

Protoberberine 알칼로이드가 PC12 세포중의 L-DOPA 유도 세포독성 작용에 미치는 영향[#]

이재준 · 김유미 · 김춘매 · 양유정 · 강민희 · 이명구[#]

충북대학교 약학대학, 생물건강산업개발연구센터

(Received July 23, 2003; Revised August 18, 2003)

Effects of Protoberberine Alkaloids on L-DOPA-Induced Cytotoxicity in PC12 Cells

Jae Joon Lee, Yu Mi Kim, 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

Abstract — Previously, protoberberine alkaloids such as berberine and palmatine have been found to lower dopamine content in PC12 cells (Shin *et al.*, 2000). In this study, the effects of berberine and palmatine on L-DOPA-induced increase in dopamine level and cytotoxicity in PC12 cells were investigated. Treatment of PC12 with L-DOPA at concentration ranges of 20~50 μM increased dopamine content and the increase in dopamine levels by L-DOPA was inhibited by 10~40 μM berberine and 10~80 μM palmatine, which the concentration ranges did not show a cytotoxicity. However, berberine and palmatine at concentrations higher than 50 μM and 100 μM caused a cytotoxicity, respectively. In addition, berberine (10~20 μM) and palmatine (10~50 μM) at non-cytotoxic concentration ranges aggravated L-DOPA-induced cytotoxicity in PC12 cells (L-DOPA concentration ranges, 20~50 μM). The L-DOPA-induced cytotoxicity was also significantly potentiated by berberine (50 μM) and palmatine (100 μM) with cytotoxic ranges. These data demonstrate that berberine and palmatine inhibit L-DOPA-induced increase in dopamine content and stimulate L-DOPA-induced neurotoxicity. Therefore, the possibility that the long-term L-DOPA treated patients with berberine and palmatine could be checked the adverse symptoms.

Keywords □ berberine, palmatine, L-DOPA-induced cytotoxicity, PC12 cells

Berberine 및 palmatine은 protoberberine isoquinoline 알카로이드에 속하는 화합물로써, 황련(*Coptis japonica* M., Ranunculaceae)의 근경에 함유된 주성분이며¹⁾ 황련은 berberine 및 palmatine 이외에 jatrorrhizine, coptisine 등을 함유하고 있다. Berberine은 항균,²⁾ 항고혈압,³⁾ 항궤양,⁴⁾ 중추억제⁵⁾ 작용 등이 알려져 있으며 임상에서는 정장제, 안신약 제제에 함유되어 있으며, palmatine은 항염, 진통, 항malaria, 진정 작용, 중추신경 억제작용이 있음이 보고되고 있다.¹⁾

Catecholamines은 dopamine, norepinephrine 및 epinephrine 을 말하며, 고혈압, 심장병 등의 순환기질환, 파킨슨씨 질환, 노인성 치매 등의 신경질환, 정신분열증, 우울병 등의 정신질환 등의 광범위한 질환과 관련이 있으며, ACTH, glucocorticoids 등과 함께 스트레스 등의 생체방어에 중요한 신경전달물질 또는 호르몬이다.

Berberine에 의한 항고혈압작용은 α-adrenoreceptor 효능작용과 유사함이 보고되었으나,³⁾ berberine은 수용체 결합시험(binding assay)에서는 길항작용이 보고되었다.⁶⁾ Berberine과 palmatine은 PC12 세포중의 dopamine 함량의 감소작용이 있으며, 이는 부분적으로 catecholamine 생합성 효소인 tyrosine hydroxylase(TH, EC 1.14.16.2)의 활성 저해작용에 의한 것으로 밝혀졌다.⁷⁻⁸⁾ 또한, 소부신의 TH를 이용한 효소 화학적인 연구에서는 berberine과 palmatine은 상경적 저해작용⁹⁻¹¹⁾을 나타내고 있음이 보고되었다. 이 결과들은 berberine과 palmatine이 부분적으로 catecholamine 생합성 저해작용을 가지고 있음을 나타낸 것으로 사료된다.

L-DOPA는 파킨슨씨 질환 환자의 증상을 치료하는데 가장 많이 선택되고 있으며, 투여된 L-DOPA는 뇌중으로 이행하여 aromatic L-amino acid decarboxylase(AADC, EC 4.1.1.28)에 의하여 dopamine으로 변환되어 약리작용을 나타내고 있다. 그러나, 장기적인 L-DOPA 요법 파킨슨씨 질환 환자는 dopamine 함량이 증가하여, dopamine 2분자의 축합반응에 의한 tetrahydro-papaveroline과 같은 isoquinoline 유도체가 생성되고 있으며, 이 화합물들은 신경독성 작용을 포함한 다양한 생리활성을 일으키

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

는 것으로 보고되고 있다.¹²⁻¹⁴⁾ 또한, L-DOPA 투여로 인하여 파킨슨증 환자의 증후가 더욱 악화될 수 있으며, L-DOPA의 독성(작용) dopamine 신경계를 손상시킨다고 보고되고 있다.^{15,16)}

PC12 세포는 rat의 부신 pheochromocytoma에서 유래한 것으로 catecholamine을 생합성, 저장, 분비하며, TH를 생합성한다.¹⁷⁾ 또한 신경세포의 분화 및 신경 세포 독성작용 등의 연구 모델로 이용되고 있다.¹⁵⁾

그러므로, 본 연구에서는 isoquinoline 화합물 중 dopamine 생합성 저해작용을 나타낸 berberine과 palmatine을 이용하여 PC12 세포중의 L-DOPA-유도 dopamine 증가작용 및 세포독성 작용에 미치는 영향에 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)로부터, DL-6-methyl-5,6,7,8-tetrahydropterine, catalase, isoproterenol, alumina 및 3,4-dihydroxybenzylamine은 Sigma(St Louis, MO, 미국)로부터 구입하였다. 그 밖의 시약은 특급 및 HPLC 용 등급을 사용하였다.

PC12 세포의 배양 및 protobberberine의 전처치

PC12 세포의 배양은 상법에 준하였다.^{17,18)} 배지는 10% HS, 5% FBS 및 penicillin/streptomycin을 포함한 RPMI 1640을 사용하여 37°C, CO₂ 배양기(5%)에서 배양하였다. PC12 세포(cell density 2~5×10⁴ cells/cm²)를 48시간 배양한 다음, 이 세포(1×10⁵ cells/cm²)에 berberine과 palmatine(10~100 μM)을 가하고 48시간 배양하였다. 상동액을 경사하여 얻은 pellet은 -70°C에서 보관하며, dopamine 함량 측정 시료로 하였다.

Dopamine 함량 측정

PC12 세포 및 배지중의 dopamine 함량의 측정은 Mitsui 등¹⁹⁾ 및 Lee 등²⁰⁾의 방법을 보정하여 사용하였다. 각 시료용액에 perchloric acid(1 M, 300 μl) 및 isoproterenol(0.2 nmol/ml, 100 μl, 1회부표준)을 가한 다음 원심분리 하였다. 상동액을 Toyopak IC-E P M cartridge(Na⁺ form, Toso, Tokyo, 일본)를 사용하여 전처리하고, 용출액에 1,2-diphenylethylenediamine을 가하여 형광-수도체화 반응을 시킨 다음, 최종 반응액 100 μl을 HPLC-형광 측정기(Toso)에 주입하였다. HPLC의 조건은 Lee 등²⁰⁾의 방법에 준하여 사용하였다.

L-DOPA-유도 세포독성 측정

세포독성은 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenylte-

trazolium bromide] 시약을 이용하여 세포생존율(cell viability)을 측정하는 Mosmann 방법(1983)을 변형하여 사용하였다.²¹⁾ PC12 세포(1×10⁵ cells/ml)를 96 well microplate에 넣은 후 48시간 배양한 다음, 새로운 배지로 바꾸어 주고, 이 세포에 berberine(10, 20, 50 μM)과 palmatine(10, 50, 100 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 formazan^o 용출 되도록 하여 흡광도를 Microplate reader(Molecular devices, Spectra Max plus, 미국)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 법²²⁾에 의하여 측정하였다. 실험결과는 mean±SEM으로 표시하였으며, 유의성 검정은 ANOVA test에 의하여 계산하였다.

결과 및 고찰

Berberine과 palmatine은 protobberberine 알카로이드 계열 화합물로서(Fig. 1), dopamine 생합성 조절작용을 나타내고 있음이 보고되었다.⁵⁻⁶⁾ Berberine과 palmatine을 PC12 세포에 전처치 하였을 때 dopamine 함량은 대조군에 비하여 농도 의존적으로 감소하였으며(20 μM 전처치에 의하여 53.7%와 61.0%의 저해작용을 나타냄), IC₅₀ 값은 각각 18.6 μM과 7.9 μM이었다.⁷⁾ 이러한 berberine 및 palmatine의 dopamine 생합성 저해작용은 TH 활성 저해작용에 의한 것으로 밝혀졌다.⁷⁾ 본 연구에서는 berberine과 palmatine을 사용하여 PC12 세포내의 L-DOPA-유도 dopamine 증가 작용 및 L-DOPA-유도 세포독성에 미치는 영향에 대하여 검토하여 장기간 L-DOPA 요법 환자에 미치는 영향에 대하여 고찰하였다.

PC12 세포중에 L-DOPA(20~50 μM)을 전처치(48시간)하면 세포내의 dopamine 함량은 증가하며(125~140%)(Fig. 2), 이러한 증가작용은 파킨슨씨 질환 환자에 대한 L-DOPA 요법과 관련한 연구의 모델로 이용되고 있다.¹⁵⁾ 그리고, berberine과 palmatine은 PC12 세포중에 각각 40 μM 및 80 μM까지의 농도범위, 전처치 48시간에서는 세포독성을 나타내지 않았으나,⁷⁾ berberine

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Berberine	O-CH ₂ -O		OCH ₃	OCH ₃
Palmatine	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃

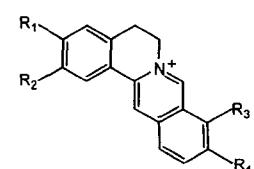


Fig. 1 – Structures of berberine and palmatine.

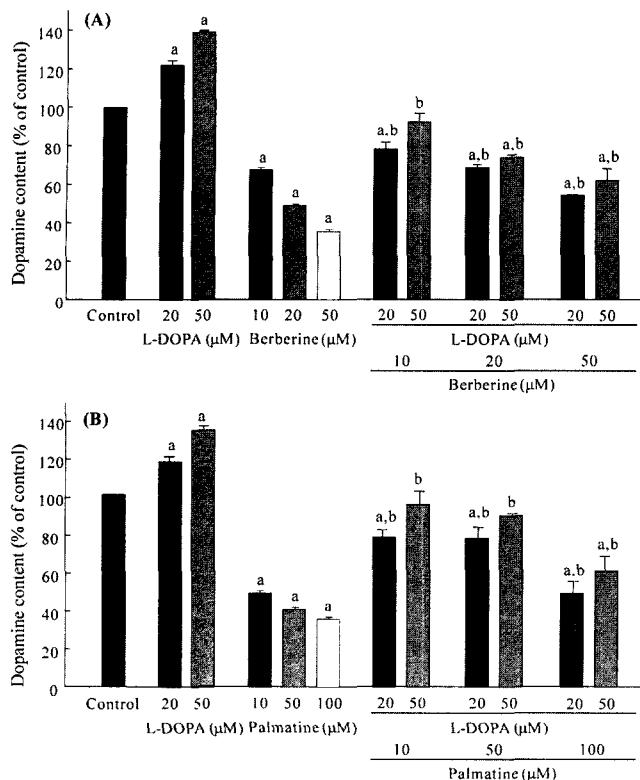


Fig. 2 – Inhibitory effects of berberine (A) and palmatine (B) on the increase in dopamine content induced by L-DOPA treatments in PC12 cells. PC12 cells were treated with berberine (10, 20 and 50 μM) and palmatine (10, 50 and 100 μM) in the presence or absence L-DOPA (20 and 50 μM) for 48 hr. The control value of dopamine content was 3.60 ± 0.31 nmol/mg protein. Results represent the mean \pm SEM of 5 dishes. a, p<0.05 compared with control; b, p<0.05 compared with the corresponding L-DOPA concentrations.

50 μM과 palmatine 100 μM 이상에서는 세포독성을 유발하였다 (Fig. 3).⁷⁾

PC12 세포중의 L-DOPA에 의한 dopamine 증가작용은 비세포독성 농도범위의 berberine(10~20 μM) 및 palmatine(10~50 μM)과 L-DOPA(20~50 μM)와의 각각 병용 처리에 의하여 L-DOPA 단독 처리군 보다 저해되었다 (Fig. 2). 이러한 berberine 및 palmatine에 의한 L-DOPA-유도 dopamine 함량증가의 감소작용에는 TH 활성의 저해작용이 관여한 것으로 사료된다.⁷⁾ 또한, 독성 농도인 berberine 50 μM 및 palmatine 100 μM을 L-DOPA(20~50 μM)와 병용 처리하였을 경우, PC12 세포중의 dopamine 함량작용이 현저하게 나타났다 (Fig. 2).

장기적인 L-DOPA 요법 파킨슨씨 질환 환자는 dopamine 함량이 증가하며, dopamine 및 그의 대사산물 사이의 축합반응에 의하여 isoquinoline 유도체인 tetrahydropapaveroline과 salsolinol 등이 생성되며,¹²⁻¹⁴⁾ 이 화합물을 포함한 tetrahydroisoquinoline 유도체 및 isoquinoline 알카로이드 유도체들은 신경독성 작용을

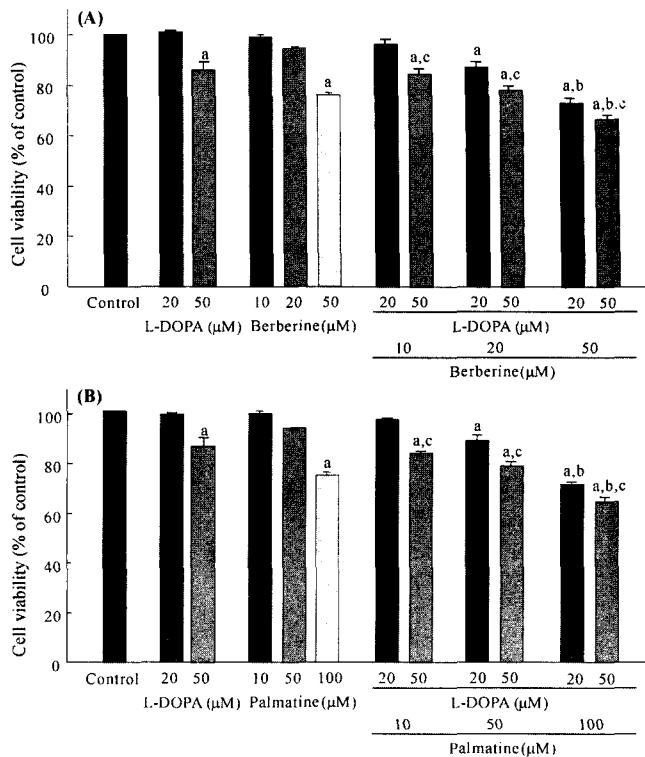


Fig. 3 – Enhancing effects of berberine (A) and palmatine (B) on L-DOPA-induced decrease in PC12 cell viability. PC12 cells in culture were incubated in the absence or presence of L-DOPA (20 and 50 μM) associated with berberine (10, 20 and 50 μM) and palmatine (10, 50 and 100 μM) for 48 hr. Cell viability was assessed using MTT methods, in which viable cells convert the soluble dye MTT to insoluble blue formazan crystals. The results represent the means \pm SEM of five experiments performed in triplicate. a, p<0.05 compared with the control; b, p<0.05 compared with the corresponding L-DOPA concentrations; c, p<0.05 compared with the corresponding berberine or palmatine concentrations.

나타내고 있음이 보고되고 있다.¹²⁻¹⁴⁾ 또한, 고농도의 L-DOPA를 PC12 세포중에 처리하였을 경우 oxidative stress에 의하여 세포독성을 나타낸다.²³⁾ 본 연구에서도 L-DOPA 20 μM의 48시간 전 처리에서는 PC12 세포의 생존율에 영향을 미치지 않았으나, 50 μM 이상에서는 현저한 세포독성을 나타내었다 (Fig. 3).

따라서, berberine과 palmatine이 PC12 세포내 L-DOPA-유도 세포독성 작용에 대하여 검토하였다. PC12 세포내에 비독성 농도범위의 berberine(10~20 μM) (Fig. 3A) 및 palmatine(10~50 μM) (Fig. 3B)을 L-DOPA(20~50 μM)와 각각 병용 처리하였을 경우, berberine 및 palmatine은 L-DOPA-유도 세포독성 작용에 대하여 미약한 세포독성의 증가작용을 나타내었으며, 이러한 세포독성 증가작용은 세포독성 농도범위의 berberine(50 μM) 및 palmatine(100 μM)을 L-DOPA(20~50 μM)와 병용 처리시하였을 경우 현저히 증가하였다 (Fig. 3A 및 3B). 그리고, 이러한

berberine 및 palmatine의 세포독성 작용은 다른 isoquinoline 화합물인 tetrahydropapaveroline 및 salsolinol 등¹²⁻¹⁴⁾에서 나타난 것처럼 세포내의 apoptosis 유도작용에 의한 것으로 사료된다.

이 연구의 결과에 의하면, protobberine 알칼로이드인 berberine 및 palmatine은 PC12 세포중의 L-DOPA 유도에 의한 dopamine 함량 증가의 저해작용 및 L-DOPA 유도에 의한 신경 독성이 증가작용을 야기 시킬 수 있는 것으로 사료된다. 또한, 본 연구의 결과는 파킨슨씨 질환 환자에게 장기간 L-DOPA 요법을 실시한 경우 berberine과 palmatine을 병용 투여시 dopamine 함량 감소 작용 및 신경 독성 유도작용이 나타날 수 있는 가능성 을 제시하고 있다.

감사의 말씀

본 연구는 과학기술부·한국과학재단 지원 생물건강산업개발 연구 세트(RRC)의 연구비 지원으로 수행되었음.

문 헌

- 1) Tang, W. and Eisenbrand, G. : *Chinese drugs of plant origin*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, p. 362 (1992).
- 2) Franzblau, S. G. and Cross, C. : Comparative *in vitro* anti-microbial activity of chinese medicinal herbs. *J. Ethnopharmacol.* 15, 279 (1986).
- 3) Chen, H. G. and Hsieh, M. T. : Two-year experience with "San-Huang-Hsia-Tang" in essential hypertension. *Am. J. Chin. Med.* 14, 51 (1986).
- 4) Takase, H., Imanishi, K., Miura, O. and Yumioka, E. : A possible mechanism for the gastric mucosal protection by OREN-GEDOKU-TO (OGT), A traditional herbal medicine. *Jpn. J. Pharmacol.* 51, 17 (1987).
- 5) Yamahara, J. : Behavioral pharmacology of berberine-type alkaloids (1), Central depressive action of Coptis Rhizoma and its constituents. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 72, 899 (1976).
- 6) Oelmez, E. and Ilhan, M. : Evaluation of the α -adrenoceptor antagonistic action of berberine in isolated organs. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 42, 1095 (1992).
- 7) Shin, J. S., Kim, E. I., Kai, M. and Lee, M. K. : Inhibition of dopamine biosynthesis by protobberine alkaloids in PC12 cells. *Neurochem. Res.* 25, 363 (2000).
- 8) Shin, J. S., Lee, S. S. and Lee, M. K. : Inhibitory effects of reserpine on dopamine biosynthesis in PC12 cells. *Arch. Pharm. Res.* 20, 510 (1997).
- 9) Lee, M. K. and Zhang, Y. H. : Inhibition of tyrosine hydroxylase by berberine. *Med. Sci. Res.* 24, 561 (1996).
- 10) Lee, M. K., Zhang, Y. H. and Kim, H. S. : Inhibition of tyrosine hydroxylase by palmatine. *Arch. Pharm. Res.* 19, 258 (1996).

- 11) 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).
- 12) McNaught, K. St. P., Carrupt, P. A., Altmore, 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).
- 13) Lee, J. J., Kim, Y. M., Yin, S. Y., Park, H. D., Kang, M. H., Hong, J. T. and Lee, M. K. : Tetrahydropapaveroline aggravates L-DOPA-induced neurotoxicity in PC12 cells. *Biochem. Pharmacol.* in press (2003).
- 14) 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).
- 15) Itano, Y., Kitamura, Y. and Nomura, Y. : 1-Methyl-4-phenylpyridium (MPP⁺)-induced cell death in PC12 cells: inhibitory effects of several drugs. *Neurochem. Int.* 25, 419 (1994).
- 16) Basma, A. N., Morris, E. J., Nicklas, W. J. and Geller, H. M. : L-DOPA cytotoxicity to PC12 cells in culture is via its autoxidation. *J. Neurochem.* 64, 825 (1995).
- 17) Greene, L. A. and Rein, G. : Short-term regulation of catecholamine biosynthesis in nerve growth factor responsive clonal line of rat pheochromocytoma cells. *J. Neurochem.* 30, 549 (1977).
- 18) 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).
- 19) 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 (1984).
- 20) Lee, M. K., Nohta, H. and 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.* 378, 329 (1986).
- 21) Mosmann, T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* 65, 55 (1983).
- 22) 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).
- 23) Micheli, R., Godani, C., Bciola, L., Delodu, M. R., Serra, P. A., Zangani, D., Natale, G. D., Miele, E. and Desole, M. S. : Enhancing effect of manganese on L-DOPA-induced apoptosis in PC12 cells: role of oxidative stress. *J. Neurochem.* 73, 1155 (1999).