

## Tributyltin 화합물이 PC12 세포의 Dopamine 생합성 저해작용에 미치는 영향

김유미 · 이재준 · 이명구<sup>#</sup>

충북대학교 약학대학

(Received January 31, 2006; Revised March 25, 2006)

### Inhibitory Effects of Tributyltin Acetate on Dopamine Biosynthesis in PC12 Cells

Yu Mi Kim, Jae Joon Lee and Myung Koo Lee<sup>#</sup>

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

**Abstract** — The effects of tributyltin acetate (TBTA), one of the endocrine-disrupting organotin compounds, on dopamine biosynthesis in PC12 cells were investigated. Treatment of PC12 cells with TBTA at 0.05~0.25  $\mu$ M significantly decreased the intracellular dopamine content in a concentration-dependent manner ( $IC_{50}$  value, 0.17  $\mu$ M). Under these conditions, tyrosine hydroxylase (TH) activity and TH mRNA level were also decreased by 0.1  $\mu$ M TBTA at 24 h, and recovered thereafter. In addition, treatment with L-DOPA at 20 and 50  $\mu$ M increased the intracellular dopamine content in PC12 cells and the increase in dopamine content by L-DOPA was significantly abolished by TBTA at 0.1~0.2  $\mu$ M. These results indicate that TBTA at 0.1~0.2  $\mu$ M causes the decrease in the basal dopamine content and abolishes the increase in dopamine content in L-DOPA-treated cells in part by the inhibition of TH gene expression and activity.

**Keywords** □ tributyltin acetate, dopamine content, tyrosine hydroxylase, PC12 cells

유기 tin 화합물에는 tributyltin acetate(TBTA) 및 tributyltin chloride(TBTC)가 있으며, 다양한 화학반응의 촉매제, 산업 생물 살충제, 염화폴리비닐(polyvinyl chloride) 다중합체의 열안정화제 등으로 널리 사용되고 있다.<sup>1)</sup> 최근 tin 화합물은 환경 및 건강의 위협요소로 내분비 교란 화합물로서 주목을 받고 있으며, 해양 유기체의 발육에 영향을 주는 것으로 간주되고 있다.<sup>2,3)</sup> 해양에서는 미량(ppb 수준)으로 존재하여도 이 화합물은 굴(oyster) 피각의 기형을 일으키며, 복족동물(neogastropods)에서의 생식장해를 일으키고 성장을 감소시킨다.<sup>4,5)</sup> 그러므로 몇몇 국가에서는 해양을 오염시키는 물질로서 보고되고 있다. 해양 오염 tin은 세포사(apoptosis)를 촉진하며,<sup>6,7)</sup> 인간 또는 실험동물에서는 유기 tin 화합물은 발작 및 건망증상을 일으키는 것으로 추측되고 있으나 세포주 모델 또는 포유동물에서의 독성 작용은 완전히 검토되지 않고 있다.

파킨슨병은 선조체-흑질(striatum-substantia nigra)의 dopamine 신경계가 퇴행되어 dopamine의 결핍으로 발생하며, 신경계에서

의 dopamine 생합성은 수산화효소 tyrosine hydroxylase(EC 1.14.16.2; TH, L-tyrosine에서 L-DOPA 생합성 촉매효소) 및 탈탄산효소 aromatic L-amino acid decarboxylase(EC 4.1.1.28; AADC, L-DOPA에서 dopamine 생합성 촉매효소)가 관여하고 있다.<sup>8,9)</sup> 파킨슨병의 약물요법에는 dopamine 보충제/L-DOPA 제제, dopamine 분비 촉진제, dopamine 대사효소 저해제, dopamine 수용체 자극제, 항콜린 제제 등으로 나뉘어 환자의 증상에 따라 조합하여 사용되고 있다.<sup>10)</sup> 이 중에서 L-DOPA 제제가 가장 많이 선택되고 있으며, 투여된 L-DOPA는 뇌중으로 이행하여 AADC에 의하여 dopamine으로 변환되어 악리작용을 나타내고 있다.<sup>11,12)</sup> 장기적인 L-DOPA 요법 파킨슨병 환자는 dopamine 함량이 정상인 보다 증가하며, dopamine의 축합반응에 의하여 isoquinoline 유도체가 생성되고 있다.<sup>12)</sup> 그러나 투여된 L-DOPA의 세포독성 및 병용투여시의 약물상호작용에 의한 L-DOPA-세포독성은 증가할 수 있는 가능성이 보고되고 있다.<sup>13)</sup>

일부 중금속 화합물인 iron(Fe) 및 manganese(Mn)은 PC12 세포중의 L-DOPA-유도 dopamine 함량 증가작용의 저해작용, PC12 세포중의 세포독성(apoptosis)을 일으키고 있음이 보고되었다.<sup>14,15)</sup> 그러므로 세포독성이 예측되는 유기 tin 화합물인 TBTA 및 TBTC에 대하여 PC12 세포에 대한 dopamine 생합성 및 세

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 043-261-2822 (팩스) 043-261-2800  
(E-mail) myklee@chungbuk.ac.kr

포독성 작용에 대한 일련의 연구를 진행하고자 하며, 이중 TBTC가 PC12 세포에 대한 dopamine 생합성 억제 작용은 보고되었다.<sup>16)</sup>

PC12 세포는 백서 부신(rat adrenal pheochromocytoma)에서 유래한 세포주이며, catecholamines를 생합성, 저장, 유리하며 TH, AADC 등의 catecholamine 생합성 효소를 함유하고 있다.<sup>9,17)</sup> PC12 세포에 L-DOPA를 전처리 할 경우 세포내 dopamine 함량은 증가하지만, 고농도의 L-DOPA의 전처리는 산화적 스트레스(oxidative stress)에 의한 세포사(apoptosis)를 일으킨다.<sup>13,15)</sup> 그러므로 PC12 세포는 catecholamines의 기능 및 그의 생합성 효소의 조절작용, 신경세포의 분화 및 chromaffin 세포의 기능, 세포독성 작용 등의 연구의 모델로 이용되고 있다.<sup>17)</sup>

따라서 본 연구에서는 해양오염물질로서 유기 tin 화합물인 TBTA가 인체에 대한 신경독성 여부 및 퇴행성 중추신경계 질환에 미치는 영향을 검토하고자, PC12 세포를 사용하여 TBTA가 dopamine 생합성 과정 및 L-DOPA-유도 dopamine 함량 증가작용에 대한 실험을 수행하였다.

## 실험 방법

### 실험재료

세포배양용 donor horse serum(HS), fetal bovine serum(FBS), penicillin/streptomycin 및 배지(RPMI 1640)는 GIBCO(Grand Island, NY, 미국), TBTA, DL-6-methyl-5,6,7,8-tetrahydropterin, catalase, alumina, 3,4-dihydroxybenzylamine 및 isoproterenol은 Sigma사(St Louis, MO, 미국)에서 구입하였으며, 그 밖의 시약은 특급 및 HPLC용 등급을 사용하였다.

### 세포배양

PC12 세포의 배양은 상법에 준하였다.<sup>17,18)</sup> 세포배양은 10% HS 및 5% FBS, 100 unit/ml penicillin과 100 µg/ml streptomycin을 포함한 RPMI 1640 배양액을 사용하여 조직배양용 dish 상에서 배양하였다. 세포배양은 37°C에서 수증기 포화된 5% CO<sub>2</sub> 배양기를 사용하였다. PC12 세포(cell density ca. 1×10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup>, confluency 40~50%)를 48시간 배양한 다음, TBTA 또는 L-DOPA 화합물을 가한 다음 24~48시간 배양하였다. 배양 후 세포를 harvest하여 원심 분리하여 pellet를 얻고 측정시료로 사용하였다.

### Dopamine 함량 측정

PC12 세포 중의 dopamine 함량은 Mitsui *et al.*<sup>19)</sup> 및 Lee *et al.*의 방법<sup>20)</sup>에 준하여 사용하였다. 시료(200~300 µl)에 trichloroacetic acid(3.0 M, 100 µl) 및 isoproterenol(1 nmol/ml, 100 µl, 내부표준)을 가한 다음 원심 분리하였다. 상정액을 Toyopak SP 카드

리지(Toso, Tokyo, Japan)를 사용하여 전처리한 후, 흡착된 monoamine은 0.6 M KCl-CH<sub>3</sub>CN(1:1, v/v) 혼합액 2 ml를 사용하여 용출시킨다. 용출액에 DPE 시약을 가하여 형광 유도체화한 다음 최종 반응액을 HPLC를 사용하여 dopamine 함량을 측정하였다. HPLC의 조건: column, TSK gel ODS 120T(5 µm, 0.45×15 cm, Toso, Tokyo); 이동상, acetonitrile-methanol-0.1 M NaOAc 완충액(pH 5.0)(50:5:45, v/v); 유속, 1 ml/min; 검출기, F1000 형광검출기(Ex. 350 nm, Em. 475 nm, Hitachi, Tokyo).

### TH 및 AADC 활성 측정

PC12 세포 중의 TH 활성 측정은 Nagatsu *et al.*의 방법<sup>21)</sup>에 준하여 측정하였다. 효소반응액은 NaOAc 완충액(pH 5.8, 1.5 M, 80 µl), catalase(2 mg/ml, 50 µl), L-tyrosine(5.0 mM, 25 µl), DL-6-methyl-5,6,7,8-tetrahydropterin(10 mM, 25 µl) 및 효소시료이며, 37°C 10분간 효소반응 후, alumina 카트리지를 사용하여 전처리한 다음 흡착된 반응 생성물은 HCl(0.5 M, 300 µl)를 사용하여 용출시킨 다음, 용출액 100 µl를 HPLC에 주입하여 L-DOPA의 농도를 정량하여 효소활성을 측정하였다. HPLC의 조건: column, TSK-gel ODS 120T(5 µm, 0.45×15 cm); 이동상, 0.1 M K-PO<sub>4</sub> 완충액(pH 3.1)-1% methanol; 유속, 1 ml/min; 검출기, CM8010 전기화학검출기(0.8 V, Ag/AgCl 전극, Toso). AADC의 활성은 기질 L-DOPA를 사용하여 효소반응에 의하여 생성된 dopamine의 함량을 정량하여 측정하였으며,<sup>20)</sup> dopamine 함량 정량을 위한 HPLC의 분석조건은 상기의 'Dopamine 함량 측정'과 동일하게 처리하였다.

### RNA 추출 및 TH mRNA 함량 분석

PC12 세포 중의 총 RNA의 분리 및 TH mRNA 함량 분석은 Kim *et al.*의 방법<sup>22)</sup>에 준하여 수행하였다. 총 RNA(10 µg)는 전기영동법(0.66 M formaldehyde 함유 1% agarose gel 사용)에 의하여 분리하고, 이중 5 µg RNA를 nylon membrane(ICN, East Hills, NY, 미국; 10× SSC)에 이행시킨 다음, 70°C 1시간 열처리하였다. Gel을 X-ray 필름에 노출한 다음 autoradiography 법(Laser scanning densitometry ultra scan XL, LKB, Bromma, Sweden)으로 정량하였다. TH mRNA 함량 측정을 위한 Northern blot 분석은 0.7 kb rat TH cDNA probe([α-<sup>32</sup>P]dCTP 표식, Random Primer labeling system, DuPont NEN, Boston, MA, 미국)의 coding 부위를 사용하여 hybrid 하여 시행하였다.

### 단백질 함량 측정 및 결과정리

각 항의 생리활성은 각각의 시료중의 단백질 함량을 측정하여 보정하였으며, 단백질 함량은 소혈청 albumin을 사용한 Lowry 법<sup>23)</sup>에 의하여 측정하였다. 실험결과는 mean±SEM으로 표시하

였으며 유의성 검정은 Tukey's test에 의한 ANOVA법에 의하여 계산하였다.

### 실험결과 및 고찰

TBTA가 PC12 세포 내의 dopamine 함량변화에 미치는 영향을 검토한 결과를 Fig. 1A에 나타내었다. TBTA(0.05~0.25  $\mu\text{M}$ )를 PC12 세포 중에 24시간 처리하였을 경우 세포내의 dopamine

함량은 농도 의존적으로 감소하였다(TBTA 0.1  $\mu\text{M}$ 에서 36.3%의 dopamine 함량 감소작용을 나타냄). TBTA의 dopamine 함량 저해작용에 대한  $\text{IC}_{50}$  값은 0.17  $\mu\text{M}$  이며, TBTA 0.3  $\mu\text{M}$  범위까지는 MTT 방법으로 측정하였을 경우 PC12 세포에 대한 세포독성은 인정되지 않았다(자료 미제시). PC12 세포내에서 생합성된 dopamine의 일부는 배지 중으로 분비되지만 TBTA(0.1~0.25  $\mu\text{M}$ ) 처리는 배지 중으로의 dopamine의 분비작용에는 영향을 주지 않았다(자료 미제시). TBTA에 의한 dopamine 함량의

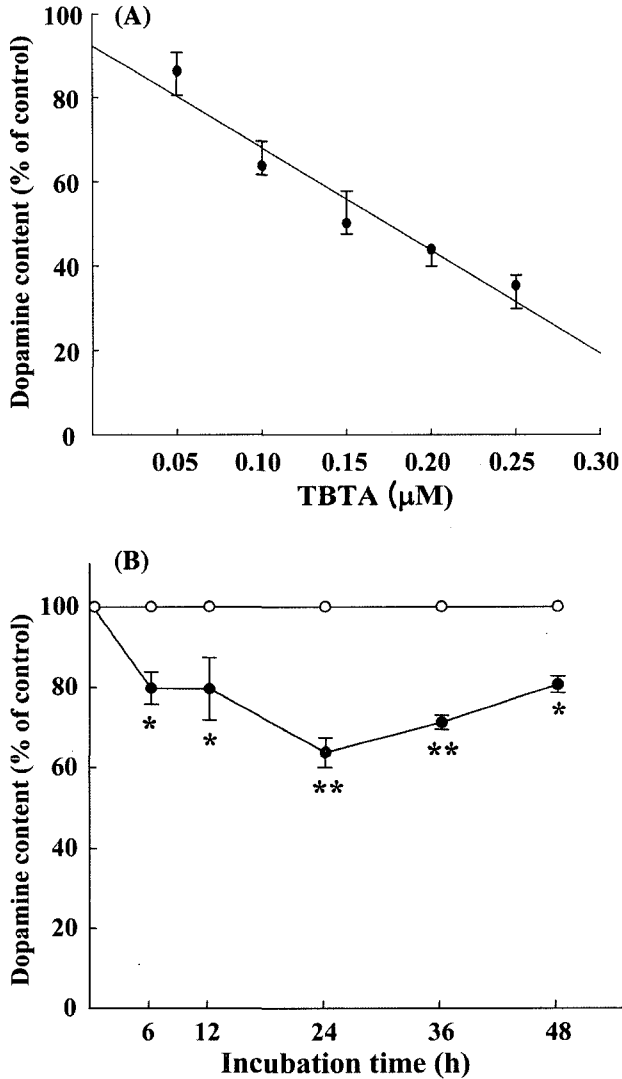


Fig. 1 - Inhibitory effects of tributyltin acetate (TBTA) on dopamine content (A) and time course of dopamine content (B) by TBTA (0.1  $\mu\text{M}$ ) in PC12 cells. PC12 cells were treated with TBTA and incubated at 37°C for 24 h. PC12 cells were harvested with phosphate buffered saline and dopamine content was measured by an HPLC method. Dopamine content was  $3.43 \pm 0.25$  nmol/mg protein. Results represent the means  $\pm$  SEM of 4~5 dishes. Significantly different from the control value: \*,  $p < 0.05$  (ANOVA followed by Tukey's test).

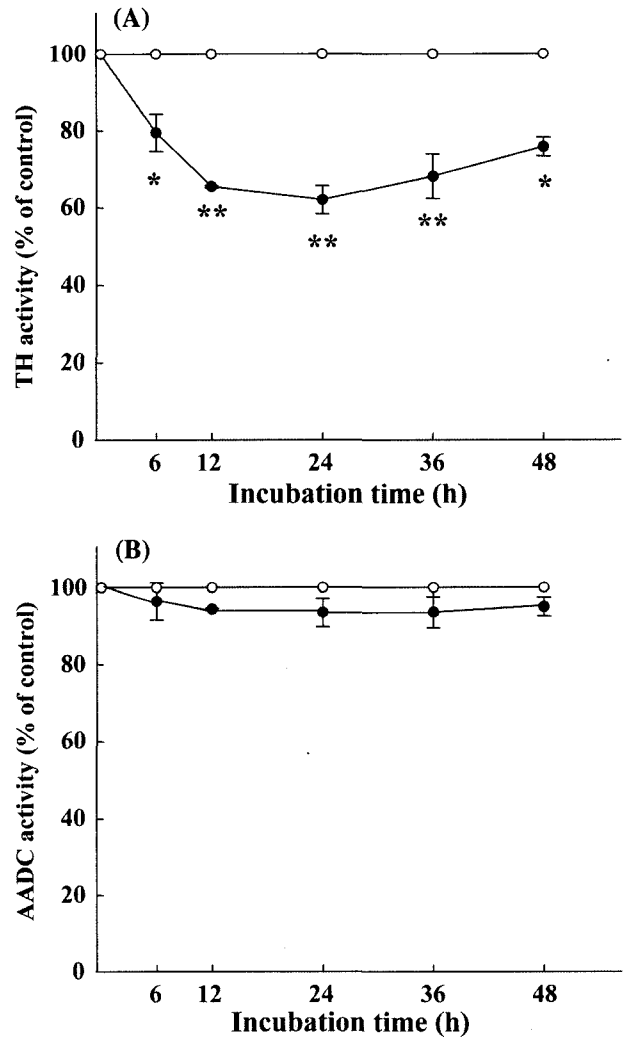


Fig. 2 - Inhibitory effects of tributyltin acetate (TBTA, -●-) on tyrosine hydroxylase (TH) (A) and aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) activities (B) in PC12 cells. PC12 cells were treated with TBTA (0.1  $\mu\text{M}$ ) and incubated at 37°C. PC12 cells were harvested with phosphate buffered saline, and TH and AADC activities were measured by an HPLC method. TH and AADC activities of the control (-○-) were  $3.57 \pm 0.29$  and  $3.98 \pm 0.32$  nmol/min/mg protein, respectively. Results represent the means  $\pm$  SEM of 4~5 dishes. Significantly different from the control value: \*,  $p < 0.05$  (ANOVA followed by Tukey's test).

경시적 변화는 전처리 24시간에서 최대의 dopamine 함량 감소 작용을 나타내었으며, 이러한 감소작용은 48시간까지 지속되었다(Fig. 1B).

TBTA에 의한 dopamine 생합성 저해작용 기전을 검토하기 위하여 dopamine 생합성 효소인 TH(L-tyrosine에서 L-DOPA 생합성 촉매 효소) 및 AADC(L-DOPA에서 dopamine 생합성 촉매 효소) 활성을 검토하였다. PC12 세포중의 TH 활성은 TBTA 처리에 의하여 유의적으로 저해되었으며(TBTA 0.1  $\mu$ M, 24시간 처리시 대조군에 비하여 38.0% TH 활성 저해), TBTA에 의한 TH 활성의 경시적 변화는 전처리 12~24시간에서 최대의 활성 저해 작용을 나타내었으며, dopamine 함량 변화와 유사한 양상을 나타내었다(Fig. 2A). 그러나 TBTA의 처리는 AADC 활성에는 영향을 주지 않았다(Fig. 2B). TH의 활성은 isoquinoline 화합물(tetrahydropapaveroline, bulbocapnine, berberine, hydrastine 등)에 의하여 저해되고 있으며,<sup>24-27)</sup> 이러한 작용을 가진 isoquinoline 알카로이드 화합물은 PC12 세포중의 dopamine 생합성 저해작용을 가지고 있음이 보고되었다.

TBTA가 TH 활성의 경시적 저해작용에 대하여 TH gene 조절작용을 검토하였다(Fig. 3). TBTA(0.1  $\mu$ M)의 처리에 의하여 TH mRNA 함량은 24시간에서 가장 감소하였고, 이후 36~48시간에서 대조군의 수준으로 회복하였으며, 이러한 경시적인 함량 변화의 양상은 TH 활성 저해작용 및 dopamine 함량변화에 영향을 주는 것으로 사료된다.

따라서 TBTA에 의한 PC12 세포중의 dopamine 함량 감소작용은 dopamine 생합성 효소인 TH의 mRNA 발현저해에 따른 활성 저해작용이 주요 역할을 하고 있는 것으로 사료된다.

파킨슨병은 대표적인 퇴행성 중추신경계 질환이며, 치료법으로서 L-DOPA 요법을 시행하고 있다. 그러나 L-DOPA 요법중환자는 종종 신경독성 작용에 의하여 질환이 악화되고 있음이 보고되고 있다.<sup>13)</sup> 또한, PC12 세포 중에 L-DOPA(20~100  $\mu$ M)를

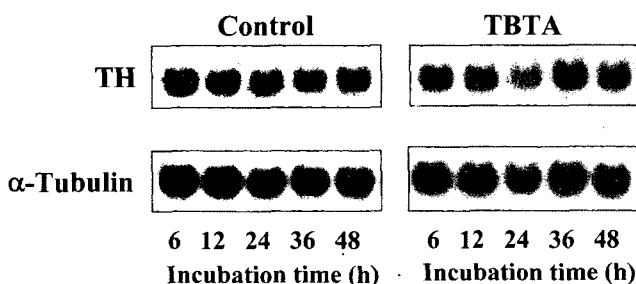


Fig. 3 - Time courses of TH mRNA level by tributyltin acetate (TBTA) in PC12 cells. RNA was extracted and 5  $\mu$ g aliquots were subjected to electrophoresis on formaldehyde gels, blotted onto nylon, and probed with <sup>32</sup>P-labeled cDNA probes for rat TH and  $\alpha$ -tubulin. Equal loading of the gels was verified by ethidium bromide staining of total RNA.

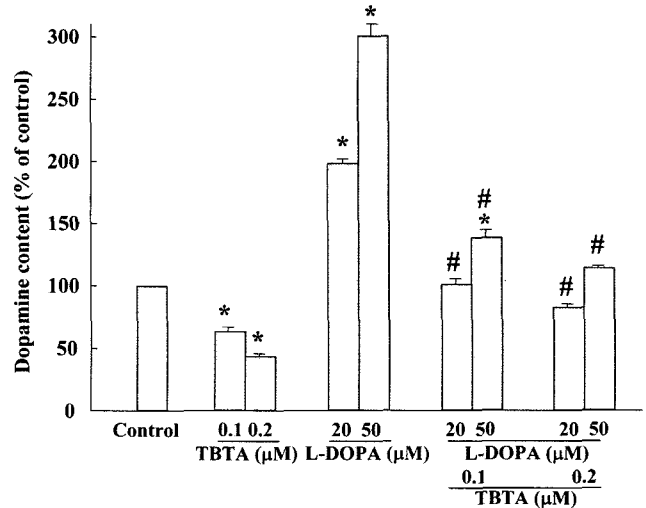


Fig. 4 - Inhibitory effects of tributyltin acetate (TBTA) on the increase in dopamine content induced by L-DOPA in PC12 cells after 24 h. PC12 cells were incubated in the absence or presence of L-DOPA (20 and 50  $\mu$ M) for 24 h. Dopamine content of the control was 3.58 $\pm$ 0.27 nmol/mg protein. Results represent the means $\pm$ SEM of 4~5 dishes. \*, p<0.05 compared with the control; #, p<0.05 compared with the corresponding L-DOPA-treated cells (ANOVA followed by Tukey's test).

전처리(24시간) 하였을 경우 세포내의 dopamine 함량은 증가하고 있으나, L-DOPA 150  $\mu$ M 이상의 고농도에서는 L-DOPA에 의한 산화적 스트레스(oxidative stress)에 의한 세포독성 작용으로 인하여 세포사(apoptosis)를 유도하고 있다.<sup>13,15)</sup> 이러한 작용에 의하여 PC12 세포는 L-DOPA 요법과 관련하여 dopamine 생합성 과정 및 세포독성 작용을 연구하기 위한 *in vitro* 연구모델로 응용되고 있다.

그러므로 dopamine 생합성 저해작용을 나타낸 TBTA를 이용하여 L-DOPA 전처리에 의한 dopamine 증가작용에 대한 영향을 검토하였다. L-DOPA(20~50  $\mu$ M)의 24시간 전처리에 의하여 PC12 세포중의 dopamine 함량은 대조군에 비하여 198~295% 증가되었으며(대조군의 dopamine 함량, 3.58 nmol/mg protein), TBTA 0.1~0.2  $\mu$ M의 처리는 L-DOPA 유도에 따른 dopamine 함량의 증가를 유의적으로 저해하였다(Fig. 4).

산화적 스트레스에 의하여 세포독성이 보고된 중금속 화합물은 Fe과 Mn이며, 이 화합물들은 PC12 세포중의 L-DOPA-유도 dopamine 함량 증가작용을 저해하며, L-DOPA(50~100  $\mu$ M)-유도 세포독성작용에 대하여 상승작용이 있음이 보고되었다.<sup>14,15)</sup> 또한, dopamine 생합성 저해작용을 나타낸 isoquinoline 화합물도 L-DOPA(20~150  $\mu$ M)-유도 세포독성 작용에 대하여 상승작용을 나타내고 있으며, 이 경우에도 산화적 스트레스가 관여하고 있음을 보고하였다.<sup>13,24)</sup>

이상의 결과에 종합하여 보면, TBTA는 비독성 농도(0.1~0.2

$\mu\text{M}$ 에서 PC12 세포 중의 세포내 dopamine 함량 감소작용 및 L-DOPA-유도 dopamine 함량 증가작용에 대한 저해작용을 나타내며, 이는 dopamine 생합성 효소인 TH 활성 저해작용에 기인한 것임을 밝혔다. 그리고 장기간 L-DOPA 요법을 시행하는 파킨슨병 환자는 적정 L-DOPA 요법을 시행하여야 하며, 세포독성을 나타내지 않는 농도에서도 중금속을 함유한 제반 환경인자에 대하여 주의해야할 필요성이 있음을 제시하고 있다.

### 감사의 말씀

본 연구는 2005년도 충북대학교 학술연구 지원사업의 연구비로 수행되었음.

### 참고문헌

- 1) Piver, W. T. : Organotin compounds: industrial application and biological investigations. *Environ. Health Perspect.* **4**, 61 (1973).
- 2) Boyer, I. J. : Toxicity of dibutyltin, tributyltin and other organotin compounds to humans and to experimental animals. *Toxicol.* **55**, 253 (1989).
- 3) Fent, K. : Ecotoxicology of organotin compounds. *Crit. Rev. Toxicol.* **26**, 1 (1996).
- 4) Alzieu, C. : Environmental problems caused by TBT in France: Assessment, regulations, prospects. *Mar. Environ. Res.* **32**, 7 (1991).
- 5) Bryan, G. W., Gibbs, P. E., Hummerstone, L. G. and Burt, G. R. : The decline of the gastropod, *Nucella lapillus*, around South-West England : Evidence for the effect of tributyltin from antifouling paints. *J. Mar. Biol. Ass. UK* **66**, 611 (1989).
- 6) Viviani, B., Rossi, A. D., Chow, S. C. and Nicotera, P. : Organotin compounds induce calcium overload and apoptosis in PC12 cells. *Neurotoxicol.* **16**, 19 (1995).
- 7) Thompson, T. A., Lewis, J. M., Dejneka, N. S., Severs, W. B., Polavarapu, R. and Billingsley, M. L. : Induction of apoptosis by organotin compounds *in vitro* : Neuronal protection with antisense oligonucleotides directed against stannin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **276**, 1201 (1996).
- 8) Kato, N., Akaike, M. and Masui, A. : Impaired spatial learning in rats with a trimethyltin-induced hippocampal lesion and the effect of fetal septal grafting on the impairment. In *Basic, Clinical, and Therapeutic Aspects of Alzheimer's and Parkinson's Disease* (ed. Nagatsu T.), 749 Plenum, New York (1990).
- 9) Tischler, A. S., Perlman, R. L., Morse, G. M. and Sheard, B. E. : Glucocorticoids increase catecholamine synthesis and storage in PC12 pheochromocytoma cell culture. *J. Neurochem.* **40**, 364 (1983).
- 10) Flahenry, J. F. and Gidal, B. E. : *Parkinson's disease. In: Applied therapeutics: the Clinical use of drugs*, editors : Young, L. Y., Koda-Kimble, M. A., 8th ed., Applied Therapeutics, Inc. Vancouver, 53.1 (2005).
- 11) Gottwald, M. D., Bainbridge, J. L., Dowling, G. A., Aminoff, M. J. and Alldredge, B. K. : New Pharmacotherapy for Parkinson's disease. *Annal Pharmacother.* **31**, 205 (1997).
- 12) Nelson, M. V., Berchon, R. C. and Lewitt, P. A. : *Parkinson's disease. In: Dipro J. T. et al., eds. Pharmacotherapy: a pathophysiologic approach.* 3rd ed. New York: Appleton & Lange, 1243 (1996).
- 13) Lee, J. J., Kim, Y. M., Yin, S. Y., Park, H. D., Kang, M. H., Hong, J. T. and Lee, M. K. : Aggravation of L-DOPA neurotoxicity by tetrahydropapaveroline in PC12 cells. *Biochem. Pharmacol.* **66**, 1787 (2003).
- 14) Cheng, Y., Wixom, P., Jame-Kracke, M. R. and Sun, A. Y. : Effects of extracellular ATP on  $\text{Fe}^{2+}$ -induced cytotoxicity in PC12 cells. *J. Neurochem.* **63**, 895 (1994).
- 15) Migheli, 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).
- 16) Kim, Y. M., Lee, J. J., Yin, S. Y., Kim, Y. S., Lee, J. K., Yoon, Y. P., Kang, M. H. and Lee, M. K. : Inhibitory effects of tributyltin on dopamine biosynthesis in rat PC12 cells. *Neurosci. Lett.* **332**, 13 (2002).
- 17) Greene, L. A. and Rein, G. : Release, storage and uptake of catecholamines by a clonal cell line of nerve growth factor (NGF) responsive pheochromocytoma cells. *Brain Res.* **129**, 247 (1977).
- 18) Greene, L. A. and Tischler, A. S. : Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **73**, 2424 (1976).
- 19) Mitsui, A., Nohta, H. and Ohkura, Y. : High-performance liquid chromatography of plasma catecholamines using 1,2-diphenyl-ethylene-diamine as precolumn fluorescence derivatization reagent. *J. Chromatogr.* **344**, 61 (1985).
- 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) Nagatsu, T., Oka, K. and Kato, T. : Highly sensitive assay for tyrosine hydroxylase activity by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **163**, 247 (1979).
- 22) Kim, K. S., Lee, M. K., Carroll, J. and Joh, T. H. : Both the basal and inducible transcription of the tyrosine hydroxylase gene are dependent upon a cAMP response element. *J. Biol. Chem.* **268**, 15689 (1993).

- 23) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
- 24) Lee, J. J., Kim, Y. M., Kim, M. N. and Lee, M. K. : Inhibitory effects of tetrahydropapaveroline on dopamine biosynthesis in PC12 cells. *Yakhak Hoeji* **49**, 156 (2005).
- 25) Shin, J. S., Kim, K. T. and Lee, M. K. : Inhibitory effects of bulbocapnine on dopamine biosynthesis in PC12 cells. *Neurosci. Lett.* **244**, 161 (1998).
- 26) Lee, M. K. and Zhang, Y. H. : Inhibition of tyrosine hydroxylase by berberine. *Med. Sci. Res.* **24**, 561 (1996).
- 27) 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)- $\beta$ -hydrastine on dopamine biosynthesis in PC12 cells. *Neuropharmacol.* **47**, 1045 (2004).