

# 黃柏의 berberine이 DNA의 기능조절에 미치는 영향에 관한 형광이방성 연구

이성경<sup>1#</sup>, 한효상<sup>2\*</sup>, 허성호<sup>1\*</sup>

1 : 충남대학교 생화학과, 2 : 중부대학교 보건행정학과

## Fluorescence Anisotropy Study on the Effect of Phellodendri Cortex's Berberine on Regulation of the Function of DNA

Seong Kyung Lee<sup>1#</sup>, Hyo Sang Han<sup>2\*</sup>, Sung Ho Huh<sup>1\*</sup>

1 : Department of Biochemistry, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea

2 : Department of Health Administration, Joongbu University, Geumsan 32713, Korea

### ABSTRACT

**Objectives** : We tried to observe the fluorescence anisotropy and intensity of ethidium ion in the intercalating binding interaction between DNA and ethidium ions in the presence of berberine, and then tried to explain the effect of berberine on the intercalating interaction of ethidium ion with DNA.

**Methods** : DNA(calf thymus DNA), berberine and ethidium bromide(EtBr) were purchased from Sigma-Aldrich Co. Proper amount of each compound was dissolved in 20 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0) containing 100 mM of NaCl to prepare stock solutions. Collections of the fluorescence anisotropy and intensity data were performed on JASCO FP-8300 spectrofluorometer equipped with a polarizer and a Peltier temperature controller. The excitation of ethidium ion was done at 550 nm and the emission data were collected at 600 nm. For Stern-Volmer plot, the fluorescence data were collected at 18°C and 30°C.

**Results** : According to the results of this research, the weak competitive binding pattern between ethidium ion and berberine appeared in binding with DNA at low ratio of DNA to ethidium ion. But at high ratio of DNA to ethidium ion, this weak competition disappeared. Instead, berberine might bind to DNA by intercalating way. In other words, berberine could de-intercalate ethidium ion from DNA at low concentration of DNA relative to ethidium ion, but could not at high concentration of DNA relative to ethidium ion. In addition, the mechanism of fluorescence quenching of ethidium ion could also proceed differently, depending on the ratio of the amount of DNA to that of ethidium ion.

**Conclusions** : The effect of berberine on the DNA-ethidium ion intercalating interaction could work differently, depending on the relative ratio of the amount of DNA to that of ethidium ion. This study also showed that fluorescence anisotropy analysis is very useful method to obtain detailed information for investigation of the complex binding interactions. In order to fully understand the mechanism of action of the pharmacological effect by berberine, studies on the effect of berberine on the action of proteins such as various enzymes closely related to berberine-induced medicinal effects should be continued.

**Key words** : fluorescence anisotropy, ethidium ion, berberine, intercalation, quenching

\*Corresponding author : Hyo Sang Han, Department of Health Administration, College of Health and Welfare, Joongbu University, Geumsan 32713, Republic of Korea.

· Tel : +82-41-750-6292 · E-mail : hanhs@joongbu.ac.kr

Sung Ho Huh, Department of Biochemistry, College of Natural Sciences, Chungnam National University, Daejeon 34134, Republic of Korea.

· Tel : +82-42-821-5488 · E-mail : sungho@cnu.ac.kr

#First author : Seong Kyung Lee, Department of Biochemistry, College of Natural Sciences, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea.

· Tel : +82-42-821-5481 · E-mail : lsk0811205@naver.com

· Received : 30 July 2018 · Revised : 07 September 2018 · Accepted : 25 September 2018

## I. 서론

자연에 존재하는 물질들 중에는 인체에 다양한 방식으로 작용하여 약리효과를 나타내는 생리활성 물질들이 많이 알려져 있으며, 인도를 비롯한 아시아의 여러 나라에서는 오래전부터 이들을 전통적인 藥材로 사용해 오고 있다. Benzylisoquinoline alkaloid 구조를 가지는 Berberine (2,3-methylenedioxy-9,10-dimethoxyprotoberberine[C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>4</sub><sup>+</sup>])도 그런 종류에 속하는 물질로서 *Coptis japonica* Makino (黃連)는 뿌리 줄기에 berberine을 함유하고 있고, *Phellodendron amurense* Ruprecht (黃柏)는 수피에 berberine을 함유하고 있는 天然生理活性 물질이다<sup>1,2)</sup>. 이 물질은 혈중 glucose와 cholesterol의 농도를 낮추며, 소염기능 및 심장박동 촉진효과 뿐 아니라 항균효과가 있다고 알려져 있다<sup>3-5)</sup>. 이 연구에서는 식품이나 향신료등을 통해 흡수된 berberine이 DNA의 작용에 영향을 미칠 가능성이 있는지를 알아 보고자 intercalating 시약인 EtBr과 DNA사이의 결합반응에 berberine이 어떤 영향을 주는지를 형광이방성(fluorescence anisotropy)과 형광세기(fluorescence intensity)를 측정하여 관찰하였다. Doxorubicin, daunorubicin과 actinomycin D등의 intercalating의약품은 항암제 또는 항생제로 이용되고 있으며 천연 intercalator로는 caffeine, curcumin, sanguinarine, camptothecin등이 알려져 있다<sup>6)</sup>.

형광비등방성(fluorescence anisotropy)은 시료용액 중에 존재하는 형광발색단 (fluorophore)의 회전확산속도(rotational diffusion rate)에 따라 달라진다<sup>7,8)</sup>. 따라서 형광 발색단을 포함하는 분자가 용액 중에 유리된 상태로 존재할 때와 단백질이나 DNA등의 거대한 분자에 결합해서 존재하는 경우를 비교하면 회전확산속도에서 큰 차이를 보이므로 형광비등방성 측정결과는 단순한 형광세기(fluorescence intensity) 보다 결합반응에 관한 더 구체적인 정보를 제공할 수 있는 것으로 알려져 있으며, 이는 우리가 앞서 수행한 EtBr-DNA결합반응에 미치는 카페인(caffeine)의 영향에 관한 연구에서도 확인되었다<sup>9)</sup>.

형광비등방성 측정을 위해서는 시료 분자에 포함된 형광발색단을 들뜨게(excitation)할 때와 방출(emission)되는 형광의 세기를 측정할 때 양쪽 모두에 편광계(polarizer)를 장치한다. 분자내의 형광 발색단은 편광계를 통과한 입사광의 수직방향의 electric vector에 의해 들뜨게 되며, 이와 평행인 형광세기(I<sub>||</sub>) 및 수직방향의 형광세기(I<sub>⊥</sub>)를 구하면 다음 식과 같이 형광비등방성(r) 값이 구해진다<sup>7-9)</sup>.

$$r = (I_{||} - I_{\perp}) / (I_{||} + 2 I_{\perp})$$

이런 특성을 가진 형광비등방성 측정을 이용하여 식품 섭취를 통해 인체 내로 흡수된 천연생리활성물질인 berberine이 DNA의 생물학적 기능에 어떤 영향을 주는지를 관찰하고자 하였다. DNA는 유전정보의 저장과 전달과정에서 중요한 역할을 맡고 있으며, 단백질 또는 리간드(ligand)라고 불리는 작은 분자들과의 결합반응을 통해 생물학적 기능이 조절된다. 이중나선구조를 하고 있는 DNA와 리간드 사이의 결합반응은 DNA의 minor- 또는 major-groove에 결합하는 groove-

binding, DNA의 염기쌍사이에 삽입하는 intercalation, 그리고 DNA backbone chain의 음이온을 띠고 있는 인산기에 결합하는 outside stacking이 있다<sup>10,11)</sup>. 첫째 방식은 리간드의 결합이 DNA의 특정 염기서열에서만 일어나는 염기서열 특이적(base sequence-specific)방법이나 그 외의 두 방법은 염기서열 비특이적(base sequence non-specific)인 특성을 나타낸다. 이미 발표된 논문에 의하면 berberine이 DNA와 인터칼레이션(intercalation)으로 결합한다는 결과가 있기 때문에 저자들은 인터칼레이션(intercalation)을 통해 DNA의 기능이 조절되는 과정에서 berberine이 어떤 영향을 미치는지를 조사하기로 하였다<sup>12,13)</sup>. 먼저 intercalating drug인 브로민화 에티듐(ethidium bromide)과 DNA사이의 결합반응 모델을 선택하고 여기에 黃柏의 주성분인 berberine이 결합반응에 어떤 영향을 미치는지, 그리고 그러한 영향으로 인해 DNA의 기능이 어떻게 조절될 수 있는지를 형광이방성(fluorescence anisotropy)과 형광세기(fluorescence intensity)의 측정을 통해 관찰하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

연구에 사용된 berberine(B3251)은 90% 이상의 순도를 가진 것으로 Sigma Aldrich(주)에서 구매하여 추가적인 정제 과정 없이 그대로 사용하였다. 분자량은 371.81 g/mol이며 화학구조는 Figure 1에 표시되어 있다.

#### 2) 시약 및 기기

연구에 사용된 DNA는 정제된 Calf thymus DNA(D4764)를 Sigma Aldrich(주)에서 구입하였으며, intercalating drug 분자로 사용한 브로민화 에티듐(ethidium bromide E7637)은 95% 이상의 순도를 가진 것으로 Sigma Aldrich(주)에서 구매하여 추가적인 정제과정 없이 그대로 사용하였다. 브로민화 에티듐(ethidium bromide) 화학구조는 Figure 1에 표시되어 있다.

그 외의 사용된 시약으로는 Sodium chloride(Samjun, Japan), Sodium phosphate dibasic(Sigma, USA), sodium phosphate monobasic(Sigma, USA), Ethanol(Samchun, Korea)등이 사용되었다. 사용된 기기는 Milli-Q(Millipore, USA), Qubit fluorometer (Invitrogen, USA), PH meter (Mettler, USA), Spectrofluorometer cuvette (Sigma, USA), Spectrofluorometer FP-8300(JASCO, Japan) 등이다.

### 2. 방법

#### 1) 시료용액 준비

연구에 사용된 DNA시료용액을 100 mM 염화나트륨(sodium chloride)가 포함되어 있는 20 mM 인산나트륨(sodium phosphate) 완충용액에 녹인 다음 pH를 7.0으로 맞추어 사용하였다. 이 연구에서 DNA의 농도는 편의상 염기쌍 mole농도

(650/mol of a base-pair)를 사용하였다. 브로민화 에티듐(ethidium bromide) 용액도 5 mM농도의 저장용액(stock solution)을 제조하여 필요에 따라 적절한 농도로 묽혀서 사용하였다. Berberine(FW371.81)은 물에 대한 용해도가 낮기 때문에 0.0372 g을 취해 99.9% ethyl alcohol 20 ml에 완전히 녹인 후 완충용액을 가해 5 mM 농도의 berberine용액을 제조하였고 필요한 경우 같은 완충용액으로 희석하여 사용하였다.

2) 형광이방성 및 형광세기 측정

Fluorescence spectrofluorometer는 여기(excitation)와 방출(emission) 빛을 위한 편광장치(polarizer)와 정밀한 온도조절을 위한 펄티어 온도조절장치(Peltier temperature controller)가 장착되어 있는 JASCO FP-8300을 사용하였다. 완충용액과 EtBr-DNA complex용액 중의 EtBr은 550 nm에서

여기(excitation)하였으며, 600 nm에서 방출크기(emission intensity)를 측정하여 형광이방성과 형광세기를 구하였다. 시료용액의 온도는 펄티어 온도조절장치(Peltier temperature controller)를 이용하여 형광측정 과정 동안 20℃를 정밀하게 유지하였다. EtBr-DNA complex를 berberine용액으로 적정(titration)할 때는 [berberine]/[EtBr] 값을 0에서 40정도 까지 점차적으로 변화시키면서 수행하였다. 형광이방성과 형광세기의 Relative change는 F/Fo (Fo: berberine을 가하기 전의 측정치, F;berberine를 가한 후의 측정치)로 계산하여 구하였다. 소광(quenching)의 메카니즘(mechanism)을 결정하기 위해 필요한 Stern-Volmer plot은 18℃ 및 30℃에서 위에 언급한 것과 동일한 방법으로 방출크기(emission intensity)를 측정하고 상대적인 형광세기의 변화를 계산하여 준비하였다.

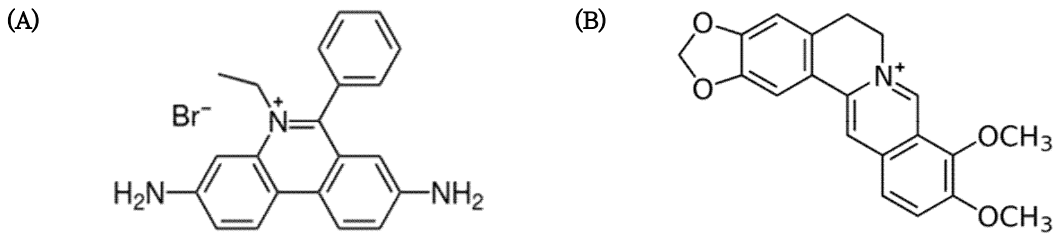


Figure 1. Chemical structure of Ethidium Bromide(A) and Berberine(B)

Ⅲ. 결 과

1. [DNA]/[EtBr] = 0.1인 조건에서의 형광측정 실험

EtBr에 비해 DNA의 염기쌍 수가 상대적으로 적은 조건인 [DNA]/[EtBr] = 0.1에서 berberine을 첨가하면 Figure 2에서와 같이 berberine의 농도가 증가함에 따라 형광이방성과 형광세기의 측정치가 모두 같은 비율로 조금씩 감소하는 것을 볼 수 있었다.

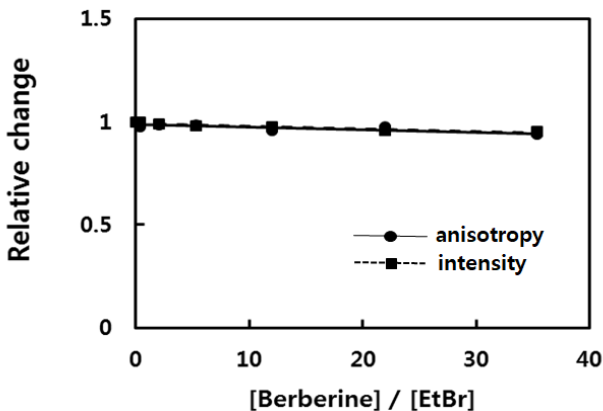


Figure 2. Titration of DNA-EtBr(1:10) complex with berberine. Fluorescence anisotropy (—) and fluorescence intensity (---) were shown in the overlapped condition.

Figure 2에 표시된 지속적인 형광이방성의 감소는 berberine에 의해서 DNA의 염기쌍 사이에 인터칼레이션(intercalation)된 에티듐(ethidium) 이온이 미량이긴 하지만 일부가 용액 중으로 해리되어 소지(quenching)되기 때문으로 해석하였다. 전에 발표된 연구결과에 의하면 berberine도 DNA와 인터칼레이션(intercalation)에 의한 결합을 할 수 있으므로 berberine의 첨가량이 증가되면서 DNA에 인터칼레이션(intercalation)되어 있던 에티듐(ethidium) 이온 중의 일부가 경쟁적인 결합반응으로 인해 용액 중으로 해리되는, 다시 말해서 에티듐(ethidium) 이온의 탈리(de-intercalation)이 가능한 것으로 판단되었다.

그리고 형광세기의 감소의 원인인 소지(quenching)의 메카니즘(mechanism)을 확인하기 위해 Stern-Volmer plot을 작성하기 위한 실험을 수행하여 구한 결과를 Figure 3에 표시하였다.

여기서 측정온도가 18℃에서 30℃로 높아짐에 따라 그래프의 기울기가 감소하는 것을 볼 수 있는데 이는 소지(quenching)이 정적 소지 메커니즘(static quenching mechanism)을 따른다는 것을 의미하였다. 다시 말해서 에티듐(ethidium) 이온의 탈리(de-intercalation)로 인한 형광세기의 감소 외에 hydrophobic interaction에 의해 용액 중에 존재하는 nonpolar한 특성을 가지는 에티듐(ethidium) 이온이 무극성(nonpolar)한 berberine과 이합체(dimer)나 다합체(multimer)를 형성하고 이로 인해 소지(quenching)이 촉진된다는 것을 나타내었다.

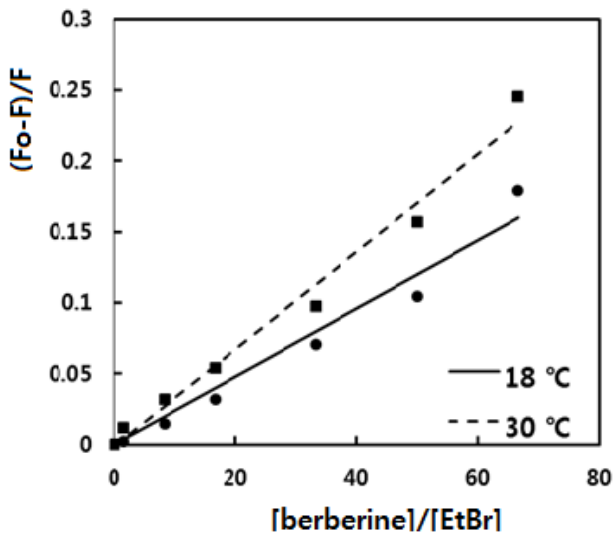


Figure 3. The Stern-Volmer plots obtained from the measurement of the fluorescence intensity with the DNA-EtBr (1:0.1) complex at various concentrations of berberine at 18°C and 30°C.

## 2. [DNA]/[EtBr] = 10인 조건에서의 형광측정 실험

DNA가 에티뒸(ethidium) 이온에 비해 상대적으로 많은 [DNA]/[EtBr] = 10일 때는 형광이방성 측정치가 약간 증가하나 그와 대조적으로 형광세기는 형광이방성 측정치의 증가보다 더 큰 폭으로 감소하는 것을 볼 수 있었다(Figure 4). 여기서 형광이방성이 증가한 현상은 DNA 농도가 berberine에 비해 높은 경우에는 berberine이 에티뒸(ethidium) 이온과 경쟁적으로 반응하기 보다는 DNA의 비어있는 염기쌍에 인터칼레이션(intercalation)방식으로 결합하기 때문에 형광이방성이 소폭 증가하는 것으로 보였다. 에티뒸(ethidium) 이온과 berberine 모두 여기(excitation) 파장이 550 nm, 방출 최대값(emission peak)이 600 nm로 같은 파장에서 여기(excitation)되고 형광이방성과 형광세기가 측정되므로 이 실험조건에서는 비어 있는 DNA염기쌍에 결합한 berberine에 의해 형광이방성 측정치가 소폭 증가하는 것이 가능하다고 판단하였다.

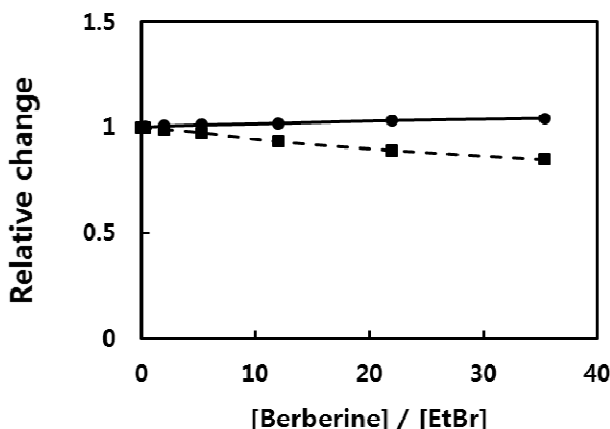


Figure 4. Titration of DNA-EtBr(10:1) complex with berberine. (— : fluorescence anisotropy, --- : fluorescence intensity)

Figure 4에서 나타난 형광세기의 감소 메카니즘(mechanism)을 정확히 조사하기 위해서 Stern-Volmer 실험을 수행하여 그 결과를 Figure 5에 표시하였다. 앞에서 [DNA]/[EtBr] = 0.1의 조건에서 수행했던 Stern-Volmer 실험결과와는 달리 [DNA]/[EtBr] = 10의 조건에서는 온도가 높아지면 Stern-Volmer 그래프의 기울기가 증가하였다. 이 결과는 전형적인 dynamic quenching mechanism을 나타내는 것으로 이 메카니즘(mechanism)은 소광(extinction)의 촉진이 berberine과 같은 소광제들이 높은 온도에서는 운동에너지가 커지기 때문에 형광발색단, 여기서는 에티뒸(ethidium) 이온과 충돌이 활발해지기 때문에 일어나는 것이라고 설명하고 있다. 따라서 [DNA]/[EtBr] = 10의 조건에서 berberine이 첨가되면 DNA에 결합되어 있는 에티뒸(ethidium) 이온과 berberine 사이의 접촉이 활발하게 되어 소지(quenching)이 촉진되므로 Figure 4에서와 같이 형광세기가 감소한다고 볼 수 있었다.

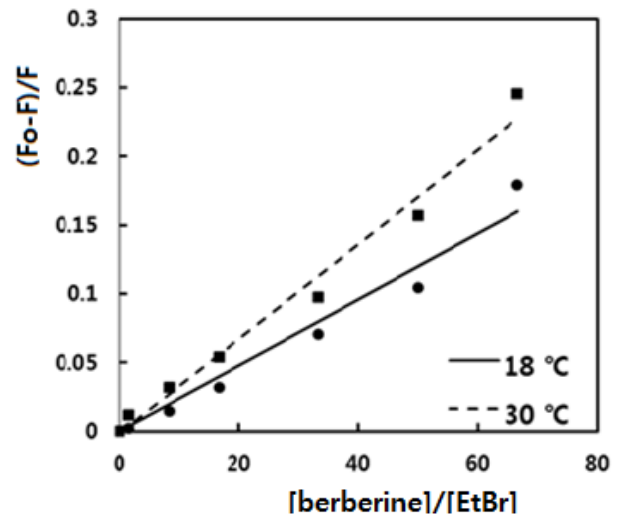


Figure 5. The Stern-Volmer plots obtained from the measurement of the fluorescence intensity with the DNA-EtBr (10:1) complex at various concentrations of berberine at 18°C and 30°C.

## IV. 고 찰

Berberine은 짙은 황색의 쓴 맛을 내는 물질로서 benzylisoquinoline alkaloid에 속하며, 여러 종류의 식물에 염화물의 형태인 Berberine(2,3-methylenedioxy- 9,10-dimethoxyprotoberberine chloride [C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>4</sub><sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>]) 구조로 포함되어 있으며 Berberine을 함유하는 식물로는 Chinese goldthread라고 알려져 있는 *Coptis chinensis* Franch(中國黃連)를 비롯하여 *Coptis trifolia* (L.) Salisb(三葉黃連), *Berberis aquifolium* (Pursh) Nutt(구골나무매자), *Berberis vulgaris* (L.)(버베리), *Hydrastis Canadensis*(Goldenseal), *Phellodendron amurense* Ruprecht(黃柏), *Coptis japonica* Makino(黃連), 그리고 *Berberis Aristata*(매자나무)등이 있다<sup>1-5,14</sup>. Berberine은 인도와 동양의 여러 나라에서 오래 전부터 다양한 질병의 약재로 사용되어 오고 있으며, 특히 내피 세포 기능저하(endothelial dysfunction)로 인하여 발생하는 다양한 심장관련 질병, 비만(obesity), 인슐린 저항성(insulin

resistance), 고혈당증(hyperglycemia)등을 개선하는데 효과가 있다고 알려져 있다. 이러한 질병들은 혈관내피세포에서의 유전자 발현(gene expression)과 세포신호전달(cell signalling)과정에서의 변화와 연관이 있는 것으로 알려져 있는데 berberine이 혈관내피의 항상성(homeostasis)을 회복하는 기능이 있어 효과를 나타낸다고 보고된 바 있다<sup>2-5,14</sup>.

따라서 저자들은 유전자 발현과정에서 나타나는 DNA와 전사조절인자(transcription factors)사이의 결합반응에 berberine이 어떤 영향을 미칠 수 있는지를 살펴보고자 하였으며, 이번 연구에서는 이들 결합반응 중에서 DNA염기쌍에 인터칼레이션(intercalation)을 통한 결합반응에 berberine이 미치는 영향을 살펴보고자 DNA-ethidium ion-berberine의 3성분계(three-component system)를 선택하여 에티듐(ethidium) 이온의 형광이방성과 형광세기가 berberine에 의해 나타내는 변화를 측정하는 실험을 수행하였다. Figure 1에서 알 수 있듯이 berberine은 에티듐(ethidium) 이온과 비슷한 평면구조의 특성을 많이 가지고 있어 에티듐(ethidium) 이온과 유사한 결합특성을 나타낼 것으로 추측되었지만 9, 10-위치의 메톡시(methoxy)기의 존재로 인해 인터칼레이션(intercalation)을 어느 정도까지 할 수 있을 것인지가 의문스러웠지만 이전에 발표된 여러 논문에 의하여 berberine이 어느 정도 약화는 되었지만 DNA에 인터칼레이션(intercalation)한다는 것이 확인되었기에 이번 실험에서 의미가 있는 결과를 구할 수 있을 것으로 판단하였다<sup>13,15</sup>.

DNA와 리간드(ligand)사이의 세 종류의 결합반응 중에서도 인터칼레이션(intercalation)만이 형광세기, 특히 형광이방성 측정에서 매우 뚜렷한 변화를 나타내므로 결합반응에 관한 구체적인 정보를 구하는데 다른 분석법들과 비교하여 형광이방성측정이 매우 효과적임을 알 수 있었다<sup>9,16</sup>. 이 분석방법을 이용한 이번의 연구에 의하면 DNA와 에티듐(ethidium) 이온의 상대적인 농도에 따라 berberine이 DNA-ethidium 이온 결합반응에 미치는 영향이 다르게 나타남을 알 수 있었다.  $[DNA]/[EtBr] = 0.1$ , 다시 말해서 DNA농도가 상대적으로 낮은 조건에서는 berberine에 의해 결합되어 있던 에티듐(ethidium) 이온 일부가 탈리(de-intercalation)될 수 있음을 알 수 있었고(Figure 2), DNA로부터 용액으로 해리된 에티듐(ethidium) 이온은 첨가된 berberine과 소수성(hydrophobic) 작용에 의한 쌓임(stacking)반응에 의해 이종이량체(heterodimer)나 이형삼량체(heterotrimer)등을 생성할 수 있다는 것이 관찰되었다(Figure 3). 다시 말해서 이런 조건에서는 DNA와 인터칼레이션(intercalation)방식으로 결합하는 리간드(ligand)는 berberine에 의해 일부가 탈리(de-intercalation)되므로 DNA의 기능이 방해받게 될 수 있음을 보였다.  $[DNA]/[EtBr] = 10$ , 다시 말해서 DNA농도가 에티듐(ethidium) 이온보다 상대적으로 높은 조건에서는 DNA-ethidium 이온 결합반응에서 해리되는 탈리(de-intercalation)보다는 berberine이 DNA의 빈 염기쌍사이에 결합하는 과정이 진행됨을 보였다(Figure 4, 5). 따라서 이 조건에서는 intercalation-ligand 결합반응에 의한 DNA의 기능이 berberine에 의해 억제되지 않음을 알 수 있었다.

이와 같이 형광이방성과 형광세기 측정법을 이용하면 복잡한 결합반응을 하는 DNA와 리간드(ligand)사이에서 인터칼

레이션(intercalation)에 의한 DNA기능의 조절이 공존하는 berberine과 같은 제3의 성분에 의해 어떻게 영향을 받게 되는지에 대한 자료를 효과적으로 구할 수 있어서 이 연구방법이 이 분야의 연구에서 매우 유용함을 알 수 있었다.

## V. 결 론

이 연구에서 저자들은 DNA의 기능 중에서 리간드(ligand)와의 인터칼레이션(intercalation)에 의한 결합반응에 의해 조절되는 DNA의 기능이 공존하는 berberine에 의해 받게 되는 영향을 형광이방성(fluorescence anisotropy)과 형광세기(fluorescence intensity)측정을 통해 조사하였으며, 연구로 수행한 결과 다음과 같은 결론을 내릴 수 있었다.

1. 인터칼레이션(intercalation)을 통한 DNA-ligand 결합반응에서 공존하는 berberine에 의해 DNA의 기능이 조절되는 경우에 이에 관한 구체적인 자료를 구하기 위한 연구에서는 형광이방성(fluorescence anisotropy)측정에 의한 분석방법이 다른 분석방법에 비해 매우 유용함을 알 수 있었다.
2. DNA와 에티듐(ethidium) 이온의 상대적인 농도에 따라 berberine이 DNA-ethidium 이온 사이의 결합반응에 미치는 영향이 다르게 나타남을 알 수 있었다.

첫째, DNA농도가 intercalating drug인 에티듐(ethidium) 이온보다 상대적으로 낮은 조건에서는 DNA에 결합되어 있던 에티듐(ethidium) 이온 일부가 공존하는 berberine에 의해 탈리(de-intercalation)될 수 있음을 알 수 있었고, DNA로부터 용액으로 해리된 에티듐(ethidium) 이온은 첨가된 berberine과 소수성(hydrophobic) 작용에 의한 쌓임(stacking)반응에 의해 이종이량체(heterodimer)나 이형삼량체(heterotrimer) 등을 생성할 수 있다는 것이 관찰되었다. 다시 말해서 이런 조건에서는 DNA와 인터칼레이션(intercalation)방식으로 결합하는 리간드(ligand)는 berberine에 의해 일부가 탈리(de-intercalation)되므로 DNA의 기능이 방해받게 될 수 있음을 보였다.

둘째, DNA농도가 에티듐(ethidium) 이온보다 상대적으로 높은 조건에서는 이들 사이의 결합반응에서 공존하는 berberine에 의해 에티듐(ethidium) 이온이 해리되는 탈리(de-intercalation)보다는 berberine이 DNA의 빈 염기쌍사이에 인터칼레이션(intercalation)하는 과정이 진행될 수 있음을 보였다. 따라서 이 조건에서는 intercalation-ligand 결합반응에 의한 DNA의 기능이 berberine에 의해 유의미한 수준까지는 억제되지 않음을 알 수 있었다.

이 연구 결과는 음식이나 건강보조식품등에 의해 신체내부로 섭취된 berberine이 특정 조건에서는 DNA의 인터칼레이션

(intercalation) 능력에 영향을 미칠 수 있음이 밝혀졌으며, 혈관내피세포의 기능저하로 인한 질병들에 대한 berberine의 약리효과는 이러한 작용 메카니즘(mechanism)과 관련이 있을 것으로 판단되었다. Berberine에 의한 약리효과의 작용 메카니즘(mechanism)을 전체적으로 규명하기 위해서는, berberine이 효과를 보이는 질병과 밀접하게 관련된 여러 종류의 효소 등의 단백질의 작용에 berberine이 어떤 영향을 주는지에 관한 연구가 계속되어야 할 것으로 생각된다.

## 감사의 글

이 논문은 충남대학교 학술연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

## References

- Kim IR, Kim HC, Kuk YB, Park SJ, Park YK, Park JH, Seo BI, Seo YB, Shin MK, Lee YJ, LeeYC, Lee JH, Leem KH, Cho SI, Chung JK, Joo YS, Choi HY, Boncho-Hak, Seoul:Young-Lim Press, 2007 : 218-23.
- Ikram M. A review on the chemical and pharmacological aspects of genus Berberis. *Planta Med.* 1975 ; 28 (4) : 353-8.
- Kuo CL, Chi CW, Liu TY. The anti-inflammatory potential of berberine in vitro and in vivo. *Cancer Lett.* 2004 ; 203(2) : 127-37.
- Salehi S, Filtz TM. Berberine possesses muscarinic agonist-like properties in cultured rodent cardiomyocytes. *Pharmacol Res.* 2011 ; 63(4) : 335-40.
- Nishida S, Kikuichi S, Yoshioka S, Tsubaki M, Fuji Y, Matsuda H, Kubo M, Irimajiri K. Induction of apoptosis in HL-60 cells treated with medicinal herbs. *Am J Chin Med.* 2003 ; 31(4) : 551-62.
- Hill GM, Moriarity DM and Setzer WN Attenuation of Cytotoxic Natural Product DNA Intercalating Agents by Caffeine. *Sci Pharm.* 2011 ; 79(4) : 729-47.
- Ameloot M, vandeVen M, Acuna AU, Valeur B. Fluorescence anisotropy measurements in solution: Methods and reference materials (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem.* 2013 ; 85(3) : 589-608.
- Lakowicz JR Principles of Fluorescence Spectroscopy Third Edition, New York:Springer Science Business Media LLC. 2006 : 529-38.
- Lee SK, Huh SH. Measuring Fluorescence Anisotropy as One of Very Useful Analytical Methods to Obtain Detailed Information of the Complex Binding Interaction. *Bull Korean Chem Soc.* 2017 ; 38(3) : 406-9.
- Nelson SM, Ferguson LR, Denny WA. Non-covalent ligand/DNA interactions: minor groove binding agents. *Mutat Res.* 2007 ; 623(1-2) : 24-40.
- Ricci CG, Netz PA. Docking studies on DNA-ligand interactions: building and application of a protocol to identify the binding mode. *J Chem Inf Model.* 2009 ; 49(8) : 1925-35.
- Park HS, Kim EH, Sung YH, Kang MR, Chung IK, Cheong C, Lee W. DNA binding mode of the isoquinoline alkaloid berberine with the deoxyoligonucleotide d (GCCGTCGTTTTACA) 2. *Bulletin-Korean Chemical Society.* 2004 ; 25(4) : 539-44.
- Pilch D S, Yu C, Makhey D, LaVoie EJ, Srinivasan AR, Olson WK, Sauers RR, Breslauer KJ, Geacintov NE, Liu LF. Minor Groove-Directed and Intercalative Ligand-DNA Interactions in the Poisoning of Human DNA Topoisomerase I by Protoberberine Analogs. *Biochemistry.* 1997 ; 36(41) : 12542-53.
- Bagade A, Tumbigeremutt V, Pallavi G. Cardiovascular Effects of Berberine: A Review of the Literature. *J Restorative Medicine.* 2017 ; 6(1) : 37-45.
- Li XL, Hu Y, Wang H, Yu BQ, Yue HL. Molecular spectroscopy evidence of berberine binding to DNA: comparative binding and thermodynamic profile of intercalation. *Biomacromoles.* 2012 ; 13(3) : 873-88.
- Iwunze MO. Media Influence on the Enhancement of the Fluorescence of Berberine Hydrochloride. *Monatshefte für Chemie.* 2000 ; 131(5) : 429-35.