

Coralyne에 의한 PC12 세포중의 도파민 생합성 저해작용

신정수, 이명구*

충북대학교 약학대학

Inhibition of Dopamine Biosynthesis by Coralyne in PC12 Cells

Jeong Soo Shin and Myung Koo Lee*

College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

Abstract—The effects of coralyne, a protoberberine isoquinoline compound, on dopamine biosynthesis in PC12 cells were investigated. Coralyne decreased the dopamine content dose-dependently (46.3% inhibition at 20 μ M for 24 hr). Dopamine content was lowered at 6 hr and reached minimal level at 24 hr after exposure to coralyne at 20 μ M. The decreased dopamine level was maintained up to 48 hr and recovered to the control level at about 72 hr. Tyrosine hydroxylase, the rate-limiting enzyme in the catecholamine biosynthesis, was also inhibited at 20 μ M of coralyne by 16.1% relative to control. These results suggest that the inhibition of tyrosine hydroxylase by coralyne with a single treatment might be partially contributed to the decrease in dopamine content in PC12 cells.

Key words—Coralyne; dopamine content; tyrosine hydroxylase; PC12 cells.

Coralyne은 protoberberine isoquinoline 계열 화합물로서 antitumor, antileukemia, antineoplast 작용이 알려져 있다.^{1,2)} 또한, 이 화합물은 catechol O-methyltransferase 및 transfer RNA methyltransferase 저해작용이 보고되었다.^{3,4)}

Catecholamines이란 dopamine, norepinephrine, epinephrine을 말하며, 일련의 생합성 과정에서 tyrosine hydroxylase(EC 1.14.16.2; TH)는 rate-limiting 효소로서 L-tyrosine에서 L-DOPA의 생합성을 촉매한다.⁵⁾

PC12 세포는 rat의 부신 pheochromocytoma에서 유래한 것으로 catecholamines을 생합성, 저장, 분비하며, TH를 생합성한다.⁶⁾ PC12 세포는 신경세포의 분화 및 chromaffin 세포의 기능, 학습-

습관화 반응(learning-habituation) 등의 연구의 모델로도 이용되고 있다.⁷⁾

최근, 저자들은 일부 isoquinoline 화합물이 catecholamine 생합성의 조절작용이 있음을 보고하였다. Berberine, palmatine 및 bulbocapnine은 PC12 세포중의 dopamine 함량의 감소작용과 TH의 활성 저해작용이 있음이 보고되었다.⁸⁻¹⁰⁾ 또한, 소부신의 TH에 대하여 기질 L-tyrosine을 이용한 효소화학적 연구에서 berberine 및 palmatine은 상경적 저해작용¹¹⁻¹³⁾을, bulbocapnine은 비상경적 저해작용¹⁴⁾을 나타내고 있음이 보고되었다. 이 결과들은 일부 생리활성 isoquinoline 계열 화합물이 부분적으로 dopamine 생합성의 저해작용을 가지고 있음을 나타낸 것으로 사료된다.

본 연구에서는 coralyne이 catecholamine 생합성 과정의 조절작용에 대한 연구를 위하여, PC12

*교신저자 : Fax 0431-268-2732

세포중의 dopamine 함량 및 TH 활성에 미치는 영향에 대하여 경시적으로 검토하였다. Coralyne은 dopamine 생합성의 저해작용이 있으며 이러한 저해작용이 부분적으로 TH 활성 저해작용을 매개로 함을 밝혔다.

재료 및 방법

실험재료-세포배양용 donor horse serum(HS), fetal calf serum(FCS), 항생제 penicillin/streptomycin 및 RPMI 1640은 Gibco(Grand Island, NY, USA), coralyne hydrochloride, L-tyrosine, catalase, DL-6-methyl-5,6,7,8-tetrahydropterin, 3,4-dihydroxybenzylamine, L-DOPA, dopamine, isoproterenol 및 alumina는 Sigma사(St Louis, MO, USA)으로 부터 구입하였다. 그밖의 시약은 특급 및 HPLC용 등급을 사용하였다.

PC12 세포의 배양 및 coralyne의 전처리-PC12 세포는 10% HS, 5% FCS, 100 units/ml penicillin 및 100 µg/ml streptomycin을 포함한 RPMI 1640을 사용하여 37°C, CO₂ 배양기(5%)에서 배양하였다.⁶⁾ PC12 세포(60 mm culture dish, cell density 2-5×10⁴ cells/cm²)를 36(-48)시간 배양한 다음, 이 세포(1×10⁵ cells/cm²)에 coralyne(5-20 µM)를 가하고 6-72시간 배양하였다. 상등액을 경사하여 얻은 pellet는 -70°C에서 보관하며, dopamine 함량 및 TH 활성 측정 시료로 하였다.

Dopamine 함량 측정-PC12 세포 및 배지중의 dopamine 함량의 측정은 Mitsui 등¹⁵⁾ 및 Lee 등¹⁶⁾의 방법에 준하였다. 각 시료용액에 1 M perchloric acid(300 µl) 및 0.2 nmol/ml isoproterenol(내부표준, 100 µl)을 가한 다음 원심분리하였다. 상등액을 Toyopak IC-SP M cartridge (Na⁺ form, Tosoh, Tokyo, Japan)를 사용하여 전처리하고, 용출액에 1,2-diphenylethylenediamine을 가하여 형광 유도체화한다음, 최종 반응액 100 µl을 HPLC-형광검출기(Tosoh)에 주입하였다. HPLC의 조건은 Lee 등¹⁶⁾의 방법에 준하여 사용하였다.

TH 활성 측정-TH 활성 측정은 Nagatsu 등¹⁷⁾의 방법을 보정하여 사용하였다.¹¹⁾ 효소 반응액은 0.5

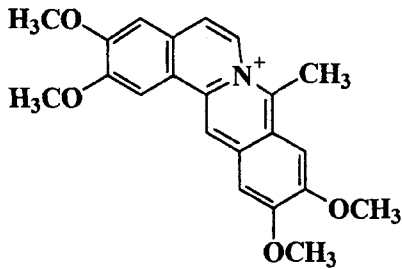
M sodium acetate(pH 6.0) 200 µl, 1 mg/ml catalase 50 µl, 5 mM L-tyrosine 100 µl, 10 mM DL-6-methyl-5,6,7,8-tetrahydropterin 50 µl, 효소시료 10(-50) µl 이다. 효소반응(10분) 후 3.0 M perchloric acid 100 µl 및 10 µM 3,4-dihydroxybenzylamine(내부표준) 100 µl를 가한 다음 원심분리 하였다. 상등액을 alumina cartridge(100 mg)를 사용하여 전처리한 다음, 용출액을 HPLC-전기화학검출기(Tosoh)에 주입하여 L-DOPA의 농도를 측정하였다. HPLC의 조건은 Lee 등¹¹⁾의 방법에 준하여 실시하였다.

단백질 함량 측정 및 결과정리-각 항의 생리활성은 각각의 시료중의 단백질 함량을 측정하여 보정하였다. 단백질 함량은 소혈청 albumin을 사용한 Lowry 법¹⁸⁾에 의하여 측정하였다. 실험결과는 mean±SEM으로 표시하였으며 유의성 검정은 Student's t test에 의하여 계산하였다.

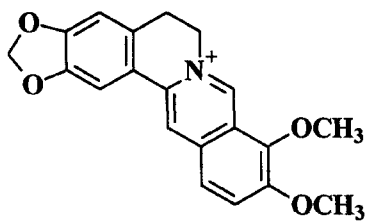
결과 및 고찰

Coralyne은 protoberberine isoquinoline 계열 화합물로서(Fig. 1), antitumor, antileukemic 작용^{1,2)} 등이 보고 되고 있으나, catecholamine 생합성 과정에 미치는 영향에 대한 연구는 매우 미미하다. 최근, 저자들은 isoquinoline 화합물인 berberine, palmatine 및 bulbocapnine이 PC12 세포중의 dopamine 함량의 감소작용이 있음을 보고하였다.⁸⁻¹⁰⁾ 또한, 소부신의 TH에 대하여 기질 L-tyrosine을 이용한 효소화학적 연구에서는 berberine, palmatine 및 hydrastine은 상경적 저해작용¹¹⁻¹³⁾을, bulbocapnine은 비상경적 저해작용¹⁴⁾을 나타내고 있음이 밝혀졌다. 이 결과들은 일부 isoquinoline 계열의 생리활성 물질이 catecholamine 생합성의 조절작용이 있음을 나타내는 것으로 사료된다.

본 연구에서는 coralyne이 catecholamine 생합성 과정에 대한 영향을 검토하기 위하여, PC12 세포중에 coralyne을 전처리한후 dopamine 함량 및 TH 활성을 경시적으로 측정하였다. Coralyne(20 µM)의 전처리에 의하여 dopamine의 함량은 대조군에 비하여 46.3% 감소되었다(Table I). Coralyne의 전처리(24시간)가 PC12 세포의 독성에



Coralyne



Berberine

Fig. 1. Structures of coralyne and berberine.

미치는 영향에 대하여 lactate dehydrogenase 활성을 측정하여 검토한 결과, 전처치 농도 60 μM 까지 세포독성을 나타내지 않았다.

다음으로 coralyne의 dopamine 함량 감소작용에 대하여 용량별, 경시적으로 검토하였다. Coralyne 전처치 (24시간)에 의하여 PC12 세포중의 dopa-

Table I. Effects of coralyne on dopamine content in PC12 cells

| Inhibitors | Dopamine content (nmol/mg protein) (% of control) |
|----------------------------|---|
| Control | 3.54 \pm 0.23 (100) |
| Coralyne 5 μM | 3.07 \pm 0.19 (86.7) |
| 10 μM | 2.47 \pm 0.17 (69.8)* |
| 20 μM | 1.90 \pm 0.12 (53.7)** |
| Berberine 10 μM | 2.12 \pm 0.45 (59.9)* |

PC12 cells were incubated for 24 hr and replaced with fresh media. The cells were treated with coralyne (5~20 μM) and then incubated for 24 hr. The cells were harvested with PBS, and the dopamine content was measured by HPLC method. Berberine was used as a positive control. Results represent the means \pm SEM of 5 dishes. Significantly different from the control value: * p <0.05; ** p <0.01 (Student's t test).

mine 함량은 용량의존적으로 감소하였으며 (Table I), coralyne의 IC₅₀ 값은 25.4 μM 이었다. Dopamine 함량은 coralyne 전처치후 감소하기 시작하여 24시간에 최저값을 나타내었고, 이러한 저해작용은 24시간 동안 지속되었으며, 48시간 이후에서 dopamine 함량은 증가하기 시작하여 72시간에서 대조군까지 증가하였다 (Fig. 2 위). Coralyne의 전처치 (전처치후 배양시간: 24 및 48시간)에 의하여 배지중으로의 dopamine 분비는 대조군에 비하여 증가되지 않았다. 따라서, coralyne의 전처치에 의하여 PC12 세포중의 총 dopamine 함량은 감소되는 것으로 사료된다.

Coralyne에 의한 PC12 세포중의 dopamine 생합성 저해작용에 대한 작용기전을 일부 규명하기 위하여 경시적인 TH 활성의 변화를 검토하였다. TH 활성은 coralyne의 전처치 (20 μM)에 의하여 12~24시간에서 최대의 저해작용을 나타내었으며 (대조군의 16.1% 저해작용), 이후 36시간까지 활성저해가 지속되었고 48시간이후 대조군의 수준으로 나타났다 (Fig. 2 아래). 이 경우 TH 활성이 먼저 회복된

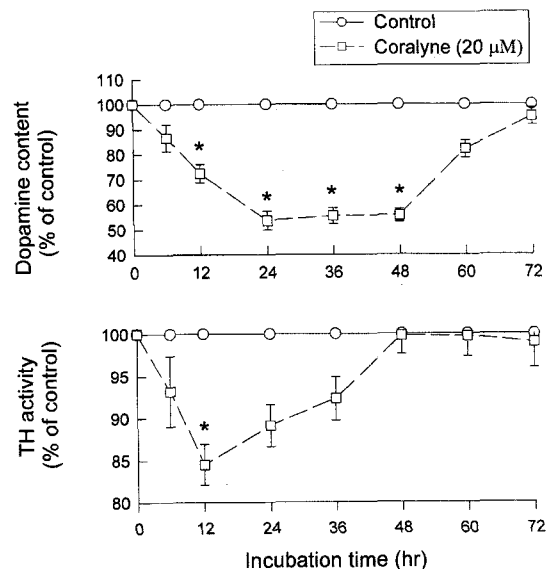


Fig. 2. Time courses of dopamine content (upper) and TH activity (lower) by coralyne (20 μM) in PC12 cells. Dopamine content and TH activity of the control were 3.68 \pm 0.21 nmol/mg protein and 3.95 \pm 0.18 nmol/min/mg protein, respectively. Results represent the means \pm SEM of 5 dishes. Significantly different from the control value: * p <0.05 (Student's t test).

이후에 dopamine 함량은 대조군 수준으로 회복되었다(72시간)(Fig. 2). 이는 coralyne 전처치에 의한 생리활성이 감소됨에 따라 PC12 세포중의 TH 활성이 활성화되고 이어서 dopamine 함량이 증가되고 있음을 나타낸 것이다.

한편, coralyne은 PC12 세포중의 aromatic L-amino acid decarboxylase(EC 4.1.1.28; L-DOPA에서 dopamine 생합성 촉매효소)의 활성에는 영향을 주지 않았으나 세포내의 Ca^{2+} 함량은 유의적으로 감소되었다.¹⁹⁾ 따라서, TH 활성의 회복에 대한 작용기전에 대한 연구는 추후 진행되어야 할 것으로 사료된다.

Coralyne과 berberine은 protoberberine isoquinoline 계열 화합물이며, 구조면에서의 주차이점은 isoquinoline 환의 methoxyl 기 및 planarity이다(Fig. 1). Coralyne과 berberine은 PC12 cells 중의 dopamine 함량 감소작용을 나타내었다(Table I). 그러나 두화합물의 화학구조와 dopamine 함량 감소작용과의 상관관계를 고찰할수 있을 정도의 유의적인 차이는 나타내지 않았으며, 이에 대한 연구는 추가로 진행되어야 할 것으로 사료된다.

이 결과들로 부터, coralyne의 1회 전처치는 부분적으로 PC12 세포중의 TH 활성을 저해하며, 이로 인하여 dopamine 생합성이 저해되고 있는 것으로 사료된다.

사 사

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

인용문헌

- Zee-Cheng, K. Y., Paull, K. D. and Cheng, C. C. (1974) Experimental antileukemic agents. Coralyne, analogs, and related compounds. *J. Med. Chem.*, 17: 347-351.
- Zee-Cheng, K. Y. and Cheng, C. C. (1976) Tetramethoxydibenzoquinolinium salts. Preparation and antileukemic activity of some positional and structural isomers of coralyne. *J. Med. Chem.*, 19: 882-886.
- Lee, J. W., MacFarlane, J. O., Zee-Cheng, R. K. and Cheng, C. C. (1977) Inhibition of catechol O-methyltransferase and transfer RNA. *J. Pharm. Sci.*, 66: 986-989.
- Sethi, M. L. (1985) Enzyme inhibition. VIII: Mode of inhibition of reverse transcriptase activity by analogues, isomers, and related alkaloids of coralyne. *J. Pharm. Sci.*, 74: 889-891.
- Nagatsu, T., Levitt, M. and Udenfriend, S. (1964) Tyrosine hydroxylase. The initial step in norepinephrine biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 239: 2910-2917.
- Greene, L. A. and Rein, G. (1977) Short-term regulation of catecholamine biosynthesis in a nerve growth factor responsive clonal line of rat pheochromocytoma cells. *J. Neurochem.* 30: 549-555.
- Greene, L. A. and Tischler, A. S. (1982) PC12 pheochromocytoma cultures in neurobiological research: *In Advance in cellular neurobiology*. vol. 3 (ed. Fereroff S.), 373. Academic Press, New York.
- Lee, M. K., Park, W. K. and Kim, H. S. (1994) Inhibitory effects of the root of *Coptis japonica* on catecholamine biosynthesis in PC 12 cells. *Arch. Pharm. Res.* 17: 269-272.
- Lee, M. K. and Kim, H. S. (1996) Inhibitory effects of protoberberine alkaloids from the root of *Coptis japonica* on catecholamine biosynthesis in PC12 cells. *Planta Med.* 62: 31-34.
- Shin, J. S., Kim, K. T. and Lee, M. K. (1998) Inhibitory effects of bulbocapnine on dopamine biosynthesis in PC12 cells. *Neuroscience Lett.* 244: 161-164.
- Lee, M. K. and Zhang, Y. H. (1996) Inhibition of tyrosine hydroxylase by berberine. *Med. Sci. Res.* 24: 561-562.
- Lee, M. K., Zhang, Y. H. and Kim, H. S. (1996) Inhibition of tyrosine hydroxylase by palmatine. *Arch. Pharm. Res.* 19: 258-260.
- Lee, M. K., Zhang, Y. H., Shin, J. S. and Lee, S. S. (1997) Inhibition of tyrosine hydroxylase by hydrastine. *Med. Sci. Res.* 25: 619-620.
- Zhang, Y. H., Shin, J. S., Lee, S. S., Kim, S. H. and Lee, M. K. (1997) Inhibition of tyrosine hydroxylase by bulbocapnine. *Planta Med.* 63: 362-363.
- Mitsui, A., Nohta, H. and Ohkura, Y. (1985)

- High-performance liquid chromatography of plasma catecholamines using 1,2-diphenylethylenediamine as precolumn fluorescence derivatization reagent. *J. Chromatogr.* 344: 61-70.
16. Lee, M. K., Nohta, H. and Ohkura, Y. (1986) Occurrence of aromatic L-amino acid decarboxylase in human plasma and its assay by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr.* 378: 329-336.
17. Nagatsu, T., Oka, K. and Kato, T. (1979) Highly sensitive assay for tyrosine hydroxylase activity by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 163: 247-252.
18. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
19. Shin, J. S., Kim, E. I., Kai, M., Kim, H. S. and Lee, M. K. (1998) Inhibitory effects of coralyne on dopamine content in PC12 cells. *Med. Sci. Res.* 26: 745-747.

(1999년 1월 11일 접수)