

Pathological Effect of Melatonin on Vascular Endothelial Cell Detachment

Jeonghwa Seo, Sunghyen Kim, Sunyoung Ahn, Eunsil Jeong, Jingu Cho and Heonyong Park*

Department of Molecular Biology & Institute of Nanosensor and Biotechnology, BK21 Graduate Program for RNA Biology, Dankook University, 126, Jookjeon-dong, Suji-ku, Yongin-si, Gyeonggi-do, 448-701, Korea

Received March 4, 2010 / Accepted April 20, 2010

In this study, we carried out a series of experiments to know whether melatonin, an anti-oxidative and immunosuppressive agent, played an important role in endothelial cells. It was revealed that melatonin had little or no effect on endothelial proliferation, cell death or migration. Additionally, melatonin had no effect on adhesion of THP-1 leukocytes to bovine aortic endothelial cells (BAECs) and THP-1 homotypic cell aggregation. In contrast, it was shown that melatonin diminished the basal level of nitric oxide by PP2A-mediated dephosphorylation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS), leading to enhanced detachment of BAEC from the extracellular matrix. Collectively, melatonin in high doses decreases the NO production via regulations of PP2A and eNOS activities, inducing detachment of endothelial cells, a possible initial step for thrombosis.

Key words : Melatonin, endothelial cells, detachment, nitric oxide, thrombosis

서 론

Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine)은 송과선(pineal gland)의 송과선세포(pinealocyte)에서 분비되는 호르몬으로 tryptophan 5-hydroxylase, serotonin N-acetyltransferase와 같은 효소가 관여하는 일련의 대사 과정을 통해 L-tryptophan으로부터 합성된다[24]. Melatonin의 합성은 빛에 의해 저해되기 때문에 밤낮을 주기로 혈중 melatonin의 농도가 변하는 것으로 알려져 있다[16]. 혈중 melatonin의 농도가 상승하면, 체온은 떨어지며 수면을 유도하게 되는데[19], 이와 같이 melatonin은 주기적 농도 변화를 통하여 생물학적인 리듬을 조절하는 것으로 잘 알려져 있다[1].

Melatonin은 강력한 항산화 기능을 갖고 있다[9]. Melatonin은 reactive oxygen species (ROS), reactive nitrogen species (RNS), organic radicals와 반응함으로써 세포 내의 자유라디칼을 제거한다[18,25]. Melatonin이 자유라디칼과 직접 반응하여 일으키는 항산화 기능은 수용체를 통하지 않고 일어나는 것으로 알려져 있다[16]. 자유라디칼에 의해 산화된 melatonin은 매우 안정하기 때문에 melatonin을 자살항산화제(suicidal antioxidant)라고도 칭한다[21]. 한편 melatonin은 세포막에 위치하는 수용체 기능에 영향을 주어 항산화 기능을 유도하기도 한다[22]. 이 경우 melatonin은 항산화효소의 활성을 증진시키거나, 산화촉진효소의 활성을 감소시킴으로써 효과적인 항산화 기능을 수행한다[11]. Melatonin은 비극성인 친지질성 분자이기 때문에 세포막뿐만 아니라 세포 내 소기관의

막도 쉽게 통과할 수 있어 세포막에 존재하는 수용체에 작용하거나 세포 내의 다양한 장소에 위치하는 라디칼에도 직접 작용하기도 한다. Melatonin의 또 다른 역할은 다양한 사이토카인의 생성을 촉진시킴으로써 면역반응에 영향을 미치는 것으로 보고되었다[3].

이러한 melatonin의 알려진 항산화적, 항염증성 기능들은 심혈관계 기능과 밀접하게 연관될 가능성이 있다. 심혈관계의 대표적인 질환은 동맥경화이다. 동맥경화는 혈관에서 진행되는 만성 염증질환으로, 염증반응이 시작되는 부위에서 화학주성 사이토카인들이 분비되어, 이를 통해 혈구세포가 내피층에 부착한 뒤, 내피층 안으로 이동하게 된다. 혈관 내막 안으로 들어간 혈구세포가 축적된 콜레스테롤 등을 흡수하여 포말세포로 변환되면 동맥경화반이 형성된다[14]. 혈구세포가 포말세포로 전환될 때, low-density lipoprotein (LDL)의 산화로 생성되는 oxidized LDL이 커다랗게 공헌한다. 따라서 melatonin의 알려진 항산화 기능은 동맥경화반의 형성에 영향을 미칠 가능성이 매우 크다.

이와 같은 가능성에 근거하여, 본 연구자들은 melatonin이 혈관내피세포의 동맥경화 발생에 어떤 역할을 하는지 조사하였다. 본 연구에서 수행한 혈관내피세포의 세포기능들은 혈관내피세포의 성장과 세포사멸, 혈관의 상처를 치유하고 혈관 형성에 중요한 과정인 혈관내피세포의 이동, 죽상동맥경화의 발달의 과정 중 하나인 혈관내피세포와 단핵구간의 부착, 혈관 상처 치유에 중요한 과정인 혈구세포의 응집 등이다.

동맥경화 이외의 또 다른 중요한 혈관의 병리학적인 현상 중의 하나는 혈관에 부착되어 있는 혈관내피세포의 탈착이다[8]. 혈관내피세포가 세포 외 기질에서 탈착되면, 혈관의 내피하층이 내강으로 노출되어, 내피 하부조직의 콜라겐, 기

*Corresponding author

Tel : +82-31-8005-3193, Fax : +82-31-8005-3191

E-mail : heonyong@dankook.ac.kr

저막 등이 혈액에 노출되어 혈전형성이 유도될 수 있다[12]. 혈관내피세포의 탈착을 야기하는 요인 중 하나는 산화질소 생산의 감소이다[23]. 따라서 일차적으로 본 논문에서는 산화질소의 생산이 melatonin에 의해 어떻게 조절되는지 규명하였다[20]. 또한 melatonin이 병리적 기능 중의 하나인 혈관내피세포 탈착에 어떤 영향을 미치는지 관찰하여, melatonin이 혈관의 병리적 기능에 미치는 영향 및 역할을 본 논문을 통하여 보고한다.

재료 및 방법

재료

Melatonin은 Sigma-Aldrich (M5250, St. Louis, MO, USA)사에서 제공하는 시약을 구입하여 에탄올에 용해하여 사용하였다.

세포배양

BAEC (bovine aortic endothelial cell, 소 대동맥 내피세포)은 세포 외 기질에 부착하여 성장하는 세포(adhesion cell)로, 소의 대동맥에서 추출한 후 계대수 8에서 13사이의 일차세포를 실험에 사용하였다. BAEC은 20% 소태아혈청(fetal bovine serum, Wel GENE Inc., Daegu, Korea)과 0.5% 항생제(streptomycin/penicillin)가 포함된 DMEM (glucose 1 g/liter, Wel GENE Inc., Daegu, Korea)을 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. THP-1은 부유세포(suspended cells)로 T-플라스크에 배양하였으며, 10% 소태아혈청과 0.5% 항생제가 첨가된 RPMI 1640 (Wel GENE Inc., Daegu, Korea)을 배지로 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

세포성장 실험

세포성장은 cell viability assay kit (Daeillab Service Co., LTD, Seoul, Korea)을 이용하여 평가하였다. 전면 성장한 BAEC을 16 시간 동안 혈청기아 시킨 후, 다양한 농도의 melatonin을 처리하여 24 시간 동안 배양하였다. 그 후 PBS (phosphate buffered saline)로 2 회 세척하여 WST reagent와 반응시켜 세포성장 비율을 결정하였다.

세포사멸 실험

전면 성장한 BAEC을 16 시간 동안 혈청기아 시킨 후 다양한 농도의 melatonin을 0, 2, 4, 8, 16, 24 시간 동안 처리하여, 시간 경과에 따른 변화를 현미경을 이용해 사진 촬영하여 기록하였다. 세포사멸 비율은 세포사멸 세포(원형 탈착 부유 세포)를 계산하여 결정하였다.

Western Blot

BAEC을 16 시간 동안 혈청기아 시킨 후, 다양한 농도의 melatonin을 처리하여 배양한 뒤, RIPA (radioimmunoprecipitation)

완충액(50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) 또는 Triton X-100 완충액(50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM Na₃VO₄, 1% triton X-100, 10% glycerol)으로 분해하여 원심분리를 통해 상층액을 얻었다. 각 실험 조건에서 얻은 세포 용해액은 BCA assay kit (Thermo scientific Inc., Waltham, MA, USA)을 이용해 단백질량을 측정하였으며, 동일한 양의 총 단백질을 포함하는 일정량의 세포 용해액(cell lysates) 내의 단백질을 SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis)에 의해 분리시켰다. 그 후 단백질을 PVDF (polyvinylidene fluoride) 막으로 이동시켜 고정하고, 분석하고자 하는 표적 단백질에 특이적으로 결합하는 1차 항체와 반응시킨 후, 2차 항체와 연속적으로 반응시켰으며, 이를 화학발광 검출법을 통해 X-선 필름에 현상하여 western blot 결과를 확보하였다[4].

세포이동 실험

전면 성장한 BAEC에 2 mM thymidine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 24 시간 동안 처리하여 세포의 성장을 중지시킨 뒤 PBS (phosphate buffered saline)로 2 회 세척하였다. 그 후 스크래퍼 칼라기를 이용하여 창상선을 만든 후 다시 PBS로 2 회 세척하고 다양한 농도의 melatonin을 처리하였다. 세포 이동 정도는 일정한 면적에 이동한 세포 수를 세어 이동한 세포 수의 비율을 계산하여 결정하였다[4].

THP-1 응집 측정

THP-1을 24 시간 동안 배양한 후 12 시간 동안 혈청기아 시켰다. 그 후 다양한 농도의 melatonin을 처리하여 8 시간 까지 시간별로 진행되는 응집 현상을 광학현미경으로 관찰하였다[4].

세포부착 실험

전면 성장한 BAEC을 혈청기아 배지에서 16 시간 동안 배양하였다. 또한 THP-1 세포를 배양한 후 10 μM의 Calcein AM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 37°C, 5% CO₂ 조건에서 45 분간 반응시키고, PBS를 이용하여 3 회 세척하였다. Calcein AM으로 염색시킨 THP-1을 BAEC이 부착된 기관 위에 동량으로 첨가하여 부착된 THP-1 세포를 형광현미경으로 관찰하였다. 부착된 세포와 전체 세포의 비율을 계산하여 정량화 하였다[4].

산화질소(NO) 측정

60 mm 배양접시에 분주된 BAEC을 24 시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양한 후, 혈청기아 배지로 16 시간 동안 추가 배양하고 5 μM의 DAF-2 DA (diaminofluoresceins diacetate, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)와 30 분간 반응시켰다. 그 후 HEPES 완충액(140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂,

5 mM glucose, 5 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, pH 7.4)으로 2 회 세척하여 치환한 HEPES 완충액에 melatonin을 농도별로 처리하였다. 그 후 세포를 수확하여 초음파파쇄로 분해한 후 세포 용해액을 13,000 rpm으로 20 분간 원심분리하여 상층액을 획득하였다. 형광분석계(Spectrofluorophotometer RF-5301 PC, SHIMADZU, Japan)를 이용하여 형광스펙트럼(Ex: 495 nm, Em: 515 nm)을 측정하여 산화질소 생산량을 분석하였다[4].

세포탈착 실험

전면 성장한 BAEC을 혈청기아 배지에서 8 시간 동안 배양한 후 PBS를 이용하여 2 회 세척하였다. 그 후 배지를 Ca²⁺와 Mg²⁺ 이온이 없는 PBS로 교체한 후 0.53 mM EDTA (Wel GENE Inc., Daegu, Korea), 150 nM SNAP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 2.5 μM L-NAME (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 그리고 다양한 농도의 melatonin을 30 분간 처리하여 세포 탈착을 현미경을 이용해 사진 촬영하여 기록하였다. Phosphatase 억제제 실험은 100 nM okadaic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)와 100 nM cyclosporin A (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 37°C, 5% CO₂ 조건에서 30 분간 전처리 한 후, 배지를 Ca²⁺와 Mg²⁺ 이온이 없는 PBS로 교체하고 다양한 농도의 melatonin을 30 분간 처리하여 세포 탈착 정도를 현미경을 이용해 사진 촬영하여 기록하였다. 세포 탈착 정도는 원형의 탈착 부유 상태에 있는 세포 수를 계산하여 탈착된 세포의 비율로 결정하였다.

통계처리

실험결과는 mean±S.E (standard error)로 나타내었고 얻어진 데이터는 ANOVA test를 이용하여 분석한 후, 유의성이 있을 경우 post-hoc test를 통해 95% 수준에서 유의성을 검증하였다.

결 과

혈관내피세포 성장 실험결과

혈관 생리 활성 가운데 하나인 내피세포의 성장에 melatonin이 미치는 영향 평가는 소 대동맥 내피세포를 이용하여 관찰하였다. Melatonin의 효과를 정확하게 알아보기 위하여 melatonin을 농도별(1 nM, 100 nM, 10 μM, 1 mM)로 처리한 후 WST assay를 통해 세포 성장을 평가하였다. Fig. 1A에서 보는 바와 같이 다양한 농도의 melatonin을 처리하였을 경우 어느 농도에서도 내피 세포의 성장이 증가하지 않는 것을 확인할 수 있었다. 이는 melatonin이 혈관내피세포의 증식에는 아무런 영향을 미치지 않는다는 것을 의미한다.

혈관내피세포 사멸 실험결과

Melatonin이 혈관내피세포의 증식에는 아무런 영향을 미

치지 않는 것을 확인하였으므로, 다음으로 혈관 내피층의 세포사멸에는 melatonin이 어떤 영향을 미치는지 관찰하였다. 소 대동맥 내피세포는 세포 외 기질에 부착하여 자라는 세포이기 때문에 죽은 세포는 모양이 원형이며 부유세포로 변화한다. 따라서 세포사멸은 모양이 원형으로 변형되어 부유하고 있는 세포의 수를 세어서 평가하였다. 혈청기아로 소 대동맥 내피세포의 세포사멸을 유도하였고, melatonin이 세포사멸에 미치는 효과는 혈청기아 상태에서 melatonin을 처리하여 확인한 결과, 다양한 농도로 처리한 melatonin의 어느 경우에도 세포사멸 정도는 변함이 없음을 확인할 수 있었다(Data not shown). Melatonin이 세포사멸에 영향을 미치지 않는다는 사실을 다시 한 번 확인하기 위하여 western blot을 통해 세포사멸과 관련된 단백질인 procaspase-3와 active caspase-3의 양을 측정함으로써 세포사멸을 확인하였다. Fig. 1B에서 보듯이 melatonin의 농도와는 관계없이 active caspase-3의 양의 변화는 관찰되지 않았고, 이는 melatonin이 세포사멸에는 아무런 영향을 미치지 않음을 보여준다.

혈관내피세포 이동에 관한 실험결과

혈관내피세포의 이동은 혈관 형성과 상처 치유에 필요한 과정 중 하나로, 혈관 형성과 상처 치유에 미치는 melatonin의 영향을 알아보기 위해 혈관내피세포의 이동에 미치는 melatonin의 영향을 관찰하였다. 본 연구에서는 thymidine을 처리하여 세포 증식을 억제한 후 스크래퍼 찰과기를 이용하여 창상 선을 만든 뒤 세포를 추가적으로 CO₂ 배양기에 보관하여 이동한 세포 수를 세어서 평가하였다. Fig. 1C에서 보듯이 혈관내피세포의 이동 정도는 melatonin의 농도와는 아무런 관계가 없음을 확인할 수 있었다. 이는 melatonin이 혈관 형성과 혈관의 상처 치유에는 영향을 미치지 않는다는 것을 의미한다.

백혈구 동종세포간 응집 실험결과

혈관에 상처가 생기면 백혈구 동종세포간 응집이 일어나 혈전이 형성되고 출혈을 방지하게 된다[15]. 하지만 혈관 안에서 형성되는 혈전은 혈류를 따라 이동하는 도중에 혈관을 막게 되면 뇌졸중이나 심근경색 같은 혈관질환이 일어난다. Fig. 1D에서 보듯이 THP-1 세포에 melatonin을 처리하였을 경우, THP-1 동종세포간 응집이 일어나지 않는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 melatonin이 혈전을 형성하는데 아무런 영향을 미치지 않는다는 것을 의미한다.

백혈구의 내피층 부착에 관한 실험결과

동맥혈관 벽의 염증은 동맥경화 진행 과정의 초기 단계로 [5], 이러한 염증반응 시 분비되는 주변분비(paracrine)에 의하여 백혈구가 혈관 내피층에 부착하게 된다[10]. 따라서 백혈구가 혈관 내피층에 부착하는 정도를 관찰함으로써 동맥경화의 발생 가능성을 간접적으로 평가할 수 있다. Fig. 1E에서 보듯

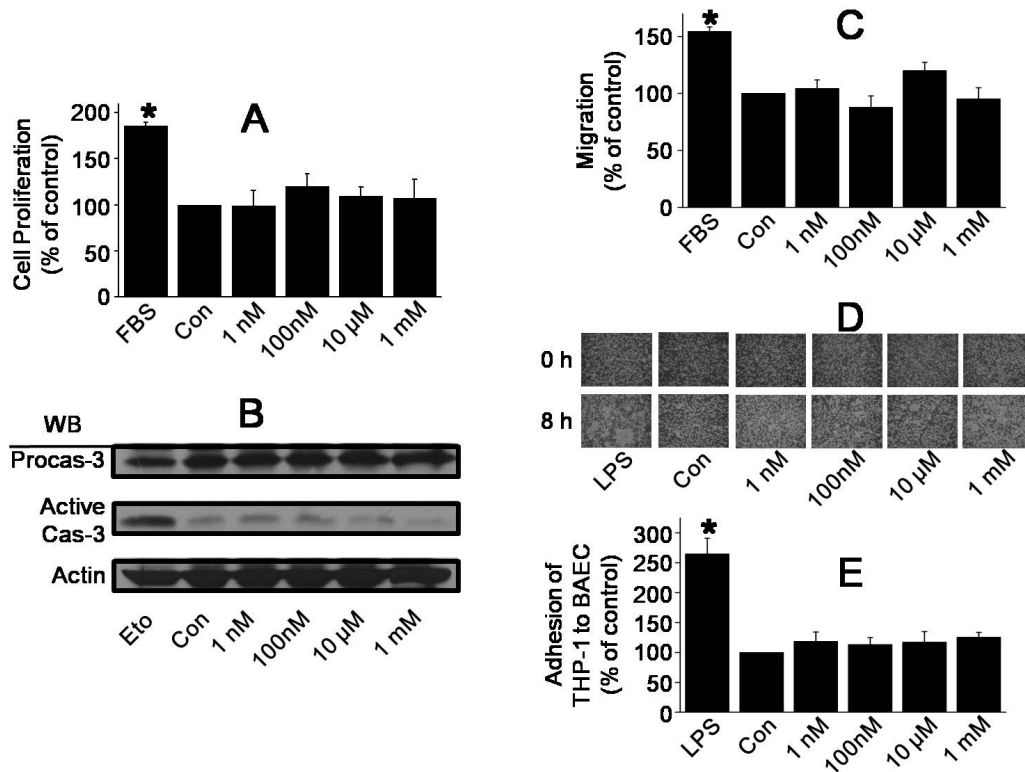


Fig. 1. Melatonin has no effect on endothelial cell proliferation, apoptosis, migration, THP-1 aggregation and adhesion of leukocytes to endothelial cells. **A.** BAECs were serum-starved for 16 hr and treated with 20% FBS, none or various concentrations of melatonin. Then the cells were incubated with WST reagent for detecting cell proliferation. Data were plotted on the bar graph (means±SE, n=3). **p*<0.05. **B.** Starved cells were treated with 100 μM etoposide, none or indicated concentrations of melatonin and then cells were lysed. Proteins of the lysed cells were resolved by SDS-PAGE, electrotransferred to PVDF membranes and immunoblotted with antibodies specific for caspase-3 (Cas-3) or actin. **C.** Confluent BAECs were incubated with none, 20% FBS or various concentrations of melatonin after synchronized with 2 mM thymidine for 24 hr. Then the cells were wounded with a scraper and additionally incubated for 24 hr. The migrated cells were then observed under a microscope and were counted in the same visual field. Data were plotted on the bar graph (means±SE, n=3). **p*<0.05. **D.** THP-1 cells were serum-starved for 12 hr, and treated with none, 1 μg/ml lipopolysaccharide (LPS) or various concentrations of melatonin. Then the cells were incubated for 8 hr. The homotypic aggregation of THP-1 cells was observed under a microscope. **E.** BAECs were serum-starved for 16 hr and then cells were treated for 6 hr with none, 1 μg/mL LPS or various concentrations of melatonin. Before adding THP-1 cells to BAECs, THP-1 cells (5-6×10⁶ cells) were stained with 10 μM Calcein AM. Then THP-1 cells were aliquot into BAEC culture dishes. After 1 hr additional incubation, adherent cells were observed under a fluorescent microscope. Then we counted the adherent cells. Data were plotted on the bar graph (means±SE, n=3). **p*<0.05.

이 melatonin을 세포에 처리하였을 경우, THP-1 세포와 소 대동맥 내피세포 사이에 일어나는 이중세포간 부착에는 melatonin이 아무런 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있었다.

혈관내피세포 탈착 실험결과

혈관이 여러 가지 생리활성을 일정하게 유지하기 위해서는 혈관의 안정성이 적절하게 유지되어야 한다. 또한 혈관내피세포가 혈관에서 탈착되어 내피하층이 드러나게 되면 내피하조직의 콜라겐, 기저막 등이 혈액에 노출되어 혈전이 형성될 수 있다[12]. 본 연구에서는 내피세포의 탈착을 세포수준에서 측

정해보았다. 세포수준에서 측정된 탈착실험은 Ca²⁺와 Mg²⁺ 이온이 없는 PBS에 melatonin을 첨가한 후 세포를 30 분 동안 배양하여 탈착된 세포를 세어 평가하였다. Fig. 2에서 보듯이 소 대동맥 내피세포에 melatonin을 처리하였을 경우 melatonin의 농도가 증가함에 따라 혈관내피세포의 탈착이 증가하였으며, 특히 1 mM의 melatonin을 처리하였을 경우, 혈관내피세포의 탈착이 대조군에 비해 5배나 증가함을 확인할 수 있었다. 이는 고농도의 melatonin은 혈관내피세포의 탈착을 상승시켜 혈전형성을 유도할 가능성이 있음을 의미한다.

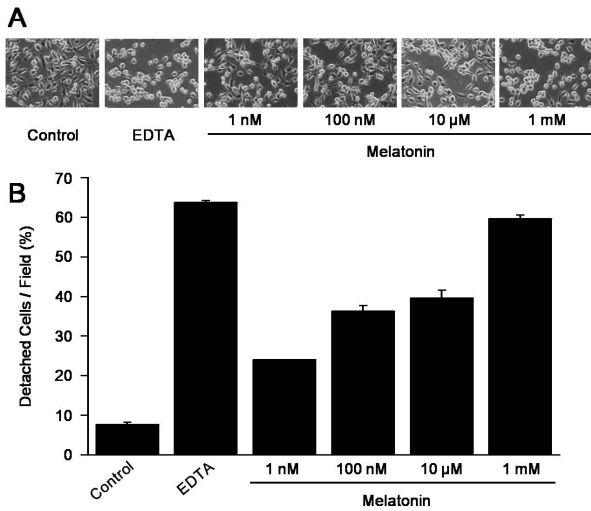


Fig. 2. Melatonin induces endothelial cell detachment. Serum-starved BAECs were treated with none or the indicated concentrations of melatonin for 30 min in Ca^{2+}/Mg^{2+} ion-free PBS. We then observed the detached cells under a microscope. Representative pictures were shown in panel A. The percentage of detached cells were represented in panel B on bar graph (means \pm SE, n=3).

산화질소 생산 측정 실험결과

산화질소는 다양한 생리적 기능을 한다고 알려져 있다[4]. 특히 혈관계에서는 혈관 확장, 혈소판 응집 억제, 호중구의 부착 억제, 동맥경화의 발생 억제와 같은 기능을 갖고 있으며[4], eNOS에 의해 L-arginine으로부터 합성된다[15]. 따라서 melatonin이 이와 같이 중요한 산화질소의 생성에 어떤 영향을 미치는지 알기 위한 실험을 수행하였다. Fig. 3A에서 보듯이 내피세포에 존재하는 산화질소의 양이 melatonin 처리에 의하여 감소되었으며, 특히 고농도(1 mM)로 처리했을 때, 산화질소의 양이 대조군에 비해 80%까지 감소함을 알 수 있었다. Melatonin이 산화질소 기초생산량을 감소시킨다는 것을 다시 한 번 확인해보기 위해, eNOS의 활성화 형태인 인산화 eNOS (p~eNOS)의 양을 western blot을 통해 확인하였다. 그 결과, Fig. 3B에서 보듯이 melatonin을 단시간 처리하였을 경우 eNOS의 전체량은 변함이 없지만, 인산화된 eNOS의 양은 확연하게 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 이는 melatonin이 산화질소의 기초생산량을 억제함으로써 새로운 혈관 생리 혹은 병리 현상을 유발할 수 있는 가능성을 보여주는 것이다.

Melatonin에 의한 산화질소 생산량의 변화와 혈관내피세포 탈착 간의 상관관계 실험결과

혈관내피세포가 혈관에서 탈착되는 현상은 산화질소의 생산 억제와 관련되어 있다고 알려져 있다[12]. Melatonin에 의해 유발되는 혈관내피세포의 탈착과 산화질소 생산량 감소

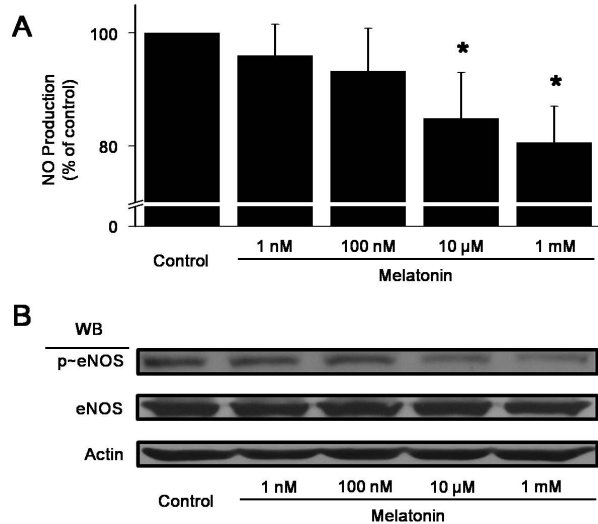


Fig. 3. Melatonin decreases an acute NO production of endothelial cells. A. BAECs were serum-starved for 16 hr and then were reacted with 5 μ M DAF-2 DA. Then cells were incubated for 15 min with none or the indicated concentrations of melatonin in HEPES. Production of NO was examined by DAF fluorescence. Data were plotted on the bar graph (means \pm SE, n=6). * p <0.05. B. Starved BAECs that were treated with none or indicated concentrations of melatonin were lysed. Proteins of the lysates were resolved by SDS-PAGE, electrotransferred to PVDF membranes and immunoblotted with antibodies specific for eNOS, phospho-eNOS (p~eNOS) or actin.

사이의 상관관계를 알아보기 위해, 산화질소의 생성을 유도하는 SNAP (S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine)과 산화질소의 생성을 억제하는 L-NAME (L- N^G -nitroarginine methyl ester)을 melatonin과 함께 처리하여 혈관내피세포 탈착 현상의 변화를 확인해 보았다. Fig. 4에서 보듯이 SNAP을 1 mM의 melatonin과 함께 처리하였을 경우, melatonin에 의한 혈관내피세포의 탈착이 감소함을 확인할 수 있었다. 이는 melatonin에 의한 혈관내피세포의 탈착이 산화질소 생성의 억제와 관련이 있음을 의미한다.

Melatonin에 의한 혈관내피세포 탈착 기전 연구 실험결과

eNOS는 L-arginine으로부터 산화질소를 합성하는 효소로, Ser 116, Ser 1179, Thr 497의 인산화와 탈인산화에 의해 활성이 조절된다[6]. eNOS의 탈인산화는 protein phosphatases에 의해 이루어지는데, Ser 1179와 Thr 497의 탈인산화에는 protein phosphatase 2A (PP2A)가 관여하며, Ser 116의 탈인산화에는 protein phosphatase 2B (PP2B)가 관여하는 것으로 알려져 있다[6]. 앞의 실험에서 고농도의 melatonin이 eNOS의 인산화를 억제하며 동시에 혈관내피세포의 탈착을 유도한다는 사실을 확인하였으므로 protein phosphatases와 내피세포 탈

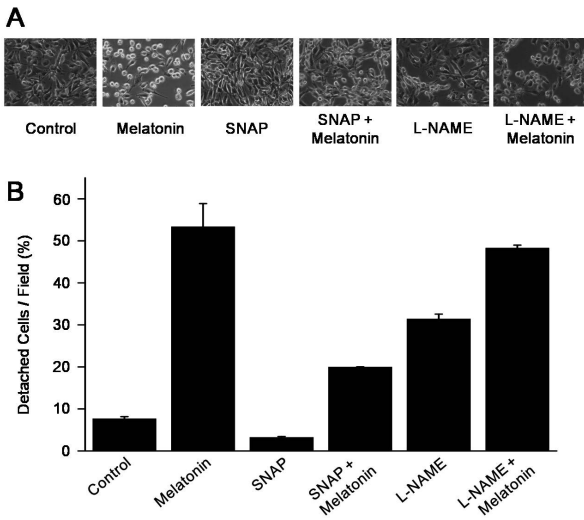


Fig. 4. Reduced NO production induces endothelial cell detachment. Serum-starved BAECs were treated with none, 150 nM SNAP or 2.5 μM L-NAME in the presence of 1 mM melatonin for 30 min in Ca²⁺/Mg²⁺ ion-free PBS. We then observed the detached cells under a microscope. Representative pictures were shown in panel A. The percentage of detached cells were represented in panel B on bar graph (means±SE, n=3).

착의 상관관계를 알아보는 실험을 수행하였다. 이 실험을 위해 PP2A의 억제자인 okadaic acid와 PP2B의 억제자인 cyclosporin A를 사용하였고, 각 억제자들은 30분간 전처리한 후 1 mM의 melatonin을 처리하여 eNOS의 탈인산화와 내피세포의 탈착 정도를 측정하였다. Fig. 5에서 보듯이 1 mM의 melatonin을 처리하였을 경우 eNOS의 양은 변화가 없지만 인산화된 eNOS의 양은 감소하였으며, okadaic acid를 전처리한 후

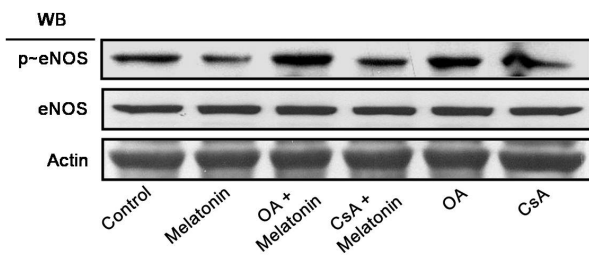


Fig. 5. PP2A is involved in melatonin-induced dephosphorylation of eNOS. Serum-starved BAECs were pre-treated with none, 100 nM okadaic acid (OA) or 100 nM cyclosporin A (CsA) before treating with 1 mM melatonin. After treatment of melatonin, cells were lysed. Proteins of cell lysates were resolved by SDS-PAGE, electrotransferred to PVDF membranes and immunoblotted with antibodies specific for eNOS, phospho-eNOS (p-eNOS) or actin. Experiments were performed in triplicate.

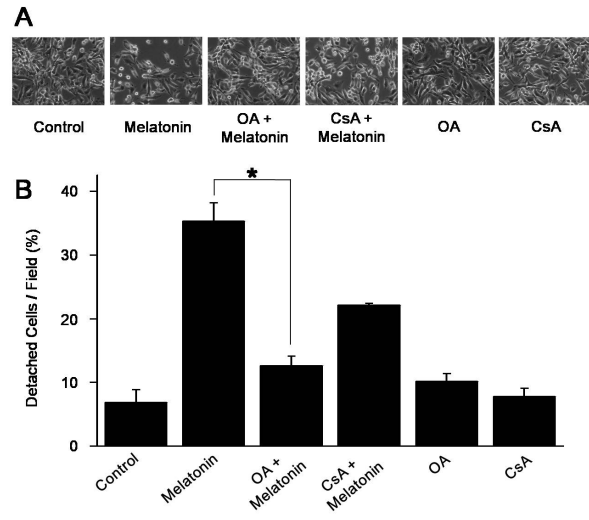


Fig. 6. Okadaic acid, a PP2A inhibitor, reverses the melatonin-induced cell detachment. Serum-starved BAECs were treated with none, 100 nM okadaic acid (OA) or 100 nM cyclosporin A (CsA) for 30 min. Subsequently, cells were treated with none or 1 mM melatonin for additional 30 min in Ca²⁺/Mg²⁺ ion-free PBS. Finally, the detached cells were observed under a microscope. Representative pictures were shown in panel A. The percentage of detached cells were represented in panel B on bar graph (means±SE, n=3). *p<0.05.

melatonin을 처리하였을 경우, eNOS의 양과 인산화된 eNOS의 양은 변화가 제한적임을 확인할 수 있었다. 이는 melatonin이 PP2A를 활성화시켜 eNOS의 탈인산화를 유도함을 의미한다.

또한 Fig. 6에서 보듯이 okadaic acid와 cyclosporin A를 전처리한 후, melatonin을 처리하였을 경우, melatonin에 의한 혈관내피세포의 탈착 비율이 감소하였으며, 특히 okadaic acid를 전처리하였을 경우, 혈관내피세포의 탈착 비율은 약 60% 정도 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 고농도의 melatonin이 PP2A의 활성화를 통해 내피세포의 탈착을 유도함을 의미한다. 즉 melatonin은 PP2A의 활성화를 유발하고 또한 eNOS의 탈인산화를 유도하며, 따라서 세포 내의 산화질소 기초생산량이 감소되어 궁극적으로는 혈관내피세포의 탈착이 상승하게 된 것이다. 본 실험 결과 나타나는 혈관내피세포의 탈착은 *in vivo*에서 혈전이 형성될 가능성이 있음을 의미한다.

고찰

Melatonin은 인체에서도 검출되는 호르몬의 일종으로, L-tryptophan으로부터 생합성되어 송과선의 송과선세포에서 분비된다. Melatonin은 생체 주기를 조절하는 것으로 알려져 있다[13]. 또한 melatonin은 항산화 및 항염증성 기능을 갖고

있기 때문에 치료제로 이용될 가능성이 있다[2]. Melatonin의 항산화 및 항염증성 기능은 심혈관의 생리학적 혹은 병리학적 기능과 밀접하게 연관되어 있기 때문에 혈관에서도 어떠한 역할을 할 것으로 예측할 수 있다.

Melatonin의 혈관 기능을 알기 위해 수행한 본 연구의 결과들을 정리해보면, melatonin은 혈관내피세포의 성장, 사멸, 이동에는 영향을 미치지 않았으며, 백혈구의 혈관내피세포 부착과 백혈구 동종간의 응집에도 영향을 미치지 않거나, 미친다 해도 매우 미약하였다. 이와 같은 결과들은 melatonin이 혈관 생리학에 커다랗게 영향을 미치지 않음을 암시한다.

Melatonin이 혈관 생리 기능에 특별한 역할을 하지 않는 것과는 대조적으로 병리적 기능에는 melatonin이 중요하게 작용하고 있음을 본 연구를 통해 알 수 있었다. 먼저, 혈관내피세포에 melatonin을 처리하였을 때 배양접시에 코팅된 세포 외 기질에 부착된 혈관내피세포가 탈착됨을 관찰하였다. 혈관내피세포의 혈관 내 지속적인 부착은 혈관의 여러 가지 생리학성이 안정적으로 유지되기 위해서 필수적이다. 혈관내피세포가 혈관에서 탈착될 경우 혈관의 안정성이 유지될 수 없으며, 이로 인해 다양한 질환이 발생할 수 있다. 그 중 대표적인 질환이 혈전증으로[12], 혈관내피세포가 탈착되어 내피하층이 드러나게 되면 내피하조직의 콜라겐, 기저막 등의 특정 자극에 의해 혈전형성이 유도될 수 있다.

Melatonin의 혈관내피세포 탈착을 유도하는 기전을 이해하기 위하여 여러 실험을 수행하였다. 그 결과 혈관 생리학에 중요한 역할을 하는 산화질소의 양과 melatonin에 의해 일어나는 탈착 상승효과가 밀접하게 연계되어 있음을 확인하였다. 즉, 고농도($\geq 10 \mu\text{M}$)의 melatonin을 처리하였을 경우 혈관내피세포의 탈착이 유도되며, melatonin이 혈관내피세포의 사멸에는 관여하지 않았으므로 혈관내피세포의 탈착은 세포 사멸에 의한 것이 아니라 살아있는 세포가 혈관으로부터 탈착된다고 볼 수 있다. 그리고 melatonin을 혈관내피세포에 처리하였을 경우 eNOS의 활성이 기저수준보다 감소하였으며, 이로 인해 산화질소의 기초생산량이 감소됨을 확인하였다. 또한 산화질소를 제공하는 SNAP을 melatonin과 함께 처리하였을 경우, melatonin에 의한 혈관내피세포의 탈착 상승효과가 억제됨을 확인하였다. 이는 혈관내피세포의 탈착 상승효과가 산화질소 생산량의 감소와 관계가 있음을 의미한다. 또한 eNOS의 탈인산화를 유도하는 PP2A의 억제자인 okadaic acid를 전처리한 후 melatonin을 처리하였을 경우, melatonin에 의한 eNOS의 활성 감소와 산화질소 기초생산량의 감소가 억제되며, 탈착 상승효과가 억제되는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 melatonin이 PP2A와의 상호작용을 통해 eNOS의 탈인산화를 유도해 eNOS의 활성을 감소시키며, 이로 인해 산화질소의 생산이 감소하여 혈관내피세포의 탈착을 상승시킨다는 것을 의미한다. 한편 PP2A가 melatonin에 의해 활성화됨으로써 eNOS의 활성 감소 이외의 PP2A가 관여하는 다른

신호전달 물질 및 생리학 물질 등이 혈관내피세포의 탈착에 추가적으로 관여할 가능성이 매우 높다.

결론적으로, 고농도의 melatonin은 혈관내피세포의 여러 가지 생리학성에는 커다랗게 공헌하지 않지만, PP2A와의 상호작용을 통해 산화질소의 생산량을 감소시킴으로써 혈관내피세포의 탈착을 증진시켜 혈전증과 같은 질환을 유발할 가능성이 있다.

감사의 글

이 연구는 2009년도 단국대학교 대학 연구비의 지원으로 연구되었습니다.

본 연구를 위해 도움을 주신 박용준 교수님께 감사드립니다.

References

1. Altun, A. and B. Ugur-Altun. 2007. Melatonin: therapeutic and clinical utilization. *Int. J. Clin. Pract.* **61**, 835-845.
2. Carrillo-Vico, A., J. M. Guerrero, P. J. Lardone, and R. J. Reiter. 2005. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. *Endocrine* **27**, 189-200.
3. Carrillo-Vico, A., R. J. Reiter, P. J. Lardone, J. L. Herrera, R. Fernandez-Montesinos, J. M. Guerrero, and D. Pozo. 2006. The modulatory role of melatonin on immune responsiveness. *Curr. Opin. Investig. Drugs* **7**, 423-431.
4. Choi, S., J. Park, J. Kim, K. In, and H. Park. 2008. *Acanthopanax senticosus* extract acts as an important regulator for vascular functions. *J. Life Science* **18**, 701-707.
5. Galkina, E. and K. Ley. 2009. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis. *Annu. Rev. Immunol. Rev.* **27**, 165-197.
6. Greif, D. M., R. Kou, and T. Michel. 2002. Site-specific dephosphorylation of endothelial nitric oxide synthase by protein phosphatase 2A: evidence for crosstalk between phosphorylation sites. *Biochemistry* **41**, 15845-15853.
7. Hardeband, R., S. R. Pandi-Perumal, and D. P. Cardinali. 2006. Melatonin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **38**, 313-316.
8. Holmen, C., E. Elsheikh, P. Stenvinke, A. R. Qureshi, E. Pettersson, S. Jalkanen, and S. Sumitran-Holgersson. 2005. Circulating inflammatory endothelial cells contribute to endothelial progenitor cell dysfunction in patients with vasculitis and kidney involvement. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16**, 3110-3120.
9. Ianas, O., R. Olinescu, and I. Badescu. 1991. Melatonin involvement in oxidative processes. *Endocrinologie* **29**, 147-153.
10. Kaperonis, E. A., C. D. Liapis, J. D. Kakisis, D. Dimitroulis, and V. G. Papavassiliou. 2006. Inflammation and atherosclerosis. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **31**, 386-393.
11. Karbownik, M. and R. J. Reiter. 2000. Antioxidative effects of melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **225**, 9-22.
12. Kushak, R. I., E. Nestoridi, J. Lamber, M. K. Selig, J. R.

- Ingelfinger, and E. F. Grabowski. 2005. Detached endothelial cells and microparticles as sources of tissue factor activity. *Thromb. Res.* **116**, 409-419.
13. Lewy, A. J., R. L. Sack, L. S. Miller, and T. M. Hoban. 1987. Antidepressant and circadian phase-shifting effects of light. *Science* **235**, 352-354.
 14. Libby, P., P. M. Ridker, and A. Maseri. 2002. Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation* **105**, 1135-1143.
 15. Moncada, S. and A. Higgs. 1993. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.* **329**, 2002-2012.
 16. Paulis, L. and F. Simko. 2007. Blood pressure modulation and cardiovascular protection by melatonin: potential mechanisms behind. *Physiol. Res. Rev.* **56**, 671-684
 17. Pieri, C., M. Marra, R. Gaspar, and S. Damjanovich. 1996. Melatonin protects LDL from oxidation but does not prevent the apolipoprotein derivatization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **222**, 256-260.
 18. Reiter, R. J., D. X. Tan, L. C. Manchester, and W. Qi. 2001. Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence. *Cell Biochem. Biophys.* **34**, 237-256.
 19. Richardson, G. S. 2005. The human circadian system in normal and disordered sleep. *J. Clin. Psychiatry* **66**, 3-9.
 20. Tamura, E. K., E. Cecon, A. W. Monteiro, C. L. Silva, and R. P. Markus. 2009. Melatonin inhibits LPS-induced NO production in rat endothelial cells. *J. Pineal Res.* **46**, 268-274.
 21. Tan, D. X., L. C. Manchester, R. J. Reiter, M. Karbownik, and J. R. Calvo. 2000. Significance of melatonin in anti-oxidative defense system: reactions and products. *Biol. Signals Recept.* **9**, 137-159.
 22. Tengattini, S., R. J. Reiter, D. X. Tan, M. P. Terron, L. F. Rodella, and R. Rezzani. 2008. Cardiovascular diseases: protective effects of melatonin. *J. Pineal Res.* **44**, 16-25.
 23. Woywodt, A., F. H. Bahlmann, K. D. Groot, H. Haller, and M. Haubitz. 2002. Circulating endothelial cells: life, death, detachment and repair of the endothelial cell layer. *Nephrol. Dial. Transplant* **17**, 1728-1730.
 24. Wurtman, R. J., J. Axelrod, and J. E. Fischer. 1964. Melatonin Synthesis in the Pineal Gland: Effect of Light Mediated by the Sympathetic Nervous System. *Science* **143**, 1328-1329.
 25. Zang, L. Y., G. Cosma, H. Gardner, and V. Vallyathan. 1998. Scavenging of reactive oxygen species by melatonin. *Biochim. Biophys. Acta.* **1425**, 469-477.

초록 : 혈관내피세포 탈착에 미치는 melatonin의 병리학적 영향

서정화 · 김성현 · 안선영 · 정은실 · 조진구 · 박현용*

(단국대학교 분자생물학과/BK21 RNA 전문인력양성팀/나노센서바이오텍연구소)

항산화 기능과 면역 억제 기능을 갖는 것으로 알려진 melatonin이 혈관 내피층에서는 어떤 기능을 갖는지 알기 위한 일련의 실험을 수행하였다. 본 연구의 실험 결과, 혈관기능과 관련된 혈관내피세포의 성장, 사멸, 이동에 melatonin은 특이적인 효과를 나타내지 않았고, 백혈구의 혈관내피세포 부착과 백혈구 동종간의 응집에도 melatonin의 역할이 관찰되지 않았다. 이와는 대조적으로 melatonin은 PP2A를 통해 eNOS의 활성을 억제하여 산화질소의 양을 감소시키고, 이로 인해 혈관내피세포의 탈착이 유발되는 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 종합해보면, 혈액 내 고농도의 melatonin은 PP2A 및 eNOS의 활성을 변화시켜 혈관내피세포의 탈착을 상승시킴으로써 혈관 내에서 발생할 수 있는 혈전 형성에 의한 병리적 현상을 유발할 수 있다.