

## 수종의 생약이 PC12 Cells 중의 Catecholamines 생합성에 미치는 영향

이명구 · 황방연 · 정은희\* · 이경순 · 김학성  
충북대학교 약학대학, \*서원대학교 가정교육과

### Effects of Herbal Medicines on Catecholamine Biosynthesis in PC12 Cells

Myung Koo Lee, Bang Yeon Hwang, Eun Hee Jung\*,  
Kyong Soon Lee, Hack Seang Kim

College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju, 360-763 and

\*Department of Home Economics Education, Seowon University, Cheongju, 360-742 Korea

**Abstract**—MeOH extracts of eight herbal medicines were investigated for the effects on catecholamine biosynthesis and tyrosine hydroxylase (TH) activity in PC12 cells. Among them, the MeOH extracts of Polygalae Radix and Rehmaniae Radix showed 32 and 22% inhibition on the dopamine biosynthesis, respectively at a concentration of 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  medium. But, the TH activity was reduced by the treatment of Polygalae Radix. These results suggest that Polygalae Radix has an inhibitory effect on the catecholamine biosynthesis by the reduction of TH activity in PC12 cells.

**Keywords**—Catecholamines · Tyrosine hydroxylase · PC12 Cells · *Polygala tenuifolia*.

Catecholamines(dopamine, norepinephrine, epinephrine)은 고혈압, 심장병등의 순환기질환, Parkinson병, Dementia 등의 신경질환, 정신분열증, 우울증등의 정신질환등 광범위한 질환과 관련이 있으며, catecholamines 생합성 과정에는 tyrosine 수산화효소(tyrosine hydroxylase, EC 1.14.16.2, TH), 방향족 L-amino acid 탈탄산효소, dopamine  $\beta$ -수산화효소(DBH), phenylethanolamine N-methyl기 전이효소가 관여하고 있다. 이중 TH는 보조소 tetrahydrobiopterin의 존재하에 tyrosine에서 L-DOPA의 생합성을 촉매하며, catecholamines 생합성 과정의 제1단계를 촉매하는 rate-limiting 효소이다.<sup>1)</sup> 따라서, catecholamines 합량 변화와 그와 관련된 TH 활성은 각종 중추신경계의 질환과 관련되어 주목을 받고 있다.

PC12 cells은 rat adrenal pheochromocytoma에서 유래한 것으로, 부신수질의 chromaffin cells의 특성을 가지고 있다. PC12 cells은 catecholamines을 생합성, 저장 및 유리하며, TH와 3종의 catecholamines 생합성 효소를 함유하고 있다.<sup>2-4)</sup> 따라서, 이 cells은 catecholamines 기능 및 그의 생합성 효소의 조절작용등의 연구에 종종 응용되고 있다.

현재, 번용되고 있는 반하의 8종의 생약(Table I)에 대한 주요 활성 성분은 알려져 있으나, 이들 생약의 활성 성분들이 catecholamines 생합성과 TH 활성에 미치는 연구는 매우 미미한 편이다. 저자들은 수종의 생약이 bovine adrenal TH 및 DBH 활성에 미치는 영향에 대한 연구를 진행하였으며, 이중 반하의 11종의 생약에서 bovine adrenal TH 및 DBH 활성(*in vitro*)의 저

해작용이 있음을 보고한 바 있다.<sup>5,6)</sup>

따라서, 본 연구는 새로운 활성 성분을 검색하기 위하여 활성이 인정된 수종의 생약을 선택하여, 각각의 생약의 MeOH 엑스가 PC12 cells 중의 catecholamines 생합성과 TH 활성에 미치는 연구를 진행하였다.

### 실험방법

**실험재료** - 활성검색을 위하여 사용한 반하의 7종의 생약은 시중에서 구입하였으며, 감정후 사용하였다.

**표준엑스의 제조** - 각각의 생약시료(50 g)를 세절한 후, MeOH을 가하여 수욕상에서 3회 반복 추출한 다음 은시 여과하였다. 여과액을 감압 건조시킨 후 시료엑스(MeOH 엑스)로 하였으며 필요시 동결 건조하였다.

**PC12 cells의 배양** - PC12 cells은 10% heat-inactivated horse serum과 5% fetal calf serum(GIBCO, Grand Island, NY), 100 units/ml penicillin과 100 µg/ml streptomycin(Sigma, St. Louis, MO)을 포함한 RPMI 1640(Sigma) 배양액을 사용하여, 조직배양용 dish(60 mm, Falcon Labware, Oxnard, CA)상에서 배양하였다.<sup>3)</sup> 세포배양은 수증기 포화된 5% CO<sub>2</sub> incubator(37°C)를 사용하였다.

**시료엑스의 전처리** - PC12 cells(ca. 1x10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup>)에 대하여 배양액을 바꾸어 준 후, 엑스(40 µg/ml medium, 증류수 또는 DMSO에 용해하여 사용)를 가한 다음 48 hrs 배양하였다. Cells(ca. 1.5-2x10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup>)을 phosphate buffered saline(PBS)용액을 사용하여 pellet를 얻은 다음, PBS 용액(500 µl)을 사용하여 현탁시킨 다음, 이 용액을 catecholamines 함량 및 TH 활성 측정용 시료로 하였다. Catecholamines 함량 및 TH 활성에 미치는 엑스의 영향은 대조군과 비교하여 %로 나타내었다.

**Catecholamines 함량 측정** - Catecholamines 함량 측정은 Mitsui 등과 Lee 등의 방법<sup>7,8)</sup>을 보정하여 사용하였다. 시료용액(200 µl)에 3 M trichloroacetic acid(100 µl), isoproterenol (1 nmol/ml, 내부표준, 100 µl)을 가한 다음 원

심분리하였다. 상등액을 Toyopak SP cation cartridge(Toso, Japan)을 사용하여 전처리한 후, 흡착된 amines을 0.6 M KCl-acetonitrile(1:1, v/v) 혼합액(2 ml)을 사용하여 용출시켰다. 용출액에 diphenylethylenediamine 시약을 가하여 형광유도체화한 다음, 최종반응액 100 µl를 고속액체크로마토그래프(HPLC)에 주입하여 catecholamines 함량을 측정하였다. HPLC의 조건은 column, TSK-gel ODS 120T(5 µm, 15x0.45 cm, Toso); 이동상, acetonitrile-methanol-0.1 M sodium acetate buffer(pH 5.0)(50:5:45, v/v); 유속, 1 ml/min; 검출기, F1000 형광검출기(Hitachi, Japan)(Ex. 350 nm, Em. 470 nm)이다.

**TH 활성 측정** - TH 활성 측정은 Nagatsu 등의 방법<sup>9)</sup>을 보정하여 사용하였다. 효소 반응액은 1.5 M NaAc(pH 6.0) 75 µl, 2 mg/ml catalase 50 µl, 10 mM L-tyrosine 50 µl, 10 mM DL-6-methyltetrahydropterin 25 µl 및 효소시료 100 µl이다. 37°C에서 10분간 효소반응후 3.0 M HClO<sub>4</sub> 100 µl 및 10 µM α-methyl dopa(내부표준) 100 µl를 가하여 반응을 정지시킨 다음, 반응액에 5 ml disodium EDTA(2%), 1.5 ml KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(0.35 M)을 가하고 N-NaOH을 사용하여 pH 8.4-8.6로 조절한다. 반응액을 alumina column에 통과시킨 다음, 흡착된 반응 생성물을 0.5 M HCl 300 µl를 사용하여 용출시켰다. 용출액 100 µl를 HPLC에 주입, L-DOPA의 농도를 정량하여 효소활성을 측정하였다. HPLC의 조건은 column, TSK-gel ODS 120T(5 µm, 15x0.45 cm, Toso); 이동상, 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 3.5)-1% methanol; 유속, 1 ml/min; 검출기, CM8010 전기화학검출기(0.8 V, Ag/AgCl 전극, Toso)이다.

**단백질 함량 측정** - 효소 활성은 각 시료중의 단백질 함량을 측정하여 보정하였다. 단백질 함량은 bovine serum albumin을 사용하여 Lowry 법<sup>10)</sup>에 의하여 측정하였다.

### 결과 및 고찰

본 연구에 사용한 생약에 대한 주성분과, 그에

**Table I.** Medicinal plants selected for experiments

Herbal medicines	Weight extracted * (gr) (yields, %)
반하 (Pinelliae Tuber, Araceae)	0.6 (1.2)
오수유 (Evodiae Fructus, Rutaceae)	1.6 (3.2)
하수오 (Polygoni multiflori Radix, Polygonaceae)	4.3 (8.6)
오미자 (Schizandrae Fructus, Schizandriaceae)	2.9 (5.8)
길경 (Platycodi Radix, Campanulaceae)	6.3 (12.6)
부자 (Aconiti Tuber, Ranunculaceae)	2.5 (5.0)
지황 (Rehmaniae Radix, Scrophulariaceae)	4.1 (8.2)
원지 (Polygalae Radix, Polygalaceae)	1.7 (3.4)

\* Raw material 50 g of each herbal medicine was subjected for MeOH extraction.

**Table II.** Effects of herbal medicines on the amounts of intracellular catecholamines in PC12 cells.

Herbal medicines (40 $\mu$ g/ml medium)	Catecholamine contents (% of control)	
	Norepinephrine (pmol/mg protein)	Dopamine (nmol/mg protein)
Control	98.0 $\pm$ 4.3 (100)	4.66 $\pm$ 0.29 (100)
Pinelliae Tuber	93.1 $\pm$ 6.1 (95.0)	4.88 $\pm$ 0.19 (105)
Evodiae Fructus	98.4 $\pm$ 8.9 (100)	4.85 $\pm$ 0.35 (104)
Polygoni multiflori Radix	94.5 $\pm$ 12.1 (96.4)	4.84 $\pm$ 0.45 (104)
Schizandrae Fructus	75.8 $\pm$ 6.5 (76.5)	4.45 $\pm$ 0.45 (95.6)
Platycodi Radix	86.4 $\pm$ 9.3 (88.2)	4.17 $\pm$ 0.18 (89.5)
Aconiti Tuber	81.3 $\pm$ 7.4 (83.3)	3.68 $\pm$ 0.38 (79.0)
Rehmaniae Radix	81.2 $\pm$ 7.4 (82.9)	3.65 $\pm$ 0.28 (78.4)*
Polygalae Radix	62.7 $\pm$ 3.86 (64.0)**	3.15 $\pm$ 0.05 (67.6)**

Cells were incubated for 24 hr and replaced with fresh media. The cells were treated with herbal medicines (40  $\mu$ g/ml medium) and then incubated for 48 hr. The cells were harvested with PBS and the catecholamine contents were measured according to the procedure. The results represent the mean  $\pm$  SEM of six dishes. Significantly different from the control values: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$  (Student's t test).

따른 약리작용은 대부분 알려져 있으나, catecholamines 생합성과 제1단계 효소인 TH 활성화에 미치는 영향에 대한 검토는 아직 보고되지 않았다. 따라서, 새로운 활성성분을 검색할 목적으로 catecholamines 함량과 TH 활성화에 미치는 영향을 검토하였다.

생약은 각각 표준엑스(MeOH 엑스)를 제조하여 검색의 시료로 하였으며, 엑스의 수득율은 0.6-6.3%이었다(Table I).

PC12 cells을 사용하여 시료엑스가 catecholamines 생합성에 미치는 영향을 검토한 결과를 Table II에 나타내었다. 각 생약에 대한 전

처리 용량은 40  $\mu$ g/ml medium이며, 이 용량에서는 PC12 cells에 대한 독성작용이 인정되지 않았다. 반하, 오수유, 하수오 및 오미자의 전처치는 catecholamines 생합성에 대하여 영향을 미치지 않았다. 길경 및 부자의 전처치는 catecholamines 생합성 억제작용을 나타냈으나 유의성은 없었다. 그러나 용매분획등을 통한 활성성분의 분리 및 검색의 가능성이 있을 것으로 사료된다. 지황 및 원지 시료엑스 전처치는 dopamine 생합성을 유의적으로 억제하였으며(각각 32 및 22%의 생합성 억제), 원지는 norepinephrine의 생합성도 억제하였다.

**Table III.** Effects of herbal medicines on tyrosine hydroxylase (TH) activity in PC12 cells.

Herbal medicines (40 µg/ml medium)	TH activity (% of control) (nmol/min/mg protein)
Control	106±11.8 (100)
Pinelliae Tuber	119±8.8 (112)
Evodiae Fructus	94.3±6.8 (88.7)
Polygoni multiflori Radix	97.0±3.4 (91.5)
Schizandrae Fructus	88.3±9.7 (83.3)
Platycodi Radix	101±8.5 (95.5)
Aconiti Tuber	97.1±10.1 (91.6)
Rehmaniae Radix	97.6±7.2 (92.1)
Polygalae Radix	80.2±4.2 (75.7)*

TH activities from PC12 cells were measured according to the procedure (n=6). See others to Table II.

TH는 catecholamines 생합성의 제1단계인 tyrosine에서 L-DOPA의 생합성을 촉매하는 rate-limiting 효소이며,<sup>1)</sup> 이들 생약에 대하여 PC12 cells중의 TH 활성에 미치는 영향을 비교 검토하였다(Table III). 반하외 7종의 생약에서는 TH 활성의 감소는 인정되지 않았으나, 원지의 전처리(40 µg/ml medium)에 의하여 TH 활성은 유의적으로 감소되었다(대조군에 비하여 25%의 활성 저해). 따라서, 원지에 의한 PC12 cells 중의 catecholamines 생합성의 억제작용은 TH 활성의 저해작용에 의한 것으로 사료된다.

PC12 cells 중의 TH 활성은 c-AMP, PKA, PKC 및 dexamethasone 등의 전처리에 의하여 활성이 증가된다.<sup>3,11)</sup> 이는 TH의 활성화에 의한 활성증가 및 TH gene에 의한 효소량의 조절작용으로 사료된다. 또한, PC12 cells은 catecholamines을 생합성하고 일부는 medium 중으로 유리(secretion)한다. Medium에의 유리작용에는 Ca<sup>++</sup> channel 등 ion channel이 중요한 역할을 하고 있다.<sup>12)</sup> PC12 cells 중의 원지엑스의 전처리는 medium으로의 catecholamines의 유리는 감소되는 경향을 나타냈으나 유의성은 인정되지 않았다(미발표 자료). 따라서, PC12 cells 중의 총 catecholamines 생합성(intracellular catecholamines 함량 및 medium으로 유리된 catecholamines 함량)은 원지엑스의 전처리에 의해

여 억제된 것으로 사료된다.

원지(*Polygala tenuifolia*, Polygalaceae)의 주 성분으로는, MeOH 엑스에서 BuOH 분획을 얻은 다음, 이 분획에서 원지 saponin(Onji saponin A, B, C, D, E, F 및 G)이 분리되었다.<sup>13)</sup> 이중 원지 saponin E, F 및 G가 c-AMP phosphodiesterase 활성 저해작용이 있음을 보고되었으며,<sup>14)</sup> 이러한 결과는 c-AMP 함량의 증가작용이 있음을 나타내고 있다. Cells내에서의 c-AMP 함량증가는 TH 활성의 증가로 나타날 것으로 사료되며, 이는 본 연구와는 상반된 결과를 예측할 수 있다. 그러나, 이러한 차이는 효소화학적 연구(*in vitro*)와 수용체 또는 ion channel을 매개한 작용기전의 차이점으로 고려되며, 추후 이에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

또한, 원지엑스(crude extracts)의 전처리는 일부 흥분작용(excited behavior)이 있음을 보고하였으며,<sup>14)</sup> 이는 원지 saponin에 의한 것보다는 saponin 이외의 다른 성분에 의한 것으로 사료된다. 그리고, 원지 saponin F는 hexobarbital 수면시간의 연장작용이 있음이 보고되었다.<sup>14)</sup>

본 연구에 의하면, 원지(*Polygala tenuifolia*) 엑스의 전처리에 의하여 PC12 cells 중의 dopamine 함량은 현저히 감소되었으며, 이는 TH 활성의 저해작용에 의한 것으로 사료된다. 따라서, 원지의 생리활성성분을 분리하고, 이들 활성성분을 이용한 catecholamines 생합성 효소에 대한 효소화학적 연구 및 PC12 cells을 이용한 작용기전등의 연구가 요구된다.

감사의 말씀 - 본 연구는 1993-94년 (2차년도) 과학기술처 선도기술개발사업의 연구비로 수행되었으며, 이에 깊은 감사를 드립니다.

<1995년 1월 19일 접수>

#### 참고문헌

1. Nagatsu, T., Levitt, M. and Udenfriend, S.; *J. Biol. Chem.*, **239**, 2910 (1964).
2. Greene, L.A. and Rein, G.; *J. Neurochem.*, **30**,

- 549 (1978)
3. Tischler, A.S., Perlman, R.L., More, G.M. and Sheard, B.E.; *J. Neurochem.*, **40**, 364 (1983)
  4. Riberio, P., Pigeon, D. and Kaufman, S.; *J. Biol. Chem.*, **266**, 16207 (1991)
  5. 김학성, 이승호, 이경순, 노재섭, 오기완, 이명구; 약학논문집(충북대학교 약학대학), **8**, 39 (1993).
  6. 황윤정, 이승호, 김학성, 이경순, 노재섭, 이명구; 생약학회지, **25**, 194 (1994).
  7. Mitsui, A., Nohta, H. and Ohkura, Y.; *J. Chromatogr.*, **344**, 61 (1985).
  8. Lee, M.K., Nohta, H. and Ohkura, Y.; *J. Chromatogr.*, **378**, 329 (1986).
  9. Nagatsu, T., Oka, K. and Kato, T.; *J. Chromatogr.*, **163**, 247 (1979).
  10. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.; *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
  11. Lewis, E.J., Harrington, C.A. and Chikaraishi, D.M.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 3550 (1987).
  12. Harris, K.M., Kongsamut, S. and Miller, R.J.; *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **134**, 1298 (1986).
  13. Sakuma, S. and Shoji, J.; *Chem.Pharm.Bull.*, **29**, 2431 (1981).
  14. Nikaido, T., Ohmoto, T., Saitoh, H., Sankawa, U., Sakuma, S. and Shoji, J.; *Chem. Pharm.*