

Berberine이 구속 스트레스 부가후 Mouse의 혈중 Catecholamine 함량에 미치는 영향

신정수 · 이상선 · 김응일 · 심성민 · 이명구

충북대학교 약학대학, 청주시 흥덕구 개신동 산48, 361-763

Effects of Berberine on Serum Levels of Catecholamines after Immobilization Stress in Mice

Jeong Soo Shin, Sang Sun Lee, Eung Il Kim, Seong Min Shim, and Myung Koo Lee

College of Pharmacy, Chungbuk National University, San 48, Kaeshin-Dong, Heungduk-Ku,

Cheongju 361-763, Republic of Korea

Berberine, a protoberberine isoquinoline alkaloid, showed inhibitory effects on dopamine content in PC12 cells (53.8% inhibition at 20 μ M). Tyrosine hydroxylase, the rate-limiting enzyme in the catecholamine biosynthetic pathway, was inhibited at 20 μ M of berberine by 21.8% relative to control. Thus, we hypothesized that the inhibition of tyrosine hydroxylase by berberine might be partially contributed to the decrease in dopamine content in PC12 cells. Furthermore, we investigated the effects of berberine on catecholamine content of serum after immobilization and cold stress in mice. Adult male mice were either subjected to 30 min of restraint or to 2 hr of cold chamber at 4-6 $^{\circ}$ C. Serum norepinephrine, 16.8 pmol/ml, in control mice was increased to 28.8 pmol/ml by immobilization and the stress-induced rise in serum norepinephrine was partially blocked by the treatment of berberine (10 mg/kg, i.p.) once a day for 6 days. Berberine (10 mg/kg/day for 3 days, i.p.) also inhibited the increase in serum norepinephrine by cold stress in mice. These results suggest that berberine may be developed as the promising antistress agent. (Kor. J. Clin. Pharm. 1997; 7(2): 81-85)

□ Keywords - Berberine, Catecholamines, Tyrosine hydroxylase, PC12 cells, Immobilization stress, Mice.

Berberine은 protoberberine isoquinoline 알카로이드에 속하는 화합물로서, 황련(*Coptis japonica* M., Ranunculaceae)의 근경에 함유된 주성분이다.¹⁾ 황련은 berberine 이외에 palmatine, jatrorrhizine, coptisine 등을 함유하고 있으며, 항균,²⁾ 항고혈압,³⁾ 항괴양,⁴⁾ 중추억제⁵⁾ 작용 등이 알려져 있다. 임상에서는 정장제, 안신약 제제에 함유되어 있다.

Berberine에 의한 항고혈압작용은 α -adrenoreceptor 효능작용과 유사함이 보고되었으나,³⁾ berberine은 수용체 결합시험(binding assay)에서는 길항작용이 보고되었다.⁶⁾ 최근에는 isoquinoline 화합물이 catecholamine 생합성의 조절작용이 있음이 보고되었다. Isoquinoline 화합물인 berberine, palmatine 및 noscapine은 PC12 cells중의 dopamine 함량의 감소작용과 catecholamine 생합성 효소 tyrosine hydroxylase (EC 1.14.16.2;

TH)의 활성 저해작용이 있음이 보고되었다.⁷⁻⁹⁾ 또한, 소부신의 TH을 이용한 효소화학적 연구에서는 berberine, palmatine 및 hydrastine은 상경적 저해작용¹⁰⁻¹²⁾을, bulbocapnine은 비상경적 저해작용¹³⁾을 나타내고 있음이 보고되었다. 이 결과들은 berberine이 부분적으로 catecholamine 생합성 과정의 저해작용을 가지고 있음을 나타낸 것으로 사료된다.

PC12 cells은 rat의 부신 pheochromocytoma에서 유래한 것으로 catecholamines을 생합성, 저장, 분비하며, TH를 생합성한다.¹⁴⁾ 따라서, PC12 cells은 신경세포의 분화 및 chromaffin 세포의 기능, 학습-습관화 반응(learning-habitation) 등의 연구의 모델로 이용되고 있다.¹⁵⁾

혈중 catecholamines는 구속(immobilization), 냉방(cold), 정신적 스트레스 등의 각종 스트레스에 의하여 증가된다.¹⁶⁾ 이는 뇌중의 하수체전엽-ACTH-부신피질계가

부활하여 일어나며, 각 스트레스에 의한 생체의 방어 작용으로 생각된다.¹⁷⁾

본 연구에서는 berberine이 catecholamine 생합성 과정의 조절작용에 대한 연구를 위하여, PC12 cells중의 dopamine 함량 및 TH 활성에 미치는 영향에 대하여 경시적으로 검토하였다. 즉, berberine은 dopamine 생합성의 저해작용이 있으며 이러한 저해작용이 부분적으로 TH 활성저해 작용을 매개로 함을 밝혔다. 또한, 이 결과들을 응용하기 위한 기초연구의 일환으로 berberine의 전처리(구속 및 냉방) 부가후의 mouse 혈중 catecholamine (norepinephrine 및 epinephrine) 함량 변화에 미치는 영향에 대하여 검토하였다.

실험재료 및 방법

실험재료

세포배양용 donor horse serum (HS), fetal calf serum (FCS), 항생제(penicillin/streptomycin) 및 배지(RPMI 1640)는 GIBCO (Grand Island, NY, 미국), berberine sulfate, DL-6-methyltetrahydropterine, catalase, 3,4-dihydroxybenzylamine, isoproterenol 및 alumina는 Sigma 사(St Louis, MO, 미국)로부터 구입하였다. 그밖의 시약은 특급 및 HPLC용 등급을 사용하였다.

PC12 cells의 배양 및 berberine의 전처리

PC12 cell line의 배양은 상법에 준하였다.¹⁴⁾ 배지는 10% HS, 5% FCS 및 penicillin/streptomycin을 포함한 RPMI 1640을 사용하여 37°C, CO₂ 배양기(5%)에서 배양하였다. Cell line (60 mm culture dish, cell density 2.5×10^4 cells/cm²)을 36(-48) 시간 배양한 다음, 이 cell (1×10^5 cells/cm²)에 berberine (5-40 μ M)를 가하고 6-48 시간 배양하였다. 상등액을 경사하여 얻은 pellet는 -70°C에서 보관하며, dopamine 함량 및 TH 활성 측정 시료로 하였다.

Catecholamine 함량 측정

PC12 cells 및 배지중의 dopamine 함량, 혈액중의 norepinephrine 및 epinephrine의 함량 측정은 Mitsui 등¹⁸⁾ 및 Lee 등¹⁹⁾의 방법을 보정하여 사용하였다. 각 시료용액에 1 M HClO₄ 300(-500) μ l 및 0.2 nmol/ml isoproterenol (내부표준) 100 μ l을 가한 다음 원심분리하였다. 상등액을 Toyopak IC-SP M cartridge (Na⁺ form)를 사용하여 전처리하고, 용출액에 DPE를 가하

여 형광유도체화 반응을 시킨 다음, 최종 반응액 100 μ l을 HPLC-형광검출기에 주입하였다. HPLC의 조건은 Lee 등¹⁹⁾의 방법에 준하여 사용하였다.

TH 활성 측정

TH 활성 측정은 Nagatsu 등²⁰⁾의 방법을 보정하여 사용하였다.¹⁰⁾ 효소 반응액은 0.5 M NaOAc (pH 6.0) 200 μ l, 1 mg/ml catalase 50 μ l, 5 mM L-tyrosine 100 μ l, 10 mM DL-6-methyltetrahydropterine 50 μ l, 효소시료 10(-50) μ l이다. 효소반응(10분)후 3.0 M HClO₄ 100 μ l 및 10 M 3,4-dihydroxybenzylamine (내부표준) 100 μ l를 가한 다음 원심분리 하였다. 상등액을 alumina cartridge (100 mg)을 사용하여 전처리한 다음, 용출액을 HPLC-전기화학검출기에 주입하여 L-DOPA의 농도를 측정하였다. HPLC 조건은 Lee 등¹⁰⁾의 방법에 준하여 실시하였다.

스트레스 실험

실험동물은 mouse (ICR male, 체중 25-30 g, 삼육동물)를 사용하였으며, 12 시간의 주야 주기, 온도 23 \pm 2°C의 조건하에서 사육하였다. Berberine (10 mg/kg, 1일 1회)은 스트레스를 가하기전 3-6일 동안 복강내로 투여하였다. 구속 스트레스는 mouse를 사각형 판자위에 테이프를 사용하여 4 다리를 고정-구속하여 작성하였다.²¹⁾ 구속시간은 30분이며, 구속후 단두하여 채혈 하였다. 냉방 스트레스는 제모한 mouse를 4-6°C의 cold chamber내에서 2시간 동안 실시한 다음 단두하여 채혈하였다. 전혈을 원심분리하여 얻은 측정시료 혈청은 -70°C에서 보관하였으며, 대조군은 스트레스를 가하지 않은 동물을 이용하였다.

단백질 함량 측정 및 결과정리

각항의 생리활성은 각 시료중의 단백질 함량을 측정하여 보정하였으며, 단백질 함량은 bovine serum albumin을 사용, Lowry 법²²⁾에 의하여 측정하였다. 결과는 mean \pm SEM으로 표시하였으며 유의성 검정은 Student's t test에 의하여 계산하였다.

실험결과 및 고찰

Berberine은 protoberberine 알카로이드로서(Fig. 1), 항균작용,²⁾ 항고혈압작용,³⁾ 항케양작용,⁴⁾ 중추억제작용,⁵⁾ tyrosinase 활성 저해작용,²³⁾ reverse transcriptase 활성 저해작용²⁴⁾ 등이 보고 되고 있으나, catechola-

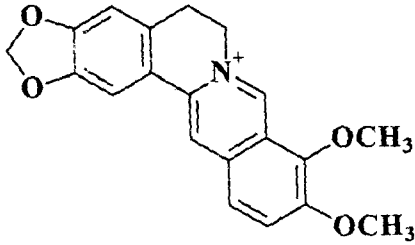


Fig. 1. Structure of berberine.

mine 생합성 과정에 미치는 영향에 대한 연구는 매우 미미하다. 최근, 저자들은 isoquinoline 화합물인 berberine, palmatine 및 noscapine이 PC12 cells중의 dopamine 함량의 감소작용이 있음을 보고하였다.^{7,9)} 또한, 소부신의 TH을 이용한 효소화학적 연구에서는 berberine, palmatine 및 hydrastine은 상경적 저해작용¹⁰⁻¹²⁾을, bulbocapnine은 비상경적 저해작용¹³⁾을 나타내고 있음이 밝혀졌다. 이 결과들은 berberine을 포함한 일부 isoquinoline 생리활성 물질이 catecholamine 생합성의 조절작용이 있음을 나타내는 것으로 사료된다.

본 연구에서는 berberine의 catecholamine 생합성 과정에 대한 저해작용을 용량별로 경시적으로 검토하였다. Berberine을 사용하여 PC12 cells중의 dopamine 함량에 미치는 영향을 검토한 결과, dopamine 함량을 용량의존적으로 감소하였다(전처치후 배양시간, 24

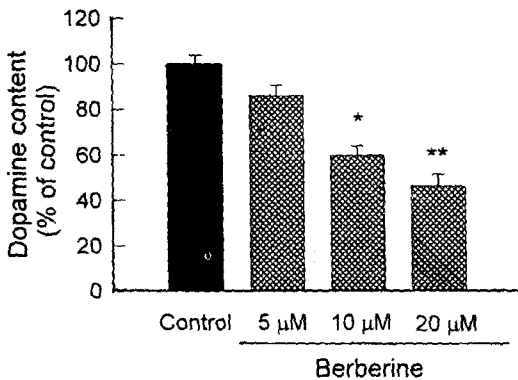


Fig. 2. Inhibitory effects of berberine on dopamine content in PC12 cells. PC12 cells were treated with berberine (5-20 μM) and then incubated for 24 hr. The cells were harvested with PBS and the dopamine content was measured by HPLC. The dopamine content (3.23 ± 0.19 nmol/mg protein) was taken as 100. Results represent the mean \pm SEM of 5 dishes. Significantly different from the control value: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (Student's *t* test).

시간) (IC_{50} : berberine, 18.6 μM) (Fig. 2). Dopamine 함량은 berberine 전처치후 감소하기 시작하여 24-48 시간 동안 감소작용을 나타내었다(Fig. 3 위). Berberine의 전처치(전처치후 배양시간; 12, 24 및 48 시간)에 의하여 배지중으로의 dopamine 분비는 미약한 증가작용을 나타냈으나 유의성은 인정되지 않았다. Berberine의 전처치(24 시간)가 PC12 cells의 세포독성에 미치는 영향을 검토하기 위하여 lactate dehydrogenase 활성을 측정된 결과 50 μM까지 세포독성을 나타내지 않았다. 따라서, berberine의 전처치에 의하여 PC12 cells중의 총 dopamine 함량은 감소되는 것으로 사료된다.

Berberine에 의한 PC12 cells 중의 dopamine 생합성 저해작용에 대한 작용기전을 일부 규명하기 위하여 TH 활성의 변화를 검토하였다. TH의 활성은 berberine의 전처치(20 μM)에 의하여 대조군의 78.2%로 나타나, 활성 저해작용을 나타내었으며(Fig. 3 아래), berberine 투여 12 시간에서 최대의 활성 저해작용을 나타내었다. 이 결과들로부터 berberine의 전처치는

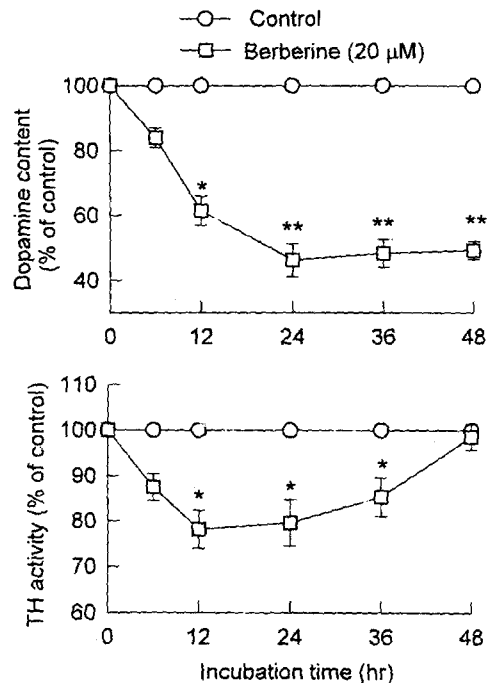


Fig. 3. Time courses of dopamine content (upper) and TH activity (lower) by berberine (20 μM) in PC12 cells. Dopamine content and TH activity of the control were 3.54 ± 0.25 nmol/mg protein and 3.92 ± 0.09 nmol/min/mg protein, respectively. Further comments see Fig. 2.

Table I. Effects of berberine on serum catecholamine content in mice by immobilization stress

Herbal medicine	Norepinephrine (pmol/ml)	Epinephrine (pmol/ml)
Control	16.8±1.85	1.93±0.47
Control+Stress	28.8±2.91 ^a	3.12±0.51
Berberine+Stress	19.5±2.75 ^b	2.64±0.38

Mice (male, ICR, 22-25 g) were obtained from Samyook animal center. Immobilization stress was done by taping all four limbs of the mouse to a board. Blood samples were collected by decapitation after 30 min of immobilization and centrifuged at 4°C for 15 min (3,000 g). Berberine (10 mg/kg) was administered i.p. to mice once a day for 6 days. Catecholamine content of serum was measured by HPLC method. Results represent the mean±SEM from seven or eight animals. ^aSignificantly different from the control value, p<0.05; ^bSignificantly different from the control+stress, p<0.05 (Student's t test).

부분적으로 PC12 cells 중의 TH 활성을 저해하며, 이로 인하여 dopamine 생합성이 저해되고 있는 것으로 사료된다.

저자들은 상기의 결과를 바탕으로 하여, 중추신경계에 대한 berberine의 효능을 검색하기 위하여, mouse를 사용하여 berberine의 전처치가 구속 및 냉방 스트레스에 미치는 영향을 검토하였다. 혈액중의 norepinephrine 및 epinephrine 함량은 각종 스트레스(구속, 냉방 및 정신적 스트레스 등)에 의하여 현저히 증가한다.¹⁶⁾ 그리고, berberine은 25 mg/kg 용량에서 호흡증가 등의 독성작용이 나타나며, rat에서의 LD₅₀는 90 mg/kg(i.p.)으로 보고되었다.¹⁾

본 실험에서는 berberine (10 mg/kg, i.p.)을 1일 1회, 3-6 일간 전처치한 후, 구속 또는 냉방 스트레스를 가하고 단두하여 채혈한 다음, 혈액중의 catecholamine 함량 변화를 측정하였다. Berberine 전처치(10 mg/kg, i.p.)에 의하여 혈중 catecholamine 함량은 변화되지 않았다. 대조군의 혈중의 norepinephrine 함량은 16.8 pmol/ml이며, 구속 스트레스(시간, 30 분) 후의 혈액중의 norepinephrine 함량은 28.8 pmol/ml으로 증가되었다. 그리고, 이러한 혈중 norepinephrine 함량의 증가는 berberine의 전처치(10 mg/kg, 1일 1회, 6 일간)에 의하여 억제되었다(Table I). 스트레스에 의한 혈액중의 catecholamine 함량이 다른 연구자의 결과와 비교하여 볼 때, 약한(mild) 증가를 나타냈으며, 이는 구속의 강도에 의한 것으로 사료된다.

또한, 냉방 스트레스에 의하여도 혈액중의 norepinephrine 함량(26.0 pmol/ml)은 대조군에 비하여 유의적으로 증가하였으며, 이러한 증가는 berberine (10 mg/

Table II. Effects of berberine on serum catecholamine content in mice by cold stress

Herbal medicine	Norepinephrine (pmol/ml)	Epinephrine (pmol/ml)
Control	17.2±2.51	3.22±1.44
Control+Stress	26.0±2.43 ^a	4.25±1.08
Berberine+Stress	22.4±1.80	3.82±1.41

Mice (male, ICR, 22-25 g) were obtained from Samyook animal center. Cold stress was done by keeping the mice in the cold room at 4-6°C for 2 hr. Berberine (10 mg/kg) was administered i.p. to mice once a day for 3 days. ^aSignificantly different from the control value, p<0.05. Further comments see Table I.

kg, i.p., 1일 1회, 3일간)의 전처치에 의하여 억제되는 것으로 나타났다(Table II). 그러나 구속 및 냉방 스트레스에 의한 혈중 epinephrine의 증가는 berberine 전처치에 의하여 유의적이지는 않았으나 억제되는 경향을 나타내었다(Table I, II).

이상의 결과를 종합하면, berberine의 전처치가 스트레스에 의한 catecholamine 생합성의 증가작용을 저해하고 있음을 나타낸 것으로, 항스트레스 작용으로의 응용 가능성을 제시한 것으로 사료되며, 스트레스 후의 진정작용에의 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다. 또한, berberine에 의한 중추신경 억제 및 안신작용에는 catecholamine 생합성 과정의 저해작용이 부분적으로 관여할 것으로 사료된다.

스트레스에 의한 생체의 반응은 매우 다양하며, 스트레스에 의한 방어기전으로서의 catecholamine 함량 변화는 고전적인 개념으로서의 생체 반응중의 일부이다. 구속 및 냉방 스트레스에 대한 berberine의 효과는 스트레스에 의한 catecholamine 대사산물, 뇌중 부위별의 catecholamine 함량 변화 및 그에 대한 작용기전 등에 대한 보완적인 연구가 필요하다. 또한, berberine에 의한 항스트레스 작용은 중추신경계 이외에 순환기계 등의 면에서도 진행되어야 할 것으로 사료된다.

문 헌

1. Tang W, Eisenbrand G. Chinese drugs of plant origin, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1992; 362-371.
2. Franzblau SG, Cross C. Comparative *in vitro* antimicrobial activity of chinese medicinal herbs, J. Ethnopharmacol. 1986; 15: 279-288.
3. Chen HC, Hsieh MT. Two-year experience with "San-Huang-Hsieh-Tang" in essential hypertension, Amer. J. Chin. Med. 1986; 14: 51-58.

4. Takase H, Imanishi K, Miura O, Yumioka E. A possible mechanism for the gastric mucosal protection by OREN-GEDOKU-TO (OGT), A traditional herbal medicine, Jpn. J. Pharmacol. 1987; 51: 17-23.
5. Yamahara J. Behavioral pharmacology of berberine-type alkaloids(1), Central depressive action of Coptidis Rhizoma and its constituents, Nippon Yakurigaku Zasshi. 1976; 72: 899-908.
6. Oelmez E, Ilhan M. Evaluation of the α -adrenoceptor antagonistic action of berberine in isolated organs, *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 1992; 42: 1095-1097.
7. Lee MK, Park WK, Kim HS. Inhibitory effects of the root of *Coptis japonica* on catecholamine biosynthesis in PC12 cells, *Arch. Pharm. Res.* 1994; 17: 269-272.
8. Lee MK, Kim HS. Inhibitory effects of protoberberine alkaloids from the root of *Coptis japonica* on catecholamine biosynthesis in PC12 cells, *Planta Med.* 1996; 62: 31-34.
9. Shin JS, Lee SS, Lee MK. Inhibitory effects of noscapine on dopamine biosynthesis in PC12 cells, *Arch. Pharm. Res.* 1997; 20: 510-512.
10. Lee MK, Zhang YH. Inhibition of tyrosine hydroxylase by berberine, *Med. Sci. Res.* 1996; 24: 561-562.
11. Lee MK, Zhang YH, Kim HS. Inhibition of tyrosine hydroxylase by palmatine, *Ach. Pharm. Res.* 1996; 19: 258-260.
12. Lee MK, Zhang YH, Shin JS, Lee SS. Inhibition of tyrosine hydroxylase by hydrastine, *Med. Sci. Res.* 1997; 25: 619-620.
13. Zhang YH, Shin JS, Lee SS, Kim SH, Lee MK. Inhibition of tyrosine hydroxylase by bulbocapnine, *Planta Med.* 1997; 63: 362-363.
14. Greene LA, Rein G. Short-term regulation of catecholamine biosynthesis in a nerve growth factor responsive clonal line of rat pheochromocytoma cells, *J. Neurochem.* 1977; 30: 549-555.
15. Greene LA, Tischler AS. PC12 pheochromocytoma cultures in neurobiological research: In *Advance in Cellular Neurobiology* vol.3 (ed. Feroroff S.): Academic Press, New York, 1982; pp.373.
16. Kopin IJ. Carecholamines, adrenal hormones, and stress: In *Neuroendocrinology* (ed. Krieger DT, Hughes JC): Sinauer Association Inc. 1980; pp.159.
17. Guillemin RG. Beta-lipotropin and endorphin: Implications of current knowledge: In *Neuroendocrinology* (ed. Krieger DT, Hughes JC): Sinauer Association Inc. 1980; pp.67.
18. Mitsui A, Nohta H, Ohkura Y. High-performance liquid chromatography of plasma catecholamines using 1,2-diphenylethylenediamine as precolumn fluorescence derivatization reagent, *J. Chromatogr.* 1985; 344: 61-70.
19. Lee MK, Nohta H, Ohkura Y. Occurrence of aromatic L-amino acid decarboxylase in human plasma and its assay by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *J. Chromatogr.* 1986; 378: 329-336.
20. Nagatsu T, Oka K, Kato T. Highly sensitive assay for tyrosine hydroxylase activity by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.* 1979; 163: 247-252.
21. Kvetnansky R, Golstein DS, Weise VK, Holmes C, Szemeredi K, Bagdy G, Kopin IJ. Effects of handling of immobilization on plasma levels of 3, 4-dihydroxyphenylalanine, catecholamines, and metabolites in rats, *J. Neurochem.*, 1992; 58: 2296-2302.
22. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265-275.
23. Fukushima M, Kimura S. Studies on cosmetic ingredients from crude drugs.I. Inhibition of tyrosinase activity by crude drugs, *Shoyakugaku Zasshi.* 1989; 43: 142-147.
24. Kusumoto IT, Hattori M, Miyaichi Y, Tomimori T, Hanaoka M, Namba T. Effects of flavonoids and alkaloids on reverse transcriptase, *Shoyakugaku Zasshi.* 1991; 45: 240-250.