

Berberine이 백서의 6-Hydroxydopamine-유도 파킨슨병 모델에서의 L-DOPA 요법에 미치는 영향

신건성 · 권익현 · 최현숙 · 임성실 · 황방연 · 이명구[#]

충북대학교 약학대학

(Received October 6, 2011; Revised November 26, 2011; Accepted November 30, 2011)

Effects of Berberine on L-DOPA Therapy in 6-Hydroxydopamine-induced Rat Models of Parkinsonism

Kun Seong Shin, Ik Hyun Kwon, Hyun Sook Choi, Sung Cil Lim, Bang Yeon Hwang and Myung Koo Lee[#]
College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

Abstract — Isoquinoline compounds including berberine enhance L-DOPA-induced cytotoxicity in PC12 cells. In this study, the effects of berberine on L-DOPA therapy in unilateral 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced rat models of parkinsonism were investigated. Rats were prepared for the models of Parkinson's disease by 6-OHDA-lesioning for 14 days and then treated with L-DOPA (10 mg/kg) with or without berberine (5 and 30 mg/kg, i.p.) for 21 days. Treatment with berberine (5 and 30 mg/kg, i.p.) showed a dopaminergic cell loss in substantia nigra of 6-OHDA-lesioned rats treated with L-DOPA: 30 mg/kg berberine was more intensive neurotoxic. The levels of dopamine were also decreased by berberine (5 and 30 mg/kg) in striatum-substantia nigra of 6-OHDA-lesioned rats treated with L-DOPA. These results suggest that berberine aggravates cell death of dopaminergic neurons in L-DOPA-treated 6-OHDA-lesioned rat models of Parkinson's disease. Therefore, the long-term L-DOPA therapeutic patients with isoquinoline compounds including berberine may need to be checked for the adverse symptoms.

Keywords □ berberine, dopamine, tyrosine hydroxylase, 6-hydroxydopamine-lesioned rats, Parkinson's disease

파킨슨병(Parkinson's disease)은 기저핵-흑질-선조체의 dopamine 신경세포의 퇴행에 의한 신경세포사에 의하여 증상을 나타내며, 주요 증상으로는 추체외로성 경로의 장애인 진전(tremor), 서동(bradykinesia), 경직(rigidity) 등의 운동장애를 일으키고, 진행되는 경우 정신이상, 불안, 우울증, 노인성 치매 등의 증상을 나타낸다. Dopamine 신경세포의 퇴행의 주요 원인으로서는 유전인자(α -synuclein), 신경독성 물질 및 활성산소(reactive oxygen species, ROS)-유도 산화 스트레스(oxidative stress)에 의한 dopamine 신경세포사 등이 보고되고 있다.¹⁾

파킨슨병의 증상완화 또는 치료에는 L-3,4-dihydroxyphenyl-alanine(L-DOPA) 요법(단독 또는 복합제제)이 가장 많이 선택되고 있으며, 투여된 L-DOPA는 뇌중으로 이행하여 방향족 L-아미

노산 탈탄산효소(aromatic L-amino acid decarboxylase, AADC, EC 4.1.1.28)에 의하여 dopamine으로 변환되어 약리작용을 나타내고 있다. 그러나 장기적인 L-DOPA 요법의 파킨슨병 환자는 dopamine, norepinephrine 및 dopamine 대사체(DOPAC, HVA)의 함량이 증가하며, 과량의 L-DOPA/dopamine 및 그의 대사체는 산화 스트레스에 의한 신경독성을 나타낸다.²⁾ 또한, L-DOPA 및 dopamine의 축합체 또는 대사체 상호간의 축합반응에 의하여 생성된 isoquinoline 유도체인 tetrahydropapaveroline 및 salsolinol은 신경세포 독성을 나타내고 있음이 보고되고 있다.³⁾

Isoquinoline 화합물은 화학구조에 따라 분류하며 다양한 생리활성을 나타내고 있다. 특히 isoquinoline 화합물은 dopamine 생합성 및 대사, L-DOPA-유도 세포독성과 관련한 연구 뿐만 아니라 dopamine 생합성 효소인 tyrosine 수산화 효소(tyrosine hydroxylase, TH, EC 1.14.16.2)의 활성 저해작용, dopamine 대사효소인 모노아민산화효소(monoamine oxidase, MAO, EC 1.4.3.4)의 저해작용이 있음이 보고되었다.⁴⁻⁸⁾ 다양한 isoquinoline

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

화합물 중에서 protoberberine 계열 화합물(berberine) 및 tetrahydropapaveroline 등은 PC12 세포중의 L-DOPA-유도 세포 독성 작용에 대한 증가작용(산화 스트레스 유도 작용에 의한 세포 사 유도 증가작용)이 있으며,^{4,9,10} isoquinoline 화합물을 장기간 복용하는 경우 인체 및 동물실험에서 신경독성작용을 나타내고 있다.¹¹⁻¹³ 이는 신경퇴행성 질환 증상을 나타내는 환자 및 노약자 정상인에게 isoquinoline 계열 화합물을 장기간 복용(1~2 주간 이상)하는 경우 신경독성의 가능성이 있음을 나타내고 있다.

Berberine은 황련(*Copis japonica* M., Ranunculaceae)의 근경에 함유된 주성분으로, 항균, 항고혈압, 중추억제 작용 등이 알려져 있으며,¹⁴⁻¹⁶ 시판중인 정장제 등의 제제에 함유되어 있다. 최근, berberine은 6-hydroxydopamine(6-OHDA)-유도 파킨슨병 동물모델에서 dopamine 신경세포에 대한 독성작용을 나타내고 있음이 보고되었다.¹⁰ 6-OHDA는 산화제(Fe^{2+} , H_2O_2)의 존재하에 비효소학적(non enzymatic)으로 dopamine에서 생합성되며 선택적으로 dopamine 신경세포사(cell death)를 유도하는 신경독성 물질이며, 뇌실투여에 의하여 파킨슨병-유도 동물모델의 작성에 사용되고 있다.¹⁷ 또한 6-OHDA는 PC12 세포중에 투여하는 경우 세포독성 작용을 나타내고 있다.¹⁸

본 연구에서는 isoquinoline 계열 화합물 중에서 임상에서 자주 사용되고 있는 berberine을 선택하여, 주요 신경퇴행성 질환인 파킨슨병의 동물모델을 이용하여 L-DOPA 요법시에 나타날 수 있는 신경세포 독성에 미치는 영향을 검토하고자 한다. 이는 파킨슨병과 같은 중추신경퇴행 질환을 가진 노약자의 약물요법과 관련하여 노약자에게 isoquinoline 화합물을 포함하여 dopamine 생합성에 영향을 주는 천연물을 장기간 투여하는 경우, 퇴행성 중추신경계 질환의 진행 및 약물상호작용의 면에서의 영향을 고찰하기 위한 것이다.

실험방법

시약 및 재료

L-DOPA, dopamine, berberine sulfate, 6-OHDA, apomorphine hydrochloride, bovine serum albumin, thiobarbituric acid, EDTA-Na, ascorbic acid 등은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, Mo, USA)에서 구입하였다. TH 항체는 Chemicon International (Temecula, CA, USA)에서, biotinylated anti-rabbit IgG, vectastain(avidin/biotin complex)(ABC) 키트 및 vectastain diaminobenzidine(DAB) 키트는 Vector Laboratories(Burlingame, CA)에서 구입하였다. 실험동물은 백서(Sprague-Dawley, male, 200~250 g, Samtako, 수원)를 사용하였고 주야 주기 12시간, 온도 $23 \pm 2^\circ C$ 의 조건하에서 사육하였으며, 동물윤리위원회(충북대학교)의 규정에 따라 수행하였다. 그 밖의 시약은 특급 및 HPLC 용 등급을 사용하였다.

6-OHDA-유도 파킨슨병 동물모델 작성

파킨슨병 모델의 작성은 뇌부위에 6-OHDA를 투여하여 작성하였다.¹⁰ 실험동물(웅성, Sprague-Dawley rat, 250~300 g)을 마취한 다음(Zoletil 50 사용, 100 mg/kg, i.p.; Vibac, Carros, 프랑스), 뇌정위 수술기구(Stereotaxic apparatus, KOPF instrument, USA)를 사용하여 동물을 고정한 후, 한쪽 부위의 흑질 치밀부위에 6-OHDA($8 \mu g/2 \mu l$, $1 \mu l/min$)를 투여하였다(위치: bregma에서 앞 -5.3 mm, 중앙선에서 +1.9 mm 옆, 경막에서 -7.5 mm 깊이).¹⁹ 모델작성의 확인(hemi-parkinsonism)은 6-OHDA 투여 14일 후에 apomorphine(0.5 mg/kg, i.p.)을 투여한 다음 회전운동을 측정하여 평가하였다(300회/시간 이상의 회전 운동).

L-DOPA 및 berberine 투여

6-OHDA-유도 파킨슨병 동물모델에 대한 L-DOPA(10 mg/kg) 및 berberine(5 및 30 mg/kg)의 투여는 6-OHDA-투여 14일 후부터, 21 일간(i.p., 1일 1회) 시행하였으며, 대조군은 생리식염수(0.9% NaCl)를 투여하였다. L-DOPA 투여 시에는 AADC 저해제인 benserazide(15 mg/kg/day, i.p.)를 병용하여 투여하였다.

Dopamine 신경세포의 면역염색

6-OHDA-유도 동물모델은 6-OHDA 투여 4주 후에 좌심실을 통한 관류고정(4% paraformaldehyde/50 mM phosphate 완충용액)을 시행한 다음 뇌를 적출하여 4% paraformaldehyde 용액에서 24시간 고정 하였다. 고정된 뇌 조직은 30% sucrose/PBS 용액/isobutane 혼합용액을 이용하여 동결박편을 제조하여 저온에 보관하였다(두께 $35 \mu m$; Cryostat, Leica, Nuolch, Germany). 뇌조직에 대한 TH 면역염색은 mouse anti-TH(1:200), biotinylated anti-rabbit IgG 및 ABC 키트를 사용하여 시행하였으며, DAB 키트를 사용하여 발색시켰다. 흑질의 치밀부위 TH의 염색성 측정은 광학현미경($\times 100$ 배, Zeiss Axiolab, Jena, Germany)을 사용하였으며, 영상분석법에 의하여 흑질에서 일정 면적 내의 염색세포수를 계수하여 시행하였다.¹⁹ 실험결과는 6-OHDA-유도 부위(ipsilateral side, 동측부위)에 대한 값과 반대측(contralateral side, intact side)에 대한 값을 비교하여 백분율로 나타내었다.

Dopamine 함량 측정

뇌시료 중의 dopamine 함량은 Mitsui 등²⁰ 및 Lee 등⁹의 방법에 준하여 사용하였다. 시료에 trichloroacetic acid(3.0 M, $100 \mu l$) 및 isoproterenol(1 nmol/ml , $100 \mu l$, 내부표준)을 가한 다음 원심 분리하였다. 상등액을 Toyopak I-CP 카트리지(Toso, Tokyo, Japan)를 사용하여 전처리한 후, 흡착된 아민화합물은 0.6 M KCl-acetonitrile(1:1, v/v) 혼합액 2 ml를 사용하여 용출시킨 다음, 용출액에 DPE 시약을 가하여 형광 유도체화하고, 최

중 반응액을 HPLC를 사용하여 dopamine 함량을 측정하였다. HPLC의 조건: column, TSK gel ODS 120T(5 μ m, 0.45 \times 25 cm, Tosco, Tokyo); 이동상, acetonitrile-methanol-sodium acetate 완충액(0.1 M, pH 5.0)(50 : 5 : 45, v/v); 유속, 1 ml/min; 검출기, F1000 형광검출기(Ex. 350 nm, Em. 475 nm, Hitachi, Tokyo).

결과정리

단백질 함량은 소혈청 albumin을 사용하여 측정하였으며,²¹⁾ 실험결과는 means \pm S.E.M.으로 표시하였으며 유의성 검정은 Tukey's test에 의한 ANOVA에 의하여 계산하였다.

실험결과 및 고찰

Berberine은 PC12 세포중에 비독성 농도(10~30 μ M)에서 6-OHDA(20~50 μ M)과 병용 처리하는 경우, 세포독성 작용은 6-OHDA 단독 처리하는 경우에 비교하여 증가하였다.¹⁰⁾ 또한, 6-OHDA-유도 파킨슨병 동물모델을 작성하는 경우(6-OHDA, 8 μ g/2 μ l, 21일간), berberine(5 및 30 mg/kg, 21일간)과의 병용투여는 실험동물의 뇌의 흑질부위의 TH 발현세포 및 dopamine 함량이 유의적으로 감소하였다.¹⁰⁾ 따라서, 본 연구는 6-OHDA-유도 파킨슨병 동물모델을 사용하여, L-DOPA 요법(10 mg/kg, i.p., 21일간)을 시행하는 경우 berberine의 병용투여(5 및 30 mg/kg, 21일간)에 따른 뇌내의 dopamine 신경세포사에 미치는 영향을 검토하였다. 파킨슨병 발현은 6-OHDA 투여 14일 후에 apomorphine(0.5 mg/kg, i.p.) 투여에 의한 회전운동으로 확인하였으며, 조직내(흑색 치밀부위)의 dopamine 신경세포사는 TH 항체를 이용한 면역조직화학적 염색법으로 검사하였다. L-DOPA(10 mg/kg)의 용량의 설정은 파킨슨병 동물모델에서 자주 사용되고 있으며, L-DOPA 21 일간의 투여는 파킨슨병 동물모델의 뇌중의 dopamine 신경세포에 대한 독성작용은 나타내지 않았으며, 연구자에 따라 L-DOPA의 투여는 dopamine 신경세포의 완전한 보호작용을 나타내고 있다.²²⁾ 본 연구에서도 6-OHDA-유도 파킨슨병 동물모델을 작성 후에, L-DOPA(10 mg/kg, 21일간)의 투여는 뇌중 dopamine 신경세포의 TH 발현세포의 생존율이 대조군에 비하여 완전한 증가작용을 나타내었다(Fig. 1B 및 E). 또한 berberine의 용량(5 및 30 mg/kg)은 동물실험 용량을 기준으로 하여 설정하였다.¹⁰⁾

6-OHDA-유도 파킨슨병 동물모델 작성 후에(6-OHDA 투여 후 14일), berberine(5 mg/kg, 21일간)의 단독투여군은 대조군의 비하여 흑질부위에서 유의적인 dopamine 신경세포군의 감소를 나타내었으며(Fig. 1C 및 2C), dopamine 생합성 효소인 TH-발현 신경세포는 6-OHDA-투여 부위(ipsilateral side) 및 반대측 부위(contralateral side)에서도 감소하였다(각각 11.7% 및 7.1% 감소,

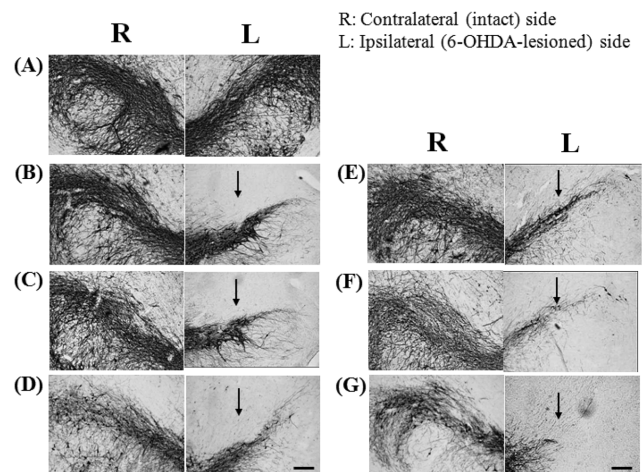


Fig. 1 – Photomicrographs of tyrosine hydroxylase (TH) immunoreactivity on substantia nigra tissue sections from representative rats of each group in the intact (contralateral (R) and 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-lesioned (ipsilateral (L) sides. Normal rat groups (A), 6-OHDA-lesioned rat groups (B), 6-OHDA-lesioned rat groups with berberine (5 mg/kg) (C), 6-OHDA-lesioned rat groups with berberine (30 mg/kg) (D), L-DOPA-treated 6-OHDA-lesioned rat groups (E), L-DOPA-treated 6-OHDA-lesioned rat groups with berberine (5 mg/kg) (F), L-DOPA-treated 6-OHDA-lesioned rat groups with berberine (30 mg/kg) (G). Rats were treated with L-DOPA (10 mg/kg/day) with or without berberine (5 and 30 mg/kg/day), or vehicle (0.9% saline). Brain tissues were cut and every three serial section was immunohistochemically stained with antibody against TH. These data are representative of 5-7 animals per group, and the arrow indicates the 6-OHDA-lesioned side. Scale bar is 100 μ m.

n=5-7). 또한, 이러한 신경세포 감소작용은 고용량 berberine (30 mg/kg, 3주간)의 투여에 의하여 현저하게 나타났다(각각 28.5% 및 30.6% 감소, n=5-7)(Fig. 1D 및 2D). 이 결과는 6-OHDA-유도 파킨슨병 동물모델 작성을 위하여, 6-OHDA의 뇌실 투여시에 berberine을 동시 투여하는 경우와 유사하게 흑질부위의 dopamine 신경세포군의 감소작용을 나타내었으며,¹⁰⁾ 파킨슨병 동물모델 작성 후에(L-DOPA 미투여) berberine을 투여하는 실험군에서 dopamine 신경세포군은 더 감소하는 경향을 나타내었다.

또한, 6-OHDA-유도 파킨슨병 동물모델에서 파킨슨병 증상발현 후에 L-DOPA의 투여(10 mg/kg, 21일간)는 흑질의 dopamine 신경세포군의 생존율은 완전하게 증가하였다(6.8% 증가, p>0.05, n=6)(Fig. 1E 및 2E). 이는 저용량의 L-DOPA는 dopamine 신경세포의 보호작용이 있음을 나타내고 있다. 그러나 6-OHDA-유도 파킨슨병 동물모델에서 L-DOPA와 berberine(5 및 30 mg/kg, 21일간)을 병용 투여하는 경우, dopamine 신경세포군은 동측 부위를 포함하여 반대측 부위에서도 berberine 농도 의존적으로 현저하게 감소하였다. 6-OHDA-투여 동물모델의 동측부위 및 반대

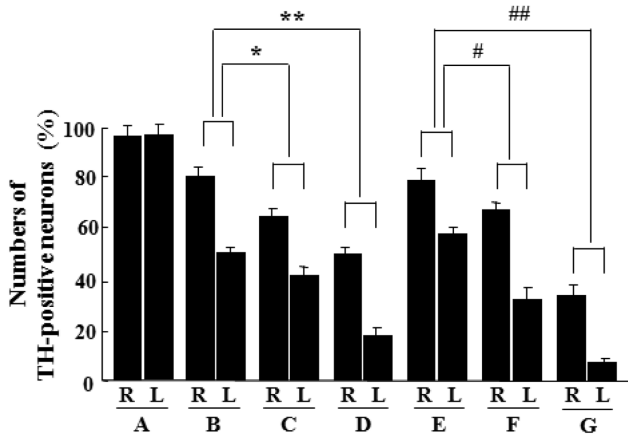


Fig. 2 – The number of surviving TH-immunopositive neuronal cells in substantia nigra of the intact (R) and 6-OHDA-lesioned (L) sides. Normal rat groups (A), 6-OHDA-lesioned rat groups (B), 6-OHDA-lesioned rat groups with berberine (5 mg/kg) (C), 6-OHDA-lesioned rat groups with berberine (30 mg/kg) (D), L-DOPA treated 6-OHDA-lesioned rat groups (E), L-DOPA-treated 6-OHDA-lesioned rat groups with berberine (5 mg/kg) (F), L-DOPA-treated 6-OHDA-lesioned rat groups with berberine (30 mg/kg) (G). TH-immunopositive neuronal cells were analyzed as a percentage of intact side. Results represent means \pm S.E.M. for 5-7 animals per group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with 6-OHDA-lesioned rat groups; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ compared with L-DOPA-treated 6-OHDA-lesioned rat groups (ANOVA followed by Tukey's test).

측 부위에서의 TH-발현 신경세포수는 5 mg berberine 투여군은 각각 20.7% ($p < 0.05$) 및 8.1% ($p > 0.05$) 감소하였으며 ($n = 5-7$), 30 mg berberien 투여군은 각각 47.3% ($p < 0.01$) 및 37.5% ($p < 0.01$) 감소하였다 ($n = 5-7$) (Fig. 1F 및 G, 2F 및 G).

TH 면역조직학적 염색결과에 의하면, 정상군은 흑질 치밀부위 (substantia nigra compacta)와 흑질 외측부위 (substantia nigra reticulata)에서 염색된 신경세포가 그물처럼 엉켜있었고, 세포체가 다각형 또는 난원형 모양으로 관찰되고 있다 (Fig. 1A). 그러나 6-OHDA-유도 파킨슨병 동물모델군은 정상군에 비하여 신경세포의 염색성 (신경세포체)이 감소하였으며, berberine 단독투여 및 L-DOPA (10 mg/kg)와 병용 투여한 경우 dopamine 신경세포군의 염색성이 현저히 감소하였다 (Fig. 1C~G).

파킨슨병은 흑질에서 dopamine 신경세포군이 선택적으로 퇴행되어 나타나는 운동장애 질환이다. 그러므로 berberine 병용 투여에 의한 흑질/선조체의 신경세포군의 감소에 따른 dopamine 함량변화를 검토하였다. 6-OHDA-유도 파킨슨병 동물모델은 6-OHDA 처치부위 (동측 부위)에서 2주째에 dopamine 함량이 감소하였다 (대조군의 38.7% 감소, $p < 0.01$, $n = 5$) (Fig. 3B). 또한, 6-OHDA-유도 파킨슨병 동물모델 작성군에 대한 berberine (5 mg/kg, 3주간)의 투여군은 대조군 (Fig. 3B)에 비하여 뇌중의

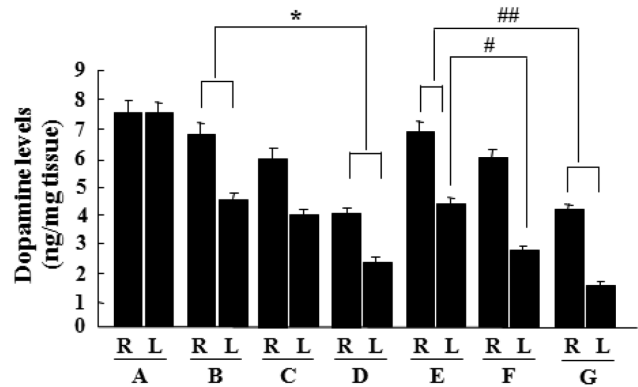


Fig. 3 – Effects of berberine on dopamine levels in striatum of the intact (R) and 6-OHDA-lesioned (L) sides. Normal rat groups (A), 6-OHDA-lesioned rat groups (B), 6-OHDA-lesioned rat groups with berberine (5 mg/kg) (C), 6-OHDA-lesioned rat groups with berberine (30 mg/kg) (D), L-DOPA-treated 6-OHDA-lesioned rat groups (E), L-DOPA-treated 6-OHDA-lesioned rat groups with berberine (5 mg/kg) (F), L-DOPA-treated 6-OHDA-lesioned rat groups with berberine (30 mg/kg) (G). After 21 days, the brains were removed and dopamine levels were determined by an HPLC method. Results represent means \pm S.E.M. for 5-7 animals per group. * $p < 0.01$ compared with 6-OHDA-lesioned rat groups; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ compared with L-DOPA-treated 6-OHDA-lesioned rat groups (ANOVA followed by Tukey's test).

dopamine 함량이 감소하였으며 (대조군의 8.8% 감소, $p > 0.05$, $n = 7$) (Fig. 3C), berberine (30 mg/kg, 3주간)의 투여군은 더 큰 감소작용을 나타내었다 (대조군의 24.3% 감소, $p < 0.05$, $n = 5-7$) (Fig. 3B, C, D).

6-OHDA-유도 파킨슨병 동물모델 작성 후에 L-DOPA (10 mg/kg, 3주간)의 투여는 6-OHDA 투여 동측 부위 및 반대측 부위에서, 대조군 (Fig. 3B)에 비하여 뇌중의 dopamine 함량이 유의적인 변화를 나타내지 않았다 (Fig. 3B 및 E). 그러나 6-OHDA-유도 파킨슨병 동물모델 작성군에 대하여 L-DOPA (10 mg/kg)와 berberine (5 mg/kg, 3주간)의 병용 투여군은 대조군 (Fig. 3E)에 비하여 뇌중의 dopamine 함량이 감소하였으며 (동측부위, 대조군의 20.8% 감소, $p < 0.05$, $n = 7$) (Fig. 3F), berberine (30 mg/kg, 3주간)과의 병용 투여군은 더 큰 감소작용을 나타내었다 (동측부위, 대조군의 33.6% 감소, $p < 0.01$, $n = 7$) (Fig. 3G).

따라서 isoquinoline 화합물인 berberine의 장기간 투여는 6-OHDA 뇌실 투여에 의한 파킨슨병 증상발현 (발병 및 진행과정)¹⁰ 및 치료과정 (L-DOPA 요법)에서 흑질부위의 dopamine 신경세포군에 대한 독성작용 (신경세포사)을 유도하고 있으며, 파킨슨병을 악화시킬 수 있음을 제시하고 있다.

본 연구에서는 6-OHDA-유도 파킨슨병 모델에서의 L-DOPA 투여는 저용량에서 신경세포 보호작용을 나타내었으나, L-DOPA와 berberine과의 병용 투여는 dopamine 신경세포사를 유도하

였다. 장기간 L-DOPA 요법을 시행하는 파킨슨병 환자는 혈액 중의 dopamine 함량의 증가하며, isoquinoline 유도체인 tetrahydropapaveroline과 salsolinol 등이 혈중에서 검출되고 있다.^{9,23,24} Teterhydroisoquinoline 및 isoquinoline 화합물들은 PC12 세포에서 L-DOPA-유도 신경독성 작용의 증가 작용을 나타내고 있으며,⁹⁻¹² 또한, 6-OHDA 및 L-DOPA는 PC12 세포에서 자가산화(auto-oxidation)에 의하여 quinone, quinone, semiquinone 등의 화합물을 생성하고 자유기(free radicals)를 생성하여 산화 스트레스에 의한 세포독성 작용을 나타낸다.²⁵ Isoquinoline 화합물은 선택적인 dopamine 신경계의 세포사를 유도하는 신경독성물질인 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine과의 화학구조적 유사성으로 인하여, dopamine 생합성 저해작용, 생합성 및 대사효소(TH 및 MAO) 활성 저해작용, dopamine 신경계의 세포독성 작용 등에 대한 연구가 보고되고 있다. 이 중에서 berberine을 포함한 protoberberine 알칼로이드 (palmatine, coptisine)는 dopamine 생합성 저해작용, TH 및 MAO 활성저해작용을 나타내고 있다.^{4,8,26} 또한, berberine은 PC12 세포 중에서 비독성 농도범위의 전처치에서 6-OHDA-유도 세포독성작용을 증가시키고 세포사(apoptosis)를 유도하며,¹⁰ 독성 농도(50 μ M)에서도 6-OHDA-유도 세포독성을 현저히 증가시키는 것으로 나타났다.¹⁰ 그러므로 berberine의 세포독성 작용은 세포내 산화 스트레스와 관련한 세포사(apoptosis) 유도 작용에 의한 것이며, 이러한 세포독성 작용은 L-DOPA 요법중인 6-OHDA-유도 파킨슨병 동물모델에서 dopamine 신경세포군의 세포사를 유도하고 있는 것으로 사료된다.

현재 시판중인 berberine 제제의 용법은 100~300 mg/day(성인 기준)이며, 증상에 따라 1주간 이상 복용할 가능성이 있다. 그러므로 산화 스트레스-유도 isoquinoline 화합물들은 노약자 및 신경퇴행질환 환자에게 장기간(최소 1주간 이상) 복용/노출되는 경우 유해작용의 가능성을 제시할 수 있다.

결 론

본 연구에서는 protoberberine 알칼로이드인 berberine은 6-OHDA-유도 파킨슨병 동물모델에서, L-DOPA와의 병용 투여에 의하여 dopamine 신경세포군의 독성작용을 나타내며 dopamine 함량 감소작용을 나타내고 있다. 이 결과들은 L-DOPA 요법 중인 파킨슨병 환자 및 노약자는 berberine를 포함한 isoquinoline 화합물, dopamine 생합성 저해작용 및 산화 스트레스를 유도하는 물질 등에 장기간 동안 투여/노출되는 경우 중추신경계 독성작용이 증가될 수 있으며, 복용 용량과 기간에 따라 신경독성이 상승될 수 있음을 나타내고 있다. 따라서 본 연구는 신경퇴행성 질환 환자 및 노약자에 대하여 천연물과의 약물상호작용, 품질관리 등에 대한 체계적인 연구가 진행되어야 할 것임을 제시하고 있다.

감사의 말씀

본 논문은 2010년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

참고문헌

- 1) Fearnley, M. and Lees, A. J. : Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* **114**, 2283 (1991).
- 2) Jung, Y. J. and Surh, Y. J. : Oxidative DNA damage and cytotoxicity induced by copper-stimulated redox cycling of salsolinol, a neurotoxic tetrahydroisoquinoline alkaloid. *Free Rad. Biol. Med.* **30**, 1407 (2001).
- 3) McNaught, K. S., Carrupt, P. A., Altomare, C., Cellamare, S., Carotti, A., Testa, B., Jenner, P. and Marsden, C. D. : Isoquinoline derivatives as endogenous neurotoxins in the aetiology of Parkinson's disease. *Biochem. Pharmacol.* **56**, 921 (1998).
- 4) Shin, J. S., Kim, E. I., Kai, M. and Lee, M. K. : Inhibition of dopamine biosynthesis by protoberberine alkaloids in PC12 cells. *Neurochem. Res.* **25**, 363 (2000).
- 5) 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 -hydrastrines on dopamine biosynthesis in PC12 cells. *Neuropharmacol.* **47**, 1045 (2004).
- 6) 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 (2004).
- 7) Jin, C. M., Lee, J. J., Yang, Y. J., Kim, Y. K., Ryu, S. Y. and Lee, M. K. : Liriodenine inhibits dopamine biosynthesis and L-DOPA-induced dopamine content in PC12 cells. *Arch. Pharm. Res.* **30**, 984 (2007).
- 8) 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 (1996).
- 9) Lee, J. J., Kim, Y. M., Yin, W. Y., Park, H. D., 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).
- 10) Kwon, I. H., Choi, H. S., Shin, K. S., Lee, B. K., Lee, C. K., Hwang, B. Y., Lim, S. C. and Lee, M. K. : Effects of berberine on 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in PC12 cells and a rat model of Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* **486**, 29 (2010).
- 11) Naoi, M., Matsuura, S., Parvez, H., Takahashi, T., Hirata, Y., Minami, M. and Nagatsu, T. : Oxidation of N-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline into the N-methyl-isoquinolinium ion by monoamine oxidase. *J. Neurochem.* **52**, 653 (1989).

- 12) Maruyama, W., Nakahara, D., Ota, M., Takahashi, T., Takahashi, A., Nagatsu, T. and Naoi, M. : N-Methylation of dopamine-derived 6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, (R)-salsolinol, in rat brains: In vivo microdialysis study. *J. Neurochem.* **59**, 395 (1992).
- 13) Naoi, M., Matsuura, S., Takahashi, T. and Nagatsu, T. : A N-methyltransferase in human brain catalyses N-methylation of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline into N-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, a precursor of a dopaminergic neurotoxin, N-methylisoquinolinium ion. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **161**, 1213 (1989).
- 14) Franzblau, S. G. and Cross, C. : Comparative in vitro antimicrobial activity of chinese medicinal herbs. *J. Ethnopharmacol.* **15**, 279 (1986).
- 15) Chen, H. C. and Hsieh, M. T. : Two-year experience with "San-Huang-Hsieh-Tang" in essential hypertension. *Am. J. Chin. Med.* **14**, 51 (1986).
- 16) Yamahara, J. : Behavioral pharmacology of berberine-type alkaloids (I), Central depressive action of Coptis Rhizoma and its constituents. *Nippon Yakurigaku Zasshi* **72**, 899 (1976).
- 17) Bereese, G. and Traylor, T. : Effect of 6-hydroxydopamine on brain norepinephrine and dopamine: evidence for selective degeneration of catecholamine neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **175**, 413 (1970).
- 18) Blum, D., Wu, Y., Nissou, M.-F., Arnaud, S., Benabid, A.-L. and Verna, J.-M. : p53 and Bax activation in 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in PC12 cells. *Brain Res.* **751**, 139 (1997).
- 19) Paxinos, G. and Watson, C. : The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, Australia (1986).
- 20) Mitsui, A., Nohta, H. and Ohkura, Y. : High-performance liquid chromatography of plasma catecholamines using 1,2-diphenylethylenediamine as precolumn fluorescence derivatization reagent. *J. Chromatogr.* **344**, 61 (1985).
- 21) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. L., Farr, A. L. and Randall, R. L. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
- 22) Mena, M. A., Davila, V. and Sulzer, D. : Neurotrophic effects of L-DOPA in postnatal midbrain dopamine neuron/cortical historicity cocultures. *J. Neurochem.* **69**, 1398 (1997).
- 23) Jenner, P. and Olanow, C. W. : Pathological evidence for oxidative stress in Parkinson's disease and related degenerative disorders. In: C.W. Olanow, P. Jenner and M. Youdim. (ed.) Neurodegeneration and Neuroprotection in Parkinson's Disease. Academic Press, London, p. 23 (1996).
- 24) Fahn, S. and Cohen, G. : The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: Evidence supporting it. *Ann. Neurol.* **32**, 804 (1992).
- 25) Saito, Y., Nishio, K., Ogawa, Y., Kinumi, T., Yoshida, Y., Masuo, Y. and Niki, E. : Molecular mechanisms of 6-hydroxydopamine-induced cytotoxicity in PC12 cells: Involvement of hydrogen peroxide-dependent and -independent action. *Free Rad. Biol. Med.* **42**, 675 (2007).
- 26) Ro, J. S., Lee, S. S., Lee, K. S. and Lee, M. K. : Inhibition of type A monoamine oxidase by coptisine in mouse brain. *Life Sci.* **70**, 639 (2001).