

Tetrahydropapaveroline의 PC12 세포내 Dopamine 생합성 저해작용

이재준 · 김유미 · 김미나 · 이명구[#]

충북대학교 약학대학

(Received January 26, 2005; Revised March 2, 2005)

Inhibitory Effects of Tetrahydropapaveroline on Dopamine Biosynthesis in PC12 Cells

Jae Joon Lee, Yu Mi Kim, Mi Na Kim and Myung Koo Lee[#]

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

Abstract — Tetrahydropapaveroline (THP) at 5~15 μM has been found to induce L-DOPA-induced oxidative apoptosis in PC12 cells. In this study, the inhibitory effects of THP on dopamine biosynthesis in PC12 cells and tyrosine hydroxylase (TH) activity in bovine adrenal were investigated. Treatment of PC12 cells with THP at 2.5~10 μM significantly decreased the intracellular dopamine content in a concentration-dependent manner (18.3% inhibition at 10 μM THP). In these conditions, TH activity was markedly inhibited by the treatment with THP at 2.5~10 μM in PC12 cells (23.4% inhibition at 10 μM THP). In addition, THP had an inhibitory effect on bovine adrenal TH activity (IC_{50} value, 153.9 μM). THP exhibited uncompetitive inhibition on bovine adrenal TH activity with a substrate L-tyrosine with the K_i value of 0.30 mM. Treatment with L-DOPA at 20~50 μM increased the intracellular dopamine content in PC12 cells, and the increase in dopamine content by L-DOPA was inhibited in part when THP at non-cytotoxic (5~10 μM) or cytotoxic (15 μM) concentrations was associated with L-DOPA (20 and 50 μM) for 24 h incubation. These results suggest that THP at 5~10 μM decreases the basal dopamine content and reduces the increased dopamine content induced by L-DOPA in part by the inhibition of TH activity, and that THP at 15 μM also decreases dopamine content by oxidative stress in PC12 cells.

Keywords □ tetrahydropapaveroline, dopamine, tyrosine hydroxylase, PC12 cells, bovine adrenal

파킨슨씨 질환은 선조체-흑질(striatum-substantia nigra)의 dopamine 신경계가 퇴행되어 dopamine의 결핍으로 발생하며, 약물요법에는 dopamine 보충제/L-DOPA 제제, dopamine 분비 촉진제, dopamine 대사효소 저해제, dopamine 수용체 자극제, 항콜린 제제 등으로 나뉘어 환자의 증상에 따라 조합하여 사용되고 있다.¹⁾ 이 중에서 L-DOPA 제제가 가장 많이 선택되고 있으며, 투여된 L-DOPA는 뇌중으로 이행하여 탈탄산효소(aromatic L-amino acid decarboxylase: EC 4.1.1.28; AADC)에 의하여 dopamine으로 변환되어 약리작용을 나타내고 있다.^{2,3)} Dopamine은 monoamine oxidase(EC 1.4.3.4; MAO) 및 catechol O-methyltransferase에 의하여 불활성화 된다.^{1,3)} 장기적인 L-DOPA 요법 파킨슨씨 질환 환자는 dopamine 함량이 증가하며, dopamine의 축합반응에 의하여 isoquinoline 유도체가 생성되

고 있다.³⁾

Tetrahydropapaveroline(THP)는 isoquinoline 유도체인 tetrahydroisoquinoline(TIQ) 계열 화합물로서 dopamine과 그의 대사체인 aldehyde와의 축합반응(Pictet-Spengler type)에 의하여 생성되며,⁴⁾ L-DOPA 요법 파킨슨씨 질환 및 알코올 중독 환자의 뇌 및 혈중에서 발견되고 있다.⁵⁾ TIQs 화합물은 각종 음식에도 존재하고, 뇌-혈액관문(blood-brain barrier)을 쉽게 통과하므로 뇌중의 TIQs는 뇌중에서 직접 합성될 수도 있고 음식으로부터 공급될 수 있으며, 주로 간에서 debrisoquine hydroxylase(CYP 2D6)에 의해 대사되기 때문에, CYP 2D6 활성이 저해된 경우 뇌중에 TIQs가 축적되어 파킨슨씨 증후군을 일으킬 수 있다.⁶⁾

TIQs는 catecholamine 생합성 과정의 율속단계(rate-limiting) 효소인 tyrosine hydroxylase(EC 1.14.16.2; TH) 활성을 저해하여 catecholamine 생합성을 저해하며,⁵⁾ TH에 대한 TIQs의 활성 저해작용은 TIQs의 신경독성과 관련 가능성이 높다. 최근 isoquinoline 알칼로이드 화합물인 berberine, palmatine, bulbocapnine, higenamine, hydrastine 등은 PC12 세포중의 dopamine

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 043-261-2822 (팩스) 043-276-2754
(E-mail) myklee@chungbuk.ac.kr

합량의 감소작용과 catecholamine 생합성 효소 TH의 활성 저해 작용이 있음이 보고 되었다.⁷⁻¹⁰ 또한 소부신(bovine adrenal)의 TH에 대하여 기질 L-tyrosine을 이용한 효소화학적 연구에서 berberine, palmatine 및 hydrastine은 상경적(competitive) 저해작용¹¹⁻¹³을, bulbocapnine은 부상경적(uncompetitive) 저해작용¹⁴을 나타내고 있음이 보고 되었다. 일부 TIQs 화합물은 MAO 저해제이며 기질로 작용하고 있다.¹⁵ 따라서 TIQs를 포함한 isoquinoline 화합물은 catecholamine 생합성 조절작용을 나타내고 있음을 의미하고 있다.

THP는 P815 세포종의 tryptophan hydroxylase 활성을 저해하여 serotonin 함량 감소작용을 나타내며,¹⁶ tryptophan hydroxylase에 대하여 부상경적(uncompetitive) 저해작용을 나타내고 있다.¹⁶ 또한 THP는 PC12 세포 중의 L-DOPA-유도 세포독성에 대한 상승작용을 나타내고 있음이 밝혀졌다.¹⁷ 그러므로 THP는 dopamine 생합성 저해작용을 나타낼 가능성이 있으나, 이에 대한 기초적인 연구는 진행되지 않고 있다.

PC12 세포는 흰쥐 부신(rat adrenal) pheochromocytoma에서 유래한 세포주이며, catecholamines를 생합성, 저장, 유리하며 TH, AADC 등의 catecholamine 생합성 효소를 함유하고 있다.¹⁸ 따라서 PC12 세포는 catecholamines의 기능 및 그의 생합성 효소의 조절작용, 신경세포의 분화 및 chromaffin 세포의 기능, 학습-습관화 반응(learning-habituation) 등의 연구의 모델로 이용되고 있다.¹⁹

본 연구에서는 PC12 세포를 사용하여 THP가 dopamine 생합성 과정에 미치는 영향 및 L-DOPA-유도 dopamine 함량 증가작용에 미치는 영향에 대하여 검토하였으며, 또한 THP의 소부신 TH 활성에 미치는 효소 화학적 작용에 대하여 검토하였다.

실험 방법

실험재료

세포배양용 donor horse serum(HS), fetal bovine serum(FBS), 항생제(penicillin/streptomycin) 및 배지(RPMI 1640)는 GIBCO(Grand Island, NY, 미국), (±)-THP hydrobromide, DL-6-methyl-5,6,7,8-tetrahydropterin, catalase, alumina, isoproterenol 및 3,4-dihydroxybenzylamine은 Sigma사(St Louis, MO, 미국)로부터 구입하였다. 그 밖의 시약은 특급 및 HPLC용 등급을 사용하였다.

세포배양

PC12 세포의 배양은 상법에 준하였다.^{18,19} 세포배양은 10% HS 및 5% FBS, 100 unit/ml penicillin과 100 µg/ml streptomycin을 포함한 RPMI 1640 배양액을 사용하여 조직배양용 dish 상에서 배양하였다. 세포배양은 37°C에서 수증기 포화된(95%) 5%

CO₂ 배양기를 사용하였다. PC12 세포(cell density ca. 1×10⁵ cells/cm²)를 48시간 배양한 다음, THP 또는 L-DOPA 화합물을 가한 다음 24~48시간 배양하였다. 배양 후 세포를 원심 분리하여 pellet를 얻고 측정시료로 사용하였다.

PC12 세포 중의 dopamine 함량 측정

Dopamine 함량은 Mitsui 등²⁰ 및 Lee 등의 방법⁶에 준하여 사용하였다. 시료(200~300 µl)에 trichloroacetic acid(3.0 M, 100 µl) 및 isoproterenol(1 nmol/ml, 100 µl, 내부표준)을 가한 다음 원심 분리하였다. 상등액을 Toyopak SP 카트리지(Toso, Tokyo, Japan)를 사용하여 전처리한 후, 흡착된 monoamine은 0.6 M KCl-CH₃CN(1 : 1, v/v) 혼합액 2 ml를 사용하여 용출시킨다. 용출액에 DPE 시약을 가하여 형광 유도체화한 다음 최종 반응액을 HPLC를 사용하여 dopamine 함량을 측정하였다. HPLC의 조건 : column, TSK gel ODS 120T(5 µm, 0.45×15 cm, Toso, Tokyo); 이동상, acetonitrile-methanol-0.1 M NaOAc 완충액(pH 5.0)(50 : 5 : 45, v/v); 유속, 1 ml/min; 검출기, F1000 형광검출기(Ex. 350 nm, Em. 475 nm, Hitachi, Tokyo).

PC12 세포 중의 TH 및 AADC 활성 측정

PC12 세포 중의 TH 활성 측정은 Nagatsu 등의 방법²¹에 준하여 측정하였다. 효소반응액은 NaOAc 완충액(pH 5.8, 1.5 M, 80 µl), L-tyrosine(5.0 mM, 25 µl), DL-6-methyl-5,6,7,8-tetrahydropterin(10 mM, 25 µl), catalase(2 mg/ml, 50 µl), 및 효소시료이며, 37°C 10 분간 효소반응 후, alumina 카트리지를 사용하여 전처리한 다음 흡착된 반응 생성물은 HCl(0.5 M, 300 µl)를 사용하여 용출시킨다. 용출액 100 µl를 HPLC에 주입하여 L-DOPA의 농도를 정량하여 효소활성을 측정하였다. 또한, AADC 활성은 기질 L-DOPA를 사용하여 효소반응을 진행한 다음, 생성된 dopamine 함량을 정량하여 측정하였다.^{7,10} HPLC의 조건 : column, TSK-gel ODS 120T(5 µm, 0.45×15 cm, Toso); 이동상, 0.1 M K-PO₄ 완충액(pH 3.1)-1% methanol; 유속, 1 ml/min; 검출기, CM8010 전기화학검출기(0.8 V, Ag/AgCl 전극, Toso).

소부신(bovine adrenal) TH 부분정제 및 활성 측정

소부신 TH는 Joh 등의 방법²²에 준하여 부분 정제하였다. 소부신(약 50 g)을 K-PO₄ 완충액(pH 7.0, 5 mM, 150 ml)을 가하여 균질화하고 거즈를 사용하여 여과한 다음 원심 분리하였다(40,000×g, 1 h). 상등액을 경사한 후 침전물에 Na-PO₄ 완충액(10 mM, pH 7.0)에 용해시킨다. 이 용액에 trypsin(5 mg/ml/100 ml)을 가한 다음 30°C에서 15분 동안 반응시킨 후 trypsin 저해제(10 mg/ml/100 ml, Soybean type IS, Sigma)를 가하여 반응을 중지시킨 다음, 원심 분리하였다(100,000×g, 1 h). 상등액에 포

화 ammonium sulfate을 가한다음(80%) 원심 분리하고, 침전물을 투석하여(5 mM K-PO₄ 완충액, pH 6.5) 효소시료로 사용하였다. TH 활성은 상기의 방법²¹⁾에 준하여 측정하였으며, 기질 L-tyrosine에 대한 K_m, V_{max} 값은 Lineweaver-Burk 법에 의하여 계산하였다.

단백질 함량 측정 및 결과정리

각 항의 생리활성은 각각의 시료중의 단백질 함량을 측정하여 보정하였으며, 단백질 함량은 소혈청 albumin을 사용한 Lowry 법²³⁾에 의하여 측정하였다. 실험결과는 means±SEM으로 표시하였으며 유의성 검정은 Tukey's test에 의한 ANOVA법에 의하여 계산하였다.

실험결과 및 고찰

PC12 세포를 사용하여 THP가 dopamine 함량변화에 미치는 영향을 검토한 결과를 Fig. 1A에 나타내었다. THP의 농도 2.5~10 μM 범위에서 PC12 세포 중에 24시간 전처치하였을 경우 세포내의 dopamine 함량은 농도 의존적으로 감소하였다(THP 10 μM에서 18.3%의 dopamine 함량 감소작용을 나타냄). THP 농도 10 μM 범위까지는 PC12 세포에 대한 세포독성은 인정되지 않았다. PC12 세포내에서 합성된 dopamine의 일부는 배지 중으로 분비되지만, THP 전처치는 배지 중으로의 dopamine의 분비 작용에는 영향을 주지 않았다(자료 미제시). 또한 PC12 세포중의 TH(L-tyrosine에서 L-DOPA 생합성 촉매 효소) 및 AADC(L-DOPA에서 dopamine 생합성 촉매 효소) 활성에 미치는 영향을 검토하였다. TH 활성은 THP 전처치에 의하여 유의적으로 저해되었다(THP 10 μM에서 대조군에 비하여 23.4% TH 활성 저해)(Fig. 1B). 그러나 THP의 전처치는 AADC 활성(대조군의 AADC 활성 37.2±3.57 nmol/min/mg protein, THP 전처치군의 AADC 활성 35.4±2.98 nmol/min/mg protein, n=5)에는 영향을 주지 않았다.

THP는 TIQ 화합물 유도체이며, TIQs 화합물을 포함한 isoquinoline 계열 화합물은 dopamine 생합성 조절작용을 나타내고 있는 것으로 보고 되었다.⁷⁻¹⁰⁾ 이 결과들에 의하면, protoberberine 화합물, fangchinoline, bulbocapnine, noscaphine, hydrastine 등은 PC12 세포 중의 dopamine 생합성 저해작용을 가지고 있으며, 이중 berberine 및 hydrastine의 IC₅₀ 값은 각각 18.6 μM 및 9.3 μM을 나타내어 THP 보다 약간 강한 dopamine 생합성 저해작용을 나타내었고, 이러한 PC12 세포내 dopamine 함량 감소작용은 isoquinoline 화합물에 의한 TH 활성 저해작용이 부분적으로 관여하고 있으며, AADC 활성은 관여하고 있지 않음이 밝혀졌다.

다음으로, THP가 TH 활성 저해작용에 미치는 효소화학적인

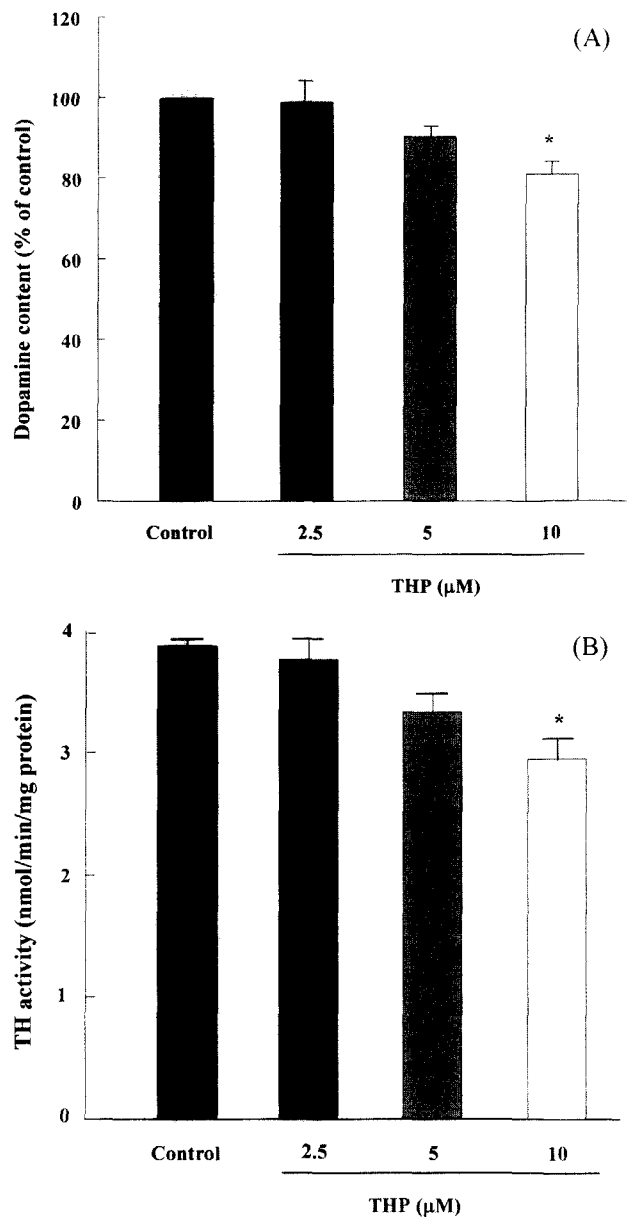


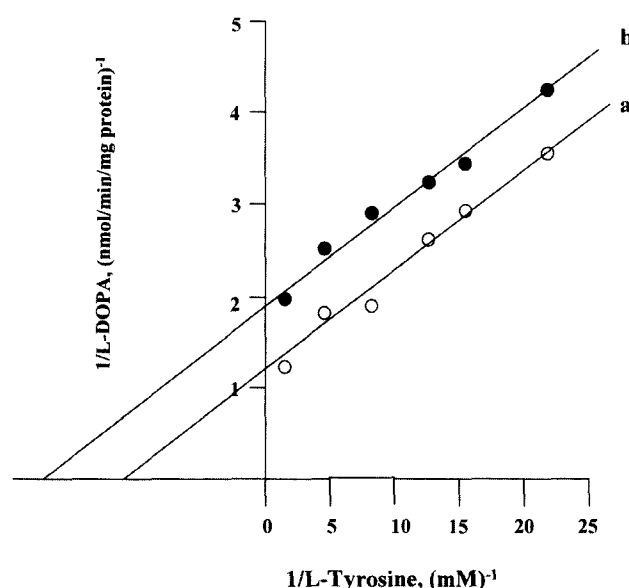
Fig. 1 - Inhibitory effects of tetrahydropapaveroline (THP) on the intracellular dopamine content (A) and tyrosine hydroxylase (TH) activity (B) in PC12 cells. PC12 cells were treated with THP (2.5~10 μM) and incubated at 37°C for 24 h. PC12 cells were harvested with phosphate buffered saline and dopamine content was measured by an HPLC method. Dopamine content and TH activity of the control were 3.43±0.25 nmol/min/mg protein and 3.87±0.29 nmol/min/mg protein, respectively. Results represent the means±SEM of 4~5 dishes. Significantly different from the control value: *, p<0.05 (ANOVA followed by Tukey's test).

검토를 진행하였다. TH 효소원은 정제 수율 및 효소활성을 고려하여 소부신(bovine adrenal)을 부분 정제하여 사용하였으며, 부분 정제한 소부신 TH 활성은 1.10±0.14 nmol/min/mg protein

Table I – Inhibitory effects of tetrahydropapaveroline (THP) on bovine adrenal tyrosine hydroxylase (TH) activity

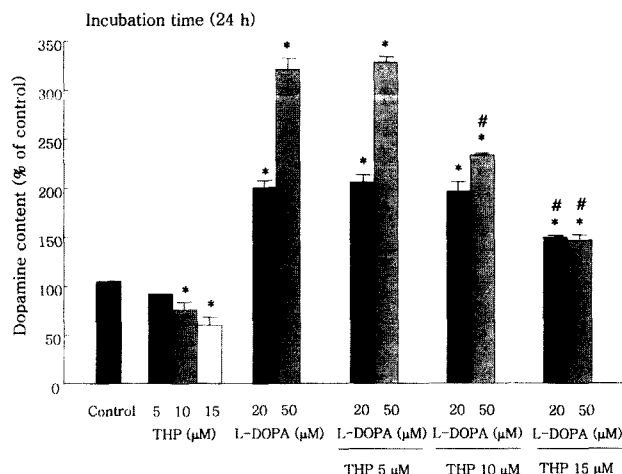
		TH activity (nmol/min/mg protein) (% of control)	IC ₅₀ value (μ M)
Control		1.10 \pm 0.14 (100)	
THP	50 μ M	0.81 \pm 0.11 (73.6)	153.9
	100 μ M	0.70 \pm 0.05 (63.6)*	
	200 μ M	0.44 \pm 0.08 (40.0)**	
Berberine	200 μ M	0.68 \pm 0.07 (61.8)*	

The control of TH activity, 1.10 nmol/min/mg protein, was taken as 100. The data were expressed as means \pm SEM of 4~5 experiments. Berberine was used as a positive control (Ref. 11). Significantly different from the control value: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ (ANOVA followed by Tukey's test).

**Fig. 2** – Inhibition of bovine adrenal TH by THP added in the enzyme reaction mixture. The data were plotted by linear regression analysis. THP concentration: (a), 0 μ M; (b), 200 μ M.

으로 조정하여 사용하였다(Table I). THP는 소부신 TH 활성을 농도 의존적으로 저해하였다. THP(100 μ M)는 기질 L-tyrosine을 사용하여 36.4%의 TH 활성 저해작용을 나타내었으며, IC₅₀ 값은 153.9 μ M 이었다(Table I). L-Tyrosine을 사용한 경우 소부신 TH의 K_m 및 V_{max}의 값은 각각 97.8 μ M 및 0.90 nmol/min/mg protein 이었다(n=5, Fig. 2). Lineweaver-Burk 방법에 의하면, THP는 기질 L-tyrosine에 대하여 부상경적 저해작용(uncompetitive inhibition)을 나타내었으며, K_i 값은 0.30 mM 이었다(Fig. 2).

THP는 serotonin 생합성 효소인 tryptophan hydroxylase 활성에 대하여도 농도 의존적인 저해작용을 나타내었으며, 기질 tryptophan에 대하여 부상경적(uncompetitive) 저해작용을 나타내었다.¹⁶⁾ 또한 소부신 TH에 대하여 기질 L-tyrosine을 이용한

**Fig. 3** – Inhibitory effects of THP on the increase in dopamine content induced by L-DOPA in PC12 cells after 24 h. PC12 cells were incubated in the absence or presence of L-DOPA (20 and 50 μ M) for 24 h. Dopamine content of the control was 3.53 \pm 0.28 nmol/min/mg protein. Results represent the means \pm SEM of 4~5 dishes. *, $p < 0.05$ compared with the control; #, $p < 0.05$ compared with the corresponding L-DOPA concentrations (ANOVA followed by Tukey's test).

효소화학적 연구에 의하면 berberine, palmatine 및 hydrastine은 상경적(competitive) 저해작용¹¹⁻¹³⁾을, bulbocapnine은 부상경적(uncompetitive) 저해작용¹⁴⁾을 나타내고 있으며, methyl-TIQ, salsolinol(THP의 analogue), methylisoquinoline 등은 MAO 활성 저해작용¹⁵⁾을 나타내고 있다. 이 결과들은 isoquinoline 화합물의 구조에 따라 효소화학적 저해작용의 양상이 다르게 나타나고 있음을 의미하며, THP를 포함한 일부 isoquinoline 생리활성 물질은 catecholamine 생합성의 조절작용이 있음을 나타내는 것으로 사료된다.

따라서 THP에 의한 PC12 세포 중의 dopamine 함량 감소작용은 부분적으로 TH 활성의 저해작용에 의한 것으로 사료된다.

THP는 dopamine과 그의 aldehyde-대사체 화합물(3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde)과의 축합에 의하여 생성되며, L-DOPA 요법 파킨슨 환자의 혈액 및 뇨 중에서 검출되고 있다.^{4,5)} 또한 L-DOPA(20~50 μ M)를 PC12 세포 중에 24시간 전처리하면 세포내 dopamine 함량은 190~330% 증가하며(Fig. 3), L-DOPA 150 μ M 이상의 농도에서는 산화적 스트레스(oxidative stress)에 의하여 세포사(apoptosis)를 유도하고 있음이 보고 되었다.^{17,24)} 이와 같은 L-DOPA-유도 dopamine 증가작용 및 세포독성 작용을 응용하여 PC12 세포는 중추 퇴행성 질환의 연구모델로 이용되고 있다.

그러므로 장기간 L-DOPA 요법으로 생성된 THP가 L-DOPA-유도 dopamine 함량 증가작용에 미치는 영향에 대하여 검토하였다. PC12 세포에 비독성 농도범위인 THP 5~10 μ M의 24 시

간 전처치는 L-DOPA(20~50 μM)-유도 dopamine 함량 증가작용을 농도 의존적으로 저해하였으며(Fig. 3), 세포 독성작용을 나타내는 농도인 15 μM THP의 24시간 전처치에 의해서도 L-DOPA-유도 dopamine 함량 증가는 유의적으로 감소되었다(Fig. 3). 또한 THP 5~10 μM 의 48시간 전처치에서도 24시간 전처치의 경우와 동일한 양상으로 L-DOPA(20~50 μM)-유도 dopamine 함량 증가는 저해되었으며(자료 미제시), 따라서 THP의 dopamine 생합성 저해작용은 THP의 농도 및 전처치 시간에 의존하여 비례적으로 나타났다.

PC12 세포에 대한 L-DOPA의 세포독성 작용은 THP 전처치에 의하여 상승작용을 나타내고 있음이 밝혀졌다.¹⁷⁾ PC12 세포 중에 비독성 농도 범위(20~50 μM)의 L-DOPA와 비독성 농도(10 μM)의 THP의 병용투여는 세포독성 작용을 나타내어 세포사(apoptosis)를 유도하였으며, L-DOPA 세포독성 농도 범위(100~150 μM)에서는 THP(5~15 μM)와의 병용 전처치에 의하여 L-DOPA의 세포독성 작용은 상승작용을 나타내었고, 이러한 THP의 세포독성 상승작용은 N-acetyl-L-cysteine(0.1 mM)의 전처치에 의하여 억제되고 있음이 보고 되었다.¹⁷⁾ 또한 THP는 미토콘드리아 complex I 및 α -ketoglutarate dehydrogenase 활성을 저해하며,²⁵⁾ 이는 reactive oxygen species(ROS) 생성 유도에 기인한 것임을 보고하고 있다.²⁶⁾ 그러므로 THP 단독에 의한 세포독성 작용 및 THP와 L-DOPA의 병용투여에 의한 세포독성 유도작용은 산화적 스트레스(oxidative stress)를 매개로 하고 있음을 제시하고 있다.

따라서 THP에 의한 ROS의 생성이 PC12 세포에 독성 작용을 유도하고, 이러한 THP의 독성작용이 PC12 세포 중의 dopamine 생합성에도 영향을 주어 dopamine 함량 감소작용을 나타내고 있을 것으로 사료된다.

이상의 결과에 종합하여 보면, THP는 비독성의 저농도(2.5~10 μM)에서 PC12 세포 중의 세포내 dopamine 함량 감소작용 및 L-DOPA-유도 dopamine 함량 증가작용에 대한 저해작용을 나타내며, 이는 dopamine 생합성 효소인 TH 활성 저해작용에 기인한 것으로 사료된다. 또한 고농도(15 μM)의 THP는 산화적 스트레스에 의한 세포독성을 나타내며,¹⁷⁾ 이러한 독성작용이 dopamine 생합성 저해작용을 유도함을 제시하고 있다. 따라서 본 연구는 장기간 L-DOPA 요법을 시행하는 파킨슨 환자는 적정 L-DOPA 요법을 시행하여야 하며, 장기간 L-DOPA 요법에 의한 THP 생성과 이로 인한 독성작용을 검사할 필요성이 있음을 제시하고 있다.

감사의 말씀

본 연구는 2004년도 충북대학교 학술연구 지원산업의 연구비로 수행되었으며 이에 감사를 드립니다.

문헌

- 1) Flahenry, J. F. and Gidal, B. E. : Parkinson's disease. In: *Applied Therapeutics: the Clinical use of Drugs*, eds. : Young, L. Y., Koda-Kimble, M. A., 8th ed., Applied Therapeutics, Inc. Vancouver, pp. 53.1-53.30 (2005).
- 2) Gottwald, M. D., Bainbridge, J. L., Dowling G. A., Aminoff, M. J. and Alldredge, B. K. : New Pharmacotherapy for Parkinson's disease. *Annal Pharmacothera.* **31**, 205 (1997).
- 3) Nelson, M. V., Berchon, R. C. and Lewitt, P. A. : Parkinson's disease. In: Dipiro, J. T. *et al.*, eds. *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach*. 3rd ed. New York: Appleton & Lange, pp. 1243-1257 (1996).
- 4) Sjöquist, B. and Magnuson, E. : Analysis of salsolinol and salsoline in biological samples using deuterium labelled internal standards and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* **183**, 17 (1980).
- 5) Weiner, C. D. and Collins, M. A. : Tetrahydroisoquinolines derived from catecholamines or dopa: effects on brain tyrosine hydroxylase activity. *Biochem. Pharmacol.* **27**, 2699 (1978).
- 6) Ohta, S., Tachikawa, O., Makino, Y., Tasaki, Y. and Hirobe, O. : Metabolism and brain accumulation of tetrahydroisoquinoline (TIQ): a possible parkinsonism inducing substance in an animal model of a poor debrisoquine metabolizer. *Life Sci.* **46**, 599 (1990).
- 7) 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).
- 8) Shin, J. S., Kim, K. T. and Lee, M. K. : Inhibitory effects of bulbocapnine on dopamine biosynthesis in PC12 cells. *Neurosci. Lett.* **244**, 161 (1998).
- 9) Shin, J. S., Yun-Choi, H. S., Kim, E. I. and Lee, M. K. : Inhibitory effects of higenamine on dopamine content in PC12 cells. *Planta Med.* **65**, 452 (1999).
- 10) Yin, S. Y., Kim, Y. M., Lee, J. J., Jin, C. M., Yang, Y. J., Ma, J. J., Kang, M. H., Kai, M. and Lee, M. K. : Enantio-selective inhibition of (1R,9S)- and (1S,9R)- β -hydrastine on dopamine biosynthesis in PC12 cells. *Neuropharmacol.* **47**, 1045 (2004).
- 11) Lee, M. K. and Zhang, Y. H. : Inhibition of tyrosine hydroxylase by berberine. *Med. Sci. Res.* **24**, 561 (1996).
- 12) Lee, S. S., Kai, M. and Lee, M. K. : Effects of natural isoquinoline alkaloids on monoamine oxidase activity in mouse brain : Inhibition by berberine and palmatine. *Med. Sci. Res.* **27**, 749 (1999).
- 13) 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).
- 14) Zhang, Y. H., Shin, J. S., Lee, S. S., Kim, S. H. and Lee, M. K. : Inhibition of tyrosine hydroxylase by bulbocapnine. *Planta*

- Med.* **63**, 362 (1997).
- 15) Naoi, M., Hirata, Y. and Nagatsu, T. : Inhibition of monoamine oxidase by N-methylisoquinolinium ion. *J. Neurochem.* **48**, 709 (1987).
 - 16) Kim, E. I., Yin, S. Y., Kang, M. H., Hong, J. T., Oh, K. W. and Lee, M. K. : Reduction of serotonin content by tetrahydropapaveroline in murine mastocytoma P815 cells. *Neurosci. Lett.* **339**, 131 (2003).
 - 17) Lee, J. J., Kim, Y. M., Yin, S. Y., Park, D. H., Kang, M. H., Hong, J. T. and Lee, M. K. : Aggravation of L-DOPA-induced neurotoxicity by tetrahydropapaveroline in PC12 cells. *Biochem. Pharmacol.* **66**, 1787 (2003).
 - 18) Tischler, A. S., Perlman, R. L., Morse, M. and Sheard, B. E. : Glucocorticoids increase catecholamine synthesis and storage in PC12 pheochromocytoma cell cultures. *J. Neurochem.* **40**, 364 (1983).
 - 19) 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).
 - 20) Mitsui, A., Nohta, H. and Ohkura, Y. : High-performance liquid chromatography of plasma catecholamines using 1,2-diphenyl-ethylenediamine as precolumn fluorescence derivatization reagent. *J. Chromatogr.* **344**, 61 (1985).
 - 21) Nagatsu, T., Oka, K. and Kato, T. : Highly sensitive assay for tyrosine hydroxylase activity by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **163**, 247 (1979).
 - 22) Joh, T. H. and Ross, M. E. : Preparation of catecholamine-synthesizing enzymes as immunogens for immunohistochemistry. In *Immunohistochemistry.* ed. Cuello A. C., IBRO, pp. 121-138 (1983).
 - 23) 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).
 - 24) Migheli, R., Godani, C., Sciola, L., Delogu, M. R., Serra, P. A., Zangani, D., De Natale, G., Miele, E. and Desole, M. S. : Enhancing effect of managanese on L-DOPA-induced apoptosis in PC12 cells: Role of oxidase stress. *J. Neurochem.* **73**, 1155 (1999).
 - 25) McNaught, K. S. P., Carrupt, P. A., Altmore, C., Cellamare, S., Carotti, A., Testa, B. and Jenner, P. : Isoquinoline derivatives as endogenous neurotoxins in the aetiology of Parkinson's disease. *Biochem. Pharmacol.* **56**, 921 (1998).
 - 26) Surh, Y. J. : Tetrahydropapaveroline, a dopamine-derived isoquinoline alkaloid, undergoes oxidation: implications for DNA damage and neuronal cell death. *Eur. J. Clin. Invest.* **29**, 650 (1999).