

한약내의 리튬이 타이로신 가수분해효소에 미치는 영향에 대한 연구

강봉주, 홍성길, 조동욱

한국한의학연구원 의료연구부

Abstract

Effects of Tyrosine Hydroxylase Levels by Lithium in Herbal Medicine

Kang Bongjoo, Hong Seonggil, Cho Dongwuk

Department of Medical Research and Development, Korea Institute of Oriental Medicine, 129-11, Chungdam-Dong, Kangnam-Gu, Seoul, 135-100, Korea

Lithium, a simple monovalent cation, is the mainstay in the treatment of manic-depressive illness, but despite extensive research, its mechanism of action remains to be elucidated. Because lithium requires chronic administration for therapeutic efficacy and because its beneficial effects last well beyond its discontinuation, it has been postulated that lithium may exert major effects at the genomic level. We have previously shown that Yungmijihwangwon (YM) increase TH protein expression through antioxidant activity and unknown effects in vivo. In the present study, we have sought to determine if lithium in herbal medicine also increases the expression of endogenous gene known to be regulated by AP-1 and have therefore investigated the effects of herbal medicine on tyrosine hydroxylase (TH) levels. Male mice were treated with LiCl and herbal medicine for 30 days, and TH levels and dopamine level were measured in striatum using immunoblotting and ECD-HPLC. Herbal medicine treatment resulted in statistically nonsignificant increase in TH levels in mouse striatum. The precise therapeutic relevance of these effects is presently unknown.

Keyword : lithium, tyrosine hydroxylase, Yungmijihwangwon, AP-1

1. 서론

Neuron들 사이에서 신호를 주고받는 매개체인 신경 전달 물질(neurotransmitter: NTM)에서 monoamine으로 catecholamines류의 NTM가 있다. Catecholamine NTM으로 dopamine (운동 발작과 관련), norepinephrine

(locus ceruleus에 존재: 기쁨, 불안, 학습, 잠 등에서 중요한 역할), epinephrine 등이 있다. Catecholamine을 합성하기 위해서는 tyrosine이 있어야 하는데, 이는 phenylalanine으로부터 합성될 수 있다. 그런데 이 과정에서 필요한 효소인 phenylalanine hydroxylase는 뇌에는 없고 간에만 있는 효소이다. 따라서, 간으로부터 CNS

로의 수송이 이루어진다. 일반적으로 LNAA (large neutral amino acid transporter)을 통해서 tyrosine이 충분히 공급되기 때문에 tyrosine hydroxylase (TH)가 rate-limiting enzyme으로 작용한다 (Fig. 1).

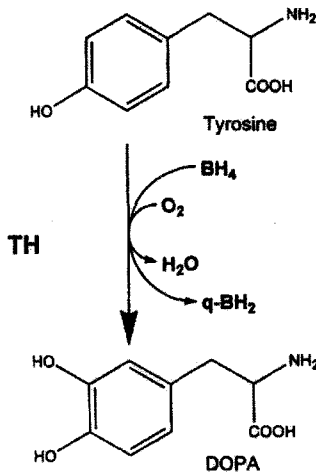


Fig. 1. Catecholamine biosynthesis. The catecholamines are synthesized in a linear fashion from the essential amino acid nutrient, tyrosine. TH: tyrosine hydroxylase.

Catecholamines는 비록 뇌에서 작은 부분을 차지하지만 그 영향력은 대단하여. 예로, 실험용 쥐의 뇌에서 dopaminergic neuron은 substantia nigra의 좁은 영역에 있지만, 약 오십만 개의 synapse terminal이 전뇌로 연결되어 있다. (사람은 약 5백만개가 전뇌와 연결되어 있다.) 또 post-synapse의 반응이 느리므로 second messenger system임을 암시한다. Dopaminergic synapse에서 second messenger로는 cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP)가 있다. 시냅스 공간에서 잔여분은 catechol-O-methyl transferase로 비활성화된다. Substantia nigra에서 ganglia로의 dopaminergic neuron의 결손으로 Parkinson씨병을 일으켜 수족이 떨리고, 자발적 움직임의 시작이 둔하게 된다.

Lithium은 조울증(MDI)의 치료에 기분을 안정시키는 약으로 사용되었지만 lithium이 조울증을 억제하고 신경안정 역할에 대한 생화학적 기작은 아직 확실히 밝혀져 있지 않고, 장기간 복용에 의해 유전자 수준에

서 변화가 나타난다¹⁾.

그리고 CNS 세포를 배양하여 장기간 lithium을 처리하여 glutamate와 NMDA에 의한 세포사를 줄였고²⁾ middle cerebral artery (MCA)를 이용한 뇌허혈 동물모델에서는 16일간 lithium을 투여해서 뇌경색부분이 56%나 감소했다고 보고되었다³⁾.

최근 tyrosine hydroxylase (TH)에 대한 연구에서는 TH knock out (homozygous null mutation) 마우스가 발생단계에서 97% 이상 사망하여⁴⁾⁵⁾ TH의 중요성을 보여 주었다. Lithium과 dopamine과의 관계는 lithium이 in vitro (adrenal medullary cell line)에서 catecholamine의 생성과 분비를 촉진시킨다고 연구되어 졌다⁶⁾.

그리고 lithium 기작의 분자생물학적 연구에서 lithium을 장기간 투여했을 경우 activator protein-1 (AP-1) 전사요소를 갖는 유전자의 발현이 증가됨이 관찰되었다. 그리고 TH 유전자의 발현은 AP-1을 포함하는 promoter에 의해 일어나고 (Fig. 2) TH에 대한 lithium의 효과를 연구한 결과 rat의 frontal cortex, hippocampus, striatum에서 TH level이 유의성 있게 증가했다⁷⁾.

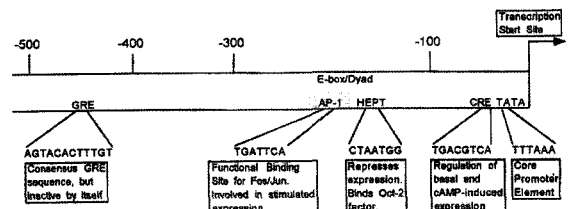


Fig. 2. TH promoter structure. Promoter structure for the TH gene. Several putative transcriptional regulatory elements have been identified within the 5' region of the TH gene (500 bp).

본 연구에서는 Parkinson씨병 모델 마우스에서 신경 보호효과를 나타낸 육미지황원의 작용기작을 조사하고자 육미지황원내에 포함되어 있는 lithium량을 정량, immunohistochemistry에 의해 striatum의 TH 변이를 측정, TH에 의해 양이 변화되는 뇌내의 dopamine 측정등을 통해서 한약내의 미량원소가 한약의 효과에 영향을

Table 1. Components of prescriptions.

Prescriptions	Component	Weight (g)	Source
Yungmijihwangwon (YJ) 六味地黃元	Rehmanniae Preparata rhizoma	30	군위
	Corni fructus	15	구례
	Dioscorea tuber	15	온양
	Alismatis rhizoma	11.25	순천
	Paeoniae cortex	11.25	의성
	Hoelen	11.25	인제

미치는지 조사하여, 한약에 포함되어 있는 미량원소들의 역할에 대해 새롭게 조명해보고자 하였다.

II. 실험방법

1. 실험동물과 MPTP 및 탕제 투여

실험동물은 22-25g 사이의 6주령된 ICR 수컷 마우스(대한바이오링크)를 사용하였다. 실험 전까지 일주일동안 12시간 밤/낮 (조명/07:00-19:00)을 유지하고 고품사료와 물을 자유로이 먹을 수 있게 조건을 동일화하였다. 동물사육 조건은 온도 23±2°C, 상대습도 55±5%로 하였다. 본 연구에 사용한 LiCl는 Sigma (USA)에서 입수하였고 음성대조군은 생리식염수를 경구투여하였고, LiCl 투여군은 10 mg/kg/day로 30일간 경구투여하였다. 그리고 탕제 투여는 400 mg/kg 30일간 경구투여했다.

2. 한약재 시료제조

400g의 약재를 Table 1과 같은 조성으로 약재부피 3배의 증류수에 18시간동안 수침한 후, 전자약탕기(DWP-1800T, 대웅약탕기, 대웅전기산업)에서 30분간 열수추출한 후, 다시 재탕으로 2시간동안 열수추출했다. Mesh (#100, Ø150µm)로 걸러낸 후, 감압농축기(R-124, Buchi)에서 농축한 후, 3,000 xg로 원심분리하여 상층액을 수거했다. 이 상층액을 filter paper(Ø

90mm, Toyo, Japan)로 filtering후 동결건조시켜 분말상태로 -20°C에서 보관했다. 이 추출물의 활성 검색을 위해 각 분말을 생리식염수에 400 mg/ml의 농도로 용해하여 사용하였다.

3. Lithium 정량

Lithium 표준용액은 Thermo Jarrell Ash 및 Shannon사에서 구입한 ICP용 표준용액을 희석하여 사용하였고, 질산은 유해금속추정용시약을 사용하였다. 시료 전처리에는 Milestone사의 Ethos 1600 Advanced Microwave Labstation을 사용하였고, Li 함량 측정을 위해서 Thermo Jarrell Ash사의 Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometer(이하 ICP)를 사용하거나 ICP에 Plasma Hydride Device (T-PHD)를 부착하여 사용하였다.

한약을 동결건조한 분말시료 약 0.5g을 정확히 무게를 측정하여 Microwave Digestion Vessel에 넣는다. 질산 6ml를 넣고, 잘 섞어 주면서 서서히 과산화수소 1ml을 넣는다. 마개를 덮고 한동안 방치 후 Microwave Labstation에서 분해시킨다. 실온에서 마개를 열고, 25ml volumetric flask에 표정한 후 ICP를 사용하여 Li은 670.7nm에서, Se은 196.026nm에서 그 함량을 측정한다. ICP의 분석 조건은 Table 2과 같다.

4. TH immunoblotting (Western blot)

마우스의 뇌조직을 부위별(cerebral cortex, hippocampus, striatum)로 분리한 후 PBS로 washing한 후 20 mM

Table 2. Operating Conditions and Optics Specifications for ICP-AES

Plasma Source	
RF frequency	27.12 MHz
RF Power	1150 W (As, Hg, Sb, Sn - 1350 W)
Touch Flow	High Flow
Auxilliary Gas Flow	Medium (1.0L/min)
Coolant Gas Flow	14L/min
Nebulizer Type	Concentric Nebulizer
Nebulizer Pressure	30 psi
Observation Height	15.0 mm
Pump tubing type	Tygon-Orange
Flush pump rate	200rpm (3.70ml/min)
Analysis pump rate	100rpm (1.85ml/min)
Monochromator Optics	
Focal Length	0.5m
Two PMT detectors	R427 solar blind and R889 IR enhanced
Grating	2400 and 1200 Lines/mm
Resolution	0.036nm 1st order, 0.018nm 2nd order, 0.12nm 1200 line/mm

HEPES(pH 7.8), 12mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.2mM EDTA, 0.2mM Na₃BO₃, 12% glycerol, phenylsulfonyl fluoride, 5mM dithiothreitol 로 구성된 500 μ l의 단백질추출 buffer에서 homogenize 시키고, 14,000g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 사용했다. 일정량의 단백질을 blotting 정량에 사용하기 위해 단백질 정량은 Bradford 법으로 사용하였다. 얻어진 상층액에 SDS(sodium dodecyl sulfate) sample buffer를 섞은 후 100°C에서 3분간 끓여서 10%의 SDS-polyacrylamide gel에 loading 한다. 100V로 전기 영동 후, nitrocellulose membrane에 100V로 1시간 동안 transfer 시키고 anti-TH primary antibody(Calbiochem, USA)와 biotinylated IgG(Vector, USA)를 1:200으로 희석하여 1시간 반응시킨 후 avidin-biotin peroxidase complex (Vector, USA)를 1:100으로 희석하여 1시간 반응시켰다. 발색반응은 0.02% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride에 0.07% nickel chloride, 0.02% H₂O₂를 섞어서 발색시켰다. NC membrane을 스캐너로 스캐닝한 후 iMT(VT) Image analysis program (iMTechnology)을 사용하여 blotting 부분을 densitometry로 정량 하였다.

5. 뇌의 도파민 정량

LiCl와 한약을 경구투여한 ICR 마우스에서 분리한 striatum의 무게를 잰 후, 0.5ml의 0.05 M perchloric acid 를 넣고 얼음위에서 ultrasonicater(sonoplus GM70, Bandelin)로 10초간 sonication-후 10초간 정치하는 방법으로 총 30초간 실행하여 조직을 파쇄 했다. 균질화된 조직액을 10,000g에서 10분간 원심분리했다. 분리된 상층액은 0.2 μ m pore size의 filter로 filtering한 후 HPLC로 dopamine을 측정할 때까지 -70°C에서 보관했다.

HPLC 조건은 다음과 같다. ECD(electrochemical detector)는 BAS LC-4C를 사용했고 [Mode : Amperometry (oxidation: + 0.6 V)], HPLC의 column은 CAPCELL PAK C18(100 \times 4.6mm ID, 3m)을 사용했고, flow rate는 1.0ml/min, injection volume은 20 μ l 이고 mobile phase로는 phosphate buffer(pH 3.0)와 acetonitrile 4%를 사용했다.

III. 결과 및 고찰

육미지황원은 여러 연구결과에서 항산화효과가 뛰어난 것으로 밝혀졌고, 뇌허혈의 실험에서도 좋은 결과를 보여 주었다⁸⁾⁹⁾.

그리고 MPP⁺와 6-OHDA와 같은 신경세포독성 억제 실험에서 PC-12 cell line에 대하여 신경보호효과를 보여 주었고¹⁰⁾, glutamate 독성억제 실험에서도 신경세포에 대한 보호효과가 확인되었다¹¹⁾. 그리고 C57BL/6 mouse를 사용한 *in vivo* 모델에서도 신경세포 보호효과를 보여 주었다.

MPTP를 이용한 파킨슨씨병 동물모델에서 육미지황원이 C57BL/6 마우스의 striatum부분의 TH (tyrosine hydroxylase) level을 MPTP만 투여한 군보다 증가시켜 주는 것을 확인하였다. TH level을 올려 주는 것은 여러 가지가 있지만 lithium에 의한 TH 증가효과가 잘 알려져 있고, 양방에서는 성인 1일 300mg의 lithium carbonate를 투여하여 조울 정신병의 예방과 치료에 사용되고 있으나, 현재까지 한약재내에 포함되어있는 lithium의 효과에 대한 연구가 없어 이에 대해 조사해 보았다.

Lithium은 임상에서 조울증(MDI)의 치료와 환자의 기분을 안정시키는 약으로 사용되었지만 lithium의 효과에 대한 정확한 생화학적 기작은 아직 밝혀져 있지 않다. 다만 기분과 밀접한 관계가 있는 뇌의 catecholamine의 생성과 분비에 영향을 미친다¹²⁾. 최근 연구에서는 Lithium과 dopamine과의 관계는 lithium이 *in vitro* (adrenal medullary cell line)에서 catecholamine의 생성과 분비를 촉진시키는데 lithium 작용 기작으로 activator protein-1 (AP-1) 전사요소를 갖는 tyrosine hydroxylase 유전자의 발현을 증대시킨다.

Lithium에 대한 dose-dependent 실험 결과는 보이지 않았지만 LiCl 투여량은 최소 10 mg/kg 이상을 투여해야 TH 증가효과가 나왔다. 그리고 TH protein을 Western blotting 하여 분자량 약 60 kDa의 밴드에서 관찰을 했다. 뇌의 다른부위 (frontal cortex, hippocampus)보다 striatum부분에서 약 80배이상 발현

이 크다¹³⁾. 그래서 ICR 마우스의 뇌로부터 striatum을 분리하여 SDS-PAGE를 거친 후 immunoblotting하여 60 kDa 밴드의 densitometry를 측정하여 정량을 하였다 (Fig. 3).

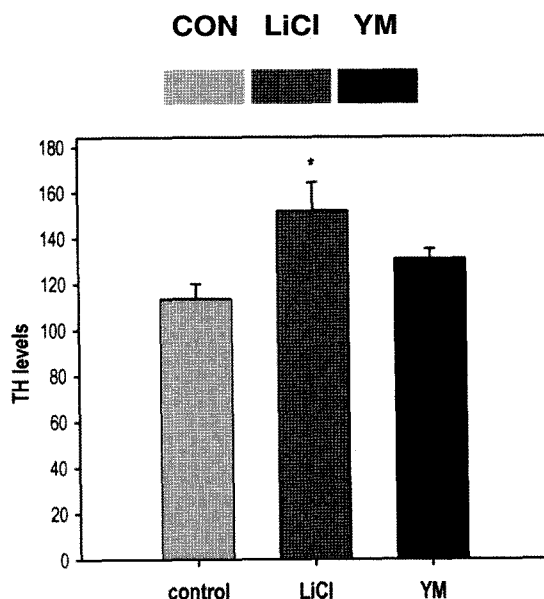


Fig. 3. Mice were treated with lithium and YM for 30 days (five in each group). Striatum samples were subjected to SDS-PAGE and immunoblotting of TH as described in methods. up panels: Representative immunoblots. down panels: Levels of TH protein from each treatment group as indicated. * $p < 0.05$ compared with control (saline treated mice).

결과에서 LiCl 투여군이 TH의 양이 유의적으로 많이 발현된으로 관찰되었다 ($p < 0.05$). YM군도 대조군보다 많은 양이 발현되었지만 통계적 차이는 없었다.

Catecholamine중에서 dopamine은 tyrosine으로부터 합성되고 TH가 합성을 담당하는 enzyme으로 작용한다. 그리고 TH의 활성 및 양에 의해서 dopamine 양이 변화되어 dopamine을 정량해서 TH의 량을 상대적으로 알 수 있다. 결과는 LiCl 투여군에서 dopamine의 양이 유의적으로 증가한 것으로 나타났고, YM은 대조군과 별 차이없이 나타났다 (Table 3). 이 결과는 TH양을 Western blotting으로 해서 정량한 것과 같은 결과를 보여주었고 lithium 투여한 human SH-Sy5Y cell과 rat C6 glioma cell에서 TH 증가한 결과와 일치한 것을 보여주었다¹⁴⁾.

Table 3. Levels of dopamine in striatum. The striatal level of dopamine was higher in the animal that administrated the LiCl than the animals that administrated the saline (control). But the levels of dopamine in striatum did not differ significantly between control and YM.

	Content of dopamine (ng/ml)
Control (saline)	163.8±7.7
LiCl	192.0±9.1*
YM	158.4±8.6

*p<0.05 compared with control (saline treated mice).

문헌 조사에서도 한약제들의 중금속 함유에 대한 보고는 많아도 lithium 함량에 대한 보고는 없었다. 그래서 YM과 더불어 각 구성약제들에 대한 lithium 함량을 측정해 보았다 (Table 4). 각 약제의 lithium 함량이 다양하게 나왔고 백복령이 가장 높게 나와서 다른 약제들보다 최고 50배 이상 높은 것으로 나왔다. 그러나 실제로 lithium이 TH protein 발현량에 영향을 나타내기 위해서는 10 mg/kg의 양으로 투여해야 되지만, 실제로 육미지황원을 400 mg/kg 투여했을 경우 lithium의 투여량으로 환산해보면 0.09 mg/kg으로 나온다. 이것은 매우 미량이 투여되는 것으로 육미지황원 또는 그 구성약제의 lithium에 의한 TH 증가효과는 미약하다고 생각된다.

Table 4. Content of lithium.

	mg/kg
Yungmijihwangwon (YM)	3.029
Rehmanniae Preparata rhizoma	3.16
Corni fructus	0.809
Dioscorea tuber	0.434
Alismatis rhizoma	0.138
Paeoniae cortex	0.917
Hoelen	6.45

결론적으로 MPTP 마우스모델에서 육미지황원에 의해 TH level이 약간 증가시킨 것은 육미지황원 내의

lithium이 일부 효과를 보인 것이라 추측할 수 있으며 당제내에 포함되어 있는 수 많은 성분들도 TH level의 증가에 영향을 미칠 것이라 생각된다. 그리고 육미지황원이 항산화효과를 가지고 있는 것으로 알려져 있어 MPTP가 미토콘드리아의 전자전달계를 와해시키는 작용을 억제하는 점을 볼 때 항산화효과에 의한 육미지황원의 약효 효능에 초점을 맞추어 추가연구가 진행되어야 할 것이다.

[색인어] 리튬, 타이로신 가수분해효소, 육미지황원, AP-1

참고문헌

1. Manji HK, Potter WZ, Lenox RH. 「Signal transduction pathways. Molecular targets for lithium's actions」. 『Arch Gen Psychiatry』 1995; Vol.52 No.7: 531-543.
2. Nonaka S, Hough CJ, Chuang DM. 「Chronic lithium treatment robustly protects neurons in the central nervous system against excitotoxicity by inhibiting N-methyl-D-aspartate receptor-mediated calcium influx」. 『Proc Natl Acad Sci U S A』 1998; Vol.95 No.5: 2642-2647.
3. Nonaka S, Chuang DM. 「Neuroprotective effects of chronic lithium on focal cerebral ischemia in rats」. 『Neuroreport』 1998; Vol.9 No.9: 2081-2084.
4. Kobayashi K, Morita S, Sawada H, Mizuguchi T, Yamada K, Nagatsu I, Hata T, Watanabe Y, Fujita K, Nagatsu T. 「Targeted disruption of the tyrosine hydroxylase locus results in severe catecholamine depletion and perinatal lethality in mice」. 『J Biol Chem』 1995; Vol.270 No.45: 27235-27243.
5. Zhou QY, Quaife CJ, Palmiter RD. 「Targeted disruption of the tyrosine hydroxylase gene reveals that catecholamines are required for mouse fetal development」. 『Nature』 1995; Vol.374 No.6523: 640-643.
6. Terao T, Yanagihara N, Abe K, Izumi F. 「Lithium chloride stimulates catecholamine synthesis and secretion in cultured

- bovine adrenal medullary cells. 『Biol Psychiatry』 1992; Vol.31 No.10: 1038-1049.
7. Chen G, Yuan PX, Jiang YM, Huang LD, Manji HK. 「Lithium increases tyrosine hydroxylase levels both in vivo and in vitro」. 『J Neurochem』 1998; Vol.70 No.4: 1768-1771.
 8. 홍성길, 이미영, 윤유식, 강봉주, 김대원, 조동욱. 「전통 한약 탕제 투여에 의한 혈장 및 간조직의 항산화력 증가 효과」. 『한국식품과학회지』 1999; 제31권 제6호: 16661-16666.
 9. 이수행, 김우환. 「Oxidant에 의한 간독성유발에 가미행체탕 함 육미지황탕의 효과」. 『생명과학회지』1998; 제8권 제4호: 464-471.
 10. 강봉주, 홍성길, 조동욱. 「MPP⁺와 6-OHDA에 대한 한약 탕제의 보호효과 연구」 『한국한의학연구원논문집』1999; 제5권 제1호: 119-131.
 11. 이미영, 강봉주, 윤유식, 홍성길, 박병주, 조동욱. 「대뇌피질 신경세포에 미치는 glutamate독성에 대한 한약재 효능 연구」 『한국한의학연구원논문집』 1998; 제4권 제1호: 99-114.
 12. Ahluwalia P, Singhal RL. 「Comparison of the changes in central catecholamine systems following short- and long-term lithium treatment and the consequences of lithium withdrawal」. 『Neuropsychobiology』 1984; Vol.12 No.4: 217-23.
 13. Kumer SC, Vrana KE. 「Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression」. 『J Neurochem』 1996; Vol. 67 No.2: 443-462.
 14. Yuan PX, Chen G, Huang LD, Manji HK. 「Lithium stimulates gene expression through the AP-1 transcription factor pathway」. 『Brain Res Mol Brain Res』. 1998; Vol.58 No.1-2: 225-230.