

Sodium Taurodeoxycholate가 肝장해 Rat에서 메틸렌 블루의 체내분포와 소실에 미치는 영향

권오승 · 심창구 · 이민화 · 김신근

서울대학교 약학대학

(Received March 5, 1986)

Effect of Sodium Taurodeoxycholate on the Disposition and Elimination of Methylene Blue in the Rats of Experimental Hepatic Failure

Oh-Seung Kwon, Chang-Koo Shim, Min Hwa Lee and Shin Keun Kim

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151, Korea

Abstract—Effect of sodium taurodeoxycholate (TDC) on the pharmacokinetics of methylene blue (MB) was investigated in the rats of experimental hepatic failure induced by CCl_4 . Intravenous infusion of TDC increased the distribution volume of central compartment (Vd_1) and the total body clearance (CL_t) of MB. Increased lipophilicity through ion-pair formation with TDC seemed to be the probable cause of increased Vd_1 and CL_t .

Methylene blue(이하 MB)는 pK_a 가 0~-1로 생리적인 pH 범위내에서 거의 완전히 양이온 상태로 존재한다.¹⁾ MB는 각종 음이온들과 ion-pair 화합물을 형성하며²⁾ 그중 sodium taurodeoxycholate(TDC)와의 이온대 화합물의 참분배계수가 benzoate, *p*-toluenesulfate나 salicylate 등과의 이온대화합물의 참분배계수보다 훨씬 크다.³⁾

한편 담즙산은 유기 음이온의 담즙으로의 수송을 촉진시키며⁴⁻⁵⁾ 그중 TDC는 사람과 동물에서의 담세관 분비에 중요한 역할을 하고 있다.⁶⁻¹⁰⁾

저자 등은 前報¹¹⁾에서 정상적인 rat에 TDC를 주입하였을 때, MB의 체순환 공간파트먼트에의 분포용적(Vd_1)이 증가하나 전신클리어런스(CL_t)는 거의 변화하지 않음을 보고하였다. Vd_1 의 증가는 MB와 TDC와의 이온대 형성에 의한 지용성 증가에 기인하는 것으로 설명되었다. 또한 CL_t 가 예상과 달리 TDC에 의해 증가하지 않은 것은 MB 소실에 필요한 내인성 TDC가 체내에 이미 충분히 존재하고 있었기 때문에 외부로부터의 TDC 주입의 효과가 제대로 나타나지 않았던 것으로 생각되었었다.

따라서 이번에는 실험실적 방법으로 CCl_4 를 써서 간장해를 유발시켜, 내인성 TDC가 MB 소실에 부족할 가능성이 있는 rat를 만든 다음, TDC를 주입시켜 MB의 분포 및 소실에 미치는 TDC의 영향, 즉 MB와 TDC와의 이온대 형성 반응의 영향을 연구하였다.

실 험 방 법

시약 및 기기—시약으로는 methylene blue(1급, Kokusan Chemical), sodium chloride(EP, 富田製藥), 생리식염수(KPIV), sodium taurodeoxycholate(Sigma), 1, 2-dichloroethane(1급, 昭和), carbon tetrachloride(EP, 關東化學), 올리그유(KPIV), GOT, GPT 측정용 시약세트(한국시약)를 사용하였고 기기로는 spectrophotometer(LKB 1), infusion pump(12H Type, Natsume), centrifuge(H-360A, Kokusan), vortex mixer(H-77VM, 和信) 등을 사용하였다.

실험동물—서울대학교 실험동물 사육장에서 사육된 320~400g의 Donryu계 웅성 rat를 사용하

였다.

간장해의 유발—실험동물에 CCl_4 와 올리브유를 1:1 동량 혼합하여 rat체중 100g당 0.1ml씩 1일과 5일째 되는 날 아침에 투여하여 간장해를 유발¹²⁾시킨 다음, 최종 투여 48시간 후에 실험에 사용하였다. 간장해는 sGOT, sGPT가 각각 693 및 1,320unit/ml로 정상 rat(각각 40, 103unit/ml)보다 높은 것으로 부터 확인하였다.

TDC의 정맥 주입—간장해를 유발시킨 rat를 에테르로 일시 마취하고 대퇴부 동맥, 대퇴부 정맥 및 담관에 PE-50 및 PE-10 튜브로 카테터를 삽입하고 대퇴부 정맥 카테터는 infusion펌프와 연결시켰다.

대조군에는 생리식염수를, TDC 투여군에는 3.89w/v% TDC용액을¹³⁾ 정맥 카테터를 통하여 0.24ml/hr의 속도로 주입하였다. 주입을 시작하여 30분이 지난 후에 4w/v% MB용액을 40mg/kg의 용량으로 대퇴부 정맥의 카테터를 통해서 주사하고 즉시 카테터를 infusion펌프에 다시 연결시켰다.

MB의 정량—DiSanto 등의 방법을 약간 수정하여 사용했다. 즉 全血중 농도측정용 검량선은 MB의 0.04, 0.06, 0.08, 0.4, 0.6, 1, 2, 4, 6, 10 μ g/ml의 각 용액 0.3ml씩을 정밀히 취하여 NaCl 60mg을 가하고 2~3분간 믹서로 교반한 후, 각각에 1.2-dichloroethane 3ml를 가했다. 이것을 10분동안 다시 믹서로 교반하고 4000rpm에서 10분동안 원심분리를 한 다음 그 상층액을 aspirator로 제거하고 1.2-dichloroethane층을 취하여 600nm에서 흡광도를 측정하여 검량선을 얻었다. 담즙 중 농도 측정용 검량선은 MB의 0.04, 0.08, 0.4, 0.8, 6, 10 μ g/ml의 각 용액을 각각 0.3ml씩 취하여 NaCl 60mg을 가한 후 진혈 중 농도 측정용 검량선에서와 똑같은 조작으로 흡광도를 측정하여 그 검량선을 얻었다.

TDC가 MB의 정량에 미치는 영향—MB를 2 μ g/ml의 농도로 고정시키고 TDC를 0.05, 0.5, 1, 5, 10, 10,000, 20,000 μ g/ml의 농도로 만들어 흡광도를 측정하여 infusion에 의해 혈중에 공존하는 TDC가 MB의 정량을 방해하지 않음을

확인하였다.

혈액 및 담즙 채취—혈액은 2, 7, 10, 15, 30, 45, 90, 150, 180분간 간격으로, 담즙은 20, 40, 60, 90, 120, 150, 180분 간격으로 채취하였으며 백혈등을 써서 실험기간 동안 체온을 유지하도록 하였다.

담즙배설 클리어란스의 계산—MB의 담즙배설량을 채취시간으로 나눈 뒤 다시 이를 그때의 평균 혈중 MB 농도로 나누어 구하였다.

sGOT, sGPT측정—Reitman-Frankel 방법을 사용하여 측정했다.

검량곡선은 sGOT, sGPT 표준 시액을 사용하여 sGOT는 0, 22, 55, 95, 150, 215units/ml 혈청으로, sGPT는 0, 25, 50, 83, 126units/ml 혈청으로 만들어 0.4N-NaOH 10ml를 가하고 혼합하여 5분이상 靜置하여 두었다가 505nm에서 증류수를 盲檢으로 하여 % 투과도를 측정하여 검량선을 얻었다.

혈청중의 sGOT, sGPT의 측정은 시험관에 sGOT, sGPT 기질액 1ml씩을 피펫으로 정확히 취하여 37°C 항온조에서 5분 이상 둔 다음, 혈청 0.2ml를 정확히 시간을 재어 시험관에 넣고 잘 혼합하여 GOT는 1시간, GPT는 30분간 37°C 항온조에서 가온하였다. 정확히 30분 가온 후, 각 시험관에 DNPH 발색시약 1ml를 가하고 혼합하여 실온에 20분간 정치하고 0.4N-NaOH 용액을 10ml씩 가하였다. 혼합하여 실온에 5분 정치한 후, 505nm 파장에서 증류수를 盲檢으로 %투과도를 측정하였다. 측정 GOT, GPT가 각각 165, 125 단위를 넘을 때는 혈청을 증류수로 10배 희석하여 재측정을 한 다음, 얻어진 단위수에 10배 하였다.

약물체내속도론적 분석—측정데이터를 MULTI-프로그램¹⁴⁾을 이용하여 2-컴파르트먼트 모델에 적용시켜 속도론적 파라메타를 계산하였다.

실험결과 및 고찰

CCl_4 로 유발시킨 간장해 rat에 TDC 또는 생리식염수를 동속주입하면서 MB를 정맥주사한 후의 혈중농도 패턴은 Fig. 1과 같았다. TDC

Table I—Effect of TDC infusion on the pharmacokinetic parameters of MB in CCl₄-hepatic failure rats.^{a)}

Parameters	Control	TDC
A ($\mu\text{g/ml}$)	115.57 \pm 1.73	71.12 \pm 8.95
α (min^{-1})	0.56 \pm 0.03	0.34 \pm 0.04
B ($\mu\text{g/ml}$)	14.49 \pm 1.35	5.63 \pm 3.15
β (min^{-1})	0.02 \pm 0.00	0.03 \pm 0.00
Vd_{ss} (ml/min.kg)	1622.82 \pm 131.81	1381.87 \pm 57.40
Vd_1 (ml/kg)	314.51 \pm 26.97	518.24* \pm 64.40
Vd_2 (ml/kg)	1308.25 \pm 109.09	863.62* \pm 4.59
K_{10} (min^{-1})	0.17 \pm 0.01	0.18 \pm 0.01
K_{12} (min^{-1})	0.33 \pm 0.02	0.12** \pm 0.02
K_{21} (min^{-1})	0.08 \pm 0.00	0.07 \pm 0.01
AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{min/ml}$)	766.64 \pm 93.54	423.25* \pm 12.98
CL_t (ml/kg/min)	53.63 \pm 5.99	94.68** \pm 2.98
CL_{bil} (ml/kg/min)	0.05 \pm 0.01	0.09 \pm 0.04

a) Each group represents the mean \pm S.E. of three rats. MB was injected intravenously at a dose of 40 mg/kg body weight. *0.02 < p < 0.05, **0.001 < p < 0.01

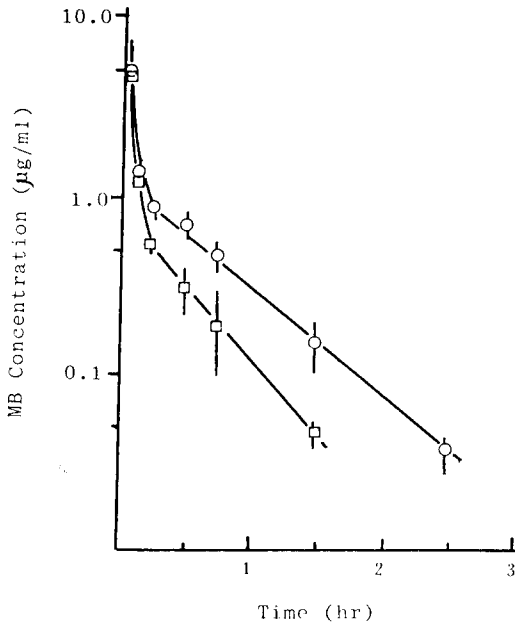


Fig. 1—Blood concentration-time curves of MB in CCl₄-hepatic failure rats. MB was injected intravenously at a dose of 40mg/kg body weight. Each point represents the mean \pm S.E. of three rats. Curves were calculated by MULTI program.¹⁴⁾
Key: —□— TDC infused group, —○— saline infused control group.

주입시의 MB 혈중농도는 대조군(생리식염수 주입군)에 비해 현저히 낮아졌다. 이와 같은 경향은 정상 rat에 TDC를 주입하였을 경우¹¹⁾와 일치하였다. 이 데이터를 2-컴파트먼트 모델로 해석하여 구한 속도론적 파라메타들은 Table I과 같다. 체순환 컴파트먼트의 분포용적(Vd_1)은 정상 rat¹¹⁾에서와 마찬가지로 TDC 주입에 의해 유의성($p < 0.05$)있게 증가하였으나 말초컴파트먼트의 분포용적(Vd_2)은 오히려 유의성($p < 0.05$)있게 감소하였다. 이와 같은 Vd_2 의 감소는 정상 rat¹¹⁾에서도 보이는 경향이였다. 이와 같은 Vd_2 의 감소는 K_{12} 의 유의성($p < 0.01$)있는 감소와도 일치한다.

한편 CCl₄ 간장해에 의해 Vd_1 이 주로 감소하였는데 이는 체순환 컴파트먼트에 속하는 간에의 MB uptake가 저해되는 때문이라고 생각된다. MB가 간장, 신장 등 혈류가 빠른 조직에 신속히 uptake되는 사실은 이미 보고된 바¹⁵⁾ 있다.

또 CCl₄ 간장해 rat에 TDC를 주입하면 AUC는 유의성($p < 0.05$)있게 감소하였고 따라서 전신 클리어런스(CL_t)는 TDC 주입에 의해 유의성($p < 0.01$)있게 증가하였다. K_{10} 가 TDC주입에 의해 유의성 있게 증가하지 않은 점으로 미루어 보아 CL_t 의 증가는 Vd_1 의 증가에 기인한

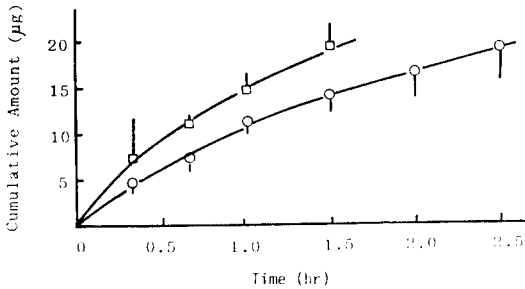


Fig. 2-Cumulative amount of MB excreted biliary in CCl₄-hepatic failure rats. Each point represents the mean \pm S.E. of three rats.
Key: \square - TDC infused group, \circ - saline infused control group.

것으로 생각된다. 이와 같은 CL_t 의 증가는 정상 rat에 TDC를 주입했을 때는 나타나지 않던 현상¹¹⁾이었다. 이는 정상시에는 내인성 TDC가 MB배설에 부족하지 않으리만큼 충분한 농도를 유지하고 있기 때문에 외부에서 TDC를 주입해 주어도 그 효과가 나타나지 않았으나 CCl₄ 간장 해시에는 내인성 TDC농도가 부족하기 때문에 외부로부터의 TDC 주입효과가 그대로 나타난 것으로 생각된다. 그러나 MB의 담즙중의 누적 배설량(Fig. 2) 및 담즙에로의 배설클리어런스(CL_{bil})는 TDC 주입에 의해 생리식염수 주입군 보다 증가하는 경향을 보였으나 유의성은 없었다. MB의 CL_{bil} 이 CL_t 중에서 차지하는 비율이 무시할 수 있을 만큼 작은 점으로 미루어 보아 담즙산 TDC가 양이온성 약물 MB의 뇨배설에 보다 큰 영향을 미치는 것으로 생각된다.

이상의 결과를 합쳐서 생각할 때, MB와 담즙산이 ion-pair 화합물을 형성⁸⁾하여 MB의 극성이 줄어들고 지용성이 증가함으로써 MB의 소실경로인 간장 또는 신장의 세포막을 더욱 잘 통과하게 된 것으로 생각된다. K_{10} 는 증가하지 않고 Vd_1 만 증가하여 CL_t 가 증가하였다는 사실은 바로 이를 의미하는 것으로 생각되었다. 그러나 TDC에 의한 Vd_2 의 감소는 그 이유를 설명하기 어렵다. 다만 Vd_2 의 특성상 β 등의 영향을 받는데 이 β 값이 두군에서 차이 나는 점도 영향을 미쳤을 가능성이 있다고 생각된다.

결론

CCl₄로 유발시킨 간장해 rat에 TDC 또는 생리식염수를 주입하면서 MB를 정맥주사함으로써 TDC가 MB의 체내분포 및 소실에 미치는 영향을 조사하였다. MB의 체순환 콤파트먼트의 분포와 전신클리어란스가 유의성있게 증가하였는데 이는 MB와 TDC가 생체내에서 이온對를 형성⁸⁾함으로써 지용성이 증가하고, 이에 따라 MB의 주된 소실장기인 신장이나 간장의 세포막을 용이하게 통과하게 된 탓으로 생각된다. 한편 정상 rat에 TDC를 주입했을때 CL_t 의 유의성 있는 증가가 보이지 않은 것¹¹⁾은, 정상시에는 TDC 소실에 충분한 TDC가 원래부터 몸안에 상존하기 때문에 외부로부터의 TDC 주입효과가 제대로 나타나지 않았기 때문으로 생각된다. TDC가 MB의 소실에 미치는 영향을 보다 확실히 하기 위해서는 腎배설 클리어런스 실험을 추가하는 것이 좋을 것이다. 또 이 연구에서 말초콤파트먼트에의 분포가 TDC 주입에 의해 감소한 사실에 대해서는 후후의 연구검토가 더욱 필요하다고 생각되었다.

감사의 말씀

이 연구의 일부는 한국과학재단의 연구비지원에 의해 수행되었다.

문헌

- 1) Shore, P.A., Brodie, B.B., and Hogben, C.A.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **119**, 361 (1957).
- 2) DiSanto, A.R., and Wagner, J.G.: *J. Pharm. Sci.* **61**, 1086 (1972).
- 3) Shim, C.K.: *Yakhak Hoeji* **27**, 125 (1983).
- 4) O'Maille, E.R., Richards, T.G., and Short, A.H.: *J. Physiol. Lond.* **186**, 424 (1966).
- 5) Boyer, J.L., Scheig, R.L., and Klatskin, G.: *J. Clin. Invest.* **49**, 206 (1970).
- 6) Boyer, J.L., and Klatskin, G.: *Gastroenterology* **59**, 853 (1970).

- 7) Hardison, W.G.M., and Aprt, T.T.: *Am. J. Physiol.* **222**, 61 (1972).
- 8) Kay, R.E., and Entenman, C.: *Am. J. Physiol.* **200**, (1961).
- 9) Nilson, S., and Schersten, T.: *Gastroenterology* **57**, 525 (1969).
- 10) Wheeler, H.O., and King, K.K.: *J. Clin. Invest.* **51**, 1337 (1972).
- 11) Shim, C.K.: *Arch. Pharm. Res.* **9**, 49 (1986).
- 12) Klassen, C.D., and Gabriel, L.P.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **12**, 132 (1968).
- 13) Douglas, E., Rollin, S., James, W.F., and Dixon, M.W.: *Biochem. Pharmacol.* **29**, 1023 (1979).
- 14) Shim, C.K., and Chung, S.J.: *Seoul University J. Pharm. Sci.* **8**, 32 (1983).
- 15) DiSanto, A.R., and Wagner, J.G.: *J. Pharm. Sci.* **61**, 1090 (1972).