC 경로 그리고 NOS/cGMP 경로와 PLC 경로의 상호 관련성을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

혈관 적출 및 수축력 측정

전북대학교 생체안전성연구소로부터 공급받은 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐(200~300 g)를 처사시켜 방혈시킨 후 흉대동맥(thoracic aorta)을 적출하여 30°C의 산소포화 영양액(133.0 mM NaCl, 5.0 mM KCl, 2.5 mM $CaCl_2$, 1.2 mM $MgSO_4$, 1.0 mM KH_2PO_4 , 11.0 mM glucose 및 12.0 mM $NaHCO_3$ 와 95% O_2 : 5% CO_2 , pH 7.3~7.4)으로 혈액을 제거한 다음 실험 현미경하에서 흉대동맥 주위의 지방 및 결합 조직편 등을 제거하고 약 2~3 mm의 길이로 절단하였다. 절단된 한 개의 혈관 고리를 상기 영양액이 관류(4±0.5 ml/min)되는 tissue chamber내에 직경 50 μ m 고정핀에 고정하고 한쪽은 직경 25 μ m 은

선에 연결된 고리에 연결한 후 tension transducer (Model 400A; Cambridge, USA)에 연결하였다. 연결 후 250~300 μ g의 장력(정지 장력)을 준 후 안정되면 등장성 40 mM KCl의 영양액을 20~30분간 2~3회 관류시켜 장력을 안정시켰다. 장력 변동은 recording system (Model 3400; Gould, USA)을 이용하여 기록하였다.

약물 처치 및 혈관 내피 제거

Phenylephrine(PE) 또는 고농도 KCl을 투여하여 수축력이 일정해지면 농도 별 melatonin의 혈관 이완효과를 관찰하고 동일 조직에서 혈관 내피를 제거하거나 여러 억제제들을 일정 시간 동안 전 처치한 후 다시 melatonin의 혈관 이완효과를 관찰하여 비교하였다. 내피 존재 유무에 따른 실험은 내피가 존재한 상태에서 혈관 이완효과를 관찰한 후 정지 장력이 유지된 상태에서 saponin(0.3 mg/ml)을 영양액에 녹여 12~15분간 관류시켜 내피를 제거하고 다시 melatonin의 혈관 이완효과를 관찰하였다. 혈관 내피 존재 유무는 0.5 μ M의 acetylcholine (ACh)을 투여하여 그 이완 여부로 혈관 내피 제거 상태를 확인하였다.

사용 약물 및 통계 처리

ACh, L-N^G-nitro-arginine(L-NNA), L-N^G-nitro-arginine methyl ester(L-NAME), methylene blue(MB), 2-nitro-4-carboxyphenyl-n,n-diphenylcarbamate(NCDC), 1H-[1,2,4]oxadiazolo-[4,3-a]quinoxalin-1-one(ODQ), PE 및 saponin은 Sigma Chemical Co.(USA)로부터 구입하였고, melatonin은 ICN Biomedical Inc.(Solon, USA)으로부터 구입하여 사용하였다. 실험 성적은 mean ± S.E.M으로 나타내었고, 각 실험 결과의 유의성은 Student's *t*-test에 의해 검정하였다.

결 과

내피 제거, L-NNA, L-NAME, MB 및 ODQ이 고농도 KCl에 의한 수축 혈관에서 melatonin의 혈관 이완작용에 미치는 영향

내피가 존재하는 혈관을 40 mM KCl로 수축시킨 후 10, 30, 100, 300, 600 및 1000 μ M melatonin을 관류시킨 결과 농도 의존적으로 혈관을 이완시켰다. 동일 조직에 saponin을 처리하여 혈관 내피를 제거(ACh 이완 여부로 내피 존재 유무 확인)하거나 NOS 억제제인 10 μ M L-NNA이나 100 μ M L-NAME 그리고 GC 억제제인 10 μ M MB나 10 μ M ODQ을 40~60분 동안 관류시켰다. 그리고 다시 KCl로 혈관을 수축시킨 후 melatonin을 상기와 같은 농도 별로 관류시킨 결과, 혈관 내피 제거 또는

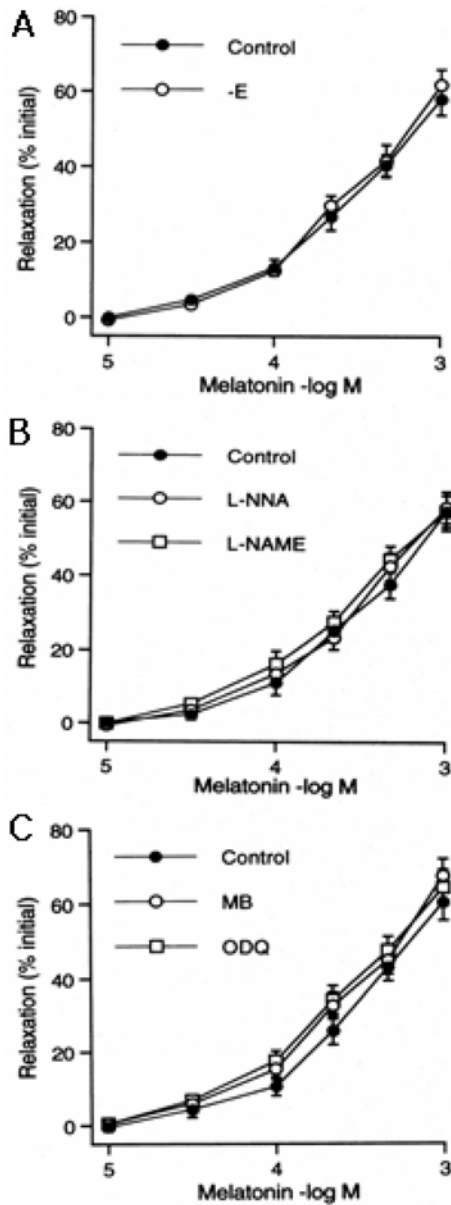


Fig. 1. Effects of removal of endothelium, NOS inhibitors and GC inhibitors on the melatonin-induced relaxation in KCl-precontracted aortic rings. Graph showing the data summary of the effects of saponin (0.3 mg/ml; removal of endothelium, A), NO synthase (NOS) inhibitors (20 μ M L-NNA and 100 μ M L-NAME, B) and guanylate cyclase (GC) inhibitors (10 μ M MB, methylene blue and 10 μ M ODQ, C) on the melatonin-induced relaxation in KCl-precontracted +E aortic rings. Responses are expressed as a percentage of the initial KCl-induced tone. Each point represents the mean \pm S.E.M by joining data files from separate experiments (n = 5).

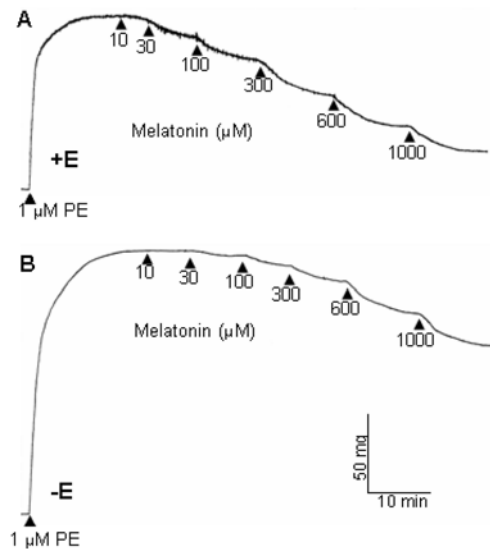


Fig. 2. Effects of removal of endothelium on the melatonin-induced relaxation in PE-precontracted aortic rings. Typical tracings of the relaxant effects of melatonin in phenylephrine (PE)-precontracted aortic rings with (+E, A) or without (-E, B) endothelium. Where indicated, chemicals were added to the perfusing medium.

각각의 억제제들에 의하여 melatonin의 혈관 이완효과가 억제되지 않았다(Fig. 1). 상기 억제제들의 농도를 변동시키거나 전 처치 시간을 변동시켜도 melatonin의 혈관 이완효과는 억제되지 않았다.

내피 제거, L-NNA, L-NAME, MB 및 ODQ이 PE에 의한 수축 혈관에서 melatonin의 혈관 이완작용에 미치는 영향

내피가 존재하는 혈관을 PE으로 수축시킨 후 10, 30, 100, 300, 600 및 1000 μ M melatonin을 관류시킨 결과 농도 의존적으로 혈관을 이완시켰다(Fig. 6A). 동일 조직에 saponin을 처리하여 혈관 내피를 제거하거나 10 μ M L-NNA, 100 μ M L-NAME, 10 μ M MB나 10 μ M ODQ을 40~60분 동안 관류시켰다. 그 후 반복하여 혈관을 PE으로 수축시키고 상기와 동일 농도의 melatonin을 관류시킨 결과, melatonin의 농도 의존적인 혈관 이완효과가 내피 존재 혈관과 각각의 억제제 처리전의 이완 정도를 비교할 때 유의성 있게 억제되었다(Fig. 2, 3A).

NCDC가 PE에 의한 수축 혈관에서 melatonin의 혈관 이완작용에 미치는 영향

내피가 존재하는 혈관에서 melatonin의 농도 별 혈관 이완효과를 관찰한 후 PLC 억제제인 30 μ M NCDC를

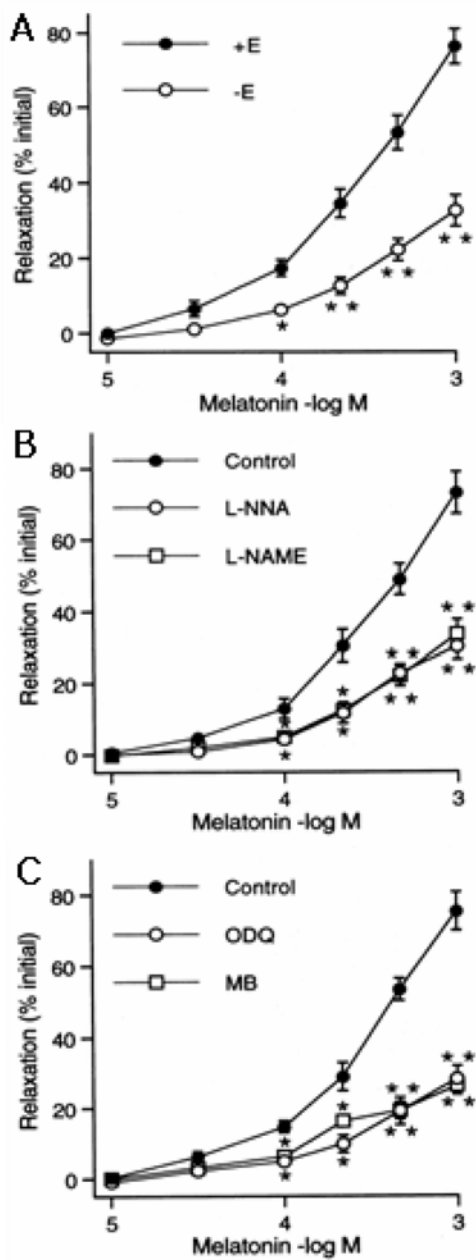


Fig. 3. Effects of removal of endothelium, NOS inhibitors and GC inhibitors on the melatonin-induced relaxation in PE-precontracted aortic rings. Graph showing the data summary of the effects of saponin (A), NOS inhibitors (20 μ M L-NNA and 100 μ M L-NAME, B) and GC inhibitors (10 μ M MB and 10 μ M ODQ, C) on the melatonin-induced relaxation in PE-precontracted +E aortic rings. Each point represents the mean \pm S.E.M by joining data files from separate experiments ($n=4-5$). * $p < 0.05$, ** < 0.001 vs. +E or control.

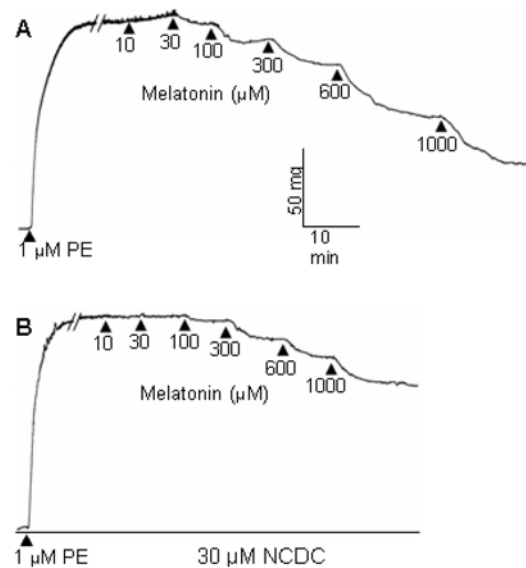


Fig. 4. Effects of PLC inhibitor on the melatonin-induced relaxation in PE-precontracted aortic rings. Typical tracings of the effects of PLC inhibitor (30 μ M NCDC) on the melatonin-induced relaxation in PE-precontracted +E aortic rings. Where indicated, chemicals were added to the perfusing medium.

포함하는 영양액을 각각 40분 동안 관류시켰다. 그 후 반복하여 혈관을 PE으로 수축시킨 후 상기와 같은 농도로 melatonin을 처치한 결과 NCDC에 의하여 melatonin의 혈관 이완효과가 유의성 있게 억제되었다(Fig. 4).

혈관 내피 제거, NOS 억제제 또는 GC 억제제 존재하에서 melatonin의 혈관 이완작용에 미치는 NCDC의 영향

PE으로 수축시킨 혈관에서 melatonin은 농도 의존적으로 혈관을 이완시켰으며(Fig. 4, 5A), 이러한 melatonin의 혈관 이완효과는 혈관 내피 제거, NOS 억제제 및 GC 억제제에 의하여 각각 유의성 있게 억제되었다. 그 후 혈관 내피를 제거하거나 NOS 억제제 및 GC 억제제가 함유된 관류액에 30 μ M NCDC를 40분 동안 전 처리한 후 melatonin의 혈관 이완효과를 관찰한 결과, 혈관 이완효과가 더 이상 억제되지 않았다(Fig. 5, 6, 7).

추가적으로 10~1000 μ M melatonin 존재하에서 농도 의존적으로 PE에 의한 수축력이 억제되었다. 동일 조직에 saponin을 처리하여 혈관 내피를 제거하거나 10 μ M L-NNA, 100 μ M L-NAME, 10 μ M MB 또는 10 μ M ODQ를 40~60분 동안 관류시킨 후 melatonin을 30분간 전 처치하고 2~5 μ M PE의 최대 수축력을 측정된 결과,

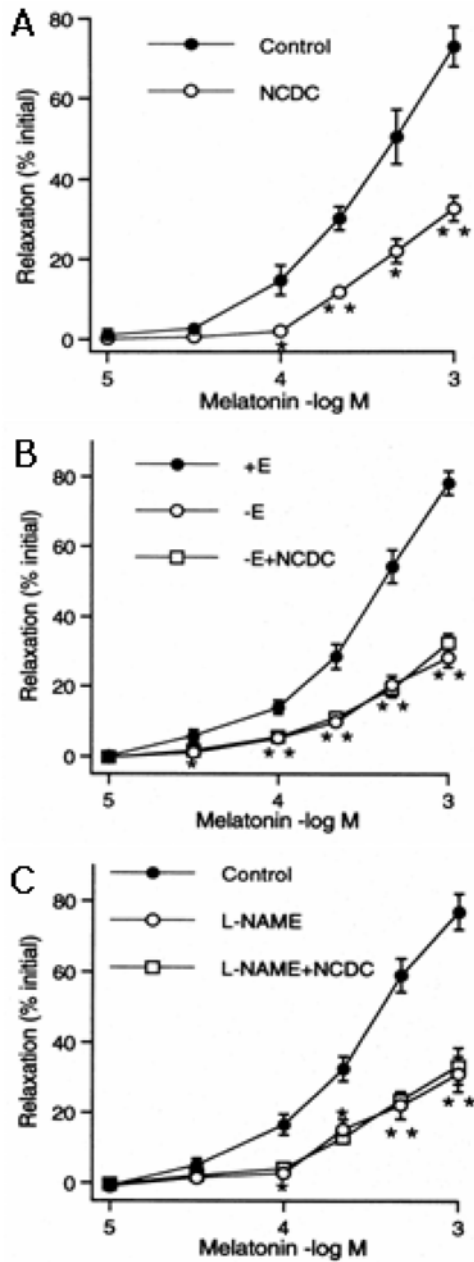


Fig. 5. Influences of PLC inhibitor on the effect of removal of endothelium and NOS inhibitor on the melatonin-induced relaxation in PE-precontracted aortic rings. Graph showing the data summary of the effects of NCDC on the melatonin-induced relaxation in PE-precontracted +E aortic rings (A) and the effects of NCDC on the melatonin-induced relaxation in saponin (B)- and L-NAME (C)-pretreated +E aortic rings. Each point represents the mean \pm S.E.M by joining data files from separate experiments (n = 4-5). * $p < 0.01$, ** < 0.001 vs. +E or control.

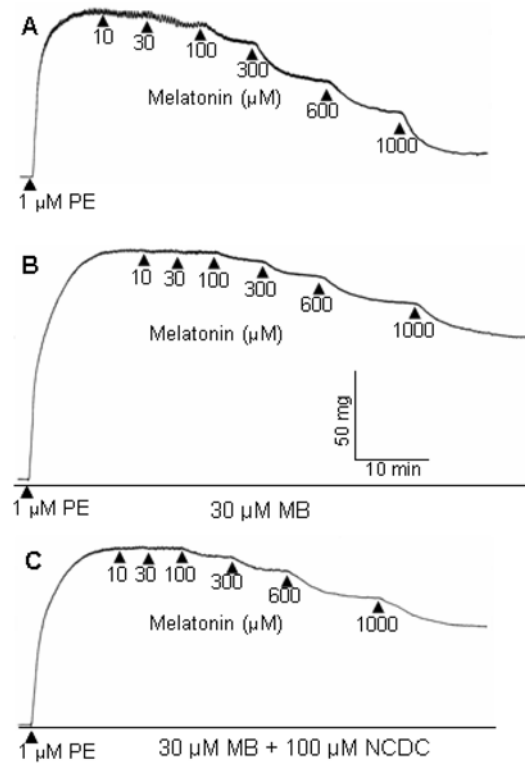


Fig. 6. Influences of PLC inhibitor on the effect of GC inhibitor on the melatonin-induced relaxation in PE-precontracted aortic rings. Typical tracings of the effects of MB on the melatonin-induced relaxation in PE-precontracted +E aortic rings (A and B), and the effect of NCDC on melatonin-induced relaxation in MB-pretreated +E aortic rings (C). Where indicated, chemicals were added to the perfusing medium.

melatonin의 수축력 억제효과가 혈관 내피 제거 또는 각각의 상기 억제제들에 의하여 유의성 있게 회복되었다. 동일 조직에서 혈관 내피를 제거하거나 10 μ M L-NNA, 100 μ M L-NAME, 10 μ M MB 또는 10 μ M ODQ를 40-60 분 동안 관류시킨 후 melatonin과 NCDC를 동시에 40분 간 전 처치하고 2-5 μ M PE의 최고 수축력을 측정 한 결과 혈관 내피 제거 또는 각각의 상기 억제제들에 의한 회복 정도에 비교하여 NCDC에 의하여 더 이상 회복되지 않았다(자료 제시하지 않음).

고 찰

Melatonin의 심혈관계 작용 중 혈관에 대하여 수축과 이완에 대한 상반된 보고가 있다. 첫째, 수축기전으로, melatonin은 수용체를 통한 Ca^{2+} 의존성 K^+ 통로 억제

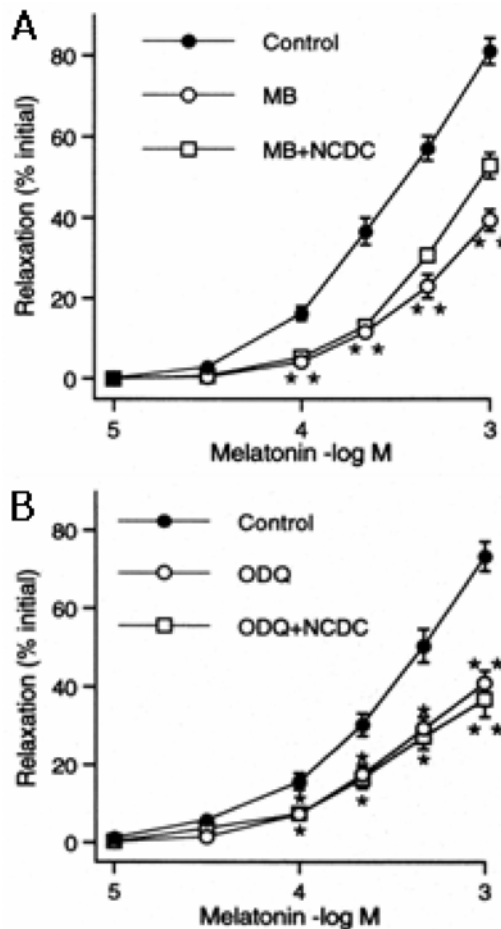


Fig. 7. Influences of PLC inhibitor on the effect of GC inhibitors on the melatonin-induced relaxation in PE-contracted aortic rings. Graph showing the data summary of the effects of NDCD on the melatonin-induced relaxation in MB (A) and ODQ (B)-pretreated +E aortic rings. Each point represents the mean \pm S.E.M by joining data files from separate experiments ($n = 5$). * $P < 0.05$, ** < 0.001 vs. control.

[11], cyclic adenosine 3',5'-monophosphate(cAMP)의 생성 억제 및 protein kinase A(PKA)의 활성 억제 [13] 또는 prostaglandin 및 NO 등의 혈관 이완물질을 감소시켜 혈관을 수축시킨다 [19, 22]. 둘째, 이완기전으로, 일반적인 근수축은 adenylate cyclase (AC)와 guanylate cyclase (GC) 활성화에 의한 cAMP와 cGMP의 증가로 PKA 및 PKG가 활성화에 의해 조절되는데, melatonin에 의한 혈관이완은 혈관 내피세포에 의존적이며 [28], melatonin은 cGMP 대사 억제 [28], Ca^{2+} 농도 감소 [1], Ca^{2+} 통로 활성 억제 [32], GC 활성 촉진 [10]과 cGMP-phosphodies-

terase(PDE) 활성 억제 [29] 등에 의한다고 하였다. 또한 혈관 이완 작용이 있음을 뒷받침해주는 연구로, melatonin은 정상적인 쥐에서 뿐만 아니라 송과선을 제거한 흰쥐 [7, 17]와 자연발생적 고혈압 흰쥐 [16]에서 혈압을 감소시키며, 흰쥐의 송과선을 제거하면 고혈압이 유발되고 [16], 이러한 고혈압 효과가 melatonin 급여로 억제되었고 [14], melatonin이 고혈압 환자에 대한 임상적 치료제로도 사용될 수도 있다 [18]는 보고 등이 있다. 이와 같은 melatonin의 혈관 이완 작용에 대한 보고들을 살펴보면 PLC의 관련성이 보고되지 않았을 뿐만 아니라 부분적인 연구에 따라 부분적인 작용기전을 설명하고 있을 뿐이다. 따라서 이 연구 결과를 토대로 주요 혈관 이완 기전으로 밝혀진 PLC 경로 관련성 및 NOS/cGMP 경로와 PLC 경로와의 상호관계를 설명하고자 한다.

고농도 KCl에 의한 혈관수축은 세포의 Ca^{2+} 제거나 L-type Ca^{2+} 통로 차단제에 의하여 억제 [5]되기 때문에 KCl에 의한 수축은 전위 의존성 Ca^{2+} 통로를 경유한 Ca^{2+} 유입에 의존적임을 의미한다. 따라서 어떤 물질이 고농도 KCl에 의한 수축을 억제하거나 수축 혈관을 이완시키면 세포막 탈분극에 의한 Ca^{2+} 유입이 억제되었다고 할 수 있다. 고농도 KCl로 수축된 혈관에 melatonin을 처치한 결과 농도 의존적인 혈관 이완효과가 관찰되었으며, 이러한 결과에 의하면 melatonin이 막전위 의존성 Ca^{2+} 통로 활성화에 의한 세포막 탈분극으로 인한 Ca^{2+} 유입을 억제하여 혈관을 이완시키는 것으로 생각한다. 또한 직접적인 L-type Ca^{2+} 통로 활성화제인 Bay K 8644로 수축시킨 혈관에서도 동일하게 melatonin이 혈관을 이완(자료 제시하지 않음)시켜 L-type Ca^{2+} 통로 활성화 억제에 의한 혈관이완을 확인할 수 있었다. 또 다른 연구방법 중 하나인 수용체 효현제에 의한 혈관 평활근 수축은 주로 수용체 자극 경로를 경유한 Ca^{2+} 통로의 개방에 의한 세포의 Ca^{2+} 의 세포내로 유입, 세포내 저장소로부터 Ca^{2+} 유리 [31] 및 비선택적 양이온 통로를 경유한 Ca^{2+} 유입 [15, 21]에 의하여 일어난다. 본 연구에서는 α_1 -adrenoceptor 효현제인 PE을 전처치하여 수축시킨 혈관에 melatonin을 처치한 결과 농도 의존적으로 혈관이 이완되었다. 그러나 PE으로 수축시킨 혈관에서는 달리 고농도 KCl에 의해 수축된 혈관에서는 혈관 내피 제거, NOS 억제제 및 GC 억제제에 의하여 melatonin에 의한 혈관 이완효과가 억제되지 않았다. 따라서 melatonin은 KCl에 의한 수축 혈관에서는 내피 의존성 NOS/cGMP계와 무관하게 막전위 의존성 Ca^{2+} 통로를 통한 Ca^{2+} 유입을 억제하여 혈관을 이완시킨다는 것을 알 수 있었다.

혈관 내피가 존재하는 경우, 혈관 내피 유래 이완 인

자인 nitric oxide(NO) 유리는 물론 평활근에서 외래성 NO는 cGMP를 증가시키기 때문에 혈관이완 및 수축 기전 연구에서 혈관 내피의 유무, NOS 억제 및 활성화 상태는 매우 중요하다. 혈관 이완물질 중 외인성 유기 질산 화합물 혈관이완제(nitrovasodilator)는 혈관 내피 세포와 관련 없이 NO를 제공하여 GC를 활성화시키고, melatonin과 같은 내인성 호르몬 또는 신경전달물질들은 혈관 내피 세포에서 NOS 활성으로 NO를 유리시켜 GC를 활성화시킴으로써 세포내 cGMP를 증가시킨다 [4]. 생체에서 melatonin은 NOS의 활성을 조절하여 혈관 내피에서 유래하는 혈관이완 인자인 NO의 생산에 영향을 미친다 [23, 24]. 자연발생적인 고혈압 흰쥐의 장간막 동맥 및 대동맥에서 혈관 내피 의존적 이완효과가 melatonin 처치에 의하여 강화되고 melatonin을 처치한 고혈압 쥐에서의 NOS 억제제인 L-NAME의 처치는 동맥압을 상승시킴으로 melatonin의 저혈압 유발 효과는 혈관의 NOS 경로의 활성화를 통해 이루어진다고 하였다 [12]. 토끼 및 흰쥐 혈관에서 melatonin은 cGMP에 특이적인 PDE 활성을 억제하고 [28, 29, 30], 이로 인해 혈관이 이완된다고 하였다. 즉, melatonin은 cGMP-PDE 억제제인 zaprinast와 유사하게 토끼 대동맥에서 nitroglycerin에 의한 이완을 강화시키고 이러한 melatonin의 혈관 이완효과가 GC 억제제인 MB에 의하여 억제되었다 [29]. 이와 같은 이전의 연구 결과들에 의하면, melatonin 및 많은 혈관 이완물질들의 작용기전이 NOS, GC 및 cGMP 활성화 경로와 밀접한 관련됨을 알 수 있다. 상기의 연구 결과들과 유사하게 본 연구에서도 PE에 의한 수축 혈관에서 melatonin의 이완효과가 혈관 내피 제거, NOS 억제제 및 GC 억제제에 의하여 유의성 있게 억제되었다. 이러한 결과는 흰쥐 대동맥에서 직접적으로 melatonin이 혈관을 이완시키는 효과 [34]와 면양의 폐 동맥과 정맥 [35]에서 melatonin의 혈관 이완효과와 일치하였다. 따라서 PE 수축 혈관에 대한 melatonin의 이완효과가 내피 의존성 NOS/cGMP 활성화 경로를 통하여 나타나는 것임을 재확인하였다.

PE에 의한 혈관수축은 세포막의 PLC가 활성화되어 PIP₂가 가수분해 됨으로써 두 종류의 이차 전달물질인 IP₃와 DAG가 형성되고 IP₃에 의한 세포내 Ca²⁺ 유리 및 DAG에 의한 PKC 활성화로 혈관은 수축한다. 반면, 혈관 이완은 직접적인 Ca²⁺ 통로 차단과 cGMP 활성화에 의한 PKG 활성으로 다양한 경로를 통하여 세포내 Ca²⁺ 농도가 감소됨으로써 일어난다 [4]. 이 중 cGMP 활성화에 의한 PKG 활성 결과로 PKC 활성을 억제로 세포내 Ca²⁺ 농도가 감소될 수 있기 때문에 이 경로 중 이전 경로인 PLC의 관련성을 고려할 수 있다. 즉, PLC의 억제에 의한 세포내 Ca²⁺ 농도 감소로 혈관이 이완될 수 있다. 이

연구에서 PE으로 수축된 혈관에서 melatonin의 혈관 이완효과에 대한 PLC 억제제인 NCDC의 영향을 관찰하였다. 그 결과 melatonin의 혈관 이완효과가 NCDC에 의하여 유의성 있게 억제되었음은 PLC 억제에 의하여 나타남을 알 수 있고 이전의 연구 결과와 본 연구 결과에 의하면 melatonin은 cGMP를 활성화시켜 PKG 활성으로 인하여 PLC를 억제하여 혈관을 이완시킬 수 있음을 의미한다. 또한 melatonin에 의한 혈관이완이 cGMP 활성화에 의한 PLC 억제는 물론 직접적인 PLC 억제 또는 IP₃와 DAG 생성 억제에 의한 결과일 가능성을 추측할 수가 있으므로 이 연구에서는 NOS/cGMP 경로와 PLC 경로와의 상호 관련성을 알아보기 위하여 PE으로 수축된 혈관에서 혈관 내피 제거, NOS 억제제 및 GC 억제제들의 이완 억제에 대한 NCDC의 영향을 관찰하였다. 그 결과 melatonin의 혈관 이완효과에 대한 혈관 내피 제거, NOS 억제제 및 GC 억제제들의 혈관이완 억제효과가 NCDC 처치에 의하여 더 이상 억제되지 않았다. 만약, melatonin의 혈관 이완효과가 각각의 단계(NOS/cGMP와 PLC 단계)를 경유한다면 이러한 두 단계가 각각 억제될 것이므로 혈관 내피 제거, NOS 억제제 및 GC 억제제들에 의한 melatonin의 혈관 이완 억제효과와 더불어 NCDC의 억제효과로 melatonin의 혈관 이완 억제효과는 더욱 강화되었어야 할 것이다. 그러나 melatonin의 이완 효과에 대한 NO/cGMP 단계 차단 또는 PLC 단계의 각각의 차단 영향과 동시 두 단계(NOS/cGMP와 PLC 단계) 차단 영향과 차이가 없었다. 즉, 억제 정도가 강화되지 않았다. Melatonin의 수축력 억제 효과 역시 이완 실험에서와 유사하게 혈관 내피 제거, NOS 억제제 및 GC 억제제들에 의하여 회복되었으나 이 회복 효과도 NCDC에 의하여 강화되지 않았다. 이러한 결과는 melatonin의 혈관 이완효과가 혈관 내피 의존성 NOS/cGMP 경로와 관련된 세포막의 PLC 경로를 경유하여 나타난 효과 즉, melatonin은 혈관 내피 세포의 NOS/cGMP 경로를 활성화시켜 이로 인하여 PKG가 활성화됨으로서 PLC가 억제되어 혈관을 이완시킬 수 있음을 알 수 있다.

결론

PE 및 KCl로 수축시킨 흰쥐 분리 대동맥에서 melatonin은 농도 의존적으로 혈관을 이완시켰다. KCl 수축 혈관에서 이완효과는 내피 제거, NOS 억제제 및 GC 억제제들에 의하여 억제되지 않았으나 PE 수축 혈관에서는 melatonin의 혈관 이완효과가 내피 제거, NOS 억제제 및 GC 억제제들에 의하여 억제되었다. 또한 melatonin의 혈관 이완효과가 PLC 억제제인 NCDC에 의하여 억제되

었다. PE 수축 혈관에서 melatonin의 혈관 이완에 대한 내피 제거, NOS 억제제 또는 GC 억제제들의 억제효과가 NCDC 병용 처치에 의하여 강화되지 않았다. Melatonin의 수축력 억제 효과 역시 이완 실험에서와 유사하게 혈관 내피 제거, NOS 억제제 및 GC 억제제들에 의하여 회복되었으나 이 회복 효과도 NCDC에 의하여 강화되지 않았다. 따라서 melatonin은 혈관 내피세포 의존적 NOS/cGMP를 활성화시켜 PKG를 활성화시킴으로써 PLC가 억제되어 혈관을 이완시킬 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Benitez-King G, Rios A, Martinez A, Anton-Tay F. In vitro inhibition of Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II activity by melatonin. *Biochim Biophys Acta* 1996, **1290**, 191-196.
2. Bitman EL, Karsch EJ. Nightly duration of pineal melatonin secretion determines the reproductive response to inhibitory day length in the ewe. *Biol Reprod* 1984, **30**, 585-593.
3. Bosman H, Dormehl IC, Hugo N, Redelinghuys IF, Theron JJ. The effect of intravenous administration of melatonin on cardiovascular parameters of the baboon (*Papio ursinus*). *J Pineal Res* 1991, **11**, 179-181.
4. Carvajal JA, Germain AM, Huidobro-Toro JP, Weiner CP. Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *J Cell Physiol* 2000, **184**, 409-420.
5. Cauvin C, Loutzenhiser R, Van Breemen C. Mechanism of calcium-antagonist induced vasodilation. *Annu Rev Pharmacol* 1983, **23**, 373-396.
6. Chuang JI, Chen SS, Lin MT. Melatonin decreases brain serotonin release, arterial pressure and heart rate in rats. *Pharmacology* 1993, **47**, 91-97.
7. Cunnane SC, Manku MS, Oka M, Horrobin DP. Enhanced vascular reactivity to various vasoconstrictor agents following pinealectomy in the rat: role of melatonin. *Can J Physiol Pharmacol* 1980, **58**, 287-293.
8. Dart AM, Kingwell BA. Pulse pressure-a review of mechanisms and clinical relevance. *J Am Coll Cardiol* 2001, **37**, 975-984.
9. Doolen S, Krause DN, Dubocovich ML, Duckles SP. Melatonin mediates two distinct responses in vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 1998, **345**, 67-69.
10. Faillace MP, Keller Sarmiento MI, Rosenstein RE. Melatonin effect on the cyclic GMP system in the golden hamster retina. *Brain Res* 1996, **711**, 112-117.
11. Geary GG, Krause DN, Duckles SP. Melatonin directly constricts rat cerebral arteries through modulation of potassium channels. *Am J Physiol* 1997, **273**, 1530-1536.
12. Girouard H, Chulak C, Lejossec M, Lamontagne D, Lamontagne D, De Champlain J. Vasorelaxant effects of the chronic treatment with melatonin on mesenteric artery and aorta of spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2001, **19**, 1369-1377.
13. Godson C, Reppert SM. The Mel_{1a} melatonin receptor is coupled to parallel signal transduction pathways. *Endocrinology* 1997, **138**, 397-404.
14. Holmes SW, Sugden D. The effect of melatonin on pinealectomy-induced hypertension in the rat. *Br J Pharmacol* 1976, **56**, 360-361.
15. Karaki H, Ozaki H, Hori M, Mitsui-Saito M, Amano K, Harada K, Miyamoto S, Nakazawa H, Won KJ, Sato K. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. *Pharmacol Rev* 1997, **49**, 157-230.
16. Kawashima K, Miwa Y, Fujimoto K, Oohata H, Nishino H, Koike H. Antihypertensive action of melatonin in the spontaneously hypertensive rat. *Clin Exp Hypertens* 1987, **9**, 1121-1131.
17. Kilic E, Ozdemir YG, Bolay H, Kelestimur H, Dalkara T. Pinealectomy aggravates and melatonin administration attenuates brain damage in focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999, **19**, 511-516.
18. Lusardi P, Piazza E, Fogari R. Cardiovascular effects of melatonin in hypertensive patients well controlled by nifedipine: a 24-hour study. *Br J Clin Pharmacol* 2000, **49**, 423-427.
19. Martinuzzo M, Del Zar MM, Cardinali DP, Carreras LO, Vacas MI. Melatonin effect on arachidonic acid metabolism to cyclooxygenase derivatives in human platelets. *J Pineal Res* 1991, **11**, 111-115.
20. McLellan TM, Gannon GA, Zamecnik J, Gil V, Brown GM. Low doses of melatonin and diurnal effects on thermoregulation and tolerance to uncompensable heat stress. *J Appl Physiol* 1999, **87**, 308-316.
21. Nakajima T, Hazama H, Hamada E, Wu SN, Igarashi K, Yamashita T, Seyama Y, Omata M, Kurachi Y. Endothelin-1 and vasopressin activate Ca^{2+} -permeable non-selective cation channels in aortic smooth muscle cells: mechanism of receptor-mediated Ca^{2+} influx. *J Mol Cell Cardiol* 1996, **28**, 707-722.

22. **Okatani Y, Wakatsuki A, Watanabe K, Taniguchi K, Fkaya T.** Weak vasoconstrictor activity of melatonin in human umbilical artery: relation to nitric oxide-scavenging action. *Eur J Pharmacol* 2001, **417**, 125-129.
23. **Pozo D, Reiter RJ, Calvo JR, Guerrero JM.** Inhibition of cerebellar nitric oxide synthase and cyclic GMP production by melatonin via complex formation with calmodulin. *J Cell Biochem* 1997, **65**, 430-442.
24. **Pozo D, Reiter RJ, Calvo JR, Guerrero JM.** Physiological concentrations of melatonin inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum. *Life Sci* 1994, **55**, 455-460.
25. **Reiter RJ.** Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev* 1991, **12**, 151-180.
26. **Reiter RJ, Calvo JR, Karbownik M, Oi W, Tan DX.** Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 2000, **917**, 376-386.
27. **Reiter RJ, Tan DX.** Melatonin: a novel protective agent against oxidative injury of the ischemic/reperfused heart. *Cardiovasc Res* 2003, **58**, 10-19.
28. **Satake N, Oe H, Shibata S.** Vasorelaxing action of melatonin in rat isolated aorta; possible endothelium dependent relaxation. *Gen Pharmacol* 1991, **22**, 1127-1133.
29. **Satake N, Sawada HOT, Shibata S.** The mode of vasorelaxing action of melatonin in rabbit aorta. *Gen Pharmacol* 1991, **22**, 219-221.
30. **Satake N, Shibata S, Takagi T.** The inhibitory action of melatonin on the contractile response to 5-hydroxytryptamine in various isolated vascular smooth muscles. *Gen Pharmacol* 1986, **17**, 553-558.
31. **Somlyo AP, Himpens B.** Cell calcium and its regulation in smooth muscle. *FASEB J* 1989, **3**, 2266-2276.
32. **Underwood H, Goldman BD.** Vertebrate circadian and photoperiodic system: role of the pineal gland and melatonin. *J Biol Rhythms* 1987, **2**, 279-315.
33. **Vanecek J.** Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol Rev* 1998, **78**, 687-720.
34. **Weekley B.** Effects of melatonin on isolated pulmonary artery and vein; role of vascular endothelium. *Pulm Pharmacol* 1993, **6**, 149-154.
35. **Weekley B.** Pharmacologic studies on the mechanism of melatonin-induced vasorelaxation in rat aorta. *J Pineal Res* 1995, **19**, 133-138.