

Bulbocapnine O| PC12 세포증의 도파민 함량에 미치는 영향

신정수 · 이명구*

충북대학교 약학대학, 청주시 흥덕구 개신동 산48, 361-763

(Received January 21, 1998)

Effects of Bulbocapnine on Dopamine Content in PC12 Cells

Jeong Soo Shin and Myung Koo Lee*

College of Pharmacy, Chungbuk National University, San 48, Kaeshin-Dong,
Heungduk-Ku, Cheongju 361-763, Republic of Korea

Abstract—The effects of bulbocapnine, an aporphine isoquinoline alkaloid, on dopamine content in PC12 cells were investigated. Bulbocapnine decreased the dopamine content dose-dependently (39.2% inhibition at 20 μM for 24 hr). The IC₅₀ value of bulbocapnine was 22.7 μM. Dopamine content was lowered at 6 hr after exposure to bulbocapnine. And then, the decreased dopamine level was almost maintained at 36 hr and recovered to the control level at about 60 hr. Tyrosine hydroxylase, the rate-limiting enzyme in the catecholamine biosynthetic pathway, was also inhibited at 20 μM of bulbocapnine by 23.1% relative to control. We, therefore, hypothesized that the inhibition of tyrosine hydroxylase by bulbocapnine with a single treatment might be partially contributed to the decrease in dopamine content in PC12 cells.

Keywords □ Bulbocapnine, dopamine content, tyrosine hydroxylase, PC12 cells.

Bulbocapnine은 aporphine isoquinoline 알카로이드에 속하는 화합물로서 항산화작용,¹⁾ dopamine 수용체 길항작용²⁾이 알려져 있다.

Catecholamines이란 dopamine, norepinephrine, epinephrine을 말하며, 일련의 생합성 과정중 tyrosine hydroxylase(EC 1.14.16.2: TH)은 rate-limiting 효소로서 L-tyrosine에서 L-DOPA의 생합성을 촉매한다.³⁾

최근, isoquinoline 화합물이 catecholamine 생합성의 조절작용이 있음이 보고되었다. Isoquinoline 화합물인 berberine, palmatine 및 noscapine은 PC12 세포증의 dopamine 함량의 감소작용과 catecholamine 생합성 효소 TH의 활성 저해작용이 있음이 보고되었다.^{4~6)}

또한, 소부신의 TH에 대하여 기질 L-tyrosine을 이용한 효소화학적인 연구에서 berberine, palmatine 및 hydrastine은 상경적 저해작용^{7~9)}을, bulbocapnine은 비상경적 저해작용¹⁰⁾을 나타내고 있음이 보고되었다. 이 결과들은 bulbocapnine이 부분적으로 catecholamine 생합성 과정의 저해작용을 가지고 있음을 나타낸 것으로 사료된다. 그러나, bulbocapnine이 catecholamine 생합성 과정에 미치는 영향에 대한 연구는 되어 있지 않고 있다.

PC12 세포는 rat의 부신 pheochromocytoma에서 유래한 것으로 catecholamines을 생합성, 저장, 분비하며, TH를 생합성한다.¹¹⁾ 따라서, PC12 세포는 신경 세포의 분화 및 chromaffin 세포의 기능, 학습-습관화 반응(learning-habituation) 등의 연구의 모델로 이용되고 있다.¹²⁾

본 연구에서는 bulbocapnine O| catecholamine

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

(전화) 0431-61-2822 (팩스) 0431-68-2732

생합성 과정의 조절작용에 대한 연구를 위하여, PC12 세포중의 dopamine 함량 및 TH 활성에 미치는 영향에 대하여 경시적으로 검토하였다. Bulbocapnine은 dopamine 생합성의 저해작용이 있으며 이러한 저해작용이 부분적으로 TH 활성 저해작용을 매개로 함을 밝혔다.

실험방법

실험재료

세포배양용 donor horse serum(HS), fetal calf serum(FCS), 항생제(penicillin/streptomycin) 및 배지(RPMI 1640)는 GIBCO(Grand Island, NY, 미국), bulbocapnine hydrochloride, DL-6-methyl-5,6,7,8-tetrahydropterin, catalase, alumina, isoproterenol 및 3,4-dihydroxybenzylamine은 Sigma사(St Louis, MO, 미국)으로부터 구입하였다. 그밖의 시약은 특급 및 HPLC용 등급을 사용하였다.

PC12 세포의 배양 및 bulbocapnine의 전처치

PC12 세포의 배양은 상법에 준하였다.¹¹⁾ 배지는 10% HS, 5% FCS 및 penicillin/streptomycin을 포함한 RPMI 1640을 사용하여 37°C, CO₂ 배양기(5%)에서 배양하였다. PC12 세포(60mm culture dish, cell density 2~5×10⁴ cells/cm²)를 36(-48) 시간 배양한 다음, 이 세포(1×10⁵ cells/cm²)에 bulbocapnine(5-40 μM)를 가하고 6-48시간 배양하였다. 상등액을 경사하여 얻은 pellet는 -70°C에서 보관하며, dopamine 함량 및 TH 활성 측정 시료로 하였다.

Catecholamine 함량 측정

PC12 세포 및 배지중의 catecholamine 함량의 측정은 Mitsui 등¹³⁾ 및 Lee 등¹⁴⁾의 방법을 보정하여 사용하였다. 각 시료용액에 1 M perchloric acid 300 μl 및 0.2 nmol/ml isoproterenol(내부표준) 100 μl을 가한 다음 원심분리하였다. 상등액을 Toyopak IC-SP M cartridge(Na⁺ form, Toso, Tokyo, 일본)를 사용하여 전처리하고, 용출액에 1,2-diphenylethylenediamine을 가하여 형광유도체화 반응을 시킨 다음, 최종 반응액 100 μl을 HPLC-형광검출기(Toso)에 주입하였다. HPLC의 조건은 Lee 등¹⁴⁾의 방법에 준하여 사용하였다.

TH 활성 측정

TH 활성 측정은 Nagatsu 등¹⁵⁾의 방법을 보정하여 사용하였다.⁷⁾ 효소 반응액은 0.5 M sodium acetate (pH 6.0) 200 μl, 1 mg/ml catalase 50 μl, 5 mM L-tyrosine 100 μl, 10 mM DL-6-methyl-5,6,7,8-tetrahydropterin 50 μl, 효소시료 10(-50) μl이다. 효소반응(10분)후 3.0 M perchloric acid 100 μl 및 10 M 3,4-dihydroxybenzylamine(내부표준) 100 μl를 가한 다음 원심분리 하였다. 상등액을 alumina cartridge(100 mg)을 사용하여 전처리한 다음, 용출액을 HPLC-전기화학검출기(Toso)에 주입하여 L-DOPA의 농도를 측정하였다. HPLC의 조건은 Lee 등⁷⁾의 방법에 준하여 실시하였다.

단백질 함량 측정 및 결과정리

각 항의 생리활성은 각각의 시료중의 단백질 함량을 측정하여 보정하였다. 단백질 함량은 소혈청 albumin을 사용한 Lowry 법¹⁶⁾에 의하여 측정하였다. 실험 결과는 mean±SEM으로 표시하였으며 유의성 검정은 Student's t test에 의하여 계산하였다.

실험결과 및 고찰

Bulbocapnine은 aporphine 알카로이드 계열 화합물로서(Fig. 1), 항산화작용,¹⁾ dopamine 수용체 길항작용²⁾ 등이 보고 되고 있으나, catecholamine 생합성 과정에 미치는 영향에 대한 연구는 매우 미미하다. 최근, 저자들은 isoquinoline 화합물인 berberine, palmatine 및 noscapine이 PC12 세포중의 dopamine 함량의 감소작용이 있음을 보고하였다.⁴⁻⁶⁾ 또한, 소부신의 TH에 대하여 기질 L-tyrosine을 이용한 효소화학적인 연구에서는 berberine, palmatine 및 hy-

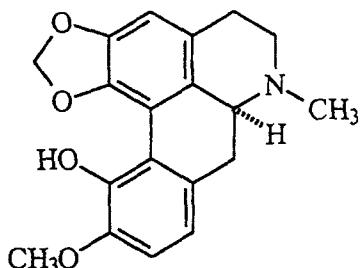


Fig. 1. Structure of bulbocapnine.

Table I — Effects of bulbocapnine on catecholamine content in PC12 cells

Inhibitor	Norepinephrine (pmol/mg protein)	Dopamine (nmol/mg protein)	TH activity (nmol/min/mg protein)
Control	94.4±6.1 (100)	4.18±0.19 (100)	4.08±0.32 (100)
Bulbocapnine (20 μM)	59.6±9.5 (63.1)*	2.54±0.38 (60.8)*	3.14±0.24 (76.9)

PC12 cells were incubated for 48 hr and replaced with fresh media. The cells were treated with bulbocapnine (20 μM) and then incubated for 24 hr. The cells were harvested with PBS, and the catecholamine content and TH activity were measured by HPLC. The control values were taken as 100. Results represent the mean±SEM of 5 dishes. Significantly different from the control value: *p<0.05 (Student's t test).

drastine은 상경적 저해작용⁷⁻⁹⁾을, bulbocapnine은 비상경적 저해작용¹⁰⁾을 나타내고 있음이 밝혀졌다. 이 결과들은 bulbocapnine을 포함한 일부 isoquinoline 생리활성 물질이 catecholamine 생합성의 조절작용이 있음을 나타내는 것으로 사료된다.

본 연구에서는 bulbocapnine의 catecholamine 생합성 과정에 대한 영향을 검토하기 위하여, PC12 세포 중에 bulbocapnine을 전처치한 후 catecholamine 함량 및 TH 활성을 측정하였다. Bulbocapnine(20 μM)의 전처치에 의하여 norepinephrine 및 epinephrine의 함량은 대조군에 비하여 각각 26.9 및 39.2% 감소되었으며, 이 경우에 TH 활성도 23.1% 저해됨을 알 수 있었다(Table I). Bulbocapnine의 전처치(24 시간)가 PC12 세포의 독성에 미치는 영향에 대하여 lactate dehydrogenase 활성을 측정하여 검토한 결과, 전처치 농도 80 μM 까지 세포독성을 나타내지 않았다. 본 연구에서는 PC12 세포 중의 dopamine 함량을 지표로 사용하여 bulbocapnine이 dopamine 생합성 조절 작용에 미치는 영향을 검토하였다.

다음으로 bulbocapnine의 dopamine 함량 감소작용에 대하여 용량별, 경시적으로 검토하였다. Bulbocapnine 전처치(24 시간)에 의하여 PC12 세포 중의 dopamine 함량은 용량의존적으로 감소하였다(Fig. 2). Bulbocapnine의 IC₅₀ 값은 22.7 μM 이었다. 그리고, dopamine 함량은 bulbocapnine 전처치 후 감소하기 시작하여 12 시간에 최저값을 나타내었으며, 이러한 저해작용은 24 시간 동안 지속되었으며, 36 시간 이후에서 dopamine 함량은 대조군까지 증가하였다(Fig. 3 위). Bulbocapnine의 전처치(전처치 후 배양시간: 12, 24 및 48 시간)에 의하여 배지중으로의 dopamine 분비는 대조군에 비하여 증가되지 않았다. 따라서, bulbocapnine의 전처치에 의하여 PC12 세포 중의 총 dopamine 함량은 감소되는 것으로 사료된다.

Bulbocapnine에 의한 PC12 세포 중의 dopamine 생합성 저해작용에 대한 작용기전을 일부 규명하기 위하여 경시적인 TH 활성의 변화를 검토하였다. TH 활성은 bulbocapnine의 전처치(30 μM)에 의하여 6~12 시간에서 최대의 저해작용을 나타내었으며, 이후 36 시간까지 활성저해가 지속되었고 48 시간 이후 대조군의 수준으로 나타났다(Fig. 3 아래). 그리고 dopamine 함량은 72 시간에서 대조군 수준으로 회복되었으며, 이 경우의 TH 활성은 유의적이지는 않지만 대조군보다 증가하는 경향을 나타내었다(Fig. 3). 이는 bulbocapnine 전처치에 의한 생리활성이 감소됨에 따라 PC12 세포 중의 dopamine 생합성이 활성화되고 있음을 나타낸 것으로 사료된다. 이러한 dopamine 생합성의 대조군 수준까지의 증가작용은 TH의 활성화에 기인되는 것

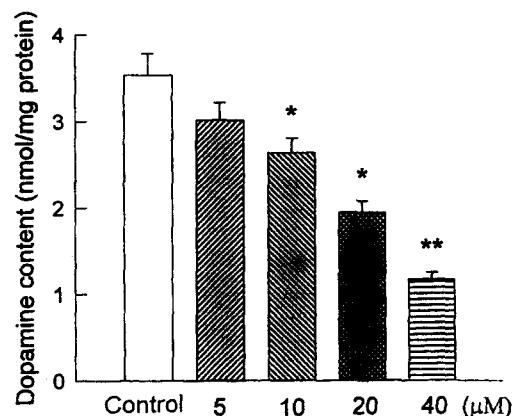


Fig. 2 — Inhibitory effects of bulbocapnine on dopamine content in PC12 cells. PC12 cells were treated with bulbocapnine (5~40 μM) and then incubated for 24 hr. The cells were harvested with PBS and the dopamine content was measured by HPLC. The dopamine content of control was 3.54±0.25 nmol/mg protein. Results represent the mean±SEM of 5 dishes. Significantly different from the control value: *p<0.05; **p<0.01 (Student's t test).

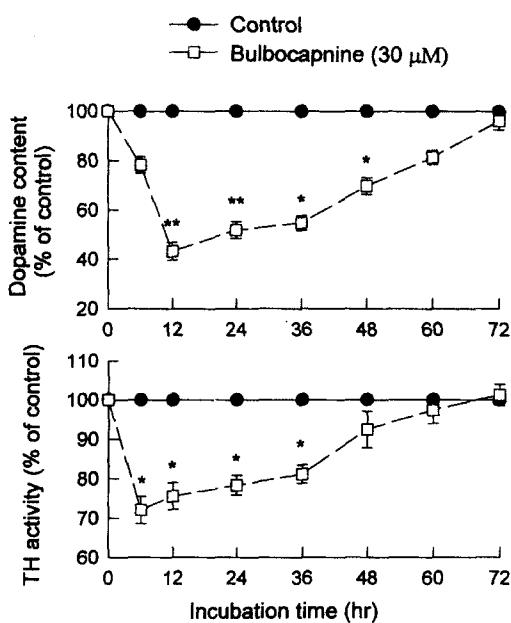


Fig. 3—Time course of dopamine content (upper) and TH activity (lower) by bulbocapnine (30 μ M) in PC12 cells. Dopamine content and TH activity of the control were 3.68 ± 0.21 nmol/mg protein and 3.95 ± 0.18 nmol/min/mg protein, respectively. Further comments see Fig. 2.

으로 사료되며, TH 활성의 회복이 인산화등에 의한 활성화인지 또는 효소단백질 함량의 증가에 의한 것인지 등의 기전에 대한 연구는 추후 진행되어야 할 것으로 사료된다.

한편, bulbocapnine은 PC12 세포중의 aromatic L-amino acid decarboxylase(EC 4.1.1.28; AADC; L-DOPA에서 dopamine 생합성 촉매효소)의 활성에는 영향을 주지 않았다(미발표 자료). Bulbocapnine은 소부신 TH를 사용하여 기질 L-tyrosine에 대하여 비상경적 길항작용을 나타내었으나,¹⁰⁾ 소부신 AADC에는 저해작용을 나타내지 않았다. 또한, bulbocapnine에 의하여 PC12 세포중의 Ca^{2+} 함량은 유의적으로 감소되었으나 cyclic-AMP 함량 및 TH mRNA 함량은 변화가 없었다(미발표 자료).

이 결과들로 부터 bulbocapnine의 1회 전처치는 부분적으로 PC12 세포중의 TH 활성을 저해하며, 이로 인하여 dopamine 생합성이 저해되고 있는 것으로 사료된다. 또한, bulbocapnine의 의한 PC12 세포중의 작용기전 및 *in vivo* 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

연구는 1997년 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비(과제번호: 1997-002-F00015)에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- artinez, L. A., Rios, J. L., Paya, M. and Alcaraz, M. J.: Inhibition of nonenzymic lipid peroxidation by benzylisoquinoline alkaloids. *Free Radical Biol. Med.* **12**, 287 (1992).
- Paderson, U. B., Norby, B., Jensen, A. A., Schiødt, M., Hansen, A., Suhr-Jessen, P., Scheideler, M., Thastrup, O. and Andersen, P. H.: Characteristics of stably expressed human dopamine D_{1a} and D_{1b} receptors: Atypical behavior of the dopamine D_{1b} receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **267**, 85 (1994).
- Nagatsu, T., Levitt, M. and Udenfriend, S.: Tyrosine hydroxylase. The initial step in norepinephrine biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **239**, 2910 (1964).
- Lee, M. K., Park, W. K. and Kim, H. S.: Inhibitory effects of the root of *Coptis japonica* on catecholamine biosynthesis in PC12 cells. *Arch. Pharm. Res.* **17**, 269 (1994).
- Lee, M. K. and Kim, H. S.: Inhibitory effects of protoberberine alkaloids from the root of *Coptis japonica* on catecholamine biosynthesis in PC12 cells. *Planta Med.* **62**, 31 (1996).
- Shin, J. S., Lee, S. S. and Lee, M. K.: Inhibitory effects of noscapine on dopamine biosynthesis in PC12 cells. *Arch. Pharm. Res.* **20**, 510 (1997).
- Lee, M. K. and Zhang, Y. H.: Inhibition of tyrosine hydroxylase by berberine. *Med. Sci. Res.* **24**, 561 (1996).
- Lee, M. K., Zhang, Y. H. and Kim, H. S.: Inhibition of tyrosine hydroxylase by palmatine. *Arch. Pharm. Res.* **19**, 258 (1996).
- Lee, M. K., Zhang, Y. H., Shin, J. S. and Lee, S. S.: Inhibition of tyrosine hydroxylase by hydrastine. *Med. Sci. Res.* **25**, 619 (1997).
- Zhang, Y. H., Shin, J. S., Lee, S. S., Kim, S. H. and Lee, M. K.: Inhibition of tyrosine hy-

- droxylase by bulbocapnine. *Planta Med.* **63**, 362 (1997).
- 11) Greene, L. A. and Rein, G. : Short-term regulation of catecholamine biosynthesis in a nerve growth factor responsive clonal line of rat pheochromocytoma cells. *J. Neurochem.* **30**, 549 (1977).
- 12) Greene, L. A. and Tischler, A. S. : PC12 pheochromocytoma cultures in neurobiological research: In Advance in Cellular Neurobiology, vol. 3 (ed. Feroroff S.), Academic Press, New York. p. 373 (1982).
- 13) Mitsui, A., Nohta, H. and Ohkura, Y. : High-performance liquid chromatography of plasma catecholamines using 1,2-diphenylethylene-diamine as precolumn fluorescence derivative reagent. *J. Chromatogr.* **344**, 61 (1985).
- 14) Lee, M. K., Nohta, H. and Ohkura, Y. : Occurrence of aromatic L-amino acid decarboxylase in human plasma and its assay by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr.* **378**, 329 (1986).
- 15) Nagatsu, T., Oka, K. and Kato, T. : Highly sensitive assay for tyrosine hydroxylase activity by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **163**, 247 (1979).
- 16) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).