

인위적인 계절적 광주기에서 쥐에 나타나는 멜라토닌 분비양상과 정소크기변화 조사

한 상 진

한림대학교 자연과학대학 생명과학부

Changes of Plasma Melatonin Level and Testis Weight in Mice in the Seasonal Light-period

Sang-Zin Han

Dept. of Biology, Hallym University, Chunchon 200-702, Korea

Abstract

Plasma melatonin in the seasonal light-period is circadian rhythmically secreted. Maximal secretion showed at 14 o'clock in summer- and winter-like period, but minimal secretion showed at 5 o'clock in summer-like period and at 8 in winter-like period. These times of minimal secretions were at the beginning of light period. Plasma melatonin in the light period is secreted 62.5% more than in the dark period in summer-like period and 45.9% more in winter-like period. Total plasma melatonin in winter-like period is secreted 56.5% more than in summer-like period. The weights of testis (-20.8%) and body (-7.1%) were reduced in the winter-like period. By the increase of plasma melatonin in mice, body- and testis-weights are decreased, on the contrary by the decrease of plasma melatonin in mice, body and testis weights are increased. In view of the results so far achieved melatonin changes on the body weight and reproductive organ in mice. It is presumed that melatonin effects on the metabolism and sex hormone.

Key words : Plasma melatonin, Testis, Seasonal light-period

서 론

멜라토닌은 척추동물의 경우 송과선에서 serotonin-N-acetyltransferase (SNAT)에 의해 N-acetyl-serotonin (NAS)이 형성된 다음 hydroxyindole-O-methyltransferase (HIOMT)에 의해 최종산물로 생성된다. 멜라토닌 형성에 관여하는 두 효소 중 SNAT는 낮과 밤의 농도가 다른 반면, HIOMT는

일정한 농도를 유지함으로써 멜라토닌 합성에 SNAT의 작용이 중요하다고 확인되었다 (Evered and Clark, 1985). 이러한 영향으로 멜라토닌의 분비량이 낮에는 저조하고 밤에는 높은 일주기 양상을 나타낸다.

이렇게 일주기적으로 분비되는 멜라토닌은 생체 내의 일주기적인 작용을 조절하게 되는데, 사람의 경우는 수면 리듬과 면역계를 조절하는 것으로 밝혀져 있다 (Reiter, 1989; Waldhauser *et al.*, 1993). 특히 멜라토닌의 일주기적인 분비변화가 내재적인 생체 주기를 조절하는 것은 물론, 일주기적으로 분비되는 내분비계를 조절하여 호르몬 분비에도 영

※ To whom correspondence should be addressed.

Tel: 033-248-2094, E-mail: szhan@hallym.ac.kr

향을 준다고 확인되었다(Karsch *et al.*, 1986). 또한 생체 내에서 발생하는 여러 free radicals를 제거하는 작용도 밝혀졌다(Hardeland *et al.*, 1993; Reiter *et al.*, 1993).

멜라토닌은 일주기적으로 분비될 뿐 아니라, 연주기로 분비되는 경우도 있다. 이는 멜라토닌이 단세포에서부터 다세포 생물에까지 대부분 생물체에서 발견되지만, 종에 따라 계절별로 분비되는 양상과 작용하는 기능이 각기 다르기 때문이다. 식물과 절지동물에서는 멜라토닌이 온도와 광주기의 상호작용에 관련하여 성장에 영향을 주고(Balzer and Hardeland, 1996b), 척추동물에서는 계절에 따라 성적 성숙과 생식 활성화에 영향을 보이기도 한다(Bartness and Goldmann, 1989). 즉 시기에 따라 분비되는 양이 달라짐으로써 여러 가지 기능이 환경에 맞게 적응되도록 작용하는 것을 알 수 있다(Herbert, 1981).

계절에 따라 멜라토닌 분비의 차이를 보이는 것은 제비와 같은 철새에서도 나타난다(Han, 2000). 제비가 장거리를 비행하는 동안에 멜라토닌이 체내의 물질대사와 기관작용을 조절한다는 사실이 확인되었다.

이 논문은 이와 같이 여러 가지 기능을 가진 멜라토닌이 지금까지 알려져 있지 않은 포유류인 마우스에서도 광주기가 다른 계절에 따른 분비변화를 보이는지 알아보기 위하여, 인위적으로 여름과 겨울의 광주기로 조성한 상태에서 멜라토닌의 분비 변화를 조사하고, 동시에 생식기관에도 영향을 미치는가를 정소의 무게를 측정함으로써, 계절에 따른 멜라토닌의 변화와 생식기관의 관계를 확인하려고 하는 것이다. 또한 이 실험을 통하여 사람에게서 멜라토닌의 분비 변화와 생식기관과의 영향관계에 대한 가능성을 가늠해 보고자 한다.

재료 및 방법

실험동물은 생후 8주된 수컷 ICR mouse (명진기 계상사)를 80마리 사용하였다. 이 동물들은 광주기 변화에 따른 확실한 실험을 위하여 광주기 이외의 조건들을 일정하게 갖춘 biotron 실험실에서 $24.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$, 40~50% 습도를 유지한 상태로 식이용 펠렛(제일제당)과 식수로 사육되었다. 또한 이 실험

협에서 광주기 이외의 요인들이 Zeitgeber (time-giver)로 작용하지 않도록 유의하며 사료와 식수공급도 불규칙한 시간에 주어졌다.

동물들을 biotron실에서 명암주기 LD 12:12 상태에서 2주간 두어 환경에 적응하도록 하였으며, 명주기의 광도는 2000~3000 Lux, 암주기의 광도는 0.01~0.03 Lux로 하였다. 그 후 여름과 겨울의 멜라토닌이 분비되는 차이를 알아보기 위하여 여름과 겨울의 명암주기로 설정한 조건으로 LD 15:9와 LD 9:15에서 각각 4주씩 사육하였고(Herbert, 1981; Karsch *et al.*, 1986), 광주기를 변경하기 전에는 항상 적응시기로서 LD 12:12에 2주간 유치하였다.

혈장 멜라토닌의 일주기 분비량을 측정하기 위하여 매 3시간마다 5마리씩 채혈하였고, 마지막에 정소의 무게를 측정하였다. 혈액은 쥐의 ophthalmic venous plexus에서 채혈한 것을 3000×g, 5분간 원심분리하여 분리된 혈장을 -70°C 에 저장하였다. 혈장 100μl를 1M perchloric acid (PCA) 10μl와 섞어 12000×g, 4°C 에서 20분간 원심분리하여 여과한 것을 25~50μl씩 측정에 사용하였다. 멜라토닌의 정량분석은 RP-HPLC 방법을 이용하였다(Vieira *et al.*, 1992).

HPLC system (Waters, USA)은 pulsed electrochemical detector로 Waters 464, integrator는 Waters 764와 HPLC pump waters 510 (Waters Co., USA)으로 구성되어 있고, Waters Symmetry C18 Column (RP, 3.9×150 mm, 5 μm)을 사용하고 이동상(pH 4.3)을 유속 1 ml/min로 흘려주며, 전극은 Ag/AgCl 기준전극으로 900 mV로 유지시켰다. 멜라토닌 함량은 멜라토닌 기준시약을 5 ng/ml와 10 ng/ml를 이용하여 실험군과 비교측정한 것을 혈액 1 ml당 함량비로 표시하였다.

농도 및 무게변화의 유의성 검증은 t-test와 X^2 -test로 확인하였다(Rohlf and Sokal, 1981).

결과 및 고찰

1. 인위적인 여름과 겨울의 광주기에 나타난 멜라토닌의 일주기 분비 현상

혈장 멜라토닌의 일주기적인 분비상태를 확인하고, 동시에 하동계절에 나타날 수 있는 분비변화를

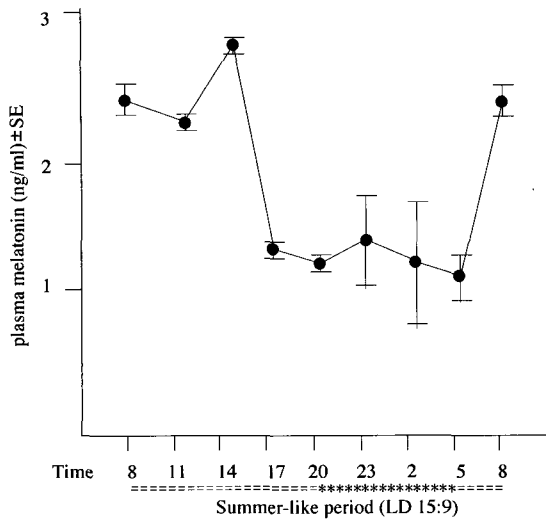


Fig. 1. Circadian rhythm of the plasma melatonin concentration in the summer-like period (==== : light period, **** : dark period).

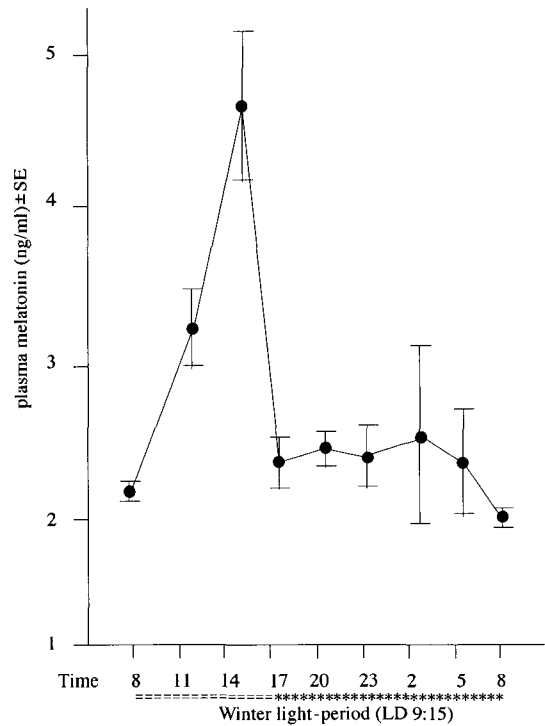


Fig. 2. Circadian rhythm of the plasma melatonin concentration in the winter-like period (==== : light period, **** : dark period).

알아보기 위하여 광주기를 낮시간이 긴 여름 시기로 LD 15:9와 낮시간이 짧은 겨울 시기로 LD 9:15 시간으로 설정하여 시간대별로 채혈한 것을 분석한 결과 Fig. 1과 2같은 그래프를 얻었다.

멜라토닌 분비의 최고치는 여름 같은 광주기와 겨울 같은 광주기에 모두 낮 2시에 2.83 ± 0.01 ng/ml와 4.84 ± 0.49 ng/ml로 나타난 반면에, 최저치는 여름과 같이 명주기가 긴 시기에 아침 5시에 1.12 ± 0.13 ng/ml와 겨울과 같이 명주기가 짧은 시기에는 아침 8시에 2.01 ± 0.04 ng/ml로 나타났다. 겨울 같은 광주기의 최고치를 제외한 수치는 유의성이 확인되었다($p < 0.05$).

이 결과와 같이 멜라토닌의 분비는 여름과 겨울 광주기에서 모두 일주기적으로 분비된 양상을 보였다(Figs. 1, 2). 이는 많은 동물과 사람의 연구에서도 확인되었듯이 일주기적으로 분비되는 현상이다.

여기에서 멜라토닌이 최저로 분비되는 시각이 모두 인위적으로 설정된 명주기가 시작되는 시점이라는 공통성을 보였다. 일반적으로 멜라토닌은 빛에 민감하여 낮에 적게 분비되고, 밤에 많이 분비되어 일주기적으로 분비양상을 보임으로써(Arendt, 1985; Huether, 1993) 수면을 할 수 있도록 생체 리듬을 조절하는 것으로 알려졌는데(Binkley,

1981; Pang, 1985), 야행성 동물의 경우는 밤에 활동하고 낮에는 수면을 취할 수 있도록 조절되기 위하여 멜라토닌의 분비가 밤보다 낮에 증가된다고 추정된다.

멜라토닌이 밤에 다량으로 분비된다 하더라도 단시간의 광선자극이 주어졌을 경우 멜라토닌의 분비가 급속히 감소되는 결과에서(Tamarkin *et al.*, 1976; Broadway, 1987) 명주기가 시작되는 시기에 광선의 영향으로 멜라토닌의 분비가 억제되는 것을 볼 수 있고, 수면조절을 위하여 다시 점진적으로 멜라토닌이 증가되는 것으로 간주된다.

실험동물을 관측한 결과와 같이 모든 명암주기에 걸쳐 명주기에 대체로 멜라토닌의 분비량이 많고, 암주기에는 멜라토닌이 적게 분비되는 것으로 나타났다(Fig. 1, Table 1). 여름과 겨울 같은 광주기에 나타난 멜라토닌의 평균 분비량이 각각 2.21 ng/ml와 3.37 ng/ml로 나타났고, 암주기의 평균 분비량은 여름 같은 시기에 1.26 ng/ml, 겨울 같은 시

Table 1. Plasma melatonin concentrations of the male mice in the seasonal light- and dark-period

Concentration in the seasonal period	Light-period (ng/ml)	Dark-period (ng/ml)	Total (ng/ml)
Summer (LD 15:9)	2.21±0.02	1.26±0.25	1.73±0.14
Winter (LD 9:15)	3.37±0.28	2.31±0.30	2.71±0.29

(mean ± standard error)

(Each value indicates the mean concentration in the given period)

기에 2.31 ng/ml로 차이를 보였다. 여름 같은 광주 기에는 암주기 때 보다 75.5%가 증가된 분비현상을 보이고, 겨울의 광주기때는 암주기때보다 45.9% 증가한 것을 볼 수 있다. 전체적인 멜라토닌의 분비량을 볼 때 겨울 같은 주기에 멜라토닌의 분비량이 여름 같은 주기때보다 56.6% 높게 증가한 현상으로 유의성 ($p < 0.05$) 있게 나타났다 (Table 1).

계절적으로 비교하였을 때, 겨울보다 여름 명암 주기에 멜라토닌의 농도 차이를 크게 보이는 것이 생식기관과 관련성이 있을 가능성에 관한 조사는 아직 이루어진 것이 없다.

계절에 따라 멜라토닌이 분비되는 양상이 다른 연구결과가 보고된 것을 보면 설치류는 여름에 소량으로 분비되고, 겨울에는 다량으로 분비되는 한편, 반추류의 경우는 여름에 다량으로, 겨울에 소량으로 분비된다. 이에 관련하여 설치류는 생식기능이 여름에 나타나는 반면, 반추류는 겨울에 생식기능이 활발해지는 것으로 나타나는 것이 확인되었다 (Lincoln and Short, 1980; Herbert, 1981). 마우스에서도 이와 같은 멜라토닌과 생식기관의 관련성의 여부를 조사하기 위하여 정소의 무게를 다음과 같이 측정하였다.

2. 여름과 겨울의 광주기에 나타난 정소의 크기 변화

인위적인 여름 및 겨울과 같은 광주기에서 정소의 크기 및 체중이 변화한 것을 조사한 결과는 Table 2와 같이 나타났다. 정소의 평균무게는 여름처럼 낮이 긴 시기에 0.24 ± 0.02 g이고, 겨울처럼 낮이 짧은 시기에는 0.19 ± 0.04 g로 20.8%가 감소된 현상을 보였다. 동시에 조사한 동물의 평균체중은 여름 같은 시기에 30.43 ± 3.32 g, 겨울 같은 시기에는 여름보다 7.1%가 감소하여 28.26 ± 4.11 g으로 나타났다. 겨울같은 시기의 체중치를 제외한

Table 2. Changes of body and testis weights of the male mice in the seasonal light- and dark-period

LD-cycle \ Weights	Body weight (g)	Testis weight (g)
Summer (LD 15:9)	30.43 ± 3.32	0.24 ± 0.02
Winter (LD 9:15)	28.26 ± 4.11	0.19 ± 0.04

(mean ± standard error)

(Each value indicates the mean concentration in the given period)

수치는 유의성이 확인되었다 ($p < 0.05$). 체중과 정소 무게와의 변화관계는 유의성 있게 나타나 ($t = 10.98$, $p < 0.05$), 멜라토닌이 체중과 생식기관에 모두 영향을 미치는 것으로 추정된다.

멜라토닌의 기능이 생식기관에도 영향을 미친다는 사실은 설치류 실험에서 이미 밝혀진 바가 있다 (Tamarkin *et al.*, 1976; Bartness, 1989). 햄스터의 경우 멜라토닌의 양이 증가하면 생식선 자극 호르몬 분비가 억제됨으로써 수컷의 고환크기가 감소하고, 암컷은 발정기가 중단되는 현상이 나타나는 것으로 보아 (Herbert, 1981) 마우스에서도 유사하게 멜라토닌의 분비가 소량일 때는 생식 호르몬의 분비가 촉진되어 정소의 크기가 증대되고, 멜라토닌의 분비가 증가하면 반대로 정소의 크기가 위축되는 것으로 확인된다.

체중과 관련하여 멜라토닌의 분비량이 겨울 같은 시기보다 여름 같은 시기에 낮았다. 반대로 여름 같은 시기에 체중이 높게 나타났고, 멜라토닌의 분비가 많은 겨울 같은 시기에 체중이 감소되었다. Rat의 실험에서 체중이 증가할 때 혈장 멜라토닌의 농도가 감소하는 연구결과를 Pang 등 (1990)이 발표한 적이 있으며, Karl 등 (1990)도 같은 현상을 햄스터에서 발견하였다. 이 실험에서 사용한 마우스에서도 여름 같은 시기에 체중이 증가하고, 혈장 멜라토닌은 적게 분비되는 반면, 체중이 감소한 겨울 같은 시기에 혈장 멜라토닌이 많이 분비되는 결과에서 멜라토닌의 분비량에 따라 신진대사가 활성화되는 정도가 달라지는 현상으로 사료된다. 또한 멜라토닌이 생체내의 신진대사를 활성화 시켜 에너지를 효과적으로 소모되게 하는 역할을 한다는 보고를 근거로 (Reiter, 1991) 멜라토닌이 신진대사를 촉진시켜 에너지가 소모되도록 영향을 미치는 작용을 하고, 반대로 멜라토닌의 분비량이 감소할 경우 신진대사가 저조하여 에너지 소모가 적어짐으로써 체중이 증가되는 현상을 초래한다고 본다.

결론

이 논문에서는 마우스를 이용한 실험 결과에서 멜라토닌이 일주기적으로 분비되어 생체 리듬을 조절하는 작용을 할 뿐 아니라, 계절적인 광주기 조건에서도 차이가 나는 분비현상으로 신진대사와 광주기에 따라 체중변화를 주게 되며, 동시에 생식 기관에도 영향을 미친다는 사실을 확인할 수 있었다. 그러나 이같은 사실을 구체적으로 확인하기 위하여 신진대사에 관한 내용과 생식기관에 직접 영향을 주는 호르몬의 조사가 병행되는 연구가 더 필요하다고 본다.

감사의 글

이 논문은 2001년도 한림대학교 교비연구비(HRF-2001-33)에 의하여 연구되었음.

참고 문헌

- Arendt J. Mammalian pineal rhythms, *Pineal Research Rev.* 1985; 3: 161-213.
- Balzer I and Hardeland R. Thermophotoperiodism In: Greppin H, Degli Agosti R & Bonzon M(eds), *Vistas on biorhythmicity*. Univ. of Geneva, Geneva 1996; 37-50.
- Bartness TJ and Goldman BD. Mammalian pineal melatonin: A clock for all seasons, *Experientia* 1989; 45: 939-945.
- Binkley S. Pineal biochemistry: comparative aspects circadian rhythm. CRC Press, Boca Raton 1981; 1: 155-172.
- Broadway J, Arendt J and Folkard S. Bright light phase shifts the human melatonin during the Antarctic winter, *Neurosci Lett* 1987; 79: 185-189.
- Evered D and Clark S. Photoperiodism, melatonin and the pineal, CIBA Foundation Symposium 117, Pitman, London, 1985.
- Han S-Z. Melatonin secretion changes upon lightning and feeding on the bird *Delichon urbica*, *J. Toxicol. Pub. Health* 2000; 16(2): 147-150.
- Hardeland R, Reiter RJ, Poeggeler B and Tan D-X. The Significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: Antioxidative protection and formation of bioactive substances, *Neuros. Biobehav. Rev.* 1993; 17: 347-357.
- Herbert J. The pineal gland photoperiodic control of the ferret's reproductive cycle, in *Biological clocks in seasonal reproductive cycles*. In: Follet, B. K. and Follet, D. E. (eds), Wright, Bristol 1981; 261-76.
- Huether G. The contribution of extrapineal sites of melatonin synthesis to circulating melatonin levels in higher vertebrates, *Experientia* 1993; 49: 665-670.
- Karl JD, Dixon ME, Powers JB. Photoperiod history, melatonin, and reproductive responses of male syrian hamsters, *J. Pineal Res.* 1990; 8: 137-152.
- Karsch FJ, Bittman EL, Robinson JE, Yellon SM. Wayne, N. L., Olster, D. H., Kaynard, A. H., Melatonin and photorefractoriness: Loss of response to the melatonin signal leads to seasonal reproductive transitions in the ewe, *Biol. Reprod.* 1986; 34: 265-274.
- Lincoln GA and Short RV. Seasonal breeding: nature's contraceptive, *Recent progress in Hormone Res.* 1980; 36: 1-52.
- Pang SF. Melatonin concentrations in blood and pineal gland, *Pineal Research Reviews* 1985; 3: 115-60,
- Pang SF, Tsang GX, Hong Yip PCY, Tang PL and Brown GM. Fluctuation of blood melatonin concentrations with age: Result of changes in pineal melatonin secretion, body growth, and aging, *J. Pineal Res.* 1990; 8: 179-192.
- Reiter RJ. Action spectra, dose-response relationship and temporal aspects of light's effect on the pineal gland, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1989; 453: 215-230.
- Reiter RJ. Pineal melatonin: Cell biology of its synthesis and its physiological interactions, *Endocrinol. Rev.* 1991; 122: 151-180.
- Reiter RJ, Poeggeler B, Tan D-X, Chen L-D. Manchester LC and Guerrero JM. Antioxidant capacity of melatonin: A novel action not requiring a receptor, *Neuroendocrinol. Lett.* 1993; 15: 103-116.
- Rohlf FJ and Sokal RR. *Statistics tables*, 2nd ed. W.H. Freeman and Company. New York, 219-312.
- Tamarkin L, Westron WK, Hamill AI and Goldman BD. *Effects of melatonin on the reproductive system of male and female Syrian hamster: Diurnal rhythm in sensitivity to melatonin*, *Endocrinol.* 1976; 99: 1534-1541.
- Vieira R, Miguez J, Lema M and Aldegunde M. Pineal and plasma melatonin as determined by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *Analytical Biochem.* 1992; 205: 300-305.
- Waldhauser F, Ehrhart B and Forster E. Clinical aspects of the melatonin action: impact of development, aging, and puberty, involvement of melatonin in psychiatric disease and importance of neuroimmunoendocrine interactions, *Experientia* 1993; 49: 671-680.