약학회지 제 51 권 제 2 호 83~87 (2007)
Yakhak Hoeji Vol. 51, No. 2

Ethaverine 화합물이 P815 세포중의 Serotonin 함량에 미치는 영향

김응일 · 신정수 · 임성실 · 박승국 · 이명구#
충북대학교 약학대학/생물건강산업개발연구센터
(Received January 9, 2007; Revised April 6, 2007)

Inhibitory Effects of Ethaverine on Serotonin Content in Murine Mastocytoma P815 Cells

Eung Il Kim, Jung Soo Shin, Sung Cil Lim, Seung Kook Park 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 ethaverine on serotonin biosynthesis in murine mastocytoma P815 cells were investigated. Ethaverine at 2.5~10 μM decreased serotonin content in a concentration-dependent manner. The IC_{50} value of ethaverine was 6.1 μM. Ethaverine at concentrations up to 20 μM was not cytotoxic towards P815 cells. Under these conditions, tryptophan hydroxylase (EC 1.14.16.4; TPH), a rate-limiting enzyme in serotonin biosynthesis, was inhibited by ethaverine in P815 cells (15.3% inhibition at 7.5 μM), however, aromatic L-amino acid decarboxylase (EC 4.1.1.28) was not. These results indicate that ethaverine leads to a decrease in serotonin content by reducing TPH activity in P815 cells.

Keywords □ ethaverine, serotonin content, tryptophan hydroxylase, P815 cells

Ethaverine은 papaverine의 tetraethoxy 유도체인 benzylisoquinoline 알카로이드 계열 화합물이며(Fig. 1), 동맥혈관 및 심장근세포의 Ca^{++} 유입과 관련한 L-type Ca^{++} 통로의 차단작용에 의하여 강력한 혈관확장 작용을 나타내고 있으며,[1,2] PC12 세포의 L-type Ca^{++} 통로를 차단하여 catecholamine 유리를 감소시킨다.[3]

Serotonin(5-hydroxytryptamine)은 주요 monoamine 신경전달물질 중의 하나로 melatonin의 전구체이며 혈소판에서 유리되고, 장관점막, 송과체, 중추신경계를 포함한 많은 체내조직 내에 고농도로 존재하며, 위액분비의 억제작용, 평활근 수축작용을 가지고 있다.[4,5] 또한, 중추신경계에서는 알코올중독, 정신질환, 스트레스 등의 병인과 관련이 있으며,[6] serotonin 저해작용 생리활성물질은 스트레스 등의 정신질환 치료제에 응용될 수 있다.

Serotonin은 tryptophan에서 5-hydroxytryptophan을 경유하여 생합성 되며, 각 단계에는 tryptophan hydroxylase(EC 1.14.16.4; TPH), aromatic L-amino acid decarboxylase(EC 4.1.1.28; AADC)가 촉매하고 있으며, TPH가 serotonin 생합성 과정의 rate-limiting 효소이다.[7] TPH는 tryptophan 이외에 L-phenylalanine도 기질로 하지만 내재성 보효소인 (6R)-L-erythro-5,6,7,8-tetrahydrobiopteridin의 함량에 따라 활성이 다르게 나타난다.[8] TPH의 활성은 ATP 및 Mg^{2+}에 의한 인산화에 의하여 가역적으로 활성화되며 Ca^{2+}, calmodulin 및 Ca^{2+}-calmodulin 의존성 protein kinase가 관여하고 있음이 보고되었다.[9]

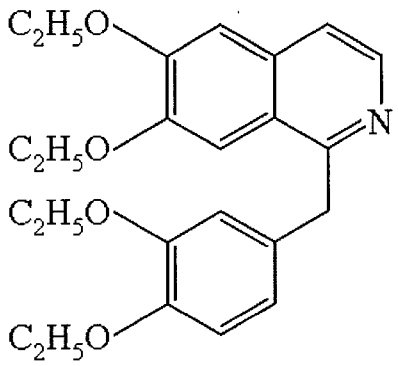

Fig. 1 – Chemical structure of ethaverine.

P815 세포는 F1 hybrid mice의 ascitic tumour에서 유래한 것으로 serotonin을 생합성, 저장 및 분비하며 TPH 및 AADC를 발현하고, 또한 histamine을 생합성, 저장 및 분비하며, histamine

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

생합성 효소인 histidine decarboxylase(EC 4.1.1.22)를 발현한다.[10] 한편 dexamethasone을 전처치하면 P815 세포내의 serotonin 함량이 감소함이 보고되고 있다.[11]

최근, ethaverine을 포함하여 berberine, palmatine, bulbocapnine, higenamine, tetrahydropapaverine, tetrahydropapaveroline, hydrastine 등의 isoquinoline 화합물은 PC12 세포중의 dopamine 함량 감소작용과,[12-17] 생쥐 뇌(mouse brain)의 monoamine oxidase(EC 1.4.3.4) 활성 저해작용을 나타내고 있음을 보고하였다.[18,19] 또한, berberine, palmatine, tetrahydropapaverine, tetrahydropapaveroline 등은 P815 세포중의 serotonin 생합성 저해작용을 나타내고 있음을 보고하였다.[20-22]

그러므로, 본 연구에서는 dopamine 생합성 저해작용을 나타낸 ethaverine의 새로운 생리활성 작용을 검색하기 위하여, ethaverine이 serotonin 생합성 과정에 미치는 영향을 비교 검토하였다. Ethaverine이 P815 세포내의 serotonin 함량, 세포내 TPH 및 AADC 활성 변화에 미치는 영향 등의 연구를 진행하였다.

실험 방법

실험재료

Ethaverine hydrochloride, L-tryptophan, 5-hydroxytryptophan, serotonin, dithiothreitol, DL-6-methyl-5,6,7,8-tetrahydropterin(4H-PT), 5-hydroxyindoleacetic acid(HIAA) 및 catalase는 Sigma 사(St. Louis, MO, USA)로부터, 세포배양용 fetal calf serum 및 penicillin/streptomycin, DMEM 배지는 Gibco 사(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 그 밖의 시약은 특급 및 HPLC 용 등급을 사용하였다.

P815 세포의 배양

P815세포는 Cornell 대학교 의과대학(분자신경생물학 교실)에서 분양 받았다. 세포배양은 10% fetal calf serum, 100 unit/ml penicillin과 100 μg/ml streptomycin을 포함한 DMEM 배지를 사용하여, 세포배양용 dish에서 37°C, 5% CO_2 상에서 배양하였다.[10] 세포 pellet는 -70°C 냉동고에 보관하여 serotonin 함량, TPH 및 AADC 효소활성 측정시료로 사용하였다.

Serotonin 함량 측정

Serotonin 함량은 HPLC-형광광도계법으로 측정하였다.[23] 시료용액(150 μl)에 trichloroacetic acid(1 M, 150 μl), HIAA(10 μM, 50 μl; 내부표준)를 가한 다음 원심 분리하였다. 상등액을 Millex-GV(0.22 μm)로 여과한 후 HPLC에 주입하여 serotonin 함량을 정량하였다. HPLC 조건: column, TSK-gel ODS 120T(5 μm, 0.45×15 cm); 이동상, NaOAc 완충액(50 mM, pH 3.5)-acetonitrile-methanol(90 : 6 : 4, v/v); 유속, 1 ml/min; 검출기, F1000 형광검출기(λmax: Ex. 285 nm, Em. 340 nm).

TPH 활성 측정

TPH 활성 측정은 Yanagisa 등의 방법을 개량하여 사용하였다.[23] 효소반응액은 Tris-acetate 완충액(0.1 M, pH 7.6, 200 μl), dithiothreitol(10 mM, 80 μl), catalase(2 mg/ml, 40 μl), L-tryptophan(2 mM, 50 μl), 4H-PT(10 mM, 40 μl) 및 효소시료액이며, 37°C에서 효소반응 20분 후 perchloric acid(3.0 M, 70 μl) 및 5-HIAA(10 μM, 50 μl)를 가한 후 원심 분리한 다음, 상등액을 HPLC에 주입, 5-hydroxytryptophan 농도를 정량하여 효소활성을 측정하였다. HPLC 조건은 serotonin 함량 측정시와 동일하게 처리하였다.

AADC 활성 측정

AADC 활성 측정은 Yanagisa 등의 방법을 사용하였다.[23] 효소반응액은 sodium phosphate 완충액(50 mM, pH 8.2, 240 μl), pargyline(5 mM, 80 μl), pyridoxal phosphate(0.1 mM, 40 μl), L-5-tryptophan(10 mM, 40 μl) 및 효소시료액이며, 37°C에서 효소반응 120~240분 후 trichloroacetic acid(3.0 M, 80 μl) 및 5-HIAA(10 μM, 50 μl)를 가한 후 원심분리한 다음, 상등액을 HPLC에 주입 serotonin 농도를 정량하여 효소활성을 측정하였다. HPLC 조건은 serotonin 함량 측정시와 동일하게 처리하였다.

P815 TPH의 부분정제 및 활성 측정

P815 TPH의 부분정제는 Naoi 등의 방법에 준하였다.[24] 세포를 포집한 후, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 4 mM dithiothreitol, 10 μg antipeptidases(antipain, pepstatin A, chymostatin, leupeptine)를 포함한 Tris-acetate 완충액(pH 7.4) 중에 가하고, 50% dutycycle로 1분간 sonication 시킨 후 extraction medium(5-bed volume)으로 희석한 후 22,000×g에서 10분간 원심 분리시켰다. 상등액을 sephadex G-10 column에서 분리시킨 후 효소원으로 사용하였다.

단백질 함량 측정 및 결과정리

검정 각 항의 생리활성은 각각의 시료중의 단백질 함량을 측정하여 보정하였으며, 단백질 함량은 소혈청 albumin을 사용한 Lowry 법에 의하여 측정하였다.[25] 실험결과는 means±SE로 나타내고 유의성은 Student's *t*-test에 의하여 검정하였다.

실험결과 및 고찰

Ethaverine을 사용하여 P815 세포내의 serotonin 함량에 미치는 영향에 대하여 검토하였다(Table I). 대조군의 serotonin 함량은 1.58 nmol/mg protein 이었다. Ethaverine은 전처치 용량

Table I – Effects of ethaverine on serotonin content in P815 cells

		Serotonin content (nmol/mg protein) (% of control)	IC_{50} values (μM)
Control		1.58±0.15 (100)	
Ethaverine			6.1
	2.5 μM	1.18±0.15 (74.5)	
	5.0 μM	0.91±0.12 (57.6)*	
	10.0 μM	0.75±0.11 (47.5)*	
Berberine			3.1
	0.5 μM	1.13±0.12 (71.5)	
	2.0 μM	0.92±0.14 (58.2)*	

The results represent means±SE of 4-5 dishes. Berberine was used for the positive control.[20] Significantly different from the control value: *, $P<0.05$ (Student's *t*-test).

5.0 μM에서 대조군의 57.6%를 나타내었으며, IC_{50} 값은 6.1 μM 이었으며, 대조군으로 사용한 berberine(IC_{50} 값, 3.1 μM) 보다 약 2배의 높은 값을 나타내었다(Table I). Ethaverine의 P815 세포에 대한 독성은 lactate dehydrogenase 활성을 측정하여 검색하였다. Ethaverine은 2.5~10 μM 까지는 P815 세포 중에 세포 독성을 나타내지 않았으나, 20 μM 이상의 농도에서는 강한 독성 작용을 나타내었다.

Ethaverine에 의한 P815 세포내의 serotonin 함량 감소가 serotonin의 배지(culture medium)로의 분비(secretion)의 가능성을 알아보기 위하여, ethaverine을 전처치 24시간 후에 세포내 및 배지중의 serotonin 함량을 측정하였다. Ethaverine(10 μM)의 전처치에 의하여 배지중의 serotonin 함량은 유의적인 변화가 없었다(Table II). 따라서 ethaverine에 의한 P815 세포중의 총 serotonin 함량 감소작용은 세포내 serotonin 함량감소가 주된 원인임을 알 수 있었다.

Ethaverine에 의한 P815 세포내의 serotonin 함량 감소작용에 대한 부분적인 작용기전을 규명하기 위하여 P815 세포내의 TPH 및 AADC 활성 변화를 측정하였다(Table III). TPH 활성은 ethaverine 전처치 24시간 후에 측정하였으며, 대조군의 TPH 및 AADC 활성은 19.6 nmol/min/mg protein 및 0.76 nmol/min/mg protein 이었다. TPH 활성은 ethaverine 7.5 μM의 전처치에 의하여 대조군의 84.7%로 나타나 유의성 있는 TPH 활성저해 작용을 나타내었다. 그러나, AADC의 활성은 ethaverine(7.5 μM)의 전처치에 의하여 미약한 활성 저해작용(대조군의 92.1%)을 나타내었으며 유의성 있는 저해작용을 나타내지 않았다.

Table II – Effects of ethaverine on serotonin secreton into the media in P815 cells

	Intracellular serotonin content (nmol/mg protein)	Extracellular serotonin content (nmol/ml medium)
Control	1.78±0.15	4.31±0.23
Ethaverine 10.0 μM	0.81±0.28*	3.96±0.49

The results represent means±SE of 4~5 dishes. Significantly different from the control values: *, $P<0.01$ (Student's *t*-test).

Table III – Effects of ethaverine on tryptophan hydroxylase (TPH) and aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) activities in P815 cells

	TPH activity (nmol/min/mg protein) (% of control)	AADC activity (nmol/min/mg protein) (% of control)
Control	19.6±0.46 (100)	0.76±0.04 (100)
Ethaverine 7.5 μM	16.6±0.64 (84.7)*	0.70±0.03 (92.1)

The results represent means±SE of 4~5 dishes. Significantly different from the control values: *, $P<0.05$ (Student's *t*-test).

Ethaverine에 의한 P815 세포중의 serotonin 함량 감소 및 TPH 활성 저해작용에 대한 경시적인 변화를 검토하였다(Fig. 2). P815 세포중의 serotonin 함량은 ethaverine(7.5 μM)의 전처치에 의하여 12시간에서 감소하기 시작하여 12~36시간까지는 감소를 유지하였으며, 이후 serotonin 함량은 48시간에서 대조군 수준(대조군의 80~85%)으로 회복되었다. 또한 TPH 활성은 ethaverine 전처치(7.5 μM)에 의하여 12시간에서 저해되기 시작하여 12~36시간에서 최대의 저해작용을 나타내었으며, 48시간에서 TPH 활성은 대조군 수준으로 회복되었다.

따라서 ethaverine에 의한 P815 세포중의 TPH 활성 저해작용은 세포내 serotonin 함량 감소작용을 유도한 것으로 사료되

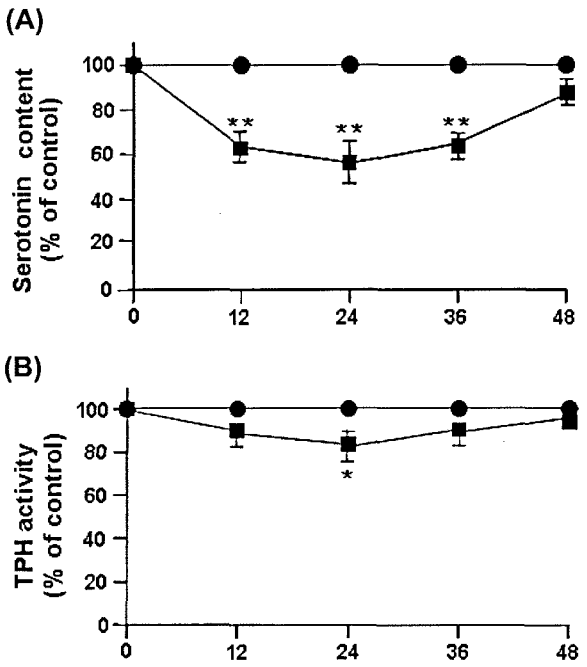

Fig. 2 – Changes of serotonin content (A) and tryptophan hydroxylase (TPH) activity (B) by ethaverine in P815 cells. Serotonin content and TPH activity of the control were 1.67 nmol/mg protein and 17.9 nmol/min/mg protein, respectively. Significantly different from the control values (n=4-5): *, $P<0.05$; **, $P<0.01$ (Student's *t*-test). -●- Control, -■- Ethaverine, 7.5 μM.

어, 세포내의 TPH를 부분정제(P815-TPH)하여 ethaverine이 P815-TPH 활성에 미치는 영향을 검토하였다. 대조군의 P815-TPH 활성은 35.3 nmol/min/mg protein 이었다.[21] P815-TPH 활성은 ethaverine(200 μM)에 의하여 활성 저해작용을 나타내었으며(대조군의 84.7%), 이는 P815 세포중의 TPH 활성 저해작용에 비하여 약 20~26배의 높은 농도이었다(자료 미제시). Ethaverine은 L-type Ca^{++} 통로 차단하여 세포내 Ca^{++} 함량의 감소를 유도하며,[2,3] 이는 세포내 TPH 활성 저해작용과 관련이 있을 것으로 사료된다.[8,9] 이 결과로부터 ethaverine에 의한 P815 세포중의 TPH 활성 저해작용은 효소 P815-TPH에 직접적인 활성 저해작용이 아니라 간접적인 활성 저해작용에 의한 것임을 제시하고 있으며, 이에 대한 연구는 추가로 진행되어야 할 것으로 사료된다.

Isoquinoline 계열 화합물에 대한 P815 세포내 serotonin 생합성에 미치는 영향을 정리하여 보면,[20-22] benzylisoquinoline 화합물(IC_{50} 값: papaverine, 7.2 μM; ethaverine, 6.1 μM; tetrahydropapaverine, 6.2 μM; tetrahydropapaveroline, 7.5 μM) 및 protoberberine 알카로이드(IC_{50} 값: berberine, 3.0 μM; palmatine, 16.5 μM; coralyne, 14.5 μM)는 serotonin 생합성 저해작용을 나타내었으며, coptisine(protoberberine 알카로이드), noscapine, hydrastine, bicuculline, bulbocapnine, chelidonine, salsolinol 등은 P815 세포내 serotonin 생합성 저해작용을 나타내지 않았다(미발표자료).

상기 4종 benzylisoquinoline 일카로이드의 serotonin 생합성에 대한 IC_{50} 값은 6.1~7.5 μM이며, isoquinoline 환의 입체구조와 모핵의 치환기는 P815 세포내 serotonin 생합성과 관련한 생리활성에는 영향을 주지 않는 것으로 사료된다. Berberine, palmatine, coralyne 및 coptisine은 protoberberine 환을 가지고 있으며 화학구조면에서 매우 유사하다. 그러나 coptisine은 P815 세포중의 serotonin 함량에는 영향을 주지 않았으며,[20] 이는 protoberberine 모핵의 R_3 및 R_4의 치환기가 중요한 역할을 할 것으로 사료된다. 또한 coptisine은 monoamine 대사 효소인 type A monoamine oxidase에 대하여 강한 저해작용(IC_{50} 값, 1.8 μM)을 나타내고 있음이 보고되었으며,[26] 이는 coptisine도 monoamine 함량 조절작용이 있음을 나타내고 있다. 그러나 coptisine은 PC12 세포중의 dopamine 함량 및 P815 세포중의 serotonin 함량변화에는 영향을 주지 않았으며,[13,20] 이는 각 세포내의 monoamine oxidase 활성과 관계가 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서는 ethaverine은 P815 세포내 serotonin 함량 감소작용을 나타내었으며, 배지 중으로의 serotonin 분비는 영향을 주지 않았다. 이 경우에 P815 세포내의 TPH 활성을 경시적으로 저해하였으나, AADC 활성은 유의적으로 저해되지 않았다. 따라서 ethaverine에 의한 P815 세포중의 serotonin 함량 감소작용은 TPH 활성 변화와 밀접하게 관련이 있을 것으로 사료된다. 따라서 ethaverine은 monoamines(dopamine 및 serotonin) 함량 감소작용을 나타내고 있으며, 이와 관련하여 세포수준에서의 작용기전 연구 및 행동 약리학적, 뇌내 동태학적인 응용 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 2006년도 충북대학교 학술연구 지원사업의 연구비로 수행되었음.

참고문헌

1) Trainer, F. S., Philips, R. E., Michie, D. D., Zellner, S. R., Hogan, L. Jr. and Chubb, J. M. : Effects of ethaverine hydrochloride on the walking tolerance of patients with intermittent claudication. *Angiology* **37**, 342 (1986).
2) Greenslade, F. C., Scott, C. K., Newquist, K. L., Krider, K. M. and Chasin, M. : Heterogeneity of biochemical actions among vasodilators. *J. Pharm. Sci.* **71**, 94 (1982).
3) Suh, B. C. and Kim, K. T. : Inhibition by ethaverine of catecholamine secretion through blocking L-type Ca^{2+} channels in PC12 cells. *Biochem. Pharmacol.* **47**, 1262 (1994).
4) Adham, N., Borden, L. A., Schechte, L. E., Gustafson, E. L. and Branchek, T. A. : Cell-specific coupling of the cloned human 5-HT_{1F} receptor to multiple signal transduction pathways. *Naunyn. Schemied. Arch. Pharmacol.* **348**, 566 (1993).
5) Hoyer, D., Clarke, D. E., Fozard, J. R., Hartig, P. R., Martin, G. R., Mylecharrane, E. J., Saxena, P. R. and Humprey, P. P. A. : Interantional union of pharmacology classification of reports for 5-hydroxytryptamine (serotonin). *Pharmacol. Rev.* **46**, 157 (1994).
6) Ballenger, J. C., Goodwin, F. K., Major, L. F. and Brown, G. L. : Alcohol and central serotonin metabolism in man. *Arch. Gen. Psychiatry* **36**, 224 (1996).
7) Lovenberg, W., Jequier, E. and Sjoerdsas, A. : Tryptophan hydroxylation; measurement in pineal gland, brain stem and carcinoid tumor. *Science* **155**, 217 (1967).
8) Hamon, M., Bourgoin, S., Hery, F. and Simonnet, G. : Activation of tryptophan hydroxylase by adenosine triphosphate, magnesium and calcium. *Mol. Pharmacol.* **14**, 99 (1978).
9) Yamaushi, T. and Fujisawa, H. : Most of Ca^{++}-dependent endogenous phosphorylation of rat brain cytosol proteins requires Ca^{++}-dependent regulation protein. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **90**, 28 (1979).
10) Schindler, R., Day, M. and Fisher, G. A. : Culture of neoplastic mast cells and their synthesis of 5-hydroxytryptamine and histamine *in vitro*. *Cancer Res.* **19**, 47 (1959).
11) Imanishi, N., Nakayama, T., Asano, M., Yatsunami, K., Tomita,

K. and Ichikawa, A. : Induction of histidine decarboxylase by dexamethasone in mastocytoma P815 cells. *Biochim. Biophys. Acta* **928**, 227 (1987).

12) Shin, J. S., Lee, J. J., Kim, Y., Lee, C. K., Yun, Y. P. and Lee, M. K. : Inhibitory effects of ethaverine, a homologue of papaverine, on dopamine content in PC12 cells. *Biol. Pharm. Bull.* **24**, 103 (2001).
13) Shin, J. S., Kim, E. I., Kai, M. and Lee, M. K. : Inhibition of dopamine biosynthesis by protoberberine alkaloids in PC12 cells. *Neurochem. Res.* **25**, 363 (2000).
14) 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).
15) 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-induced neurotoxicity by tetrahydropapaveroline in PC12 cells. *Biochem. Pharmacol.* **66**, 1787 (2003).
16) Shin, J. S., Yun-Choi, H. S., Kim, E. I. and Lee, M. K. : Inhibitory effects of higenamine on dopamine content in PC12 cells. *Planta Med.* **65**, 452 (1999).
17) 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)-β-hydrastine on dopamine biosynthesis in PC12 cells. *Neuropharmacol.* **47**, 1045 (2004).
18) Lee, S. S., Kai, M. and Lee, M. K. : Effects of natural isoquinoline alkaloids on monoamine oxidase activity in mouse brain: inhibition by berberine and palmatine. *Med. Sci. Res.* **27**, 749 (1999).
19) Lee, S. S., Yun-Choi, H. S., Kim, E. I. and Lee, M. K. : Inhibition of monoamine oxidase by higenamine. *Med. Sci. Res.* **26**, 71 (1999).
20) Lee, M. K., Kim, E. I., Hur, J. D., Lee, K. S. and Ro, J. S. : Effects of protoberberine copounds on serotonin content in P815 cells. *Kor. J. Pharmacogn.* **32**, 49 (2001).
21) Kim, E. I., Kang, M. H. and Lee, M. K. : Inhibitory effects of tetrahydropapaverine on serotonin biosynthesis in murine P815 cells. *Life Sci.* **75**, 1949 (2004).
22) Kim, E. I., Yin, S. Y., Kang, M. H., Hong, J. T., Oh, K. W. and Lee, M. K. : Reduction of serotonin content by tetrahydropapaveroline in murine mastocytoma P815 cells. *Neurosci. Lett.* **339**, 131 (2003).
23) Yanagisa, M., Hasegawa, H. and Ichiyama, A. : Assay of tryptophan hydroxylase and aromatic L-amino acid decarboxylase based on rapid separation of the reaction product by high performance liquid chromatography. *J. Biochem.* **92**, 449 (1982).
24) Matsubara, K., Kobayashi, Y., Tanabe, Y., Maruyama, W., Ishinaga, Y., Idzu, T., Kimura, K. and Naoi, M. : Modulation of tryptophan hydroxylase activity in vitro by ethanol depends on biopterin cofactor concentration. *Alcohol.* **13**, 455 (1996).
25) 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).
26) Ro, J. S., Lee, S. S., Lee, K. S. and Lee, M. K. : Inhibition of type A monoamine oxidase by coptisine in mouse brain. *Life Sci.* **70**, 639 (2001).