

## 흰쥐 대동맥에서 melatonin의 내피 의존적 혈관 이완 작용에 대한 lithium의 영향

김상진 · 유선봉 · 조인국 · 강형섭 · 김진상\*

진북대학교 생체안전성연구소  
(계재승인: 2005년 11월 22일)

### Effect of lithium on endothelial-dependent relaxation to melatonin in rat aorta

Shang-Jin Kim, Xianfeng Yu, In-Gook Cho, 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*. Lithium inhibits both inositol polyphosphate phosphatase (IPase) and inositol monophosphatase (IMPase), which are involved in a wide range of signal transduction pathways. The aim of the present study was to assess the effect of lithium on endothelial-dependent relaxation to melatonin and on the melatonin-induced inhibition of contraction by phenylephrine (PE) in isolated rat aorta. Melatonin induced a concentration-dependent relaxation in PE-precontracted in endothelium-intact (+E) aortic rings. Melatonin inhibited a PE-induced sustained contraction in +E aortic rings. These effects of melatonin on relaxation and contractile responses were inhibited by pretreatment with lithium. In PE-precontracted +E aortic rings, the melatonin-induced vasorelaxations and the inhibitory effects of melatonin on maximal contractions were inhibited by endothelium removal or by pretreatment with L-N<sup>G</sup>-nitro-arginine (L-NNA), 1H-[1,2,4] oxadiazolo-[4,3-a] quinoxalin-1-one (ODQ) and nifedipine and verapamil, but not by tetrabutylammonium, clotrimazole and glibenclamide. However, in endothelium-denuded (-E) aortic rings and in the presence of L-NNA and ODQ in +E aortic rings, the melatonin-induced residual relaxations and the melatonin-induced residual contractile responses to PE were not affected by lithium. It is concluded that the inositol phosphate pathway may be involved in endothelial-dependent relaxation induced by melatonin.

**Key words** : aorta, contractile response, endothelium, lithium, melatonin, vasorelaxation

## 서 론

심혈관계 기능 조절은 생체 항상성 유지를 위해 매우 중요하며 이는 주로 신경계 및 내분비계 내인성 물질에 의한 신경계 반응으로 이뤄진다. 송과체 호르몬인 melatonin은 다른 내인성 물질처럼 생체 면역기능, 생식 기능, 수면 및 심박관 등의 주요 생리적 기능에 영향을 미치는 호르몬이다 [7, 9, 11, 21, 25, 24, 30, 34]. 심박관계에 대한 보고로, 나이에 따라 혈중 melatonin 농도

는 감소 [19]하는 반면 심박관 질환은 증가 [30]한다. 또한 심박관 질환이 있는 환자에서 혈중 melatonin의 농도가 낮고 생산 및 분비도 감소한다고 한다 [8, 16, 30]. Melatonin은 허혈성 심장과 재관류에 의한 심장의 산화적 손상에 대하여 억제 효과를 가지며 [26], 흰쥐의 송과선을 제거하면 고혈압이 유발 [38]되는 반면 melatonin은 고혈압 흰쥐와 정상 및 송과선을 제거한 흰쥐에서 혈압과 심박수를 감소시킨다 [11, 14, 18]. 사람에서도 자율성 심박관계 조절에 영향을 미친다 [2]. Melatonin은

\*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]

심맥관계에 대한 영향 중 5-hydroxytryptamine(5-HT), phenylephrine(PE) 또는 norepinephrine와 같은 혈관 수축제에 의한 혈관 수축을 억제 [1, 27] 하고 혈관을 이완 [28, 29, 32, 36]시킨다. 이와 같은 상기 논문들에 의하면 melatonin은 다양한 기전에 의하여 혈관을 이완시킴을 알 수 있다.

세포막 인지질인 phosphatidylinositol(PI)은 phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate(PIP<sub>2</sub>)로 인산화되고 phospholipase C(PLC)에 의하여 2차 전령체인 inositol triphosphate(IP<sub>3</sub>)와 diacylglycerol(DAG)로 가수분해 된다. IP<sub>3</sub>는 근형질세포망내에서 Ca<sup>2+</sup>을 유리시키고 결국 inositol polyphosphate phosphatase(IPPase)에 의해 inositol monophosphate(IP)로 탈인산되고 IP는 inositol monophosphatase(IMPase)에 의하여 탈인산화되어 유리형 inositol로 된다 [31]. 항조증 약물로 사용되고 있는 lithium은 inositol 합성과 재순환 합성에 필요한 IMPase 및 IPPase를 억제하기 때문에 유리형 inositol이 감소되어 결국 세포내 IP<sub>3</sub> 농도가 감소한다 [6, 31, 37]. 또한 cyclic guanosine 3',5'-monophosphate(cGMP)에 의한 protein kinase G(PKG) 활성화는 IP<sub>3</sub> 수용체를 억제하고 IP<sub>3</sub> 합성을 억제하기 때문에 혈관 이완에 있어 매우 중요한 기전이다. 이제까지 연구에 의하면 흰쥐 대동맥에서 melatonin의 이완작용에 대한 lithium의 영향을 관찰한 결과 inositol phosphate의 관련 가능성을 제시 [35]하였으나 그 외 관련 보고는 찾아보기 어렵다. 그리고 고혈압 흰쥐의 장간막 동맥에서 melatonin이 inositol phosphate 형성을 억제하며 이 억제 효과가 내피제거에 의하여 증가하였다는 보고 [15]에 따르면 melatonin의 혈관 이완작용이 inositol phosphate 경로와 관련이 있음을 추측할 수 있다. 따라서 이 연구에서는 melatonin의 혈관내피 의존적 이완작용에 대한 lithium의 영향을 관찰하고 inositol phosphate 경로와의 관련성을 평가하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 혈관 적출 및 수축력 측정 방법

전북대학교 생체안전성연구소로부터 공급받은 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐(200~300 g)를 연구소의 실험동물이용 실험규정에 적합하게 치사시켜 방혈시킨 후 흉대동맥(thoracic aorta)을 적출하여 30의 산소포화 영양액(133.0 mM NaCl, 5.0 mM KCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.0 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 11.0 mM glucose 및 12.0 mM NaHCO<sub>3</sub>와 95% O<sub>2</sub>:5% CO<sub>2</sub>, 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 μm 고정핀에 고정하고 한쪽은 직경 25 μm 은선에 연결된 고리에 연결한 후 tension transducer (Model 400A, Cambridge, USA)에 연결하였다. 연결 후 250~300 μg의 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, 혈관 내피 제거 및 수축력 측정

PE를 투여하여 수축력이 일정해지면 농도 별 melatonin의 혈관 이완효과를 관찰하고 동일 조직에서 혈관 내피를 제거하거나 여러 억제제들을 일정 시간 동안 전 처치한 후 다시 melatonin의 이완효과를 관찰하여 비교하였다. 내피 존재 유무에 따른 실험은 내피 존재 상태에서 이완효과를 관찰하고 정지 장력이 유지된 후 saponin(0.3 mg/ml)을 영양액에 녹여 12~15분간 관류시켜 내피를 제거하고 다시 melatonin의 이완효과를 관찰하였다. 내피 존재 유무는 0.5 μM의 acetylcholine을 투여하여 그 이완 여부로 내피 제거 상태를 확인하였다. Melatonin의 PE에 의한 혈관 수축력 억제효과는 PE를 2~3회 처치하여 일정한 정도의 수축값(control, 100%)을 얻은 후 농도 별 melatonin을 일정 시간 동안 전 처치한 후 PE의 수축값을 얻어 그 억제 정도를 백분율(%)로 환산하였다. 그 후 동일 조직에서 내피를 제거하거나 여러 억제제 및 기타 약물을 일정 시간 동안 전 처치한 후 다시 melatonin에 의한 PE 수축 억제 정도를 얻어 melatonin에 의한 수축력 억제효과에 대한 내피 및 여러 억제제 및 기타 약물들의 영향을 관찰하였다.

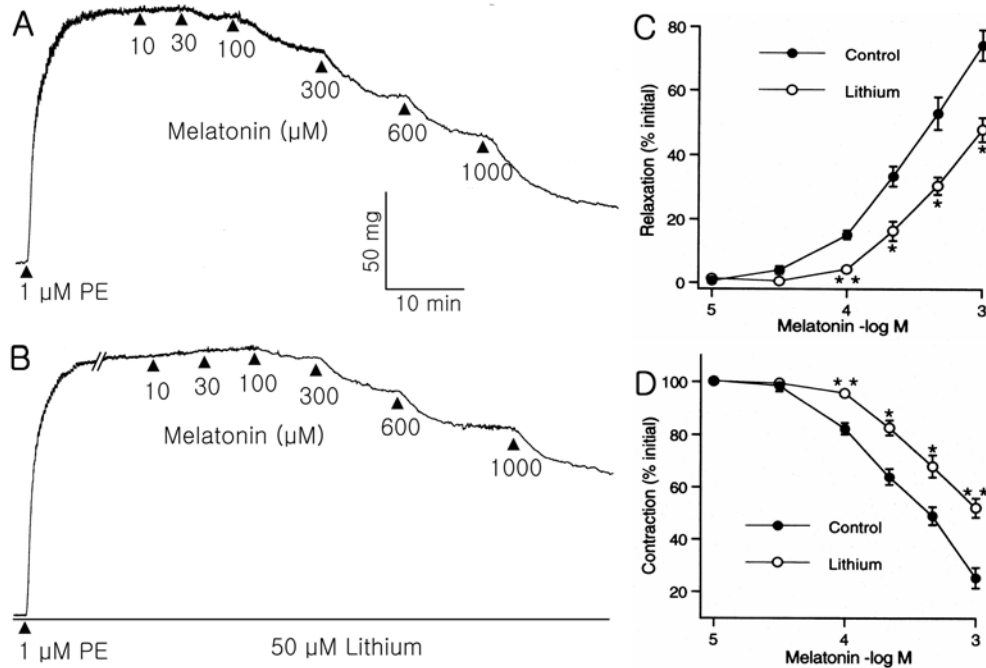
### 사용 약물 및 통계 처리

Acetylcholine, clotrimazole, glibenclamide, lithium, L-N<sup>G</sup>-nitro-arginine(L-NNA), nifedipine, 2-nitro-4-carboxyphenyl-n,n-diphenylcarbamate(NCDC), PE, 1H-[1, 2, 4] oxadiazolo-[4,3-a] quinoxalin-1-one(ODQ), saponin, tetrabutylammonium(TBA) 및 verapamil은 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

### Lithium이 melatonin의 혈관 이완작용 및 PE 수축반응에 미치는 영향

내피가 존재하는 혈관을 PE으로 수축시킨 후 10, 30,



**Fig. 1.** Effects of lithium on the melatonin-induced relaxation and contraction in aortic rings. Typical tracings of the effects of 50  $\mu\text{M}$  lithium on the melatonin-induced relaxation in endothelium-intact (+E) aortic rings precontracted with phenylephrine (PE, A and B). Where indicated, chemicals were added to the perfusing medium. Graph showing the data summary of the effects of lithium on the melatonin-induced relaxation (C) in +E aortic rings precontracted with PE and on the inhibitory effects of melatonin on contractile responses (D) to PE in +E aortic rings. Responses are expressed as a percentage of the initial PE-induced tone. Each point represents the mean $\pm$ S.E.M by joining data files from separate experiments ( $n=5$ ). \* $p < 0.01$ , \*\* $< 0.001$  vs. control.

100, 300, 600 및 1,000  $\mu\text{M}$  melatonin을 관류시킨 결과 농도 의존적으로 이완시켰다. 동일 조직에 50  $\mu\text{M}$  lithium을 40분간 처리한 후 혈관을 PE으로 수축시키고 상기와 동일 농도의 melatonin을 관류시킨 결과, melatonin의 농도 의존적인 이완효과가 lithium을 처리하지 않을 때와 비교할 때 유의성 있게 억제되었다(Fig. 1). 또한 PE에 의한 최대 혈관 수축력이 10~1,000  $\mu\text{M}$  melatonin 존재하에서 농도 의존적으로 억제되었다. 동일 조직에 50  $\mu\text{M}$  lithium을 40분 동안 관류시킨 후 2~5  $\mu\text{M}$  PE의 최대 수축력을 측정 한 결과, melatonin의 수축력 억제효과가 lithium에 의하여 회복되었다(Fig. 1D).

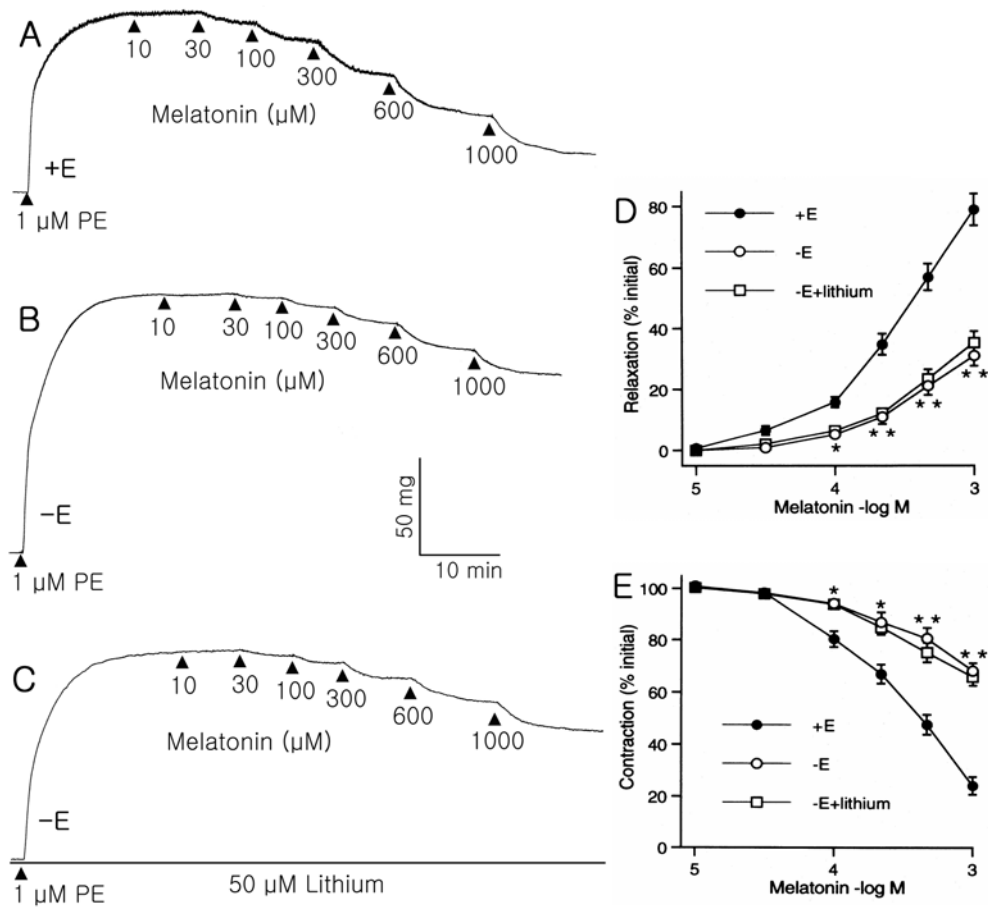
**혈관 내피 제거, nitric oxide synthase(NOS) 억제제 또는 guanylate cyclase(GC) 억제제 존재하에서 melatonin의 혈관 이완효과 및 이에 대한 lithium의 영향**

내피가 존재하는 혈관에서 melatonin의 농도 별 이완효과를 관찰한 후 saponin으로 내피를 제거하거나 10

$\mu\text{M}$  L-NNA 또는 10  $\mu\text{M}$  ODQ을 포함하는 영양액을 각각 50~60분 동안 관류시켰다. 그 후 반복하여 PE으로 수축시킨 후 상기와 같은 농도의 melatonin을 각각 관류시킨 결과, melatonin의 농도 의존적 이완효과가 각각의 내피제거, NOS 또는 GC 억제제에 의하여 유의성 있게 억제되었다. 동일 혈관(내피 제거, NOS 억제제 및 GC 억제제를 처리한 혈관)에 50  $\mu\text{M}$  lithium을 전 처리한 후 PE으로 수축시킨 후 농도 별 melatonin의 이완효과를 관찰한 결과, 이완효과가 강화되지 않았다(Fig. 2, 3, 4).

**내피 제거, NOS 억제제 및 GC 억제제가 melatonin의 최대 혈관 수축력 억제효과에 미치는 영향 및 이에 대한 lithium의 영향**

Melatonin이 PE으로 수축시킨 혈관을 농도 의존적으로 이완시켰다. 이러한 결과는 melatonin이 PE에 의한 수축을 억제할 수 있음을 의미한다. 따라서 상기의 이완 실험 결과를 확인하기 위하여 PE에 의한 최대 혈관 수축력에 대하여 melatonin의 억제효과를 관찰하고 이 억



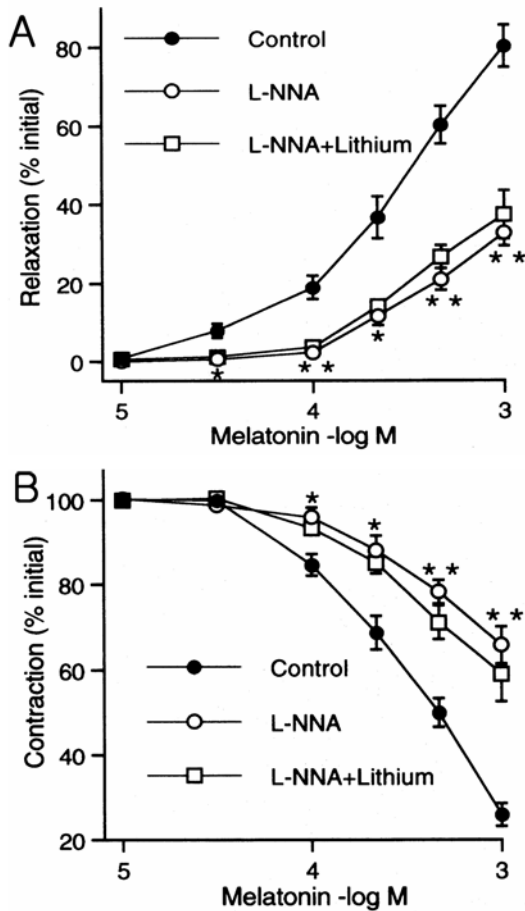
**Fig. 2.** Influences of removal of endothelium on the effects of lithium on the melatonin-induced relaxation and contraction. Typical tracings of the relaxant effects of melatonin in +E (A) and endothelium-denuded (-E, B) aortic rings precontracted with PE, and the effects of lithium on melatonin-induced relaxation in -E aortic rings (C). Graph showing the data summary of the effects of lithium on the melatonin-induced relaxation (D) in -E aortic rings precontracted with PE and on the inhibitory effects of melatonin on contractile responses (E) to PE in -E aortic rings. Each point represents the mean±S.E.M by joining data files from separate experiments (n=5). \**p*<0.01, \*\*<0.001 vs. +E.

제 효과에 대한 내피 제거 및 억제제들의 영향을 관찰하였다. Melatonin 존재하에서 농도 의존적으로 PE에 의한 수축력이 억제되었다. 동일 조직에 혈관 내피를 제거하거나 10 μM L-NNA 또는 10 μM ODQ을 50~60분 동안 관류시킴과 동시에 melatonin을 30분간 전 처치하고 2~5 μM PE의 최대 수축력을 측정된 결과, melatonin의 수축력 억제효과가 내피 제거 또는 각각의 상기 억제제들에 의하여 유의성 있게 회복되었다. 동일 혈관에서 내피를 제거하거나 10 μM L-NNA, 또는 10 μM ODQ을 50~60분 동안 관류시킴과 동시에 melatonin과 lithium을 동시에 30분간 전 처치하고 2~5 μM PE의 최고 수축력

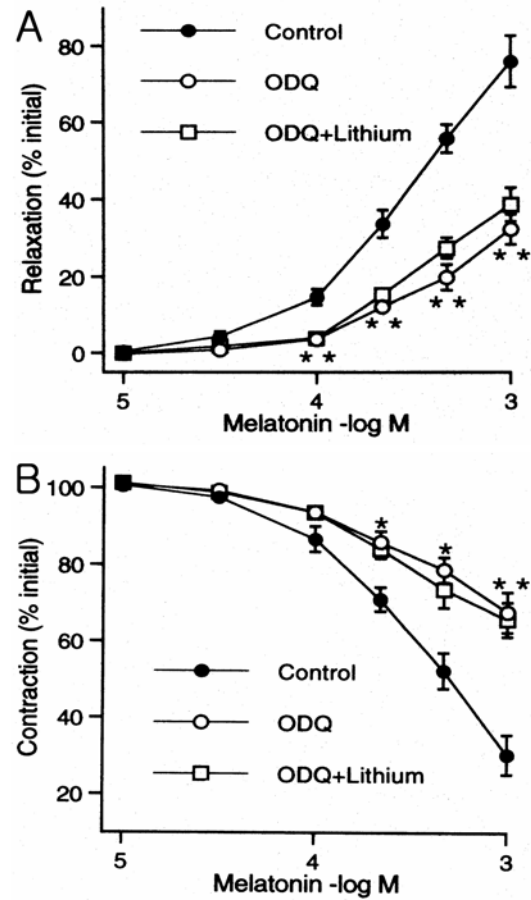
을 측정된 결과 melatonin의 수축력 억제효과가 lithium에 의하여 강화되지 않았다(Fig. 2E, 3B, 4B).

#### Ca<sup>2+</sup> 또는 K<sup>+</sup> 통로 차단제가 melatonin의 혈관 이완작용 및 melatonin의 최대 혈관 수축력 억제효과에 미치는 영향

내피가 존재하는 혈관을 PE으로 수축시킨 다음 300 μM melatonin의 이완효과를 관찰한 후 전압 의존성 Ca<sup>2+</sup> 통로 억제제인 1 μM nifedipine 또는 5 μM verapamil을 30분간 전 처치한 후 melatonin의 이완효과를 관찰한 결과, 유의성은 없으나 Ca<sup>2+</sup> 통로 억제제에 의하여



**Fig. 3.** Influences of NOS inhibitor on the effects of lithium on the melatonin-induced relaxation and contraction. Graph showing the data summary of the effects of lithium on the melatonin-induced relaxation in +E aortic rings pretreated with L-NNA (20  $\mu$ M) (A) and on the inhibitory effects of melatonin on contractile responses to PE in +E aortic rings pretreated with L-NNA (B). Each point represents the mean  $\pm$  S.E.M by joining data files from separate experiments (n = 5). \**p* < 0.01, \*\* < 0.001 vs. control.



**Fig. 4.** Influences of GC inhibitor on the effects of lithium on the melatonin-induced relaxation and contraction. Graph showing the data summary of the effects of lithium on the melatonin-induced relaxation in +E aortic rings pretreated with ODQ (10  $\mu$ M) (A) and on the inhibitory effects of melatonin on contractile responses to PE in +E aortic rings pretreated with ODQ (B). Each point represents the mean  $\pm$  S.E.M by joining data files from separate experiments (n = 5). \**p* < 0.01, \*\* < 0.001 vs. control.

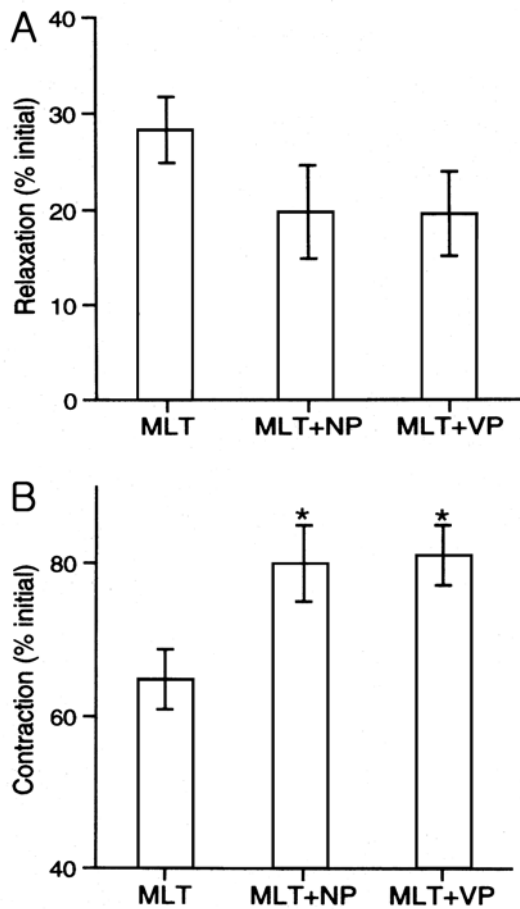
melatonin의 이완효과가 억제되는 경향을 보였다(Fig. 5A). Melatonin은 PE에 의한 최대 혈관 수축력을 억제 하였으며, 이러한 수축력 억제효과가 nifedipine 또는 verapamil에 의하여 유의성 있게 회복되었다(Fig. 5B).

비특이적 K<sup>+</sup> 통로 차단제인 1 mM TBA, Ca<sup>2+</sup> 의존적 K<sup>+</sup> 통로 차단제인 3  $\mu$ M clotrimazole 또는 ATP 의존적 K<sup>+</sup> 통로 차단제인 100  $\mu$ M glibenclamide은 melatonin의 이완효과를 억제하지 못했고(Fig. 6A), melatonin의 수축력 억제효과 역시 TBA, clotrimazole 또는 glibencla-

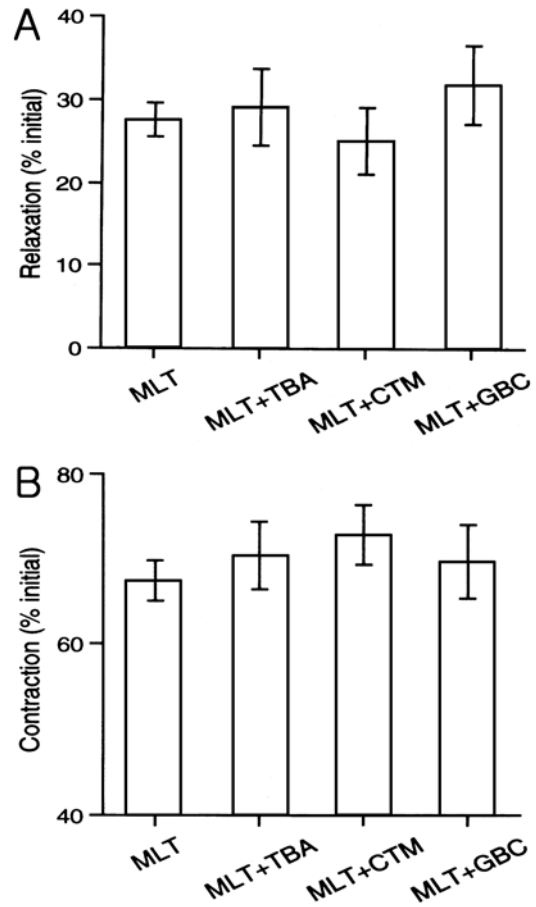
mide에 의해서는 회복되지 않았다(Fig. 6B). K<sup>+</sup> 통로 차단제들의 농도를 변동시키거나 전 처치 시간을 변동시켜도 melatonin의 수축력 억제효과가 회복되지 않았다.

### 고 찰

주요 혈관 이완기전인 Ca<sup>2+</sup> 농도 감소는 cGMP 활성화에 의한 PKG 활성화와 직접적인 Ca<sup>2+</sup> 통로 차단으로 일어난다. PKG 활성화는 Ca<sup>2+</sup>-활성 K<sup>+</sup> 통로 활성화, 원형질막



**Fig. 5.** Influences of  $\text{Ca}^{2+}$  channel blockers on the effects of lithium on the melatonin-induced relaxation and contraction. Graph showing the data summary of the effects of  $\text{Ca}^{2+}$  channel blockers (1  $\mu\text{M}$  nifedipine, NP and 5  $\mu\text{M}$  verapamil, VP) on the 300  $\mu\text{M}$  melatonin (MLT)-induced relaxation in +E aortic rings precontracted with PE (A) and on the inhibitory effects of melatonin on contractile responses to PE in +E aortic rings pretreated with  $\text{Ca}^{2+}$  channel blockers (B). Each bar represents the mean  $\pm$  S.E.M by joining data files from separate experiments ( $n = 5\sim 10$ ). \* $p < 0.05$  vs. MLT (control).



**Fig. 6.** Influences of  $\text{K}^{+}$  channel blockers on the effects of lithium on the melatonin-induced relaxation and contraction. Graph showing the data summary of the effects of  $\text{K}^{+}$  channel blockers (1 mM tetrabutylammonium, TBA; 3  $\mu\text{M}$  clotrimazole, CTM and 100  $\mu\text{M}$  glibenclamide, GBC) on the 300  $\mu\text{M}$  melatonin-induced relaxation in +E aortic rings precontracted with PE (A) and on the inhibitory effects of melatonin on contractile responses to PE in +E aortic rings pretreated with  $\text{K}^{+}$  channel blockers (B). Each bar represents the mean  $\pm$  S.E.M by joining data files from separate experiments ( $n = 5\sim 15$ ).

$\text{Ca}^{2+}$  펌프 활성, 근형질세망내  $\text{Ca}^{2+}$  펌프 활성,  $\text{IP}_3$  수용체 억제,  $\text{IP}_3$  합성 억제, 근수축계의  $\text{Ca}^{2+}$  감수성 감소 및 PKC 활성 감소로 혈관을 이완시킬 수 있다 [10]. 그리고 혈관 내피가 존재하는 경우, 혈관 내피 유래 이완인자인 NO는 물론 평활근에서 NO는 cGMP를 증가시키기 때문에 혈관 내피, NOS 및 GC 활성 상태는 혈관 이완 및 수축에 매우 중요한 요인이다. 내인성 호르몬

또는 신경전달물질들은 혈관 내피 세포에서 NOS 활성으로 NO를 유리시켜 GC를 활성화시킴으로써 세포내 cGMP를 증가시킨다 [10]. 이들 기전과 관련하여 melatonin의 혈관 이완 기전으로 cGMP 대사 억제 [27],  $\text{Ca}^{2+}$  농도 감소 [4],  $\text{Ca}^{2+}$  통로 활성 억제 [29, 32], GC 활성 촉진 [12]과 cGMP-phosphodiesterase(PDE) 활성 억제 [28] 등을 들 수 있다. 또한  $\alpha_1$ -adrenoceptor 자극은

세포막 신호전달계를 경유하여 IP<sub>3</sub> 또는 protein kinase C(PKC) 활성화 [5]으로 혈관을 수축시킨다. IP<sub>3</sub>는 결국 IPPase에 의해 IP로 탈인산되고 IP는 IMPase에 의하여 탈인산화되어 유리형 inositol로 된다 [31]. 결국 inositol 합성과 재순환 합성에 필요한 IMPase 및 IPPase의 활성화에 의하여 혈관 이완작용이 조절될 수 있다. 그러나 melatonin의 혈관 이완작용과 IMPase의 관련성에 대한 연구는 아직 미비하다. 따라서 상기 이전의 연구 결과를 토대로 melatonin의 혈관 이완 작용에 있어서 IMPase (또는 IPPase) 경로 및 NOS/cGMP 경로와 IMPase 경로와의 상호관계를 설명하고자 한다.

고혈압 흰쥐의 혈관에서 내피 의존적 이완효과가 melatonin 처치에 의하여 강화되고 NOS 억제제인 L-NAME의 처치는 동맥압을 상승시킴으로 melatonin의 저혈압 유발 효과는 혈관의 NOS 경로의 활성화를 통해 이루어진다고 하였다 [14]. 토끼 혈관에서 melatonin은 PDE 활성을 억제하고, melatonin은 cGMP-PDE 억제제인 zaprinast와 유사하게 nitroglycerin에 의한 이완을 강화시키고 이러한 melatonin의 혈관 이완효과가 GC 억제제인 methylene blue에 의하여 억제되었다 [28]. 이들 연구 결과들에 의하면, melatonin의 혈관 이완 작용기전이 NOS, GC 및 cGMP 활성화 경로와 밀접한 관련됨을 알 수 있다. 상기의 연구 결과들과 유사하게 본 연구에서도 melatonin은 PE에 의한 최대 수축력 억제효과(PE 수축 반응에 대한 억제효과)를 보였고, 이러한 최대 수축력 억제효과가 혈관 내피 제거, NOS 억제제 및 GC 억제제에 의하여 유의성 있게 회복되었다. 또한 PE에 의한 수축 혈관에서 melatonin의 이완효과가 혈관 내피 제거, NOS 억제제 및 GC 억제제에 의하여 유의성 있게 억제되었다. 이러한 결과는 토끼 대동맥에서 melatonin의 혈관 이완효과는 cGMP 농도 증가와 관련된다는 보고 [28]와 유사하며, 고혈압 흰쥐에서 melatonin의 혈압 하강효과는 NOS 경로와 관련이 있다는 보고 [14], 그리고 melatonin이 NOS의 활성을 조절하여 혈관 내피에서 유래하는 혈관 이완 인자인 nitric oxide(NO)의 생산에 영향을 미친다는 보고 [22, 23]와 일치하였다. 따라서 PE 수축 혈관에 대한 melatonin의 이완효과가 내피 의존성 NOS/cGMP 활성화 경로를 통하여 나타남을 재확인하였다.

PE은 세포막의 PLC를 활성화시켜 PIP<sub>2</sub>가 가수분해함으로써 두 종류의 이차 전달물질인 IP<sub>3</sub>와 DAG가 형성되고 IP<sub>3</sub>에 의한 세포내 Ca<sup>2+</sup> 유리 및 DAG에 의한 PKC 활성화로 혈관을 수축시킨다 [5]. 반면, 혈관 이완은 직접적인 Ca<sup>2+</sup> 통로 차단과 cGMP 활성화에 의한 PKC 활성화로 다양한 경로를 통하여 세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도가 감소됨으로써 일어난다 [15]. 이들 중 cGMP 활성화에 의한

PKG 활성화 결과로 IP<sub>3</sub> 수용체 억제 또는 IP<sub>3</sub> 합성 억제로 세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도가 감소될 수 있기 때문에 이차 신호전달 매개체인 IP<sub>3</sub>의 관련성을 고려할 수 있다. 즉, IP<sub>3</sub> 수용체 억제는 Ca<sup>2+</sup>을 직접적으로 유리시킬 수 없을 것이며, IP<sub>3</sub> 재합성에 사용되는 inositol의 고갈은 IP<sub>3</sub>를 재합성할 수 없기 때문에 이들 모두 세포내 Ca<sup>2+</sup> 농도를 감소시켜 혈관을 이완시킬 것이다. 이 연구에서 PE으로 수축된 혈관에서 melatonin의 혈관 이완효과 및 최대 수축력 억제효과에 대한 IMPase 억제제인 lithium의 영향을 관찰한 결과, melatonin의 혈관 이완효과 및 최대 수축력 억제효과가 lithium에 의하여 유의성 있게 억제되어 이러한 melatonin의 효과는 IMPase(IPPase) 억제에 의하여 나타남을 알 수 있고, 이전의 연구 결과와 본 연구 결과에 의하면 melatonin의 혈관 이완효과는 IP<sub>3</sub> 합성 억제와 관련될 수 있음을 의미한다. 또한 melatonin에 의한 혈관 이완 및 최대 수축력 억제효과가 혈관내피 의존적 NOS/cGMP 활성화 경로를 경유한 IP<sub>3</sub> 합성 억제 결과인지 또는 직접적으로 IP<sub>3</sub> 합성 억제에 의한 결과인지를 밝힐 필요가 있다. 따라서 이 연구에서 NOS/cGMP 경로와 IP<sub>3</sub> 경로와의 상호 관련성을 알아보기 위하여 PE으로 수축된 혈관에서 혈관 내피 제거, NOS 억제제 및 GC 억제제들의 melatonin의 혈관 이완효과 억제에 대한 lithium의 영향을 관찰하였다. 그 결과 melatonin의 혈관 이완효과에 대한 혈관 내피 제거, NOS 억제제 및 GC 억제제들의 혈관 이완 억제효과가 lithium 처치에 의하여 더 이상 억제되지 않았다. 만약, melatonin의 혈관 이완효과가 각각의 단계(NOS/cGMP와 IP<sub>3</sub> 단계)를 경유한다면 이러한 두 단계가 각각 억제될 것이므로 혈관 내피 제거, NOS 억제제 및 GC 억제제들에 의한 melatonin의 혈관 이완 억제효과와 더불어 lithium의 억제효과로 melatonin의 이완 억제효과는 더욱 강화되었어야 할 것이다. 그러나 melatonin의 이완 효과에 대한 NOS/cGMP 단계 차단 또는 IP<sub>3</sub> 단계 차단 결과를 비교한 결과, 각각의 차단 영향과 동시 두 단계(NOS/cGMP와 IP<sub>3</sub> 단계) 차단 영향과 차이가 없었다. 즉, 억제 정도가 강화되지 않았다. Melatonin의 최대 수축력 억제효과 역시 이완 실험에서와 유사하게 혈관 내피 제거, NOS 억제제 및 GC 억제제들에 의하여 회복되었으나 이 회복 효과도 lithium에 의하여 강화되지 않았다. 이러한 결과는 melatonin의 이완효과가 내피 의존성 NOS/cGMP 경로와 관련된 IMPase 경로를 경유하여 나타난 효과 즉, melatonin은 내피 세포의 NOS/cGMP 경로를 활성화시켜 이로 인하여 PKG가 활성화됨으로써 IMPase가 억제되어 혈관을 이완시킬 수 있음을 알 수 있다. 고혈압 흰쥐의 장간막 동맥에서 melatonin이 inositol phosphate 형성을 억제하며 이 억제효과가 내피제거에 의하여 증가

하였다는 보고 [15]는 상기 본 실험의 결과를 직접적으로 설명해주고 있으며, 이러한 효과는 흰쥐 대동맥에서 melatonin의 이완효과가 lithium에 의해 억제되어 inositol phosphate 경로와 관련이 있음을 언급한 보고 [35]와 유사하였다. 그러나 면양 폐동맥에서 lithium은 melatonin의 이완효과를 억제하지 않았고 내피제거 폐정맥에서 melatonin의 이완효과가 lithium에 의해 증가하였다는 보고 [36]와는 일치하지 않았다.

Melatonin에 의한 혈관 이완효과는 이온 통로 조절에 의할 수 있다. 이전 연구에서 melatonin과  $Ca^{2+}$  통로와의 관련성이 제기되었고 [20, 33], melatonin은 calmodulin과 상호작용하여 직접적으로  $Ca^{2+}$  신호계에 작용하거나 [1], adenylate cyclase, PDE 및 여러 구조 단백질의 표적 효소에 영향을 미친다 [3, 17]고 하였다. Melatonin은 KCl 및 5-HT에 의해 활성화되는  $Ca^{2+}$  통로를 억제하여 혈관을 이완시키며 [32], melatonin은 5-HT에 의한 혈관 수축을 억제하는데 이는  $Ca^{2+}$  저장소로부터  $Ca^{2+}$  유리를 억제하기보다는 수용체 경유  $Ca^{2+}$  통로를 경유한  $Ca^{2+}$  유입을 억제한 결과 [27]라 하였다. 막전위 의존성  $Ca^{2+}$  통로 봉쇄제인 nifedipine과 verapamil은 혈관 평활근 활성을 억제하는데 본 연구 결과에서는 PE 수축 혈관에 대한 melatonin의 최대 수축력 억제 및 이완효과가 nifedipine과 verapamil에 의하여 억제되어 상기의 혈관 이완효과와 일치하여 melatonin이  $Ca^{2+}$  통로 활성을 억제하여 혈관을 이완시킬 수 있을 것으로 생각하지만 melatonin의 혈관 이완 기전에 있어 전압의존성  $Ca^{2+}$  통로와 IMPase와의 관련성은 이 결과를 통해 설명할 수 없다.  $K^{+}$  통로 활성은 혈관을 이완시킬 수 있는데  $K^{+}$  통로 활성을 통한 저분극으로 전위 의존성  $Ca^{2+}$  통로를 통한  $Ca^{2+}$ 의 유입 억제로 혈관이 이완될 수 있다. 흰쥐 미동맥에서 melatonin은 PE에 의한 혈관 수축 반응을 강화시켰고, 이 강화효과가 내피 인자 활성화와  $Ca^{2+}$  활성화  $K^{+}$  통로 활성화에 의존적이며, melatonin의 수축 효과는 내피의  $K^{+}$  통로의 억제에 기인한 것이라고 하였다 [13]. 그러나 본 연구 결과에서는 PE에 의한 수축 혈관에서  $Ca^{2+}$ -활성  $K^{+}$  통로 억제제인 TBA와 clotrimazole 및 ATP-선택적  $K^{+}$  통로 억제제인 glibenclamide가 melatonin의 최대 수축력 억제 및 이완효과에 영향을 미치지 않았다. 이는 melatonin의 혈관 이완효과는  $K^{+}$  통로의 활성화는 무관함을 알 수 있으나 더 많은 연구가 필요하다 고 생각된다.

## 결 론

PE로 수축시킨 흰쥐 분리 대동맥에서 melatonin은 농도 의존적으로 이완시켰으며 PE에 의한 최대 수축력 효

과를 농도 의존적으로 억제하였다. 이러한 melatonin의 혈관 이완효과 및 PE의 최대 수축력 억제효과가 lithium에 의하여 억제되거나 회복되었다. PE 수축 혈관에서 melatonin의 혈관 이완효과 및 PE의 최대 수축력 억제 효과가 내피 제거, NOS 억제제 및 GC 억제제에 의하여 억제되거나 회복되었다. 또한 melatonin의 혈관 이완효과 및 PE의 최대 수축력 억제효과에 대한 내피 제거, NOS 억제제 또는 GC 억제제들의 억제효과 및 회복효과가 lithium의 병용 처치에 의하여 강화되지 않았다. 추가적으로 melatonin의 혈관 이완효과 및 PE의 최대 수축력 억제효과가  $Ca^{2+}$  통로 억제제들에 의하여 억제되거나 회복되었으나  $K^{+}$  통로 억제제들에 의해서는 억제되거나 회복되지 않았다. 따라서 inositol phosphate 경로는 melatonin의 혈관 내피세포(NOS/cGMP 경로) 의존적 이완효과와 관련될 것으로 생각된다.

## 참고문헌

1. Anwar MM, Meki AR, Rahma HH. Inhibitory effects of melatonin on vascular reactivity: possible role of vasoactive mediators. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2001, **130**, 357-67.
2. Arangino S, Cagnacci A, Angiolucci M, Vacca AM, Longu G, Volpe A, Melis GB. Effects of melatonin on vascular reactivity, catecholamine levels, and blood pressure in healthy men. *Am J Cardiol* 1999, **83**, 1417-1419.
3. Benitez-King G, Anton-Tay F. Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. *Experientia* 1993, **49**, 635-641.
4. 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.
5. Berridge MJ. Rapid accumulation of inositol trisphosphate reveals that agonists hydrolyse polyphosphoinositides instead of phosphatidylinositol. *Biochem J* 1983, **212**, 849-858.
6. Berridge MJ, Downes CP, Hanley MR. Neural and developmental actions of lithium: a unifying hypothesis. *Cell* 1989, **3**, 411-419.
7. 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.
8. Brugger P, Marktl W, Herold M. Impaired nocturnal secretion of melatonin in coronary heart disease. *Lancet*



- 1995, **3**, 1408.
9. **Brzezinski A.** Melatonin in humans. *N Engl J Med* 1997, **336**, 186-195.
  10. **Carvajal JA, Germain AM, Huidobro-Toro JP, Weiner CP.** Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *J Cell Physiol* 2000, **184**, 409-420.
  11. **Chuang JI, Chen SS, Lin MT.** Melatonin decreases brain serotonin release, arterial pressure and heart rate in rats. *Pharmacology* 1993, **47**, 91-97.
  12. **Faillace MP, Keller Sarmiento MI, Rosenstein RE.** Melatonin effect on the cyclic GMP system in the golden hamster retina. *Brain Res* 1996, **4**, 112-117.
  13. **Geary GG, Duckles SP, Krause DN.** Effects of melatonin in the rat tail artery: role of K<sup>+</sup> channels and endothelial factors. *Br J Pharmacol* 1998, **123**, 1533-1540.
  14. **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.
  15. **Girouard H, de Champlain J.** Inhibitory effects of melatonin on  $\alpha_1$ -adrenergic-induced vasoconstriction in mesenteric beds of spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 2004, **17**, 339-346.
  16. **Girotti L, Lago M, Ianovsky O, Carbajales J, Elizari MV, Brusco LI, Cardinali DP.** Low urinary 6-sulphatoxymelatonin levels in patients with coronary artery disease. *J Pineal Res* 2000, **29**, 138-142.
  17. **Godson C, Reppert SM.** The Mel<sub>1a</sub> melatonin receptor is coupled to parallel signal transduction pathways. *Endocrinology* 1997, **138**, 397-404.
  18. **Holmes SW, Sugden D.** The effect of melatonin on pinealectomy-induced hypertension in the rat. *Br J Pharmacol* 1976, **56**, 360-361.
  19. **Karasek M, Reiter RJ.** Melatonin and aging. *Neuro Endocrinol Lett* 2002, **23**, 14-16.
  20. **Muck AO, Seeger H, Bartsch C, Lippert TH.** Does melatonin affect calcium influx in human aortic smooth cells and estradiol-mediated calcium antagonism? *J Pineal Res* 1996, **20**, 145-147.
  21. **Nishiyama K, Yasue H, Moriyama Y, Tsunoda R, Ogawa H, Yoshimura M, Kugiyama K.** Acute effects of melatonin administration on cardiovascular autonomic regulation in healthy men. *Am Heart J* 2001, **141**, E9.
  22. **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.
  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. **Reiter RJ.** Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocrinol Rev* 1991, **12**, 151-180.
  25. **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.
  26. **Reiter RJ, Tan DX.** Melatonin: a novel protective agent against oxidative injury of the ischemic/reperfused heart. *Cardiovasc Res* 2003, **58**, 10-19.
  27. **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.
  28. **Satake N, Sawada HOT, Shibata S.** The mode of vasorelaxing action of melatonin in rabbit aorta. *Gen Pharmacol* 1991, **22**, 219-221.
  29. **Satake N, Oe H, Shibata S.** Vasorelaxing action of melatonin in rat isolated aorta; possible endothelium dependent relaxation. *Gen Pharmacol* 1991, **22**, 1127-1133.
  30. **Sewerynek E.** Melatonin and the cardiovascular system. *Neuro Endocrinol Lett* 2002, **23**, 79-83.
  31. **Shaldubina A, Agam G, Belmaker RH.** The mechanism of lithium action: state of the art, ten years later. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2001, **5**, 855-866.
  32. **Shibata S, Nobuhiro S, Takagi T, Usui H.** Vasorelaxing action of melatonin in rabbit basilar artery. *Gen Pharmacol* 1989, **20**, 677-680.
  33. **Uchida K, Aoki T, Satoh H, Tajiri O.** Effects of melatonin on muscle contractility and neuromuscular blockade produced by muscle relaxants. *Masui* 1997, **46**, 205-212.
  34. **Vanecek J.** Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol Rev* 1998, **78**, 687-720.
  35. **Weekley B.** Melatonin-induced relaxation of rat aorta: interaction with adrenergic agonists. *J Pineal Res* 1991, **11**, 28-34.
  36. **Weekley B.** Effects of melatonin on isolated pulmonary artery and vein; role of vascular endothelium. *Pulm*

- Pharmacol 1993, **6**, 149-154.
37. **Williams RS, Harwood AJ.** Lithium therapy and signal transduction. Trends Pharmacol Sci 2000, **21**, 61-64.
38. **Zanoboni A, Zanoboni-Muciaccia W.** Experimental hypertension in pinealectomized rats. Life Sci 1967, **6**, 2327-2331.