

In vitro 계에서의 Streptozotocin 분해 및 세포내 흡수

박기숙 · 호지숙 · 문창규 · 정진호

서울대학교 약학대학

SPONTANEOUS DEGRADATION AND CELLULAR UPTAKE OF STREPTOZOTOCIN UNDER IN VITRO SYSTEMS

Ki-Suk Park, Ji-Suk Ho, Chang-Kiu Moon and Jin-Ho Chung*

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul, 151-742, Korea

(Received August 8, 1991)

(Accepted September 15, 1991)

ABSTRACT: Since streptozotocin has been known to be chemically stable only under acidic condition (pH 4), the spontaneous degradation and cellular uptake of streptozotocin in neutral incubation medium was determined by chemical assay. Streptozotocin levels in both phosphate buffered saline (pH 7.4) and Krebs-Henseleit buffer (pH 7.4) decreased with a half life of about 2 hours. The presence of erythrocytes or hepatocytes under the same buffers did not affect the streptozotocin degradation rate at all. However, streptozotocin levels in plasma isolated from rats decreased rapidly compared to those in neutral buffers. Cellular uptake studies showed that streptozotocin in erythrocytes or hepatocytes increased rapidly within 30 minutes and reached plateau thereafter although the amount of cellular uptake was relatively small compared to those in incubation medium. These results suggest that spontaneous degradation of streptozotocin in incubation medium may not affect cellular uptake of streptozotocin *in vitro*.

Key words: Streptozotocin, *In vitro* degradation, Erythrocytes, Hepatocytes, Plasma

서 론

Streptozotocin은 *Streptomyces achromogenes*에서 분리된 1-methyl-1-nitrosourea의 2-deoxy-D-glucose

*To whom correspondence should be addressed

유도체로서, 광범위 항균제이며 항암성, 변이원성, 혈당 증가의 특성을 가지고 있다(Weiss, 1982). 1963년 streptozotocin이 rat과 개에서 당뇨병을 유발한다고 보고된 이래, 실험동물에서 당뇨병을 유도하기 위한 약물로 널리 사용되고 있다(Junod *et al.*, 1967; Past *et al.*, 1982). 당뇨병을 유발하는 기전은 췌장의 beta cell에 대한 특이한 독성 때문이라고 알려져 있다. Streptozotocin의 nitroso기는 췌장세포의 독성을 매개하며, deoxyglucose기는 beta cell로의 유입을 용이하게 한다(Rossini *et al.*, 1977). Streptozotocin은 세포내에서 alkylation 및 radical attack 등을 통한 DNA 손상을 일으켜 poly(ADP-ribose) polymerase의 활성을 증가시키기 때문에 세포내의 NAD⁺ 함량을 낮추며(Dulin *et al.*, 1969; LeDoux *et al.*, 1988; Yamamoto *et al.*, 1981), 또한 superoxide dismutase 활성을 현저히 감소시킨다(Wilson *et al.* 1984). 따라서 당뇨병을 유발하는 기전은 alkylation이나 radical attack 으로 인한 DNA 손상 및 NAD⁺ depletion으로 추정되고 있다(Papaccio *et al.*, 1986).

Streptozotocin은 매우 불안정한 화합물로 알려져 있으며, 체내로 들어가면 혈중에서 빠르게 제거되며 뇨로 배설된다. Isotope-labeled streptozotocin을 사용한 rat의 체내 분포 상태에 관한 보고에 따르면 혈액에서는 정맥 투여 후 10분 정도에 최대농도가 되며 간과 신장에서는 30분에서 1시간 사이에 혈액보다 높은 농도를 나타내고, 투여량의 70% 이상이 투여 후 4시간 이내에 뇨로 배설된다(Bhuyan *et al.*, 1974; Karunanayake *et al.*, 1974; Karunanayake *et al.*, 1975).

본 실험에서는 streptozotocin의 적혈구와 간세포에 대한 독성을 연구하는 과정에서, 문헌에서 보고된 것처럼(Bhuyan *et al.*, 1974) streptozotocin은 중성용액에서는 불안정하여 자발적으로 분해됨을 관찰하였다. 따라서 streptozotocin을 사용한 대부분의 *in vivo* 및 *in vitro* 실험에서는 pH 4의 NaCl 용액 또는 pH 4의 citrate 완충액에 녹여서 사용하고 있다. 그러나, streptozotocin을 *in vitro* 세포 배양 실험에 사용하는 경우 streptozotocin이 안정한 pH 4의 조건에서는 세포의 상태가 악화되므로 실험의 지속이 곤란하다. 예를들어 적혈구를 pH 4의 용액에서 배양하면 용액 자체만으로도 용혈이 일어나며, 간세포의 경우도 세포의 생존율이 산성 용액에서는 현저히 감소한다. 이와 같이 *in vitro* 세포 배양 실험은 세포의 안정성을 고려할 뿐만 아니라 생체와 가장 유사한 상태를 유지하기 위해 pH 7.4 조건하에서 실험하는 것이 바람직하다.

본 연구에서는 산성 용액에서만 안정하다고 알려진 streptozotocin의 중성용액에서 자발적인 분해 여부와 더불어 중성 용액에서 *in vitro* 세포 배양시 streptozotocin의 세포 흡수 정도에 관하여 실험하였다. 이러한 연구를 생체내 완충 용액이라 할 수 있는 혈장을 분리하여 동시 실험함으로써 streptozotocin이 *in vivo*로 투여된 후의 생체내 kinetics를 *in vitro* 실험과 비교 분석하였다.

재료 및 방법

시약

Collagenase, Hank's balanced salts, Krebs-Henseleit 완충액, albumin, HEPES, sulfanilic acid, streptozotocin, N-(1-naphthyl)-ethylene diamine dihydrochloride 및 trypan blue는 Sigma Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, pentobarbital은 TCI사(Tokyo, Japan)에서 구입하였다. Phosphate buffered saline은 직접 조제하여 사용하였다.

실험동물

자성 Sprague-Dawley rats를 생후 3주에 유한 양행 중앙 연구소로부터 공급받아 최소한 4주간 본 대학 사육실에서 적응시켰다. 사육조건은 온도 21±1°C, 습도 55±1%로 맞추어 주고, 12시간 주기로 명암을 바꾸어 주었다. 사료(제일제당 사료) 및 식수는 충분히 공급하였다. 180-270 g의 무게에서 실험에 사용하였다.

적혈구와 혈장의 분리 및 배양

Rat를 ether로 흡입마취시킨 후 헤파린을 처리한 주사기를 이용하여 복부 동맥으로부터 혈액을 채취하고, 3000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상층의 혈장을 조심스럽게 취해 얼음 속에 보관하고,

lymphocytes등으로 구성된 buffy coats는 감압 장치를 사용하여 완전히 제거한 후 남아있는 적혈구는 phosphate-buffered saline(PBS: KH_2PO_4 , 8.69 mM, NaH_2PO_4 , 30.4 mM, NaCl 96 mM, pH 7.4)를 이용하여 동일방법으로 세척하였다. 얻어진 적혈구는 PBS를 이용하여 20% 현탁액으로 만들고 이것을 소량 취해 현미경을 이용하여 세포수를 측정하였다. Microcentrifuge tube에 20% RBC suspension 0.2 ml, PBS 0.6 ml, 식염수에 녹인 streptozotocin을 가해 최종 농도가 10 mM이 되도록 하였다. 이것을 37°C 항온조에서 배양하면서 0, 10, 20, 30, 60, 120분 후에 꺼내어 90초간 10,000 g로 원심분리하여 상층액을 얻고 남은 세포는 PBS로 2번 세척하여 streptozotocin의 농도를 측정하였다.

간세포 분리 및 배양

Rat에 pentobarbital (65 mg/kg, *i.p.*)을 투여하여 마취시킨 후 collagenase perfusion 방법을 이용하여 isolated hepatocytes를 얻었다(Snell *et al.*, 1987). 분리시 생존율은 trypan blue exclusion test로 80-89%였다. 3×10^6 cells/ml의 농도로 25 mM HEPES와 2% albumin을 함유한 Krebs-Henseleit 완충액(NaCl 6.9 g, KCl 0.35 g, KH_2PO_4 0.16 g, MgSO_4 0.141 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.3575 g, NaHCO_3 2.1 g, glucose 2 g per 1 l, pH 7.4)를 사용하였다. 95% O_2 /5% CO_2 를 공급한 상태의 플라스틱 삼각 플라스크에 37°C하에서 배양하였다. Streptozotocin을 식염수에 녹여 최종 농도가 10 mM이 되도록 가했다. 이때 식염수는 배양액 총부피의 10%가 되도록 했다. 배양 시간 0, 10, 20, 30, 60, 120분마다 세포 현탁액을 150 μl 씩 취하여 원심분리하여 cell pellet과 배양액을 분리한 후, 배양액 100 μl 를 취하고 cell pellet은 완충액으로 2회 세척하여 streptozotocin의 농도를 측정하였다.

Streptozotocin의 정량

이 방법은 Forist (1964)에 의해 개발된 화학적 분석법으로 streptozotocin의 N-nitroso기를 분해하여 nitrous acid로 만들고 이 nitrous acid가 sulfanilic acid와 반응하여 diazo 화합물이 생기며 이 화합물이 N-(1-naphthyl)-ethylene diamine과 결합하여 550 nm에서 최대 흡광치를 나타내는 원리를 이용한 것이다. 시료를 1 M perchloric acid 처리하여 protein-free supernatant를 얻어서 얼음속에 넣어둔 acetate 완충액 (0.1 M acetic acid, 0.02 M sodium acetate, pH 4)로 streptozotocin의 농도가 0.01-0.1 mM 범위에 들어가도록 희석하였다. 여기에 6 N HCl 1 ml와 1% sulfanilic acid를 함유한 30% acetic acid에 N-(1-naphthyl)-ethylene diamine dihydrochloride를 2 mg/ml의 농도로 녹인 후, 30% acetic acid로 1:1 희석하여 만든 발색액 5 ml를 가하고 끓는 수욕에서 5분간 가운 후 상온에서 방치 냉각하였다. Acetate 완충액을 blank로 사용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준액은 streptozotocin을 acetate 완충액에 녹여 10 mM 원액을 조제한 후, 실험시 acetate 완충액으로 희석하여 0.01, 0.03, 0.06, 0.1 mM의 농도로 검량선을 만들었다. 화학적 분석법으로 측정된 streptozotocin 농도는 "streptozotocin chemical equivalents"라고 불리워진다.

결 과

배양용액 내의 streptozotocin을 정량하는데 몇가지 방법이 가능하나 비교적 용이하고 정확하다고 보고된 Forist (1964)에 의한 화학적 방법을 본 실험에서 사용하였다. 이 방법에 의한 streptozotocin의 검출 한계는 3-30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 라고 보고되어 있으므로 이와 유사한 0.01-0.1 mM의 streptozotocin 농도를 사용하여 calibration curve를 만들었다. Streptozotocin의 농도가 0.01-0.1 mM 범위에서는 Fig. 1에서 보이는 것처럼 직선 형태를 나타내기 때문에 배양 용액에서의 streptozotocin 농도가 이 범위에있으면 측정이 가능함을 제시하고 있으며, 본 실험의 결과는 앞선 문헌 보고 (Forist 1964; Bhuyan *et al.*, 1974)와 일치하였다. 또한 같은 실험을 7번 반복한 결과 streptozotocin 각각의 농도에서의 거의 유사한 흡광치를 보이며 재현성이 뛰어났으므로 하기 세포 배양 실험에서는 Fig. 1의 결과를 사용하여 streptozotocin의 농도를 측정하였다.

Streptozotocin의 중성 완충용액하에서 안정성을 연구하기 위하여 두가지 서로 다른 용액에서 시간에 따른 분해 정도를 실험하였다. 또한 생체내 완충 용액이라 할 수 있는 혈장을 분리하여 비교 실험함으로써 *in vivo* 하의 streptozotocin의 안정성을 예측하고자 했다. Fig. 2에서 보이는 것처럼 streptozotocin은 두

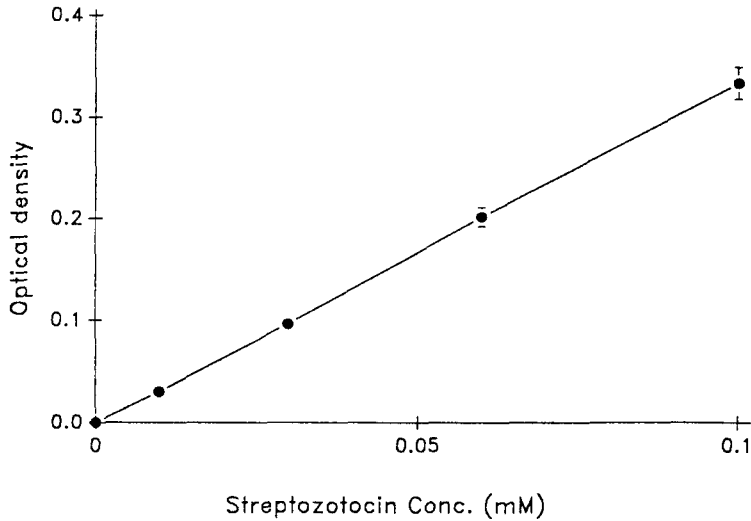


Fig. 1. The calibration curve of streptozotocin. Absorbance at 550 nm follows Beer's law over the range 0.01 to 0.1 mM of streptozotocin.

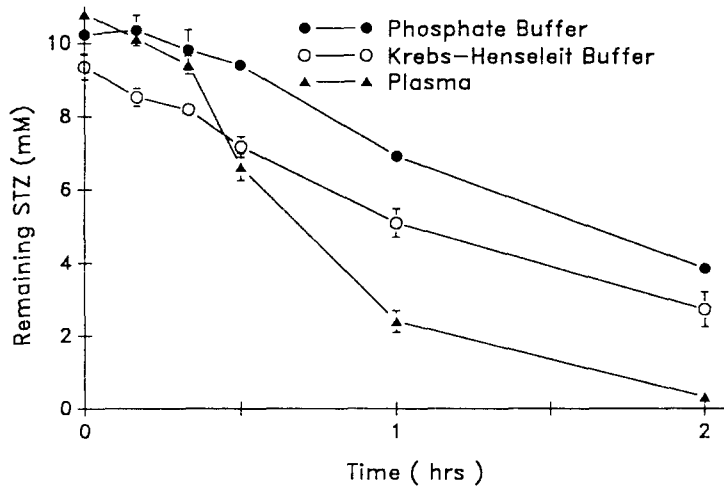


Fig. 2. Comparisons of streptozotocin degradation kinetics between plasma isolated from rats and two neutral buffer systems.

중성 완충 용액에서 2시간 내에 50% 이상이 분해되었지만 중성 완충 용액에 따른 차이는 관찰되지 않았다. 그러나 혈장에서는 완충 용액보다 더 빠른 속도로 분해되어 2시간이 되면 거의 100%가 자발적으로 분해됨을 알 수 있다. 이 결과로부터 streptozotocin은 *in vitro* 중성 용액에서 분해될 뿐만 아니라 *in vivo*로 주입되어도 더 빠른 속도로 자발적으로 분해될 수 있음을 제시하고 있다.

*Streptozotocin*의 분해 속도가 *in vitro* 용액에서는 *in vivo* 상태의 혈장에서보다 더 느리다는 실험 결과로부터 *in vitro* 중성 용액에 세포를 가하여 세포존재 유무에 따른 배양액 및 세포 내의 streptozotocin 농도 변화를 실험하였다. 중성 용액 내의 streptozotocin 분해 속도는 적혈구를 가한 경우와 없는 경우 서로 유사하였다(Fig. 3). 한편 적혈구 내의 streptozotocin 흡수는 2시간까지 계속 증가함을 보이고 있다. 다음은

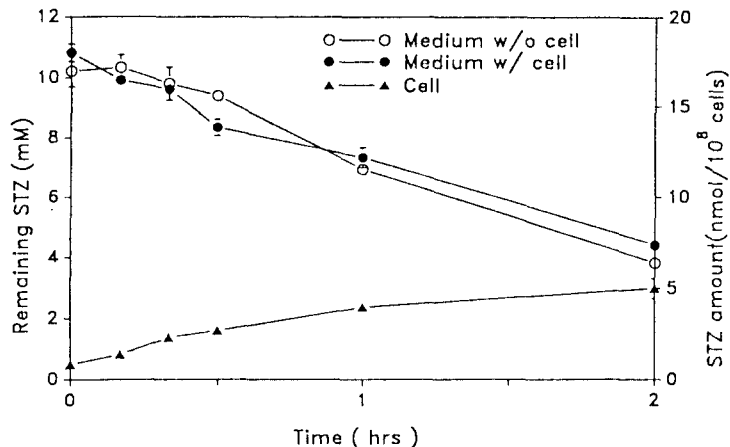


Fig. 3. Streptozotocin degradation and cellular uptake in phosphate-buffered saline in the absence or the presence of erythrocytes. The value of left axis represents streptozotocin remaining in medium and that of right axis represents the amount of streptozotocin in erythrocytes.

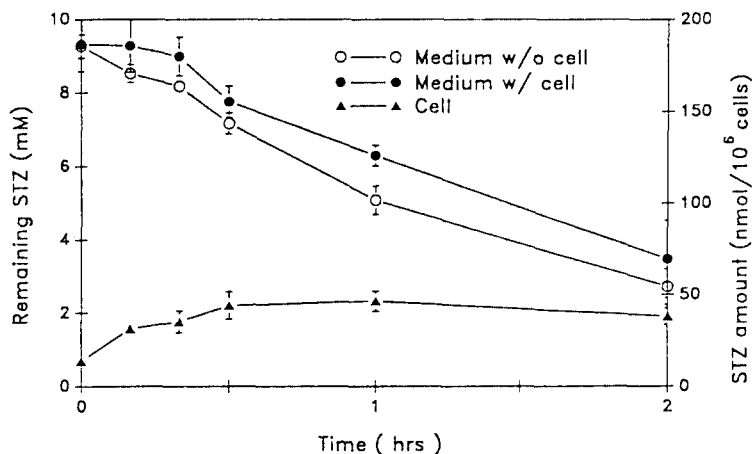


Fig. 4. Streptozotocin degradation and cellular uptake in Krebs-Henseleit buffer in the absence or the presence of isolated hepatocytes. The value of left axis represents streptozotocin remaining in medium and that of right axis represents the amount of streptozotocin in hepatocytes.

적혈구 대신 간세포를 사용하여 동등한 실험을 수행하였다. 적혈구를 사용한 실험과 유사한 결과를 Fig. 4에 보여주는데 세포 유무에 상관 없이 streptozotocin 분해 속도는 일정하였다. 이러한 결과로부터 세포가 medium에 가해진다고 해서 medium내의 streptozotocin 분해 정도는 변화되지 않음을 제시한다.

고 찰

현재 streptozotocin은 당뇨병을 연구하는 많은 실험에서 실험 동물을 당뇨상태로 유도하기 위하여 사용하고 있다. 따라서 산성 완충액(pH 4)에서 streptozotocin을 안정하게 조제한 후 *in vivo*로 실험 동물에

주입시킨다. 본 연구실에서는 streptozotocin이 생체내 다른 기관 즉 혈액계 및 간에 미치는 독성 기전을 연구하기 위하여 streptozotocin의 *in vitro* 실험을 시작하였다.

Streptozotocin의 적혈구 용혈 유발 정도에 관하여 실험하던 중 여러 문헌에 보고된 streptozotocin의 수송체로 사용되던 pH 4의 완충액에 의해서 용혈이 일어남을 확인하였다. 또한 간세포를 사용하여 실험하는 경우 산성 용액에서는 생존율이 현저히 감소하므로 세포 상태에 영향을 미치지 않으며 생리적 상태와 유사한 pH 7.4에서 streptozotocin의 자발적 분해에 관하여 연구하였다. 만일 pH 7.4의 배양 용액에서 streptozotocin의 분해가 *in vivo* 상태와 비교하여 유사하다면 세포 내의 흡수에 큰 영향을 미치지 않으므로 *in vitro* 실험에서 용액의 액성에 따른 streptozotocin의 자발적 분해 요인은 무시할 수 있다.

실험 결과 실험동물에서 분리한 혈장에서 streptozotocin이 분해되는 정도는 완충액에서 분해되는 정도에 비하여 훨씬 빨랐다. 혈장에서의 분해 속도가 *in vivo*에서의 혈장 clearance 속도보다 느리게 나타났던 것은(Bhuyan *et al.*, 1974) 이 실험 모델이 조직 분포에 의한 혈장에서의 clearance는 제외된 상태이기 때문인 것으로 추정된다. 혈장에서 중성 완충용액보다 더 빠른 감소가 나타나는 것은 혈장의 조성과 실험에 사용한 중성 완충액의 조성의 차이 때문인지 아니면 혈장내에 존재하는 효소들의 작용때문인지는 알 수 없다. 실험에 사용된 중성 완충용액은 각각 적혈구와 간세포의 배양 용액인데, 두 종류의 용액에서의 streptozotocin의 분해 양상이 유사한 것을 볼 수 있었다. Streptozotocin의 분해 속도를 보면, 반감기가 혈장에서의 두배 정도가 된다(Fig. 2).

Fig. 3와 4에서 streptozotocin이 세포에 흡수되는 양을 보면, 간세포에서는 30분 정도 지난 후에 plateau를 이루고 있는데 이러한 양상이 나타나는 것은 세포의 흡수능이 포화되어 나타날 수도 있으며 세포내에서 분해 또는 대사되는 속도와 흡수되는 속도가 같아서 나타날 수 있는 두가지 가능성이 있다. 그러나 rat에 정맥 투여시 간에 빠르게 축적되다가 30분 이후 감소되는 양상이 나타난것을 보면(Bhuyan *et al.*, 1974) 세포내에서의 분해에 의한 전자의 경우가 타당성이 높다. 이런 관점에서 보면 적혈구에서 배양 2시간까지 계속 streptozotocin의 양이 증가되는 것은 적혈구내에서는 streptozotocin 대사능이 약하기 때문이라고 추정할 수 있다. 적혈구 및 간세포의 세포 내로 흡수되는 양이 peak를 나타내지 않으므로 배양하는 동안 용액내에서의 streptozotocin의 자발적인 분해는 세포내 흡수에 영향을 주지 않음을 제시 하고 있다. 간세포에 흡수되는 streptozotocin의 양에 비해 적혈구에 흡수되는 양이 훨씬 적게 나타나는 것은 이 두 종류의 세포의 부피 차이 때문으로 생각된다. 간세포는 적혈구에 비해 세포 부피 및 세포질 부피가 더 크기 때문에 세포당 흡수되는 streptozotocin의 양도 많아질 것이다.

이상과 같이 세포 존재 여하에 따라 용액내의 streptozotocin양의 변화에 차이가 없다는 점에서 간접적으로 이러한 분해가 세포내 흡수에는 영향을 미치지 않음을 알 수 있고, 혈장에서의 분해정도가 더 크다는 점에서 streptozotocin을 중성 용액에서 실험하여도 *in vivo* 상태와 크게 다르지 않으리라 생각된다. 따라서 중성 용액에서 streptozotocin이 세포에 미치는 영향에 대하여 실험하는 것이 가능하다고 믿어진다.

감사의 말씀

본 연구는 1990년도 한국과학재단 목적기초 연구비에 의해 이루어졌음.

참고문헌

- Bhuyan, B.K., Kuentzel, S.L., Graey, L.G., Fraser, T.J., Wallach, D. and Neil, G.L. (1974): Tissue distribution of streptozotocin (NSC-85998), *Cancer Chemother. Rep.*, **58**, 157-165.
- Forist, A.A. (1964): Spectrophotometric determination of streptozotocin, *Anal. Chem.*, **36**, 1338-1339.
- Junod, A. and Lambert, A.E. (1967): Studies on the diabetogenic action of streptozotocin, *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.*, **126**, 201-205.

- Karunanayake, E.H., Hearse, D.J. and Mellows, G. (1975): The metabolic fate and elimination of streptozotocin, *Biochem. Soc. Trans.*, **3**, 410-414.
- Karunanayake, E.H., Hearse, D.J. and Mellows, G. (1974): The synthesis of [¹⁴C] streptozotocin and its distribution and excretion in the rat, *Biochem. J.*, **142**, 673-683.
- Papaccio, G., Pisanti, F.A. and Frascatore, S. (1986): Acetylhomocysteine-thiolactone-induced increase of superoxide dismutase counteracts the effect of subdiabetagenic doses of streptozotocin, *Diabetes.*, **35**, 470-474.
- Past, M.R. and Cook, D.E. (1982): Effect of diabetes on rat liver cytochrome P-450, *Biochem. Pharmacol.*, **31**, 3329-3334.
- Snell, K., Mullock, B. (1987): *Biochemical Toxicology-a Practical Approach* (IRL Press, Washington DC), pp. 23-80.
- Weiss, R.W. (1982): Streptozotocin: Review of its pharmacology, efficacy, and toxicity, *Cancer Treatment Reports*, **66**, 427-438.
- Wilson, G.L. *et al.* (1984): Mechanism of streptozotocin and alloxan induced damage in rat B-cells, *Diabetologia*, **27**, 587-591.
- Yamamoto, H., Uchigata, Y. and Okamoto, H. (1981): Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly(ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets, *Nature*, **294**, 284-286.