

Protoberberine 화합물이 P815 세포중의 serotonin 함량에 미치는 영향

이명구¹ · 김응일¹ · 허재두² · 이경순¹ · 노재섭^{1,*}

¹충북대학교 약학대학, ²광동제약 주식회사

Effects of Protoberberine Compounds on Serotonin Content in P815 Cells

Myung Koo Lee¹, Eung Il Kim¹, Jae Doo Hur²,

Kyong Soon Lee¹ and Jai Seup Ro^{1,*}

¹College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763

²Kwang Dong Pharmaceutical Co., Ltd., Seoul 152-050, Korea

Abstract – The effects of protoberberine compounds on serotonin biosynthesis in P815 cells were investigated. Protoberberine compounds such as berberine, palmatine and coralyne decreased serotonin content dose-dependently, but coptisine did not. The IC₅₀ values of berberine, palmatine and coralyne were 3.0 μM, 16.5 μM and 14.5 μM, respectively. Protoberberine compounds at concentrations up to 20 μM were not cytotoxic towards P815 cells. The activity of tryptophan hydroxylase, a rate-limiting enzyme in serotonin biosynthesis, was inhibited by the exposure of berberine, palmatine and coralyne in P815 cells (14.9-19.3% inhibition at 2-15 μM), but that of aromatic L-amino acid decarboxylase was not. These results suggest that the inhibition of tryptophan hydroxylase activity by berberine, palmatine and coralyne might partially contribute to the decrease in serotonin content in P815 cells.

Key words – protoberberine compounds, serotonin content, tryptophan hydroxylase, aromatic L-amino acid decarboxylase, P815 cells.

Serotonin(5-hydroxytryptamine, 5-HT)은 강장동물에서 척추동물에 이르는 각종 동물, 세균 및 많은 식물에 포함되어 있으며, 혈소판에서 유리되고, 장관점막, 송과체, 중추신경계를 포함한 많은 체내조직 내에 고농도로 존재하고, melatonin의 전구체이며, 위액분비의 억제작용, 평활근 수축작용을 가지고 있다.^{1,2)}

Serotonin은 tryptophan에서 5-hydroxytryptophan을 경유하여 생합성되며 각 단계에는 tryptophan hydroxylase(EC 1.14.16.4; TPH), aromatic L-amino acid decarboxylase(EC 4.1.1.28; AADC)가 촉매하고 있으며,

TPH가 serotonin 생합성 과정의 rate-limiting 효소이다.³⁾ TPH는 tryptophan 이외에 L-phenylalanine도 기질로 하지만 내재성 보조소인 pteridine의 함량에 따라 활성이 다르게 나타난다.⁴⁾ TPH의 활성화는 ATP 및 Mg²⁺에 의한 인산화에 의하여 가역적으로 활성화되며 Ca²⁺, calmodulin 및 Ca²⁺-calmodulin 의존성 protein kinase가 관여하고 있음이 보고되었다.⁵⁾

P815 세포는 F1 hybrid mice의 ascitic tumour에서 유래한 것으로 serotonin을 생합성, 저장 및 분비하며, TPH 및 AADC를 발현하고 histamine을 생합성, 저장 및 분비하며, histamine 생합성 효소인 histidine decarboxylase(EC 4.1.1.22)를 발현한다.⁶⁾ 한편

*교신저자 : Fax : 043-268-2732

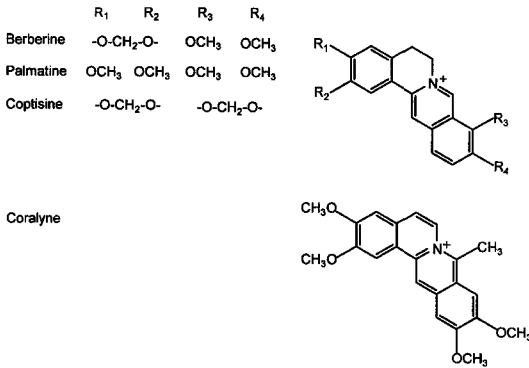


Fig. 1. Chemical structures of protoberberine compounds.

dexamethasone을 전처치하면 P815 세포내의 serotonin 함량이 감소함이 보고되고 있다.⁷⁾

Protoberberine alkaloids 계열 화합물에는 berberine, palmatine, coptisine, coralyne 등이 있다(Fig. 1).⁸⁾ Berberine은 살균, 고혈압, 항체양, 항경련 작용 등이 보고되었으며, palmatine은 항염, 진통, 항 malaria, sedative 작용, 중추신경 억제작용이 있음이 보고되었다.^{8,9)} Coptisine은 평활근 이완작용이 있으며,¹⁰⁾ coralyne은 antitumor, antileukemic, antineoplastic 효과가 보고되었다.¹¹⁾ Isoquinoline alkaloids 계열 화합물은 화학구조상으로 볼 때 중추신경계 및 catecholamine 생합성 효소와 반응 가능성이 있음을 제시하고 있다. Berberine은 catecholamine 작동성 수용체와 결합작용이 있으며,^{8,9)} bulbocapnine은 dopamine D₁ 및 D₂ 수용체 결합작용이 보고되었다.¹²⁾ 또한 protoberberine alkaloids 계열 화합물은 PC12 세포중의 dopamine 함량 감소작용 및 monoamine oxidase 활성 저해작용이 보고되었다.^{13,14)}

본 연구에서는 protoberberine alkaloids 계열 화합물을 이용하여 주요 monoamine 신경전달물질중의 하나인 serotonin 생합성 과정에 미치는 영향을 검토하였다. Protoberberine alkaloids 계열 화합물이 P815 세포내의 serotonin 함량, 세포내 TPH 활성 및 AADC 활성 변화, P815 TPH 활성에 미치는 효소화학적 영향 등의 연구를 진행하였다.

재료 및 방법

실험재료 - Berberine hydrochloride, palmatine hydrochloride, coralyne hydrochloride, L-tryptophan, 5-hydroxytryptophan, catalase, DL-6-methyl-5,6,7,8-te-

tetrahydropterin(4H-PT), serotonin, dithiothreitol 및 5-hydroxyindoleacetic acid(HIAA)는 Sigma사(St. Louis, MO, USA)로 부터, 세포배양용 fetal calf serum 및 penicillin/streptomycin, DMEM 배지는 Gibco사(Grand Island, NY, USA)로 부터 구입하였으며, coptisine(free base)은 본교 약학대학(노재섭 교수)에서 분리하여 사용하였다.¹⁵⁾ 그 밖의 시약은 특급 및 HPLC 용 등급을 사용하였다.

P815 세포의 배양 및 protoberberine 화합물의 전처치 - P815 세포는 Cornell 대학교 의과대학(분자 신경생물학 교실)에서 분양받았으며, 배양은 10% fetal calf serum, 100 unit/ml penicillin과 100 µg/ml streptomycin을 포함한 DMEM 배지를 사용하여, cell culture용 dish에서 37°C, 5% CO₂ 상에서 배양하였다.⁶⁾ P815 세포(2×10⁵ cells/cm², 60 mm culture dish)를 배양한 다음, 이 세포에 protoberberine 화합물을 1~20 µM까지 가한 다음 6~48시간 배양하였다. 배양 후 cell line을 ice-cold phosphate buffered saline (PBS) 용액으로 harvest하여 원심분리하고 pellet을 얻은 후, pellet은 -70°C freezer에 보관하면서 serotonin 함량, TPH 및 AADC 효소활성 측정시료로 사용하였다.

Serotonin 함량 측정 - Serotonin 함량은 HPLC-형광광도계법으로 측정하였다.¹⁶⁾ 시료용액(150 µl)에 trichloroacetic acid(1 M, 150 µl), HIAA(10 µM, 50 µl; 내부표준)를 가한 다음 10,000 rpm으로 원심 분리하였다. 상정액을 Millex-GV(0.22 µm)로 여과한 후 HPLC에 주입하여 serotonin 함량을 측정하였다. HPLC 조건: column, TSK-gel ODS 120T(5 µm, 0.45×15 cm); 이동상, NaOAc buffer(50 mM, pH 3.5)-acetonitrile-methanol(90:6:4, v/v); 유속, 1 ml/min; 검출기, F1000 형광검출기(λ_{max}: Ex. 285 nm, Em. 340 nm).

P815 TPH의 부분정제 및 활성 측정 - P815 TPH의 부분정제는 Naoi 등의 방법에 준하였다.¹⁷⁾ 세포를 harvest한 후, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 4 mM dithiothreitol, 10 µg antipeptidases(antipain, pepstatin A, chymostatin, leupeptine)를 포함한 Tris-acetate buffer(pH 7.4)중에 가하고, 50% dutycycle로 1분간 sonication시킨 후 extraction medium(5-bed volume)으로 희석한 후 22,000 g에서 10분간 원심분리시켰다. 상정액을 sephadex G-10 column에서 분리시킨 후 1차로 2 ml buffer로 용출시키고, 2차로 4.5 ml buffer로 용출시켜 효소원으로 사용하였다.

TPH 활성 측정 - TPH 활성 측정은 Yanagisa 등의 방법을 개량하여 사용하였다.¹⁶⁾ 효소반응액은 Tris-acetate(0.1 M, pH 7.6, 200 μ l), dithiothreitol(10 mM, 80 μ l), catalase(2 mg/ml, 40 μ l), L-tryptophan(2 mM, 50 μ l), 4H-PT(10 mM, 40 μ l) 및 효소 시료액이며, 37°C에서 효소반응 20분 후 perchloric acid(3.0 M, 70 μ l) 및 5-HIAA(내부표준액, 10 μ M, 50 μ l)를 가한 후 원심 분리한 다음, 상정액을 HPLC에 주입, 5-hydroxytryptophan 농도를 정량하여 효소활성을 측정하였다. HPLC 조건 : column, TSK-gel ODS 120T (5 μ m, 0.45 \times 15 cm); 이동상, NaOAc buffer(50 mM, pH 3.5)-acetonitrile-methanol(90:6:4, v/v); 유속, 1 ml/min; 검출기, F1000 형광검출기(λ_{max} : Ex. 285 nm, Em. 340 nm).

AADC 활성 측정 - AADC 활성 측정은 Yanagisa 등의 방법을 사용하였다.¹⁶⁾ 효소반응액은 sodium phosphate buffer(50 mM, pH 8.2, 240 μ l), pargyline HCl(5 mM, 80 μ l), pyridoxal phosphate(0.1 mM, 40 μ l), L-5-tryptophan(10 mM, 40 μ l) 및 효소 시료액이며, 37°C에서 효소반응 120~240분 후 trichloroacetic acid(3.0 M, 80 μ l) 및 5-HIAA(내부표준액, 10 μ M, 50 μ l)를 가한 후 원심분리한 다음, 상정액을 HPLC에 주입 serotonin 농도를 정량하여 효소활성을 측정하였다. HPLC 조건은 TPH 활성 측정시와 동일하게 처리하였다.

단백질 함량 측정 및 결과정리 - 각 항의 생리활성은 각각의 시료중의 단백질 함량을 측정하여 보정하였으며, 단백질 함량은 소혈청 albumin을 사용한 Lowry 법에 의하여 측정하였다.¹⁸⁾ 실험결과는 mean \pm SE로 나타내고 유의성은 Student's *t*-test에 의하여 계산하였다.

결과 및 고찰

Protoberberine alkaloids 계열 화합물인 berberine, palmatine, coptisine 및 coralyne을 사용하여 P815 세포내의 serotonin 함량에 미치는 영향에 대하여 검토하였다(Table 1). 대조군의 serotonin 함량은 1.58 nmol/mg protein이었다. Berberine은 전처리 용량 4.0 μ M에서 대조군의 48.2%를 나타내었으며, palmatine 및 coralyne은 20 μ M에서 각각 45.4% 및 38.4%를 나타내었다. 그러나 coptisine은 serotonin 함량 감소작용을 나타내지 않았다. Berberine, palmatine 및 coralyne의 IC₅₀ 값은 각각 3.1 μ M, 16.5 μ M 및 14.5

Table 1. Effects of protoberberine alkaloids on serotonin content in P815 cells

Protoberberine alkaloids	Concentration	Serotonin content (nmol/mg protein) (% of control)	IC ₅₀ values (μ M)
Control		1.58 \pm 0.15 (100)	
Berberine	0.5 μ M	1.13 \pm 0.12 (71.4)	3.1
	2.0 μ M	0.91 \pm 0.12 (57.3)**	
	4.0 μ M	0.76 \pm 0.11 (48.2)**	
Palmatine	5.0 μ M	1.30 \pm 0.12 (82.3)	16.5
	10.0 μ M	0.85 \pm 0.12 (53.8)**	
	20.0 μ M	0.72 \pm 0.13 (45.4)**	
Coralyne	5.0 μ M	1.06 \pm 0.11 (67.4)*	14.5
	10.0 μ M	0.80 \pm 0.15 (50.6)**	
	20.0 μ M	0.61 \pm 0.13 (38.4)**	
Coptisine	5.0 μ M	1.66 \pm 0.13 (105)	
	10.0 μ M	1.72 \pm 0.13 (108)	
	20.0 μ M	1.73 \pm 0.12 (109)	

The results represent the mean \pm SE of 4-5 dishes. Significantly different from the control value: *, P<0.05; **, P<0.01 (Student's *t*-test).

μ M이었다(Table 1).

Protoberberine alkaloids 계열 화합물의 P815 세포에 대한 독성은 lactate dehydrogenase 활성을 측정하여 검색하였다. Berberine은 20 μ M 이상의 농도에서 강한 독성 작용을 나타내었으며, palmatine 및 coralyne은 50 μ M 농도 범위까지 P815 세포에 대하여 독성작용을 나타내지 않았다.

Protoberberine alkaloids 계열 화합물에 의한 P815 세포내의 serotonin 함량 감소가 serotonin의 배지 (culture medium)로의 분비의 가능성을 알아보기 위해

Table 2. Effects of protoberberine alkaloids on tryptophan hydroxylase (TPH) and aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) activities in P815 cells

Protoberberine alkaloids	TPH activity (nmol/min/mg protein) (% of control)	AADC activity (nmol/min/mg protein) (% of control)
Control	19.6 ± 0.46 (100)	0.76 ± 0.04 (100)
Berberine 2 μM	16.7 ± 0.72 (85.1)*	0.69 ± 0.03 (90.8)
Palmatine 15 μM	16.1 ± 0.45 (82.1)**	0.68 ± 0.03 (89.5)
Coralyne 15 μM	16.0 ± 0.79 (81.7)**	0.71 ± 0.02 (93.4)

The results represent the mean ± SE of 4-5 dishes. Significantly different from the control values: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ (Student's *t*-test).

여, alkaloids 화합물을 전처리 24시간 후에 세포내 및 배지중의 serotonin 함량을 측정하였다. Berberine, palmatine 및 coralyne의 전처리에 의하여 배지중의 serotonin 함량은 유의적인 변화가 없었다. 따라서 protoberberine alkaloids 계열 화합물에 의한 P815 세포중의 총 serotonin 함량 감소작용은 세포내 serotonin 함량감소가 주된 원인임을 알 수 있었다.

Berberine, palmatine 및 coralyne에 의한 P815 세포내의 serotonin 함량 감소작용에 대한 부분적인 작용기전을 규명하기 위하여 P815 세포내의 TPH 활성 변화를 측정하였다(Table 2). TPH 활성은 protoberberine alkaloids 계열 화합물 24시간 전처리 후에 측정하였으며, 대조군의 TPH 활성은 19.6 pmol/min/mg protein이었다. TPH 활성은 berberine 2 μM, palmatine 15 μM 및 coralyne 15 μM의 전처리에 의하여 대조군의 85.1%, 82.1% 및 81.7%로 나타나 유의성 있는 TPH 활성저해 작용을 나타내었다.

Berberine, palmatine 및 coralyne에 의한 P815 세포중의 serotonin 함량 감소 및 TPH 활성 저해작용에 대한 경시적인 변화를 검토하였다(Fig. 2). Berberine, palmatine 및 coralyne 전처리(12-24시간)에 의하여 P815 세포내의 TPH 활성은 12시간에서 저해되기 시작하여 12-24시간에서 최대의 저해작용을 나타내었으며, 24시간 이후 48시간에서 TPH 활성은 대조군 수준으로 회복되었다. 또한, P815 세포중의 serotonin 함량도 12시간에서 감소하기 시작하여 12-24시간까지는 감소를 유지하였으며, 이후 serotonin 함량은 60시간에서 대조군 수준으로 회복되었다(data not shown).

다음으로 berberine, palmatine 및 coralyne이 P815 세포중의 AADC 활성에 미치는 영향에 대하여 검토하였다(Table 2). Berberine(2 μM), palmatine 및 cor-

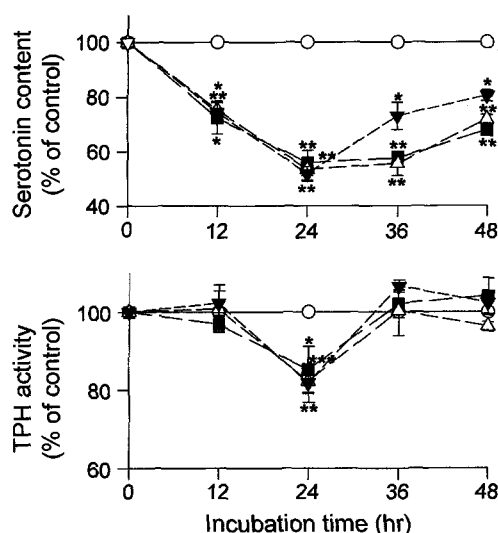


Fig. 2. Changes of serotonin content and tryptophan hydroxylase (TPH) activity by protoberberine compounds in P815 cells. Significantly different from the control values ($n=4-5$): *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ (Student's *t*-test).

○- Control
 ■- Berberine, 2.0 μM
 △- Palmatine, 15.0 μM
 ▼- Coralyne, 15.0 μM

alyne(각 15 μM)은 24시간 전처리에 의하여 미약한 활성저해작용을 나타내었으나, 유의성 있는 변화를 나타내지 않았다.

이상의 결과로부터, protoberberine alkaloids 계열 화합물에 의한 P815 세포중의 TPH 활성 저해작용은 세포내 serotonin 함량 감소작용을 나타낸 것으로 사료되어, 세포내의 TPH를 부분정제(P815 TPH)하여 protoberberine alkaloids가 P815 TPH 활성에 미치는 영향을 검토하였다. 대조군의 P815 TPH 활성은 35.3 pmol/min/mg protein이었다. P815 TPH 활성은 ber-

berine, palmatine 및 coralyne(각각 200 μ M)에 의하여 활성 저해작용을 나타내지 않았다. 이 결과로부터 protoberberine alkaloids 계열 화합물에 의한 P815 세포종의 TPH 활성 저해작용은 TPH에 직접적인 활성 저해작용이 아니라 간접적인 활성 저해작용에 의한 것임을 제시하고 있으며, 이에 대한 연구는 추가로 진행되어야 할 것으로 사료된다.

본 연구에서는 protoberberine alkaloids 계열 화합물 중에서, berberine, palmatine 및 coralyne은 P815 세포내 serotonin 함량 감소작용을 나타내었으며, 배지중으로의 serotonin 분비는 나타내지 않았다. 이 경우에 P815 세포내의 TPH 활성을 경시적으로 저해하였으나, AADC 활성은 저해되지 않았다. 따라서 berberine, palmatine 및 coralyne에 의한 P815 세포종의 serotonin 함량 감소작용은 TPH 활성 변화와 밀접하게 관련이 있을 것으로 사료된다. 또한 berberine, palmatine 및 coralyne은 PC12 세포종의 dopamine 함량 감소작용이 있으며, 이 경우에도 tyrosine hydroxylase(dopamine 생합성 과정의 rate-limiting 효소)의 활성 변화가 중요한 역할을 하고 있음이 보고되었다.¹³⁾

Berberine, palmatine, coralyne 및 coptisine은 protoberberine 환을 가지고 있으며 화학구조면에서 매우 유사하다(Fig. 1). 그러나 coptisine은 PC12 세포 중의 dopamine 함량 및 P815 세포종의 serotonin 함량에는 영향을 주지 않았으며, 이는 R_3 및 R_4 의 치환기가 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

Coptisine은 monoamine 대사 효소인 type A monoamine oxidase에 대하여 강한 저해작용을 나타내고 있음이 보고되었으며,¹⁵⁾ coptisine도 monoamine 함량 조절작용이 있음을 나타내고 있다. 그러나 coptisine은 PC12 세포 및 P815 세포종의 monoamine 함량변화에는 영향을 주지 않았으며, 이는 PC12 세포 및 P815 세포종의 monoamine oxidase 활성과 관계가 있기 때문이다.

이러한 결과들은 berberine 및 palmatine의 중추신경계의 억제작용이 부분적으로 monoamine(dopamine 및 serotonin) 함량 감소작용과 관련이 있음을 시사하고 있다.

따라서 protoberberine alkaloids 계열 화합물은 monoamine 함량 조절 작용에 대한 세포수준에서의 작용기전 연구 및 행동 약리학적, 뇌내 동태학적인 응용 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 충북대학교 지방대학 특성화사업 산학협력연구과제(과제번호 99R-P-1; 협력업체, 광동제약)의 지원으로 진행되었으며, 이에 감사를 드립니다.

인용문헌

- Adham, N., Borden, L. A., Schechte, L. E., Gustafson, E. L. and Branchek, T. A. (1993) Cell-specific coupling of the cloned human 5-HT_{1F} receptor to multiple signal transduction pathways. *Neuropharmacology*. 34: 566-575.
- Hoyer, D., Clarke, D. E., Fozard, J. R., Hartig, P. R., Martin, G. R., Mylecharrane, E. J., Saxena, P. R. and Humprey, P. P. A. (1994) International union of pharmacology classification of reports for 5-hydroxytryptamine (serotonin). *Pharmacol. Rev.* 46: 157-203.
- Lovenberg, W., Jequier, E. and Sjoerdsma, A. (1967) Tryptophan hydroxylation; measurement in pineal gland, brain stem and carcinoid tumor. *Science* 155: 217-219.
- Hamon, M., Bourgoin, S., Hery, F. and Simonnet, G. (1978) Activation of tryptophan hydroxylase by adenosine triphosphate, magnesium and calcium. *Mol. Pharmacol.* 14: 99.
- Yamauchi, T. and Fujisawa, H. (1979) Most of Ca⁺⁺-dependent endogenous phosphorylation of rat brain cytosol proteins requires Ca⁺⁺-dependent regulation protein. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 90: 28.
- Schindler, R., Day, M. and Fisher, G. A. (1959) Culture of neoplastic mast cells and their synthesis of 5-hydroxytryptamine and histamine *in vitro*. *Cancer Res.* 19: 47-51.
- Imanishi, N., Nakayama, T., Asano, M., Yatsunami, K., Tomita, K. and Ichikawa, A. (1987) Induction of histidine decarboxylase by dexamethasone in mastocytoma P815 cells. *Biochim. Biophys. Acta* 928: 227-234.
- Tang, W. and Eisenbrand, G. (1992) Coptis supp. 362-371, in *Chinese drugs of plant origin*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Sethi, M. L. (1983) Inhibition of reverse transcriptase activity by protoberberine alkaloids and structure-activity relationship. *J. Pharm. Sci.* 72: 538-541.
- Hiller, K. O., Ghorbani, M. and Schilcher, H. (1998) Antispasmodic and relaxant activity of chelidonium, protopine, coptisine, and Chelidonium majus extracts on isolated guinea-pig ileum. *Planta Med.* 64: 758-760.
- Zee-Cheng, K. Y., Paul, K. D. and Cheng, C. C. (1974) Experimental antileukemic agents. Coralyne, analogs and related compounds. *J. Med. Chem.* 17: 347-351.

12. Paderson, U. B., Norby, B., Jensen, A. A., Schiodt, M., Hansen, A., Suhr-Jessen, P., Scheideler, M., Thastrup, O. and Andersen, P. H. (1994) Characteristics of stably expressed human dopamine D_{1a} and D_{1b} receptors: atypical behavior of the dopamine D_{1b} receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 267: 85-93.
13. Shin, J. S., Kim, E. I., Kai, M. and Lee, M. K. (2000) Inhibition of dopamine biosynthesis by protoberberine alkaloids in PC12 cells. *Neurochem. Res.* 25: 363-368.
14. Lee, S. S., Kai, M. and Lee, M. K. (1999) Effects of natural isoquinoline alkaloids on monoamine oxidase activity in mouse brain: inhibition by berberine and palmatine. *Med. Sci. Res.* 27: 749-751.
15. Lee, M. K., Lee, K. S., Kim, H. S., Hong, S. S. and Ro, J. S. (2000) Inhibitory effects of coptisine on monoamine oxidase activity. *Nat. Prod. Sci.* 6: 70-72.
16. Yanagisa, M., Hasegawa, H. and Ichiyama, A. (1982) Assay of tryptophan hydroxylase and aromatic L-amino acid decarboxylase based on rapid separation of the reaction product by high performance liquid chromatography. *J. Biochem.* 92: 449-456.
17. Matsubara, K., Kobayashi, Y., Tanabe, Y., Maruyama, W., Ishinaga, Y., Idzu, T., Kimura, K. and Naoi, M. (1996) Modulation of tryptophan hydroxylase activity in vitro by ethanol depends on biopterin cofactor concentration. *Alcohol* 13: 455-459.
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.

(2001년 1월 10일 접수)