

Evodiamine의 Monoamine Oxidase 활성 저해작용

이상선 · 황방연 · 노재섭 · 이명구*

충북대학교 약학대학

Inhibition of Monoamine Oxidase by Evodiamine

Sang Seon Lee, Bang Yeon Hwang, Jai Seup Ro, and Myung Koo Lee*

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

Abstract – The effects of evodiamine on monoamine oxidase (MAO) activity were investigated. MAO was purified from mouse brain and the K_m and V_{max} values of MAO were $78.5 \pm 5.28 \mu\text{M}$ and $0.68 \pm 0.07 \text{ nmol/min/mg protein}$, respectively ($n=4$). Evodiamine at 30-120 μM showed an inhibitory effect on MAO activity using a substrate kynuramine with an IC_{50} value of 104.2 μM ($n=4$). Evodiamine also exhibited a non-competitive inhibition on MAO. The K_i value for evodiamine was $72.5 \pm 10.8 \mu\text{M}$ ($n=4$). These results suggest that evodiamine partially contributes to the regulation of monoamine content.

Key words – evodiamine, monoamine oxidase, mouse brain, kynuramine, non-competitive inhibition

Evodiamine은 오수유(*Evodia rutaecarpa*, Rutaceae)의 열매에 함유되어 있는 알카로이드이다. 오수유는 두통, 복부 통증, 편두통, 이질, 분만 후 출혈, 무월경, 사지오한 등에 전통적으로 사용되어 왔다.^{1,2)} Evodiamine은 양성변력효과(기니피크), 항염증작용(NO 생성), 전립선암세포주(LNCaP)의 증식저해작용, 해면체(가토) 이완작용 등이 보고되고 있다.³⁻⁵⁾

Monoamine oxidase(EC, 1.4.3.4; MAO)는 세포내의 미토콘드리아 외막에 존재하여, monoamine 계열 신경전달물질인 catecholamines(dopamine, norepinephrine 및 epinephrine) 및 serotonin(5-hydroxytryptamine) 등을 불활성화시키는 FAD 함유효소이다.⁶⁾ 중추성 MAO의 활성은 우울증(depression) 등의 정신질환과, 말초에서는 고혈압(hypertension) 등의 질환과 관련이 되어 있다. MAO는 기질 및 저해제의 특이성에 따라 A 및 B type(MAO-A 및 MAO-B)으로 분류된다.⁷⁾ MAO-A 및 -B는 iproniazid, nialamide, phenelzine 등에 의하여 저해된다.⁸⁾ MAO-A는 clorgyline, harmine, harmaline 등에 의하여 저해되며,⁹⁾ MAO-B는 deprenyl, pargyline 등에 의하여 비가역적으로, imipramine, amitriptyline 등에 의하여 가역적으로 저해된다.¹⁰⁾ MAO 저해제는 뇌중 dopamine 함량을 상승시키고 L-DOPA로부터 생합성된 dopamine의 약리작용을 증대시키며,¹¹⁾ 우울증, 알코올중독증(alcoholism),

정신분열증(schizophrenia) 등의 병인으로 비정상적인 MAO 활성이 작용할 수 있다고 생각되고 있다.^{12,13)}

천연물 또는 대사산물로부터 MAO 활성 저해작용을 가진 화합물로는 salsolinol 계열 화합물,¹⁴⁾ pyridine 계열 화합물,¹⁵⁾ isoquinoline 계열 화합물,¹⁶⁾ bifemelane¹⁷⁾ 등이 보고되었다. MAO 활성 저해작용을 가진 화합물은 화학구조면에서 고찰하면 isoquinoline, quinoline 및 catechol 계열 화합물^{14,18)}과 indole 및 isatin 유도체¹⁹⁾ 등이다. 또한, 천연물중에서 얻은 isoquinoline 계열 화합물(protoberberine, ethaverine, higenamine 등)이 MAO 저해작용을 나타내고 있음을 보고하였다.²⁰⁻²⁴⁾

본 연구에서는 isoquinoline 및 indole 화합물의 monoamine oxidase 활성 저해작용을 검색하는 과정에서, evodiamine이, 그의 다양한 생리활성 작용이외에, MAO 활성 저해작용을 나타내어 이에 대한 작용기전을 진행하였다. 효소 MAO는 mouse의 뇌로부터 부분 정제하여 사용하였으며,¹⁷⁾ MAO 활성은 기질 kynuramine을 사용하여 측정하였다.^{17,20-24)}

재료 및 방법

실험재료 – Kynuramine, 4-hydroxyquinoline은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였으며, 그 이외의 시약은 특급을 사용하였다. Evodiamine은 충북대학

*교신저자(E-mail) : myklee@chungbuk.ac.kr
(FAX) : 043-276-2754

교 약학대학 생약학교실에서 분리하였으며 기증받아 사용하였다.

MAO 효소원의 부분정제 - MAO 시료는 Naoi의 방법에 준하여 부분 정제하였다.¹⁷⁾ Mouse를 단두하고 뇌를 분리하여 세절한 후(8.8 g), 10 mM potassium phosphate 완충액을 함유한 0.25 M sucrose 용액(pH 7.4)을 가하여 균질화시켰다. Homogenate를 1,200×g로 5분간 원심분리하여 얻은 상등액을 다시 16,000×g로 20분간 원심분리한 다음, 침전의 pellet에 대하여 농도가 100-300 mg/ml가 되도록 10 mM sodium phosphate 완충액(pH 7.4)을 넣고 현탁시킨 다음 MAO 효소원으로 하였다. MAO 효소원은 -20°C에 보관하였으며, 단백질 함량은 표준 소혈청 albumin을 사용하여 Lowry 등의 방법²⁵⁾으로 측정하였다.

MAO 활성 측정 - MAO의 활성은 Kraml의 방법에 준하여 측정하였다.^{17,20)} 반응용기에 0.2 M potassium phosphate 완충액(pH 7.4) 720 µl, 효소원 30 µl, 시료 MeOH 엑스 50 µl를 넣고 37°C에서 5분간 방치하였다. Kynuramine(500 µM, 200 µl)을 가하여 효소반응을 진행시키고 30분후 10% ZnSO₄ 250 µl와 1 N NaOH 50 µl를 가하여 종결하였다. 반응액을 3,000×g로 5분간 원심분리하고 상등액 700 µl에 1 N NaOH 1.4 ml를 가한 다음, 반응생성물 4-hydroxyquinoline의 농도를 형광광도계(Model F-3000, Hitachi, Tokyo, 일본) (λ_{ex}/λ_{em} : 315 nm/380 nm)로 측정하고, 이를 표준곡선을 사용, 정량하여 MAO 활성을 측정하였다. K_m 및 V_{max} 값은 Lineweaver-Burk 법으로 계산하였다.

통계처리 - 실험결과는 means±SEM으로 나타내었으며, 시료에 의한 효과는 Student' t-test를 사용하여 유의차 검정을 하였다.

결과 및 고찰

MAO는 mouse brain을 사용하여 부분정제 하였으며, 실험에 사용된 대조군 MAO의 활성은 0.321±0.015 nmol/min/mg protein이 되도록 조정하여 사용하였다. 또한, 대조군 MAO는 K_m 및 V_{max}의 값은 각각 78.5±5.28 µM 및 0.68±0.07 nmol/min/mg protein이었다(n=4).

Evodiamine은 30-120 µM 범위에서 유의적으로 MAO 활성 저해작용을 나타내었으며(60 µM에서 42.7%의 저해작용을 나타냄), 양성대조군 iproniazid에 비하여 미약한 저해작용을 나타내었다. Evodiamine의 IC₅₀ 값은 104.2 µM이었다(Table I). 또한, evodiamine은 Lineweaver-Burk 방법에 의하여 검토한 결과 비상경적 저해작용(non-competitive inhibition)을 나타내었으며(Fig. 1), 저해상수 K_i 값은 72.5±10.8 µM이었다(n=4).

Evodiamine이 MAO-A 및 -B에 대한 저해작용을 검토한 결과로부터 MAO-A(저해제 deprenyl 사용) 및 MAO-B(저

Table I. Effects of evodiamine on monoamine oxidase (MAO) in mouse brain.

Compounds	MAO activity (nmol/min/mg protein) (% of control)	IC ₅₀ value (µM)
Control	0.321±0.015 (100)	
Iproniazid 10 µM	0.163±0.016 (50.8)**	13.1
Iproniazid 20 µM	0.125±0.013 (38.9)***	
Evodiamine 30 µM	0.240±0.010 (74.8)*	104.2
Evodiamine 60 µM	0.184±0.008 (57.3)**	
Evodiamine 120 µM	0.152±0.011 (47.4)**	

The control of MAO activity, 0.321 nmol/min/mg protein, was taken as 100. Iproniazid was used as the positive control. The data are expressed as means±SEM of five experiments. As compared with control value: *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001 (Student's t-test).

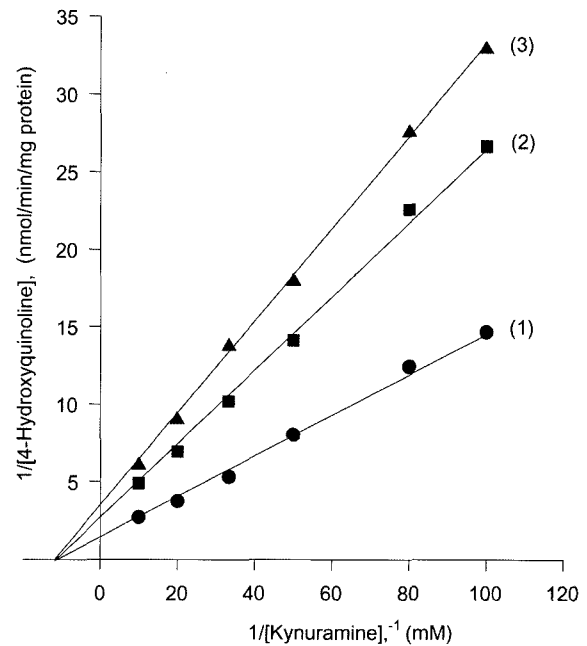


Fig. 1. Inhibition of MAO by evodiamine added in the enzyme reaction mixture. The data were plotted by linear regression analysis. Evodiamine concentrations (µM): 1, 0; 2, 50; 3, 100.

해제 clorgyline 사용)에 대한 IC₅₀ 값은 각각 98.5±7.8 µM 및 112.6±12.1 µM을 나타내어 MAO-A 및 MAO-B에 대한 저해작용의 특이성을 나타내지 않았다. 그러므로 evodiamine은 MAO 저해작용을 가지고 있는 것으로 사료된다. 또한, 오수유(*E. rutaecarpa*)에서 분리한 quinolone 화합물은 MAO-B에 대하여 비가역적이며 상경적인 저해작용(IC₅₀ 값, 15.3 µM; K_i 값, 9.91 µM)이 있음을 보고하였으며,²⁶⁾ 이는 evodiamine에 비하여 강한 저해작용을 나타내었다. 따라

서 오수유(*E. rutaecarpa*)는 진통작용 등 다양한 생리활성 이외에 MAO 저해작용이 있음을 나타내고 있다.

MAO 활성의 저해작용은 소수성 부위(hydrophobic region), 친핵성 위치(nucleophilic locus) 및 친전자성 군(electrophilic group)이 결합부위에 필요하다고 제안되었다.²⁷⁾ Evodiamine은 소수성 부위(-CH₃) 및 친핵성 위치(indole ring)를 가지고 있으며, 이 부위가 MAO 활성 저해작용에 관여하고 있을 것으로 사료된다.

천연물 중에서 isoquinoline 알카로이드인 protoberberine,²⁸⁾ higenamine²⁹⁾ 및 ethaverine³⁰⁾ 등은 PC12 세포 중의 dopamine 생합성 저해작용을 가지고 있음이 보고되었다(IC₅₀ 값, 7.9-18.6 μM). 또한 protoberberine,^{21,22)} higenamine 및 ethaverine^{23,24)} 알카로이드 등은 선택적 MAO 활성 저해작용(IC₅₀ 값, 10-150 μM)을 나타내고 있으며, 이중 coptisine은 선택적인 MAO-A 저해제(IC₅₀ 값, 1.8 μM)이며,²²⁾ ethaverine은 MAO-B 저해제(IC₅₀ 값, 32.8 μM)임을 보고하였다.²⁴⁾ 이 결과들은 상기의 isoquinoline 화합물은 PC12 세포내 dopamine 생합성 저해작용에서 보다 더 큰 친화력을 나타낸 것임을 의미한다. 그러나 evodiamine은 PC12 세포중의 미약한 dopamine 생합성 저해작용을 나타내었으며(IC₅₀ 값, 98.1 μM)(미 발표 자료), 이는 MAO 저해작용과 유사한 친화력을 가지고 있음을 의미하고 있다. 따라서 evodiamine은 indole 계열 화합물로서 isoquinoline 또는 quinolone 계열 화합물에 비하여 MAO 활성 저해작용은 미약한 것으로 나타났으며, evodiamine을 포함한 알카로이드에 대한 dopamine 생합성 및 대사효소에 대한 친화력 및 기전에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

본 연구에 의하면, evodiamine은 MAO 활성 저해작용을 가지고 있으며, 주성분으로 evodiamine 및 quinolone을 함유하고 있는 오수유(*E. rutaecarpa*)는 monoamine 함량 조절작용이 있음을 나타내고 있다. MAO-A 저해제는 항우울제 또는 항스트레스제의 개발에 응용되며, MAO-B 저해제는 파킨슨병과 같은 신경계 질환에 응용되고 있다.¹¹⁻¹³⁾ 따라서 오수유(*E. rutaecarpa*)의 MAO 활성 저해작용을 응용한 *in vivo* 생리학적 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 생물건강산업개발연구센터(산업자원부)(2004-2005)의 연구비 지원으로 수행되었으며, 이에 감사를 드립니다.

인용문헌

- Hu, C. P. and Li, Y. J. (2003) Research progress in pharmacological actions of evodiamine and rutaecarpine. *Chem. Pharm. Bull.* **10**: 1084-1087.
- Dai, Y. Y., Liu, B. I. and Dou, C. G. (2003) The pharmacological improvements of Evodia and its active components. *J. Chin. Med. Mater.* **4**: 295-298.
- Shoji, N., Umeyama, A., Takemoto, T., Kajiwar, A., Ohizumi, Y. (1986) Isolation of evodiamine, a powerful cardiotoxic principle, from *Evodia rutaecarpa* Benthann (Rutaceae). *J. Pharmaceut. Sci.* **75**: 612-613.
- Kan, S. F., Huang, W. L., Lin, L. C. and Wang, P. S. (2004) Inhibitory effects of evodiamine on the growth of human prostate cancer cell line LNCaP. *Int. J. Cancer* **110**: 641-651.
- Shyu, K. G., Lin, S., Lee, C. C., Chen, E., Lin, L. C., Wang, B. W. and Tsai, S. C. (2006) Evodiamine inhibits *in vitro* angiogenesis: Implication for antitumorigenicity. *Life Sci.* **78**: 2234-2243.
- Nagatsu, T., Yamamoto, T. and Harada, M. (1970) Purification and properties of human brain mitochondrial monoamine oxidase. *Enzymologia* **39**: 15-25.
- Fowler, C. J., Ekstedt, B., Egashira, T., Kinemuchi, H. and Oreland, L. (1979) The interaction between human platelet monoamine oxidase, its monoamine substrates and oxygen. *Biochem. Pharmacol.* **28**: 3063-3068.
- Houslay, M. D. and Tipton, K. F. (1976) Multiple forms of monoamine oxidase : fact and artefact. *Life Sci.* **19**: 467-478.
- Donnelly, C. H. and Murphy, D. L. (1977) Substrate- and inhibitor-related characteristics of human platelet monoamine oxidase. *Biochem. Pharmacol.* **26**: 853-858.
- Yang, H. Y. T. and Neff, N. H. (1974) The monoamine oxidases of brain : selective inhibition with drugs and the consequences for the metabolism of the biogenic amines. *J. Pharm. Exp. Ther.* **189**: 733-740.
- Riederer, P. and Youdim, M. B. H. (1986) Monoamine oxidase activity and monoamine metabolism in brains of parkinsonian patients treated with l-deprenyl. *J. Neurochem.* **46**: 1359-1365.
- Naoi, M. and Nagatsu, T. (1986) Quinoline and quinaldine as naturally occurring inhibitors specific for type A monoamine oxidase. *Life Sci.* **40**: 1075-1082.
- Cross, A. J. and Joseph, M. H. (1981) The concurrent estimation of the major monoamine metabolites in human and non-human primate brain by HPLC with fluorescence and electrochemical detection. *Life Sci.* **28**: 499-505.
- Minami, M., Maruyama, W., Dostert, P., Nagatsu, T. and Naoi, M. (1993) Inhibition of type A and B monoamine oxidase by 6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines and their N-methylated derivatives. *J. Neural Transm.* **92**: 125-135.
- Naoi, M. and Nagatsu, T. (1988) Inhibition of type A monoamine oxidase by methylquinolines and structurally related compounds. *J. Neurochem.* **50**: 1105-1110.
- Naoi, M., Matsuura, S., Parvez, H., Takahashi, T., Hirata, Y., Minami, M. and Nagatsu, T. (1989) Oxidation of N-methyl-

- 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline into the N-methyl-isoquinolinium ion by monoamine oxidase. *J. Neurochem.* **52**: 653-655.
17. Naoi, M., Nomura, Y., Ishiki, R., Suzuki, H. and Nagatsu, T. (1988) 4-(O-Benzylphenoxy)-N-methylbutylamine (bifemelane) and other 4-(O-benzylphenoxy)-N-methylalkylamines as new inhibitors of type A and B monoamine oxidase. *J. Neurochem.* **50**: 243-247.
 18. Bembenek, M. E., Abell, C. W., Chrisey, L. A., Rozwadowska, M. D., Gessner, W. and Brossi, A. (1990) Inhibition of monoamine oxidase A and B by simple isoquinoline alkaloids: racemic and optically active 1,2,3,4-tetrahydro-, 3,4-dihydro-, and fully aromatic isoquinolines. *J. Med. Chem.* **33**: 147-152.
 19. Medvedev, A. E., Ivanov, A. S., Kamyshanskaya, N. S., Kirkel, A. Z., Moskvitina, T. A., Gorkin, V. Z., Li, N. Y. and Marshakov, V. (1995) Interaction of indole derivatives with monoamine oxidase A and B. Studies on the structure-inhibitory activity relationship. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **36**: 113-122.
 20. Kraml, M. (1965) A rapid microfluorimetric determination of monoamine oxidase. *Biochem. Pharmacol.* **14**: 1683-1685.
 21. Lee, S. S., Kai, M. and Lee, M. K. (1999) Effects of natural isoquinoline alkaloids on monoamine oxidase activity in mouse brain: inhibition by berberine and palmatine. *Med. Sci. Res.* **27**: 749-751.
 22. Ro, J. S., Lee, S. S., Lee, K. S. and Lee, M. K. (2001) Inhibition of type A monoamine oxidase by coptisine in mouse brain. *Life Sci.* **70**: 639-645.
 23. Lee, S. S., Yun-Choi, H. S., Kim, E. I. and Lee, M. K. (1999) Inhibition of monoamine oxidase by higenamine. *Med. Sci. Res.* **27**: 71-72.
 24. Lee, S. S., Lee, J. J., Cheong, M. J., Kim, Y. H., Kim, Y., Yun, Y. P., Lee, C. K. and Lee, M. K. (2001) Inhibitory effects of ethaverine, a homologue of papaverine, on monoamine oxidase activity in mouse brain. *Biol. Pharm. Bull.* **24**: 838-840.
 25. Lowry, O. H., Rosebough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-267.
 26. Lee, M. K., Hwang, B. Y., Lee, S. A., Oh, G. J., Choi, W. H., Hong, S. S., Lee, K. S. and Ro, J. S. (2003) 1-Methyl-2-undecyl-4(1*H*)-quinolone as an irreversible and selective inhibitor of type B monoamine oxidase. *Chem. Pharm. Bull.* **51**: 409-411.
 27. Severina, I. S. (1979) Mechanism of selective inhibition by clorgyline and deprenyl of the possible nature of its form A and B., in Monoamine oxidase: structure, function and altered functions, ed. by Singer, T. P., Von Korff, R. W. and Murphy, D. L., 169-183, Academic Press, New York.
 28. Shin, J. S., Kim, E. I., Kai, M. and Lee, M. K. (2000) Inhibition of dopamine biosynthesis by protoberberine alkaloids in PC12 cells. *Neurochem. Res.* **25**: 363-368.
 29. Shin, J. S., Yun-Choi, H. S., Kim, E. I. and Lee, M. K. (1999) Inhibitory effects of higenamine on dopamine content in PC12 cells. *Planta Med.* **65**: 452-455.
 30. Shin, J. S., Lee, J. J., Kim, Y., Lee, C. K., Yun, Y. P. and Lee, M. K. (2001) Inhibitory effects of ethaverine, a homologue of papaverine, on dopamine content in PC12 cells. *Biol. Pharm. Bull.* **24**: 103-105.

(2006년 9월 19일 접수)