

Chelidonine이 PC12 세포내의 L-DOPA-유도 세포독성에 미치는 영향

김유미 · 이재준 · 김춘매 · 양유정 · 강민희 · 이명구*
충북대학교 약학대학, 생물건강산업개발연구센터, 청주시 흥덕구 개신동 산48

Effects of Chelidonine on L-DOPA-Induced Cytotoxicity in PC12 Cells

Yu Mi Kim, Jae Joon Lee, Chun Mei Jin, Yoo Jung Yang, Min Hee Kang, and Myung Koo Lee*

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

Abstract – The effects of chelidonine, a benzophenanthridine isoquinoline alkaloid, on L-DOPA-induced cytotoxicity in PC12 cells were investigated. The treatment of PC12 cells with chelidonine (1–4 μM) decreased dopamine content in a dose-dependent manner (30.2% inhibition at 4 μM). Chelidonine was not cytotoxic up to 4 μM . However, chelidonine at concentrations higher than 5 μM caused a cytotoxicity in PC12 cells. L-DOPA at concentrations higher than 50 μM led to cell damage by oxidative stress in PC12 cells. Chelidonine at non-cytotoxic concentration ranges of 1–4 μM aggravated L-DOPA (20–50 μM)-induced cytotoxicity in PC12 cells. The L-DOPA-induced cytotoxicity was synergistically stimulated by chelidonine at concentrations greater than 5 μM . These data demonstrate that chelidonine exacerbates L-DOPA-induced cytotoxicity. Therefore, it is proposed that the long-term L-DOPA therapeutic patients with chelidonine may need to be checked for the adverse symptoms.

Key words – Chelidonine, L-DOPA-induced cytotoxicity, PC12 cells

Chelidonine은 benzophenanthridine isoquinoline 알칼로이드계 화합물로서(Fig. 1), 양귀비과(Papaveraceae)에 속하는 애기똥풀(*Chelidonium major* L.)의 뿌리부분의 주성분으로,¹⁾ 잇몸 염증을 감소시키는 항균 작용과 항염증 작용으로 인하여 치과 용품으로 사용되고 있다.^{2,3)}

한편 catecholamines는 dopamine, norepinephrine 및 epinephrine을 말하며, 일련의 생합성 과정에는 tyrosine hydroxylase (EC 1.14.16.2; TH), aromatic L-amino acid decarboxylase (EC 4.1.1.28; AADC), dopamine β -

hydroxylase (EC 1.14.17.1), phenylethanolamine N-methyltransferase (EC 2.1.1.28)가 관여하고 있다.⁴⁾ 이러한 catecholamines는 고혈압, 심장병 등의 순환기질환, 파킨슨씨 질환, 노인성 치매 등의 신경질환, 정신분열증, 우울증 등의 정신질환 등과 광범위한 관련이 있으며, ACTH, glucocorticoids 등과 함께 스트레스에 대한 생체방어에 중요한 신경전달물질 또는 호르몬이다.

이와 같은 catecholamine 연구에 필요한 PC12 세포는 rat의 부신 pheochromocytoma에서 유래한 세포주로서 catecholamines를 생합성, 저장, 분비하고, TH 및 AADC를 생합성하며,⁵⁾ 신경세포의 분화 및 chromaffin 세포의 기능, 학습-습관화 반응 등의 연구의 모델로도 이용되고 있다.⁶⁾

현재 파킨슨씨 질환 환자의 약물요법에는 L-DOPA 제제가 가장 많이 선택되고 있으며, 투여된 L-DOPA는 뇌중으로 이행하여 AADC에 의하여 dopamine으로 변환되어 약리작용을 나타내고 있다. 그러나 장기적인 L-DOPA 요법 파킨슨씨 질환 환자는 혈중 dopamine 함량이 증가하고, dopamine과 그 대사산물의 축합반응에 의하여 tetrahydropapaveroline, salsolinol 등의 isoquinoline 유도체가 생성되는데, 이 화합물들은 신경독성 작용을 포함하여 다양한 부정

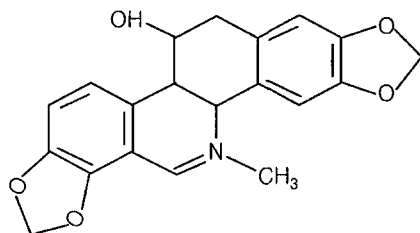


Fig. 1. Structure of chelidonine.

*교신저자(E-mail) : myklee@chungbuk.ac.kr
(FAX) : 043-276-2754

적인 생리활성을 일으키는 것으로 보고되고 있다.⁷⁾

Isoquinoline 화합물은 다양한 생리 활성을 나타내고 있으며, 그 중에서도 catecholamine 생합성의 조절작용이 보고되고 있다. 즉 isoquinoline 화합물인 berberine, palmatine, coralyne, hydrastine 및 bulbocapnine은 PC12 세포내의 dopamine 함량을 감소시키고 catecholamine 생합성 효소인 TH의 활성 저해작용이 있음이 보고되었다.⁸⁻¹⁰⁾

따라서, 본 연구에서는 퇴행성 중추신경계 질환과 생리 활성물질과의 약물 상호작용에 미치는 영향을 검색하기 위하여 isoquinoline 화합물인 chelidone를 선택하여 L-DOPA 유도 신경독성 작용에 미치는 영향에 대하여 검토하였다.

재료 및 방법

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

PC12 세포의 배양 및 chelidone의 전처리 - PC12 세포의 배양은 상법에 준하였다.^{5,6)} 배지는 10% HS, 5% FBS 및 penicillin/streptomycin을 포함한 RPMI 1640을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 100 mm culture flask를 사용하여 배양하였다. PC12 세포 (cell density: 2-5×10⁴ cells/cm²)를 48시간 배양한 다음, 이 세포(1×10⁵ cells/cm²)에 chelidone (1-10 μM)를 가하고 48시간 배양하였다. 상등액을 경사하여 얻은 pellet는 -70°C에서 보관하며 dopamine 함량 측정 시료로 사용하였다.

Dopamine 함량 측정 - PC12 세포 및 배지중의 dopamine 함량의 측정은 Mitsui 등¹¹⁾ 및 Lee 등¹²⁾의 방법을 보정하여 사용하였다. 각 시료용액에 1 M perchloric acid 300 μl 및 0.2 nmol/ml isoproterenol (내부표준) 100 μl을 가한 다음 원심분리 하였다. 상등액을 Toyopak IC-SP M cartridge (Na⁺ form, Toso, Tokyo, Japan)를 사용하여 전처리하고, 용출액에 1,2-diphenylethylenediamine을 가하여 형광유도체화 반응을 시킨 다음, 최종 반응액 100 μl을 HPLC-형광검출(Toso)에 주입하였다. HPLC의 조건은 Lee 등¹²⁾의 방법에 준하여 사용하였다.

L-DOPA 유도 세포독성 측정 - 세포독성은 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 시약을 이용하여 세포생존율(cell viability)을 측정하는 Mosmann

방법을 변형하여 사용하였다.¹³⁾ PC12 세포(1×10⁵ cells/cm²)를 96 well microplate에 넣은 후 48시간 배양한 다음, 새로운 배지로 바꾸어 주고, 이 세포에 chelidone (1-5 μM) 및 L-DOPA (20, 50 μM)를 단독 처리하거나 혹은 농도별로 조합하여 병용 처리한 다음 48시간 배양하였다. 세포 배양 후 MTT 시약(5 mg/ml)을 가한 후 푸른색의 formazan이 용출 되도록 하여 용출액의 흡광도를 microplate reader (Molecular devices, Spectra Max plus, USA)를 사용하여 570 nm에서 측정하였다.

단백질 함량 측정 및 결과정리 - 각 항의 생리활성은 각각의 시료중의 단백질 함량을 측정하여 보정하였다. 단백질 함량은 소혈청 albumin을 사용한 Lowry 법¹⁴⁾에 의하여 측정하였다. 실험결과는 mean±SEM으로 표시하였으며 유의성 검정은 student's *t*-test에 의하여 계산하여 *p*<0.05인 경우 유의차가 있는 것으로 처리하였다.

결과 및 고찰

Isoquinoline계 화합물인 chelidone은 항균 작용, 항염증 작용, 항바이러스 작용 및 종양 표적 활성 작용이 보고되었다.^{2,3)} 저자들은 수종의 isoquinoline 화합물의 dopamine 생합성 조절작용에 대하여 검토하였으며,⁸⁻¹⁰⁾ 본 연구에서는 chelidone을 사용하여 PC12 세포내의 dopamine 함량 및 L-DOPA 유도 세포독성에 미치는 영향에 대하여 검토하였다.

PC12 세포에 chelidone을 1-4 μM 농도로 48시간 전처리를 시행하면 dopamine 함량은 대조군에 비하여 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 2). Chelidone을 PC12 세포에

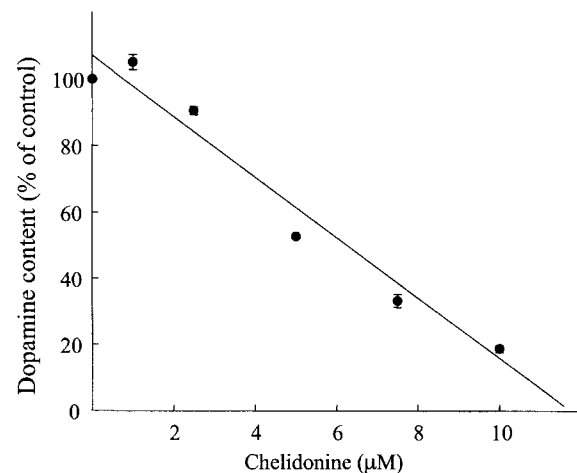


Fig. 2. Inhibitory effects of chelidone on dopamine content in PC12 cells. Experimental details are described in Material and Methods. The control value of dopamine content was 3.56±0.25 nmol/mg protein. Results represent the mean±SEM of 5 dishes.

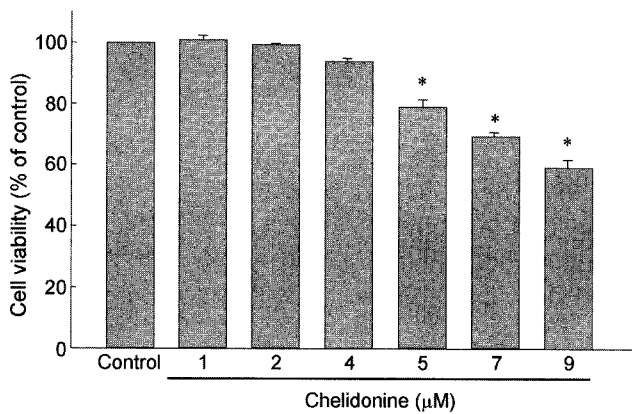


Fig. 3. Effects of chelidone on PC12 cell viability. Experimental details are described in Material and Methods. The results represent the mean±SEM of three experiments. *: $p < 0.05$ compared with the control.

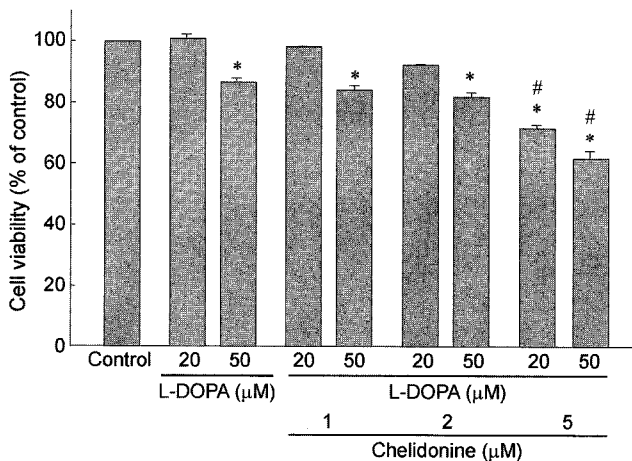


Fig. 4. Effects of chelidone on L-DOPA-induced decrease of cell viability in PC12 cells. The results represent the mean±SEM of five experiments performed in triplicate. *: $p < 0.05$ compared with the control; #: $p < 0.05$ compared with the corresponding L-DOPA concentrations.

48시간 전처리하여 나타난 세포 독성작용에 미치는 영향을 MTT assay를 통해 검토한 결과, 전처리 농도 4 µM까지 세포독성을 나타내지 않았으나 chelidone 5 µM 이상에서는 세포독성을 유발하였다(Fig. 3).

장기적인 L-DOPA 요법 파킨슨씨 질환 환자는 dopamine 함량이 증가하며, dopamine과 그의 대사산물의 축합반응에 의하여 tetrahydropapaveroline과 salsolinol 등의 isoquinoline 유도체가 생성되며, L-DOPA, dopamine 및 isoquinoline 유도체들의 신경독성 작용에 대하여 보고되고 있다.¹⁵⁻¹⁸⁾ Migheli 등에 의하면 L-DOPA를 PC12 세포중에 처리하였을 경우 oxidative stress에 의하여 세포독성을 나타낸다고 알려져 있다.¹⁹⁾ 따라서, chelidone이 나타내는 PC12 세포내 L-DOPA 유도 세포독성작용에 대한 영향을 검토하였다.

L-DOPA를 20 µM 농도로 48시간 전처리하면 PC12 세포의 생존율에 영향을 미치지 않았으나, 50 µM 이상에서는 15.0%의 현저한 세포독성을 나타내었다(Fig. 4). 아울러 PC12 세포내에 chelidone을 비독성 농도 범위인 1-2 µM (Fig. 3), 그리고 L-DOPA를 20-50 µM로 각각 병용 처리시 L-DOPA 유도 세포독성 작용에 대하여 2.5%-8.8%의 증가 작용을 나타내었으며(Fig. 4), 독성 농도인 chelidone 5 µM 농도와 L-DOPA (20-50 µM)와의 병용 처리시는 chelidone은 L-DOPA 유도 세포독성 작용에 대하여 현저한 21.2%-24.4%의 증가 작용을 나타내었다. 그리고 이러한 chelidone의 세포독성 작용은 다수의 isoquinoline 화합물인 tetrahydropapaveroline, salsolinol 등에서 나타난 것처럼 apoptosis에 의한 것으로 사료된다. 반면, chelidone의 analogue인 sanguinarine은 PC12 세포내 dopamine 함량 감소작용은 나타내지 않았으나, L-DOPA 유도 신경독성 작용을 나타내었다.²⁰⁾

다양한 isoquinoline 화합물 중에서 berberine, palmatine, bulbocapnine, hydrastine 등은 PC12 세포내의 dopamine 함량 감소작용을 나타내고 있으며, 소부신의 TH에 대하여 기질 L-tyrosine을 이용한 효소 화학적인 연구에서도 berberine, palmatine 및 hydrastine은 상경적 저해작용²¹⁻²³⁾을, bulbocapnine은 비상경적 저해작용²⁴⁾을 나타내고 있음이 보고되었다. 저자들에 의하여 이 화합물들은 PC12 세포내의 L-DOPA 유도 세포독성 작용에 대한 증가작용을 나타내고 있음을 밝혔다(data not shown).

이 결과들로부터, PC12 세포내에 chelidone의 전처치는 dopamine 함량을 감소시키며, L-DOPA 유도에 의한 신경독성 작용을 증가시킬 수 있는 것으로 사료된다. 따라서, chelidone을 포함한 isoquinoline 계열 화합물은 용량 의존적으로 신경독성 작용이 있을 가능성이 높으며, L-DOPA 요법과 관련한 환자의 약물상호작용 연구가 지속되어야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 생물건강산업개발연구센터(RRC)의 연구비 지원으로 의하여 수행되었으며, 이에 감사 드립니다.

인용문헌

- Shamma, M. and Guinaudeau, H. (1986) Aporphinoid alkaloids. *Nat. Prod. Rep.* 3: 345-351.
- Kuftinec, M. M., Mueller-Joseph, L. J., and Koczyk, R. A. (1990) Sanguinaria toothpaste and oral rinse regimen clinical

- efficacy in short- and long-term trials. *J. Can. Dent. Assoc.* **56**: 31-33.
3. Laster, L. L. and Lobene, R. R. (1990) New perspectives on Sanguinaria clinicals: individual toothpaste and oral rinse testing. *J. Can. Dent. Assoc.* **56**: 19-30.
 4. Nagatsu, T., Levitt, M., and Udenfriend, S. (1964) Tyrosine hydroxylase. The initial step in norepinephrine biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **239**: 2910-2917.
 5. 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.
 6. 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, NY.
 7. Shier, W. T., Rossier, J., Koda, L. Y., and Bloom, F. E. (1990) Tetrahydropapaveroline inhibits dopamine uptake in rat brain synaptosomes. *Adv. Exper. Med. Biol.* **132**: 807-812.
 8. 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.
 9. 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.
 10. 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.
 11. 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.
 12. 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.
 13. Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular-growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* **65**: 55-63.
 14. 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.
 15. McNaught, K. P., Carrupt, P. A., Altmore, C., Cellamare, S., Carotti, A., Testa, B., Jenner, P., and Marsden, C. D. (1998) Isoquinoline derivatives as endogenous neurotoxins in the aetiology of Parkinsons disease. *Biochem. Pharmacol.* **56**: 921-933.
 16. Lee, J. J., Kim, Y. M., Yin, S. Y., Park, H. D., Kang, M. H., Hong, J. T., and Lee, M. K. (2003) Tetrahydropapaveroline Aggravates L-DOPA-Induced Neurotoxicity in PC12 Cells. *Biochem. Pharmacol. in press.*
 17. Jung, Y. J. and Surh, Y. J. (2001) Oxidative DNA damage and cytotoxicity induced by copper-stimulated redox cycling of salsolinol, A neurotoxic tetrahydroisoquinoline alkaloid. *Free Rad. Biol. Med.* **30**: 1407-1417.
 18. Dorit, B. S., Roza, Z., and Yelena, G. (1995) Dopamine neurotoxicity: Inhibition of mitochondrial respiration. *J. Neurochem.* **64**: 718-723.
 19. Migheli, R., Godani, C., Bciola, L., Delodu, M. R., Serra, P. A., Zangani, D., Natale, G. D., Miele, E., and Desole, M. S. (1999) Enhancing effect of manganese on L-DOPA-induced apoptosis in PC12 cells: role of oxidative stress. *J. Neurochem.* **73**: 1155-1163.
 20. Yin, S. Y., Kim, Y. M., Lee, J. J., and Lee, M. K. (2002) Effects of sanguinarine on L-DOPA-induced neurotoxicity in PC12 cells. *J. Pharm. Sci. (CUBU)*. **17**: 41-45.
 21. Lee, M. K. and Zhang, Y. H. (1996) Inhibition of tyrosine hydroxylase by berberine. *Med. Sci. Res.* **24**: 561-562.
 22. Lee, M. K., Zhang, Y. H., and Kim, H. S. (1996) Inhibition of tyrosine hydroxylase by palmatine. *Arch. Pharm. Res.* **19**: 258-260.
 23. 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.
 24. 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.

(2003년 8월 2일 접수)