

Liriodenine이 PC12 세포중의 Dopamine 생합성에 미치는 영향

김춘매 · 이재준 · 윤수옥 · 김유미 · 김영균¹ · 유시용² · 이명구*

충북대학교 약학대학, 생물건강산업개발연구센터, 청주시 흥덕구 개신동 산48, 361-763

¹국민대학교 임산공학과, 서울시 성북구 정릉동 861-1, 136-702

²한국화학연구원, 대전시 유성구 장동 100, 305-606

Effects of Liriodenine on Dopamine Biosynthesis in PC12 Cells

Chun Mei Jin, Jae Joon Lee, Shou Yu Yin, Yu Mi Kim, Young Kyoon Kim¹,
Shi Yong Rhu², and Myung Koo Lee*

College of Pharmacy, and Research Center for Bioresource and Health,
Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

¹College of Forest Science, Kookmin University, Seoul 136-702, Korea

²Korea Research Institute of Chemical Technology, Taejeon 305-606, Republic of Korea

Abstract – The effects of liriodenine, an aporphine isoquinoline alkaloid, on dopamine content in PC12 cells were investigated. Treatment of PC12 cells with liriodenine decreased dopamine content in a dose-dependent manner (33.6% inhibition at 10 μ M for 12 h). The IC₅₀ value of liriodenine was 8.4 μ M. Dopamine content decreased at 3 h and reached a minimal level at 12 h after the exposure to liriodenine. Under these conditions, the activities of tyrosine hydroxylase and aromatic L-amino acid decarboxylase were also inhibited at 10 μ M of liriodenine by 10.1% and 20.2% relative to control, respectively. In addition, liriodenine inhibited the increase in dopamine content induced by L-DOPA treatments (50 – 100 μ M) in PC12 cells. These results suggest that liriodenine inhibited dopamine biosynthesis and L-DOPA-induced increase in dopamine content by reducing the activities of tyrosine hydroxylase and aromatic L-amino acid decarboxylase in PC12 cells.

Keywords – Liriodenine, dopamine content, tyrosine hydroxylase, aromatic L-amino acid decarboxylase, PC12 cells

Liriodenine은 aporphine isoquinoline 알카로이드에 속하는 화합물로서 백후박(*Magnolia obovata* Thun., Magnoliaceae)의 수피에서 분리되었으며,¹⁾ *M. obovata*는 위장관 질환 등에 사용되고 있는 전통생약이며 항암작용도 보고되고 있다.¹⁾

Catecholamines이란 dopamine, norepinephrine 및 epinephrine을 말하며, 일련의 생합성 과정에는 tyrosine hydroxylase(EC 1.14.16.2; TH, L-tyrosine에서 L-DOPA 생합성 촉매), aromatic L-amino acid decarboxylase(EC 4.1.1.28; AADC, L-DOPA에서 dopamine 생합성 촉매), dopamine β -hydroxylase, phenylethanolamine N-methyltransferase가 관여하고 있다.²⁾ Catecholamine은 고혈압, 심장병 등의 순환기질환, 파킨슨씨 질환, Senile dementia 등의 신경질환, 정신분열증, 우울병 등의 정신질환 등의 광범위한 질환과 관련이 있으며, ACTH, glucocorticoids 등과 함께 스트레스 등

의 생체방어에 중요한 신경전달물질 또는 호르몬이다.

PC12 세포는 rat의 부신 pheochromocytoma에서 유래한 것으로 catecholamine을 생합성, 저장, 분비하며, TH 및 AADC를 생합성한다.³⁾ 또한, PC12 세포는 신경세포의 분화 및 chromaffin 세포의 기능, 학습-습관화 반응 등의 연구의 모델로 이용되고 있다.⁴⁾

최근, 수종의 isoquinoline 화합물이 catecholamine 생합성의 조절작용이 있음이 보고되었다. Isoquinoline 화합물인 berberine, palmatine, coralyne, hydrastine 및 bulbocapnine은 PC12 세포중의 dopamine 함량의 감소작용과 catecholamine 생합성 효소 TH의 활성 저해작용이 있음이 보고되었다.⁵⁻⁷⁾ 또한, 소부신의 TH에 대하여 기질 L-tyrosine을 이용한 효소 화학적인 연구에서 berberine, palmatine 및 hydrastine은 상경적 저해작용⁸⁻¹⁰⁾을 bulbocapnine은 비상경적 저해작용¹¹⁾을 나타내고 있음이 보고되었다.

그러므로, 본 연구에서는 aporphine isoquinoline 화합물로

*교신저자(E-mail) : myklee@cbucc.chungbuk.ac.kr
(FAX) : 043-268-2732

서 생리활성을 나타낸 bulbo-capnine과 유사 구조를 가진 liri-odenine을 선택하여 catecholamine 생합성 과정에 미치는 영향에 대한 연구에 대하여 검토하였다.

재료 및 방법

실험재료 - 세포배양용 donor horse serum(HS), fetal bovine serum(FBS), 항생제(penicillin/streptomycin) 및 배지(RPMI 1640)는 Gibco(Grand Island, NY, 미국)로부터, DL-6-methyl-5, 6, 7, 8-tetrahydropterine, catalase, alumina, isoproterenol 및 3, 4-dihydroxybenzylamine은 Sigma(St Louis, MO, 미국)로부터 구입하였다. 그 밖의 시약은 특급 및 HPLC 용 등급을 사용하였다.

Liriodenine의 분리 - Liriodenine은 *M. obovata*로부터 분리하였으며,¹⁾ 표품과 비교하여 확인, 동정하였다.

PC12 세포의 배양 및 liri-odenine의 전처리 - PC12 세포의 배양은 상법에 준하였다.^{3,4)} 배지는 10% HS, 5% FBS 및 penicillin/streptomycin을 포함한 RPMI 1640을 사용하여 37°C, CO₂ 배양기(5%)에서 배양하였다. PC12 세포(cell density 2.5×10⁴ cells/cm²)를 36(-48) 시간 배양한 다음, 이 세포(1×10⁵ cells/cm²)에 liri-odenine(5-20 μM)를 가하고 6-72 시간 배양하였다. 상등액을 경사하여 얻은 pellet는 -70°C에서 보관하며, dopamine 함량, TH 및 AADC 활성 측정 시료로 하였다.

Dopamine 함량 측정 - PC12 세포 및 배지중의 dopamine 함량의 측정은 Mitsui 등¹²⁾ 및 Lee 등¹³⁾의 방법을 보정하여 사용하였다. 각 시료용액에 1 μM perchloric acid 300 μl 및 0.2 nmol/ml isoproterenol(내부표준) 100 μl을 가한 다음 원심분리하였다. 상등액을 Toyopak IC-SP M cartridge(Na⁺ form, Tosoh, Tokyo, 일본)를 사용하여 전처리하고, 용출액에 1,2-diphenylethylenediamine을 가하여 형광유도체화 반응을 시킨 다음, 최종 반응액 100 μl을 HPLC-형광검출기(Tosoh)에 주입하였다. HPLC의 조건은 Lee 등¹³⁾의 방법에 준하여 사용하였다.

TH 활성 측정 - TH 활성 측정은 Nagatsu 등¹⁴⁾의 방법을 보정하여 사용하였다.⁸⁾ 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-tetrahydropterine 50 μl, 효소시료 10(-50) μl이다. 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)을 사용하여 전처리한 다음, 용출액을 HPLC-전기화학검출기(Tosoh)에 주입하여 L-DOPA의 농도를 측정하였다. HPLC의 조건은 Lee 등⁸⁾의 방

법에 준하여 실시하였다.

AADC 활성 측정 - AADC 활성 측정은 Lee 등의 방법¹⁴⁾을 사용하였다. 효소반응액은 0.2 M Na-PO₄ 원충액(pH 6.8) 200 μl, 0.2 mM pyridoxal phosphate 100 μl, 8 mM L-DOPA 및 효소시료 10(-100) μl이다. 효소반응(30분)후 1 M HClO₄ 300 μl 및 0.2 nmol/ml isoproterenol(내부표준) 100 μl을 가한 다음 원심 분리하였다. 효소반응 후 생성된 dopamine 함량은 상기의 HPLC 방법으로 측정하여 효소활성을 측정하였다.

단백질 함량 측정 및 결과정리 - 각 항의 생리활성은 각각의 시료중의 단백질 함량을 측정하여 보정하였다. 단백질 함량은 소혈청 albumin을 사용한 Lowry 법¹⁵⁾에 의하여 측정하였다. 실험결과는 mean±SEM으로 표시하였으며 유의성 검정은 Student's *t*-test에 의하여 계산하였다.

결과 및 고찰

Liriodenine은 aporphine isoquinoline 알카로이드 계열 화합물로서(Fig. 1), 항암작용,¹⁾ 항혈전작용,¹⁶⁾ 항부정맥작용¹⁷⁾ 등이 되었다. 그러나, liri-odenine의 catecholamine 생합성 과정에 미치는 영향에 대한 연구는 진행되지 않고 있다. 최근, 저자들은 수종의 isoquinoline 화합물이 dopamine 생합성 조절 작용이 있음을 보고하였다.^{5,7)} 이중 bulbo-capnine은 PC12 세포중의 dopamine 함량 감소작용이 있으며,⁷⁾ 소부신 TH에 대하여 비상경적 저해작용¹¹⁾을 나타내고 있음이 밝혀졌다. 이 결과들은 bulbo-capnine을 포함한 일부 isoquinoline 계열 생리활성 물질이 catecholamine 생합성의 조절작용이 있음을 나타내는 것으로 사료된다.

본 연구에서는 bulbo-capnine의 analogue인 liri-odenine을 사용하여 dopamine 생합성 과정에 대한 영향을 검토하기 위하여, PC12 세포 중에 liri-odenine을 전처리한 후 dopamine 함량, TH 및 AADC 활성을 측정하였다.

Liriodenine의 전처리에 의하여 dopamine의 함량은 대조군에 비하여 농도 의존적으로 감소하였으며(10 μM 전처리

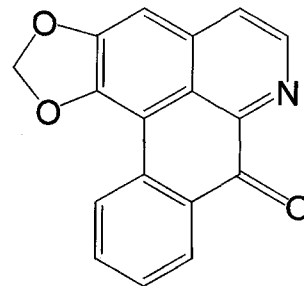


Fig. 1. Structure of liri-odenine.

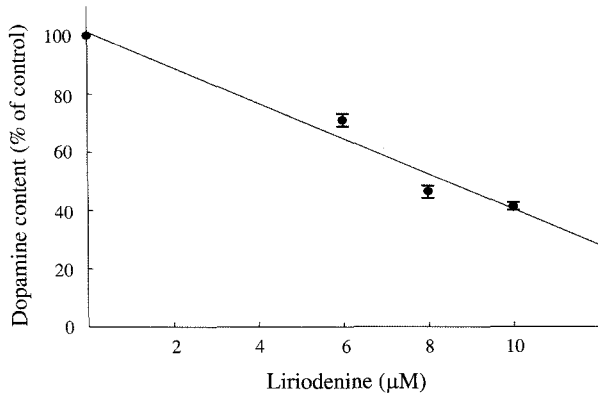


Fig. 2. Inhibitory effects of liriodenine on dopamine content in PC12 cells. PC12 cells were treated with liriodenine (5-10 µM) and then incubated for 24 h. The cells were harvested and dopamine content was measured by a HPLC method. The control value of dopamine content was 3.54 ± 0.25 nmol/mg protein. Results represent the mean \pm SEM of 5 dishes.

에 의하여 33.6% 저해작용을 나타냄)(Fig. 2), IC_{50} 값은 8.4 µM이었다. Liriodenine의 전처리(24 시간)가 PC12 세포에 대한 독성작용에 미치는 영향에 대하여 lactate dehydrogenase 활성을 측정하여 검토한 결과, 전처리 농도 20 µM 까지 세포독성을 나타내지 않았다. Liriodenine의 전처리(전처리 후 배양시간; 12, 24 및 48 시간)에 의하여 배지중으로의 dopamine 분비는 대조군에 비하여 증가되지 않았다. 따라서, liriodenine의 전처리에 의하여 PC12 세포중의 총 dopamine 함량은 감소되는 것으로 사료된다.

Liriodenine의 dopamine 함량 감소작용에 대하여 경시적으로 검토하였다. PC12 세포중의 dopamine 함량은 liriodenine 전처리 후 감소하기 시작하여 12 시간에 최저값을 나타내었으며, 이러한 저해작용은 12-24 시간 동안 지속되었으며, 48 시간 이후에서 dopamine 함량은 대조군까지 회복되었다(Fig. 3, A). 또한, dopamine 함량은 72 시간에서 일시적으로 증가되었으나, 이후 대조군 수준으로 나타났다.

Liriodenine에 의한 PC12 세포중의 dopamine 생합성 저해작용에 대한 작용기전을 일부 규명하기 위하여 경시적인 TH 및 AADC 활성의 변화를 검토하였다. TH 활성은 liriodenine의 전처리(10 µM)에 의하여 0.5 시간에서 저해작용을 나타내었으며(10.1% 저해작용), 이후 1 시간에서 대조군보다 약간 활성이 증가되었으나 대조군 수준으로 감소되어 지속되었다(Fig. 3, B). 그러나, AADC의 활성은 liriodenine의 전처리에 의하여 감소되어 3-6 시간에서 최대의 저해작용(대조군의 20.2% 저해작용)을 나타내었다(Fig. 3, C). 이는 liriodenine 전처리에 의한 PC12 세포중의

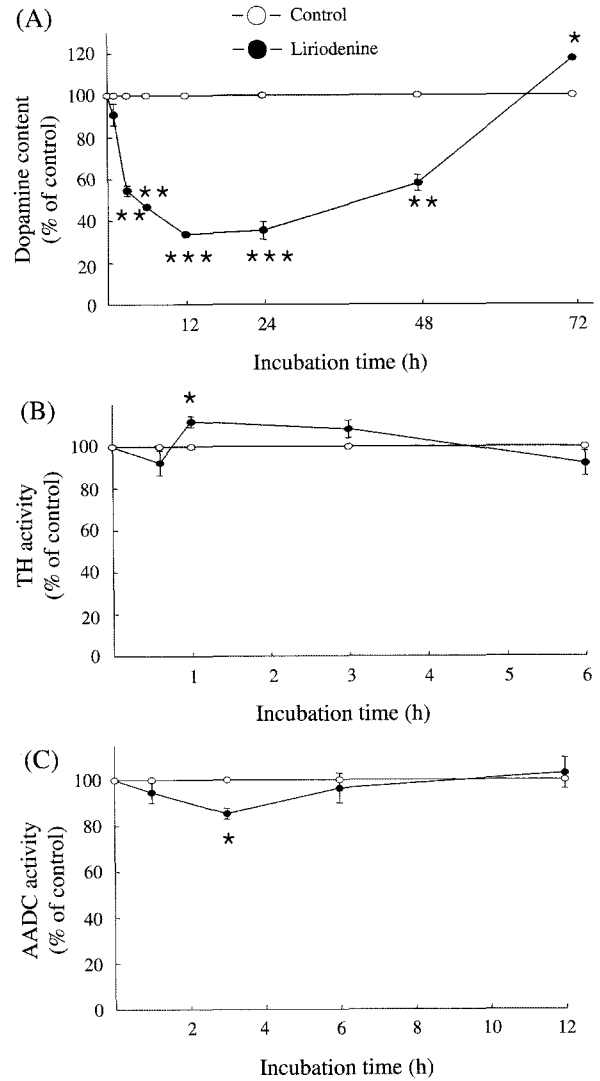


Fig. 3. Time courses of dopamine content (A), and the activities of tyrosine hydroxylase (TH) (B) and aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) (C) by liriodenine (10 µM) in PC12 cells. The control values of dopamine content, and the activities of TH and AADC were 3.68 ± 0.29 nmol/mg protein, and 3.95 ± 0.18 and 39.4 ± 3.67 nmol/min/mg protein. Results represent the mean \pm SEM of 5 dishes. Significantly different from the control value: *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$ (Student's *t*-test).

dopamine 함량 감소작용은 단시간(1 시간 이내)에는 TH 및 AADC 활성 감소작용에 기인하며, 장시간(3 시간 이후)에는 AADC 활성 감소작용에 기인한 것으로 사료된다. 그러나, liriodenine에 의한 dopamine 함량 감소작용과 TH 및 AADC 활성변화는 먼저 효소활성이 감소되며, 이어서 dopamine 함량 감소작용이 나타났기 때문에 경시적으로 일치하지 않았으며, 이에 대한 연구는 추후 진행되어야 할 것

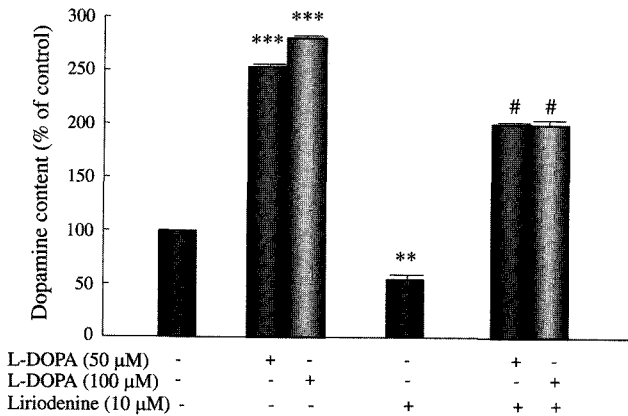


Fig. 4. Inhibitory effects of liriodenine on the increase in dopamine content induced by L-DOPA treatments in PC12 cells. PC12 cells were treated with liriodenine (10 μM) or L-DOPA (50 and 100 μM), alone or in combination, for 24 h. The control value of dopamine content was 3.60 ± 0.31 nmol/mg protein. Results represent the mean \pm SEM of 5 dishes. **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$ compared with control, #, $p < 0.05$ compared with the corresponding L-DOPA concentrations.

으로 사료된다. 또한, 이러한 dopamine 함량과 TH 및 AADC 활성과의 경시적 변화는 berberine,⁵⁾ palmatine,⁵⁾ hydrastine⁶⁾의 dopamine 함량 감소작용에서도 같은 양상으로 나타났다.

따라서, liriodenine과 bulbocapnine은 aporphine isoquinoline 계열 화합물이며, PC12 세포종의 dopamine 함량 감소작용을 나타내고 있으며, 이에 대한 작용기전으로서 bulbocapnine은 TH 활성 감소작용에 의한 것이며, liriodenine은 주로 AADC 활성 감소작용에 기인되는 것으로 사료된다. Bulbocapnine은 소부신 TH 활성의 저해작용을 나타내었으나,¹¹⁾ PC12 세포종의 AADC 활성 및 소부신 AADC 활성의 저해작용을 나타내지 않았다.⁷⁾

PC12 세포종에 L-DOPA(50–100 μM)을 전처리(24 시간)하면 세포내의 dopamine 함량은 현저히 증가한다(250–280%)(Fig. 4).¹⁸⁾ 이 경우, liriodenine(10 μM)을 L-DOPA(50–100 μM)와 병용 처리할 경우 PC12 세포내의 dopamine 함량은 대조군의 200–210%로 나타났으며, L-DOPA 단독 전처리 군과 비교하여 50–70%의 함량이 감소되어, 유의적으로 dopamine 함량 감소작용을 나타내고 있다(Fig. 4).

이 결과들로부터 liriodenine의 전처리는 부분적으로 PC12 세포종의 TH 및 AADC 활성을 저해하며, 이로 인하여 dopamine 생합성의 저해작용 및 L-DOPA 유도에 의한 dopamine 함량 증가의 저해작용을 나타내고 있는 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 2000년 한국학술진흥재단의 선도연구과제 연구비(과제번호: 2000-041-F00212)에 의하여 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

인용문헌

- Kim, Y. K. and Rhu, S. Y. (1999) Cytotoxic components from stem bark of *Magnolia ovobata*. *Planta Med.* **65**: 291-292.
- 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. Ferroff S.), 373. Academic Press. New York, NY.
- 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.
- Kim, S. H., Shin, J. S., Lee, J. J., Yin, S. Y., Kai, M. and Lee, M. K. (2001) Effects of hydrastine derivatives on dopamine biosynthesis in PC12 cells. *Planta Med.* **67**: 609-613.
- Shin, J. S., Kim, K. T. and Lee, M. K. (1998) Inhibitory effects of bulbocapnine on dopamine biosynthesis in PC12 cells. *Neurosci. 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. (1984) High-performance liquid chromatography of plasma catecholamines using 1,2-diphenylethylenediamine as precolumn fluorescence derivatization reagent. *J. Chromatogr.* **344**: 61-70.
- 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.

14. 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.
15. 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.
16. Chen, K. S., Ko, F. N., Teng, C. M. and Wu, Y. C. (1996) Antiplatelet and vasorelaxing actions of some aporphinoids. *Planta Med.* **62**: 133-136.
17. Chang, K. C., Su, M. J., Peng, Y. I., Shao, C. C., Wu, Y. C. and Tseng, Y. Z. (2001) Mechanical effects of liriodenine on the left ventricular-arterial coupling in water rats: pressure-stroke volume analysis. *Brit. J. Pharmacol.* **133**: 29-36.
18. Basma, A. N., Morris, E. J., Nicklas, W. J. and Geller, H. M. (1995) L-DOPA cytotoxicity to PC12 cells in culture is via its autoxidation. *J. Neurochem.* **64**: 825-832.

(2002년 11월 26일 접수)