

유기 음이온계 약물의 간수송과정에 있어서 대향수송현상에 관한 속도론적 연구

정연복[†] · 한 건 · 노정렬

충북대학교 약학대학
(1992년 11월 23일 접수)

Kinetic Analysis of the Counter-transport Phenomenon in the Hepatic Transport of Organic Anionic Drugs

Youn Bok Chung[†], Jung Ryul No and Kun Han

College of Pharmacy, Chungbuk National University Cheongju, Chungbuk 360-763, Korea

(Received November 23, 1992)

The counter-transport phenomena in the hepatic transport of 1-anilino-8-naphthalene sulfonate (ANS) were kinetically investigated by analyzing the plasma disappearance-time profiles and the transport into the isolated hepatocytes. *In vivo* "counter transport phenomena" were simulated based on the perfusion model which incorporated the carrier-mediated transport and the saturable intracellular binding. The condition that the mobility of carrier-ligand complex is greater than that of free carrier is not essential for the occurrence of counter-transport phenomenon. To examine the inhibitory effects on the initial uptake of a ligand by the liver, it is necessary to judge whether the true counter-transport mechanism (trans-stimulation) is working or not. The initial plasma disappearance curves of ANS were then kinetically analyzed based on a two-compartment model, in which the ligand is eliminated only from the peripheral compartment (liver compartment). No effects on the initial plasma disappearance rates of ANS were observed after preloading of bromophenol blue (BPB) or rose bengal (RB) in the liver. Inhibitory effect of BPB or RB on the initial uptake (or efflux) rates of ANS by the isolated hepatocytes were not observed, suggesting that the true counter transport mechanism is not working. In conclusion, checking the preloading effects of trans-stimulation on the initial uptake of a ligand by the liver could be a useful criterion for carrier cycling and common use of the same carrier between two ligands. However, one cannot exclude those possibilities even if the preloading effects cannot be observed.

Keywords—Carrier-mediated transport, Counter-transport, Organic anions, 1-Anilino-8-naphthalene sulfonate (ANS), Hepatic transport

약물의 작용부위로의 송달 및 약효발현을 위한 생체내 이행에 관한 연구가 최근 관심의 대상이 되고 있다. 약물의 간내 이행에 관한 연구는 담즙산, bilirubin 및 유기 음이온계 약물들을 이용하여 이루어져 왔다. 대부분의 유기 음이온계 약물들은 혈중 알부민과 강력히 결합하고 있음에도 불구하고, 혈 관측에 접해 있는 sinusoidal막의 담체(carrier)에

의해 선택적이고도 신속히 간으로 이행(uptake)된다.¹⁻⁴⁾ 간세포내에서는 리간드 및 기타 세포질내 단백질과 강력히 결합한다.⁵⁻⁷⁾ 일부는 대사되고, 비 결합형 약물의 일부는 혈액측으로 efflux 되기도 한다.⁸⁾ 간세포내로 이행된 유기 음이온계 약물은 담즙으로 배설되는데, 이 과정도 canalicular 막에 존재하는 담체에 의한 것으로 생각되고 있다.¹⁾ 이와

[†] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

같이 약물의 간수송에 있어서 비선형이 일어날 수 있는 과정 혹은 약물상호작용이 일어날 수 있는 과정으로 혈장 albumin 결합, 세포내 이행, 담즙배설의 담체에 의한 수송과정 및 간세포내 단백질결합 등이 존재한다.

현재까지 유기 음이온계 약물이 간으로 이행되는 과정에 있어서 담체가 관여한다는 것을 증명하기 위해 보통 포화성, 경쟁저해 이외에 소위 “대향수송(counter-transport)현상”이 검토되고 있다. Schar-schmidt 등⁹⁾은 이러한 현상의 검출이 *in vivo*에 있어서도 가능한가에 대해 검토하여 긍정적인 결과를 보고하였다. 즉, 담체의 막내 순환(cycle)을 증명하기 위해 사용되고 있는 대향수송현상이 *in vivo*에 있어서도 일어날 수 있다는 사실을 시사하여, 그 후 이 분야의 많은 종설 및 교과서 등에 인용되어 정착되고 있다. Schar-schmidt 등⁹⁾은 tracer량의 약물 A[예를 들면, isotope를 표시시킨 sulfobromophthal-ein(BSP)]를 정맥 주사한 수분 후에 약물 B[예를 들면, BSP, indocyanine green(ICG)]를 비교적 과량으로 투여하는 것에 의해, 간장내로 이행되었던 표지체가 혈중으로 efflux 되어 일시적으로 표지체의 혈중농도가 높아지는 현상을 보고하였다. 즉, 대측이라고 볼 수 있는 혈액 중에 첨가된 과량의 비표지체에 의해 간장내에 이행되었던 표지체의 efflux가 촉진된 것을 반영한 것으로, 적어도 겉보기 대향수송현상을 나타낸 것이라고 할 수 있다.

최근, Sugiyama 등¹⁰⁾은 유기 음이온계 약물인 1-anilino-8-naphthalene sulfonate(ANS)가 간기능 검사약인 BSP, ICG 등과 담체를 공유하여 유리간세포(isolated hepatocytes)내로 이행된다는 사실을 보고하였다. 또한, ANS는 대부분의 유기 음이온계 약물들과 리간드 등의 간세포내 결합단백의 동일부위에 결합하는 성질을 이용하여 결합율의 측정에 이용되어 왔다¹¹⁻¹⁴⁾. 이러한 ANS는 형광양자수율이 상당히 높은 형광색소이므로, 보다 넓은 농도범위에 걸쳐서 해석이 가능하다는 장점이 있는 약물이다. 본 연구자 등^{15,16)}은 *in vivo*에 있어서의 대향수송현상이 ANS에 있어서도 관찰된 사실을 보고하였다. 또한, 이러한 현상이 막내 담체에 의해서 뿐만 아니라 간세포내 단백질결합의 치환에 의해서도 설명될 수 있다는 가능성을 시사하였다. 즉, 혈액측에 가해진 약물 B가 간장내로 이행된 후, 약물 A(ANS)의

단백결합을 치환시킨 결과, 유리형 A의 농도를 증가시켜 efflux를 촉진시킨다고 설명하였다.

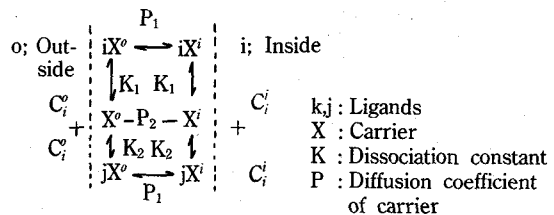
한편, 본래 의미의 대향수송현상은 혈액측에 가해진 약물 B에 의해 막내 비결합형 담체의 분포가 간장측에 풍부하게 된 결과, 같은 담체에 의해 수송되는 약물 A의 efflux가 촉진된다고 생각되고 있다⁹⁾. 따라서, 본 연구에 있어서는 ANS를 모델 약물로 하여 간내 이행에 있어서의 대향수송현상에 관해 속도론적으로 해석하고자 하였다. 그 중에서도, 담체매개 수송을 가정한 속도론 모델에 의한 이론적인 해석, *in vivo* 혈장중 농도추이의 초기소실곡선의 해석 및 유리간세포를 사용한 세포내 이행에 관한 실험 등에 의해 유기 음이온계 약물의 간내 이행과정에 있어서 담체에 의한 대향수송현상이 일어나는 기구를 해명하고자 하였다.

실험 방법

시약 및 실험동물

1-아닐리노-8-나프탈렌설폰산나트륨(ANS) 및 브롬페놀블루(BPB)는 Tokyo Chemical Industries, Co.(Tokyo, Japan)로부터 구입하였다. Rose bengal (RB)은 Wako Pure Chemical Co.(Tokyo, Japan)로부터, 설포브로모프탈레인(BSP) 및 인도시아닌그린(ICG)는 Diichi Chemical Co.(Tokyo, Japan)로부터 구입하여 사용하였다. 기타 시약은 모두 특급을 사용하였다. 실험동물로는 웅성 SD계 랫트(240~280g)

Interstitial Membrane Cell
fluid



Scheme I—A model to explain the counter-transport (facilitated diffusion). Assumptions; (1) ligand i and j share the same carrier, (2) diffusion coefficients of carrier can be changed depending on whether it is bound to ligands or not (usually, $P_1 > P_2$ is assumed), (3) assuming facilitated diffusion, the affinities of ligands to the carriers are the same both at outer and inner sides.

를 오산동물센타(오산, 경기도)로부터 구입하여 사용하였다.

담체매개 수송을 가정한 모델

본 연구의 시뮬레이션에 이용한 담체에 의한 수송을 나타내는 일반모델¹⁷⁾을 Scheme I에 표시하였다. 두 리간드 i 및 j가 동일한 담체를 공유한다고 가정하였다. 또한 비결합형담체의 막내확산속도정수를 P₂, 리간드와 결합한 담체의 막내확산 속도정수를 P₁으로 정의하였다. 아울러, 막의 양측에서 리간드의 결합에 관한 친화성은 동일하다고 가정하였다. 이상과 같은 가정을 근거로 하여, 리간드 i 및 j의 flux를 나타내는 식을 다음과 같이 세울 수 있다.

리간드 j의 flux에 관해서는 식 (1) 및 식 (2)에 있어서 P₁→P₃, P₃→P₁, C_i^o→C_j^o, C_jⁱ→C_j^j, C_j^j→C_jⁱ, K₁→K₂, K₂→K₁으로 치환하는 것에 의해, 각각 influx (J_i^{oi}), efflux(J_i^{io})를 나타낼 수 있다.

여기서, 리간드 i의 농도가 j에 비해 낮아서 i의 j에 대한 영향을 무시할 수 있는 조건이라면, 다음과 같이 간단히 나타낼 수 있게 된다.

대항수송현상의 해석을 위한 속도론 모델

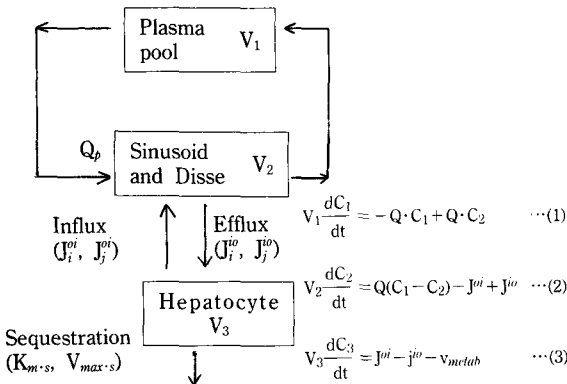
혈장중 농도추이의 시뮬레이션에는 Scheme II에 나타낸 perfusion model을 사용하였다. 대부분의 유기 음이온계 약물들은 혈장 알부민과 강력히 결합하고, 간장 이외의 조직으로 분포는 무시할 수

i의 influx (J_i^{oi}) :

$$J_i^{oi} = \frac{P_1[X_j]}{\left(\frac{K_1}{C_i^o} + 1 + \frac{K_1 C_j^o}{K_2 C_i^o}\right) + \frac{C_i^o K_2 P_1 + K_1 P_2 K_2 + K_1 P_3 C_j^o}{C_i^o K_2 P_1 + K_1 P_2 K_2 + K_1 P_3 C_j^o} \cdot \frac{C_i^j}{C_i^o} \cdot \left(\frac{K_1}{C_i^j} + 1 + \frac{K_1 C_j^j}{K_2 C_i^j}\right)} \quad (1)$$

i의 efflux (J_i^{io}) :

$$J_i^{io} = \frac{P_1[X_j]}{\left(\frac{K_1}{C_i^j} + 1 + \frac{K_1 C_j^j}{K_2 C_i^j}\right) + \frac{C_i^j K_2 P_1 + K_1 P_2 K_2 + K_1 P_3 C_j^j}{C_i^j K_2 P_1 + K_1 P_2 K_2 + K_1 P_3 C_j^o} \cdot \frac{C_i^o}{C_i^j} \cdot \left(\frac{K_1}{C_i^o} + 1 + \frac{K_1 C_j^o}{K_2 C_i^o}\right)} \quad (2)$$



Scheme II—A perfusion model for the simulation of counter-transport phenomenon *in vivo*. Calculation procedure and assumptions; (1) equations representing the flux of ligands i and j (J_i^{oi}, J_i^{io}) are obtained from a model in Scheme I, (2) kinetic parameters are determined so that they can explain the *in vivo* plasma disappearance curves of ligands (some parameters are still arbitrary), (3) efflux of ligands depends on the unbound concentrations in the liver cytosol.

있다. 간의 세포외, 세포내 사이에는 Scheme I에 나타낸 모델을 고려해서 influx(J_i^{oi}) 및 efflux(J_i^{io})를 나타내는 식을 쓸 수 있다. 또한 간으로부터 혈액으로의 efflux 및 sequestration 과정은 간세포내 비결합형 리간드 농도에 의존하는 것으로 가정하였다. 세포내 단백질결합에 관해서는, 특이적 결합 및 비특이적 결합의 두 종류 결합부위가 존재한다는 사실^{9,15,16)}을 고려하여, 간세포질단백상의 고친화성 결합을 리간드 i 및 j가 경쟁적으로 저해한다고 가정하였다.

$$C_o = \frac{R \cdot C_j}{K_d(1 + I_j/K_i) + C_j} + \alpha C_j \quad (5)$$

여기서, C_o 및 C_j는 각각 리간드 i의 결합형 및 비결합형 농도(μM)를 나타낸다. R 및 K_d는 각각 간세포 내 리간드결합체의 결합용량(μM) 및 해리정수(μM)를 나타낸다. 또한 I_j 및 K_i는 저해제(리간드 j)의

$$J_j^{jo} = \frac{P_3[X_i]}{\left(1 + \frac{K_2}{C_j^o}\right) + \frac{P_3C_j^o + K_2P_2}{P_3C_j^o + K_2P_2} \cdot \frac{C_j^i}{C_j^o} \cdot \left(1 + \frac{K_2}{C_j^i}\right)} \quad (3)$$

$$J_j^{oi} = \frac{P_3[X_i]}{\left(1 + \frac{K_2}{C_j^i}\right) + \frac{P_3C_j^i + K_2P_2}{P_3C_j^o + K_2P_2} \cdot \frac{C_j^o}{C_j^i} \cdot \left(1 + \frac{K_2}{C_j^o}\right)} \quad (4)$$

비결합형 농도(μM) 및 저해정수(μM)를 각각 나타내고, α는 비특이적 결합정수를 나타낸다.

각 콤팩트먼트내의 mass-balance를 식으로 나타내면 다음과 같다.

약물 i에 대해서

$$V_1 \cdot \frac{dC_1}{dt} = -Q_p \cdot C_1 + Q_p \cdot C_2 / f_2 \quad (6)$$

$$\frac{V_2}{f_2} \cdot \frac{dC_2}{dt} = Q_p \left(C_1 - \frac{C_2}{f_2} \right) - J_i^{oi} + J_i^{jo} \quad (7)$$

$$V_3 \cdot \frac{dC_3}{dt} = J_i^{oi} - J_i^{jo} - v_{metab, i} \quad (8)$$

$$\text{단, } v_{metab, i} = \frac{V_{max, s}^i \cdot C_{3, f}}{K_{m, s}^i + C_{3, f}} \quad (9)$$

여기서, f는 각 콤팩트먼트내에서의 비결합형분율을

나타낸다. 식 (7) 및 (8)에 있어서 J_j^{jo} 및 J_j^{oi} 는 식 (1) 및 (2)를 적용하였다. 단, $C_i^o = C_2$, $C_i^o = C_{3, f}$, $C_j^o = C_5$, $C_j^i = C_6$ 를 각각 나타낸다.

약물 j에 대해서

$$V_1 \cdot \frac{dC_4}{dt} = -Q_p \cdot C_4 + Q_p \cdot C_5 / f_5 \quad (10)$$

$$\frac{V_2}{f_5} \cdot \frac{dC_5}{dt} = Q_p \left(C_4 - \frac{C_5}{f_5} \right) - J_j^{oi} + J_j^{jo} \quad (11)$$

$$V_3 \cdot \frac{dC_{6, total}}{dt} = J_j^{oi} - J_j^{jo} - v_{metab, j} \quad (12)$$

$$\text{단, } v_{metab, j} = \frac{V_{max, s}^j \cdot C_6}{K_{m, s}^j + C_6} \quad (13)$$

여기서, 식 (12)의 좌변을 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$V_3 \cdot \frac{dC_{6, total}}{dt} = V_3 \cdot \frac{dC_{6, total}}{dC_6} \cdot \frac{dC_6}{dt} = \left(\frac{R_{1, j} + K_{d1, j}}{(K_{d1, j} + C_6)^2} + \frac{R_{2, j} \cdot K_{d2, j}}{(K_{d2, j} + C_6)^2} + 1 \right) \cdot V_3 \cdot \frac{dC_6}{dt} \quad (14)$$

(14)를 식 (12)에 대입하면 식 (15)가 된다.

$$V_3 \cdot \frac{dC_6}{dt} = \frac{J_j^{oi} - J_j^{jo} - v_{metab, j}}{\left(\frac{R_{1, j} + K_{d1, j}}{(K_{d1, j} + C_6)^2} + \frac{R_{2, j} \cdot K_{d2, j}}{(K_{d2, j} + C_6)^2} + 1 \right)} \quad (15)$$

본 모델에 있어서 담체에 의한 수송에 관한 *in vivo*에서의 파라메타는 리간드의 혈장소실곡선^{9,15,16)}을 설명할 수 있도록 시행착오를 행하여 결정하였다. 세포내 결합단백으로는 ligandin으로 가정하고, 대

표적인 유기 음이온계 약물인 BSP, ICG 및 ANS의 혈장소실을 재현할 수 있도록 파라메타를 설정하고 식 (6)~(15)를 이용하여 시뮬레이션을 하였다.

정맥투여 및 혈액의 채취

랫트를 에텔로 가볍게 마취시키고 좌측대퇴동맥 및 대퇴정맥에 폴리에틸렌 튜브(PE-50, Intramedic®, Clay Adams, U.S.A)를 삽입한 후 봉합하였다. 마취로부터 회복된 후 ANS(3 μmol/kg)를 대퇴정맥으로 투여한 다음, 대퇴동맥으로부터 경시적으로 혈액(150 μl)을 채취하였다. 실험 중에는 백열등을 사용하여 랫트의 체온을 37°C 로 유지시켜 주었다. 채취한 혈액을 탁상용원심분리기(Beckman Instruments, Fullerton, CA)로 3000 g로 원심분리한 후, 얻어진 혈장(50 μl)을 3 ml의 에탄올로 추출, 원심분리하였다. 상정액 중의 ANS를 형광광도계를 이용하여 측정하였다(Em : 480, Ex : 400).

ANS의 간내이행에 미치는 유기 음이온류의 간장내 Preloading 효과

유기 음이온류(BPB, RB ; 60 μmol/kg)를 정맥주사한 경우 30분 후에는, 혈중으로부터 유기 음이온계 약물의 대부분이 간장으로 이행(preloading)되어 혈중농도(약 100~200 μM)에 비해 간장중 농도(약 1000 μM)가 높았다. 따라서, 유기 음이온류를 정맥주사한 다음, 30분 후에 ANS(3 μmol/kg)을 정맥주사하여, 유기 음이온류의 간장내 preloading이 ANS의 혈장중 농도추이에 미치는 영향에 관해 속도론적으로 해석하였다.

ANS의 간내이행에 미치는 유기 음이온류의 Infusion 효과

유기 음이온류(BSP, RB)의 정맥주사 및 점적주사(infusion)를 동시에 행하여 유기 음이온류의 혈장중 농도를 정상상태(steady-state)로 일정하게 유지시킨 후 ANS를 정맥주사 하였다. 정맥주사 투여량(X_0 ; mg/kg) 및 점적주사 속도(K_0 ; mg/min)는 다음 식에 따라 산출하였다. 즉,

$$X_0 = C_{ss} \cdot V_1 \tag{16}$$

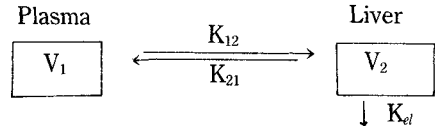
$$K_0 = C_{ss} \cdot V_1 \cdot K_{el} = C_{ss} \cdot CL_{tot} \tag{17}$$

여기서, C_{ss} 는 정상상태에서의 혈장중 농도(μM)를, V_1 은 체순환 콤파트먼트의 분포용적(ml/kg)을 나타내고, K_{el} 은 배설속도정수(min^{-1})를, CL_{tot} 는 전신클리어런스($\text{ml}/\text{min}/\text{kg}$)를 각각 나타낸다. ANS 혈장중 농도는 전술한 방법에 의해 측정하였다.

ANS 혈장중 농도추이의 약물속도론적 분석

혈장중 ANS 농도추이는 2-콤파트먼트모델을 사

용하여 분석하였다. 여기서, ANS는 혈중으로부터 대부분이 간으로 이행되어 배설되므로 콤파트먼트 2는 간으로 가정하였다.¹⁵⁾ 혈장중 소실에 관한 약물속도론적 파라메타는 혈장중 농도(C_p)-시간 데이터를 다음 모델에 적용하여 비선형최소사승법¹⁷⁾으로 산출하였다.



$$C_p = A \cdot e^{-\alpha t} + B \cdot e^{-\beta t} \tag{18}$$

여기서 얻어진 A, B, α , β 로부터 다음의 파라메타들을 산출하였다.

$$V_1 = \text{Dose}/(A + B)$$

$$K_{12} = (A\alpha + B\beta)/(A + B)$$

$$K_{el} = \alpha\beta/K_{12}$$

$$V_2 = V_1 \cdot K_{12}/(K_{21} + K_{el})$$

$$K_{21} = (\alpha + \beta) - (K_{12} + K_{el})$$

$$CL_{up} = K_{12} \cdot V_1$$

$$CL_{tot} = \text{Dose}/\text{AUC} = \text{Dose}/(A/\alpha + B/\beta)$$

여기서 V_1 과 V_2 는 각각 체순환 콤파트먼트와 말초(간장) 콤파트먼트의 분포용적(ml/Kg)을, K_{12} , K_{21} , K_{el} 은 각각 전(total) 약물에 대한 influx, efflux, 배설속도정수(min^{-1})를, CL_{up} 및 CL_{tot} 는 각각 전 약물에 대한 uptake 및 전신 클리어런스(clearance, $\text{ml}/\text{min}/\text{kg}$)를 나타낸다. 또한, AUC는 혈장중농도-시간곡선하면적을 나타낸다.

유리간세포의 분리

유리간세포는 collagenase 간 관류법을 이용한 Baur 등의 방법¹⁸⁾에 따라, 그 개량법¹⁹⁾으로 조제하였다. 즉, 간 문맥에 캐놀라를 삽입하여 200 ml의 calcium-free bicarbonate buffer로 관류하여 탈혈시킨 후, calcium ion 및 세포분산용 collagenase를 각각 1 mM 및 0.05% 함유한 bicarbonate buffer 100 ml로 15분간 관류시킨 다음 100 ml의 calcium-free buffer를 사용하여 재차 관류하여 간내에 잔존하는 collagenase를 세척해 주었다. 그리고 간장을 적출하여 buffer에 분산시킨 후, 2~3회 저속원심(2000 rpm)을 행하여 parenchymal cell을 제거시킨 후, 분리된 간세포를 0°C 에서 약 10 mg protein/ml가 되도록 Krebs-Henseleit buffer(pH 7.4)에 분산시켜

실험에 사용하였다. 각 실험에 사용된 간세포의 viability는 trypan blue exclusion test에 의해 측정하였으며, 95% 이상의 viability를 나타내는 세포만을 사용하여 실험하였다.

ANS의 간세포내 이행에 관한 실험

유리간세포($2.4 \sim 3.4 \times 10^6$ cells/ml)를 함유한 반응혼합물 중에 소량 용적의 ANS를 가하여 간세포내로 이행되는 초속도를 산출하였다. 즉, 37°C에서 5분간 예비반응(preincubation)시킨 후, ANS($50 \mu\text{M}$)를 반응액(medium) 중에 가하여 반응을 시작하였다. 반응액 중의 ANS 초농도는 $10 \mu\text{M} \sim 20 \mu\text{M}$ 의 범위 내로 하였다. 이 실험에 사용된 반응액은 137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.25 mM CaCl_2 , 1.0 mM MgCl_2 , 0.8 mM MgSO_4 , 0.5 mM NaH_2PO_4 , 0.4 mM Na_2HPO_4 , 4.2 mM NaHCO_3 , 10 mM HEPES 및 5 mM glucose를 함유한 Krebs-Henseleit buffer(pH 7.4)를 사용하였다. 반응혼합물을 경시적으로 채취($500 \mu\text{l}$)하여 centrifugal filtration법으로 cell과 medium을 분리하였다. 즉, $100 \mu\text{l}$ 의 glycerol 위에 $500 \mu\text{l}$ 의 silicone : mineral oil(density : 1.015)이 들어 있는 원심용 튜브에 샘플을 가하여, 탁상용원심분리기를 사용하여 20초간 원심분리하였다. 간세포가 용해된 glycerol 층의 ANS를 3 ml 에탄올로 추출하여 간세포내로 이행된 양을 형광광도계를 이용하여 측정하였다(Em : 480, Ex : 400). 부착수 용적(adherent water volume)은 ^{14}C -inulin과 $^3\text{H}_2\text{O}$ 를 사용하여 산출하였으며, 세포내로 이행된 ANS의 양을 보정하였다. 또한, 단백질농도는 BSA를 표준물질로 사용한 단백질정량용 kit(Bio-Rad Co., Ltd)를 사용하여 측정하였다.

ANS의 간세포내 이행에 미치는 유기 음이온류의 저해효과

5분간 ANS(초농도 : $10 \mu\text{M}$)를 세포내로 이행시킨 후 정상상태(steady-state)에 도달하였을 때, BPB 및 RB(최종농도 : $50 \mu\text{M}$)을 반응액에 가하여 경시적으로 반응혼합물을 채취하여 간세포내로 이행된 ANS를 측정하였다.

ANS의 간세포내 이행에 미치는 유기 음이온류의 Preloading 효과

ANS의 세포내로의 이행과정에 대한 대향수송현상의 해석을 위해, 간세포내로 BPB 및 RB(초농도 : $50 \mu\text{M}$)을 10분간 이행시킨 후, BSA를 1% 함유한

완충액으로 0°C에서 한번 씻어내고, BSA를 포함하지 않은 0°C의 완충액으로 2번 씻어내어 BSA를 제거시켰다. 얻어진 유리간세포를 37°C의 완충액에 희석시킨 후 ANS(최종농도 : $10 \mu\text{M}$)를 반응액 중에 가하여 반응을 시작하였다.

ANS의 Efflux 과정에 미치는 유기 음이온류의 영향

ANS의 세포내에서 세포외로의 efflux 과정에 관한 실험은, ANS(초농도 : $20 \mu\text{M}$)를 5분간 세포내로 이행시킨 후, 전술한 방법에 따라 BSA로 처리한 다음, BPB 및 RB(최종농도 : $50 \mu\text{M}$)을 반응액 중에 가하여 세포내에서 반응액 중으로 efflux 되는 과정에 대해 검토하였다. 간세포내로 이행된 ANS는 전술한 방법에 따라 형광광도계를 이용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

대향수송현상에 대한 속도론적 해석 Scheme I에 나타낸 모델에 있어서 약물 j를 세포내로 이행시킨 후, 약물 i의 세포내 이행을 시뮬레이션한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. *In vivo*의 분리세포 또는 막베지클(vesicle)을 사용한 실험계로 가정하여, 세포내 체적에 비해 반응액의 체적이 크므로 약물 i의 반응액 중의 농도는 일정하고, efflux된 약물 j의 반응액 중의 농도는 무시할 수 있을 정도로 작다고 가정하였다. 약물과 결합한 담체(X_i , X_j)의 막내확산속도정수를 P_1 , 비결합형 담체(X)의 막내확산속도정수를 P_2 라고 정의하였을 때, $P_1 > P_2$ 인 경우에는 미리 세포내로 이행시킨 약물 j의 농도가 증가함에 따라서 약물 i의 이행 초속도가 증가되는 “대촉효과(trans-stimulation)”가 관찰되었다(Fig. 1(a)). 이러한 현상은 약물 j가 존재하는 반대측에 담체의 분포가 많아져서 약물 i의 세포내 이행이 촉진된 결과라고 생각되었다. 한편, $P_1 < P_2$ 인 경우에는 약물 j가 존재하는 반대측에 결합형 담체의 분포가 많아져서, 재순환에 이용될 수 있는 담체의 수가 감소하여, 약물 i의 이행초속도가 감소하는 “대촉억제(trans-inhibition)” 현상이 관찰되었다(Fig. 1(c)). $P_1 = P_2$ 인 경우에는 약물 i의 세포내 이행 초속도는 약물 j에 의해 영향을 받지 않았다(Fig. 1(b)). 그러나 모든 경우에 있어서, 약물 i의 세포내 이행속도가 일시적으로

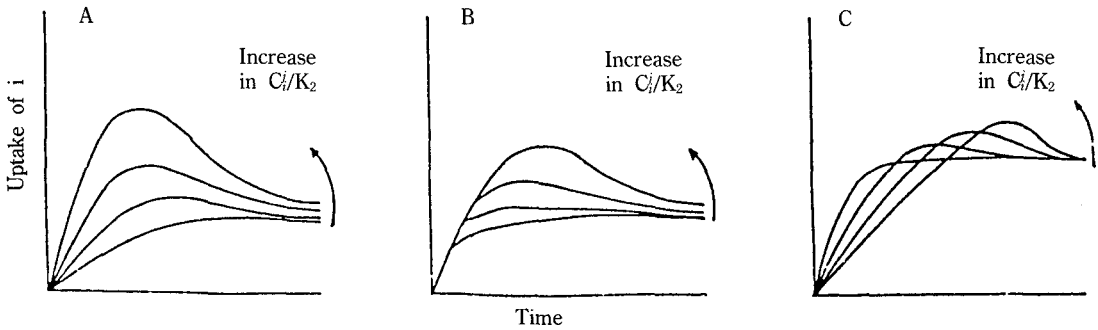


Figure 1—Stimulation of counter-transport phenomenon assuming *in vitro* isolated vesicle or cell studies. The uptake of ligand *i* into the cell was simulated with increasing the ligand *j* concentration (C_j) in the cell, based on the model (Scheme I). (A) $P_1=10 \cdot P_2$, (B) $P_1=P_2$, (C) $P_1=1/10 \cdot P_2$, where P_1 is the membrane transport constant for ligand-carrier complex, P_2 is the membrane transport constant for free carrier.

증가하는 overshoot 현상이 일어날 수 있다는 사실을 알 수 있었다.

Scheme I 및 II에 나타난 모델을 사용하여 약물 *i*의 혈장중 농도추이를 시뮬레이션한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 약물 *i*를 정맥투여한 다음 10분 후, 약물 *j*를 투여량을 변화시켜(1~1000 $\mu\text{M}/\text{kg}$) 정맥투여하였을 때 *i*의 혈장중 농도추이를 계산한 결과를 나타내었다. 약물 *j*의 투여에 의해 약물 *i*의 혈장중 농도가 일시적으로 증가하는 소위 “대항수송현상”을

나타낸 것으로, Scharshmidt 등⁹⁾ 및 Chung 등^{15,16)}의 실험결과와 일치되는 결과를 보여 주고 있다. $P_1 > P_2$ 인 경우가 $P_1 = P_2$ 인 경우보다 저해제(약물 *j*)를 가한 후 초기의 혈장중 농도 증가율이 현저한 것을 알 수 있었다(Fig. 2). 이러한 현상은 Fig. 1의 “대축효과”에 기인한 결과라고 생각되었다. 그러나, $P_1 > P_2$ 인 조건은 대항수송현상이 일어나기 위한 필요충분 조건은 될 수 없다고 생각되었다.

ANS의 간내이행에 미치는 유기 음이온류의 Pre-

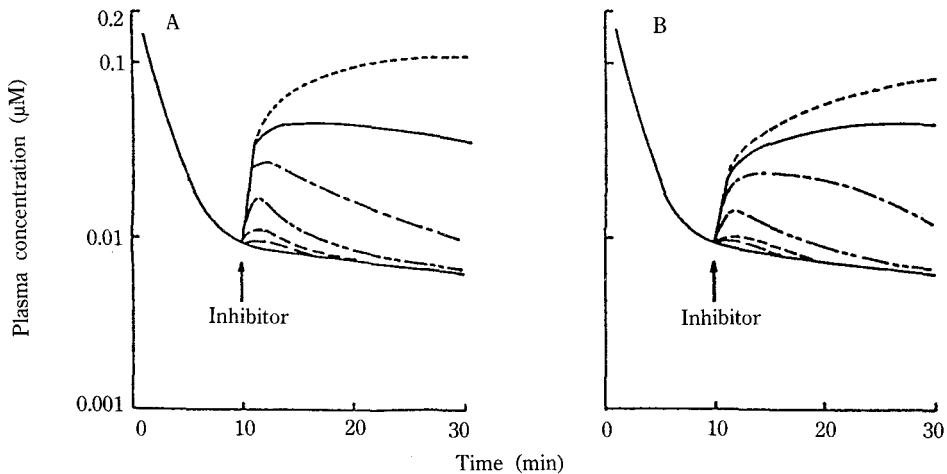


Figure 2—Effect of inhibitor on the transport process. (A) $P_1 > P_2$ ($P_1=10 \cdot P_2$), (B) $P_1=P_2$. (1) The parameters concerning the hepatic uptake of drugs; $P_1=10, 100$ (min^{-1}), $P_2=10$ (min^{-1}), $X_i=550$ (nmol/Kg), $K_1=K_2=74$ (μM). (2) The parameters concerning the inhibition of intracellular binding; binding capacity (primary binding site is on ligandin) = 100 (μM), dissociation constant (K_{d1}) = 1 (μM). (3) The parameters concerning the sequestration; $K_{m,s}=50$ (μM), $V_{max,s}=40$ (μM), $V_{max,s}=3000$ ($\text{nmol}/\text{min}/\text{kg}$).

Key: Inhibitor: (---) 1000 $\mu\text{mol}/\text{kg}$, (—) 100 $\mu\text{mol}/\text{kg}$, (- - -) 30 $\mu\text{mol}/\text{kg}$, (· · ·) 10 $\mu\text{mol}/\text{kg}$, (- · -) 3 $\mu\text{mol}/\text{kg}$, (— · —) 1 $\mu\text{mol}/\text{kg}$

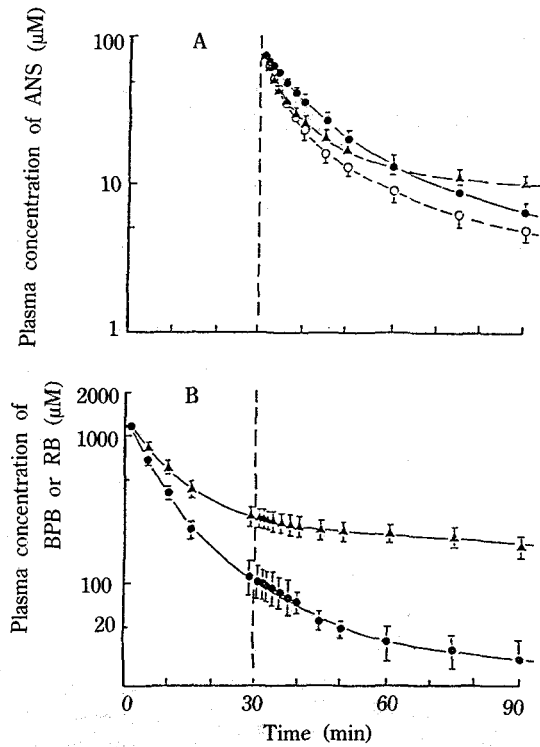


Figure 3—Effect of preloading of organic anions (BPB or RB) on the plasma disappearance curves of ANS. BPB or RB (60 µmol/kg) was administered intravenously to rats before the administration of ANS (3 µmol/kg). Each point represents the mean ± S.E. of three rats. (A) plasma concentration-time profiles of ANS. Key: (○) ANS only, (●) preloading of BPB, (▲) preloading of RB. (B) plasma concentration-time profiles of BPB (●) and RB (▲).

loading 효과

ANS가 혈중으로부터 간내로 이행되는 과정에 있어서의 대향수송현상에 대해 검토하기 위해, BPB 및 RB(60 µmol/kg)을 정맥투여하여 간내로 이행 (preloading)시킨 30분 후, ANS(3 µmol/kg)를 정맥 투여한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. BPB 및 RB을 투여한 30분 후 간장중 농도는 약 1000 µM 정도로 혈장농도보다 현저하게 높은 것을 확인하였다(Fig. 3 (b)). ANS의 초기 혈장 소실속도는 BPB에 의해 약간 감소하였지만, RB에 의해서는 유의한 차이가 나타나지 않았다. 콤팩트먼트 2가 간장이라고 가정하고 2-콤팩트먼트 모델에 의해 Fig. 3의 혈장중 농도추이를 fitting 하여 산출한 약물속도론적 파라메타를

Table 1—Effect of Preloading of BPB or RB (60 µmol/kg) on the Pharmacokinetic Parameters of ANS after Its I.V. Administration (3 µmol/kg) to Rats

| Parameters ^{a)} | Control (ANS only) | +BPB | +RB |
|--------------------------------------|--------------------|----------------|----------------|
| V ₁ (ml/kg) | 34.3 ± 0.7 | 35.9 ± 1.0 | 35.7 ± 1.2 |
| V ₂ (ml/kg) | 103 ± 14 | 73.5 ± 6.5* | 108 ± 18 |
| V _{dss} (ml/kg) | 138 ± 15 | 109 ± 7.3 | 144 ± 19 |
| k ₁₂ (min ⁻¹) | 0.176 ± 0.006 | 0.097 ± 0.006* | 0.165 ± 0.008 |
| k ₂₁ (min ⁻¹) | 0.034 ± 0.006 | 0.021 ± 0.003 | 0.042 ± 0.006 |
| k _{el} (min ⁻¹) | 0.028 ± 0.004 | 0.027 ± 0.001 | 0.016 ± 0.003* |
| CL _{up} (ml/min/kg) | 6.06 ± 0.17 | 3.49 ± 0.23* | 5.88 ± 0.19 |
| CL _{tot} (ml/min/kg) | 2.76 ± 0.20 | 2.01 ± 0.192 | 1.60 ± 0.04** |

^{a)} Mean S.E. of three rats. *Significantly different from the control value (p < 0.05). **Significantly different from the control value (p < 0.001).

Table I에 나타내었다. ANS의 혈중으로부터 간장으로의 이행에 관한 클리어런스(CL_{up})는 BPB에 의해 약간 감소하였지만, RB에 의해서는 유의성있는 차이가 없었다.

ANS의 간내이행에 미치는 유기 음이온류의 Infusion 효과

ANS가 간내로부터 혈중으로 이행되는 과정 (efflux)에 있어서의 대향수송현상에 대해 검토하기 위해, RB 및 BSP의 정맥투여 및 점적주사를 동시에 행하여 혈장농도를 약 1000 µM로 유지시킨 상태에서 ANS(3 µmol/kg)를 정맥투여하여 얻은 결과를 Fig. 4에 나타내었다. ANS의 초기 혈장 소실속도는 RB에 의해 현저하게 증가하였지만 BSP에 의해서는 유의한 차이를 나타내지 않았다. RB에 의한 효과는, 혈장에 고농도로 존재하는 RB에 의해 ANS의 혈장 단백질결합이 치환된 결과 유리형 ANS 농도가 증가된 것에 기인한 것으로 생각된다. Fig. 4의 ANS 혈장중 농도추이를 2-콤팩트먼트 모델에 의해 fitting 하여 산출한 약물속도론적 파라메타를 Table II에 나타내었다. 간내에서 혈장 중으로의 efflux를 나타내는 파라메타, K₁₂은 BSP 또는 RB에 의해서 유의한 차를 나타내지 않았다. 또한, CL_{up}는 RB에 의해 증가하였지만, BSP에 의해서는 유의성있는 차이를 나타내지 않았다. 따라서, ANS의 간내 이행과정에 있

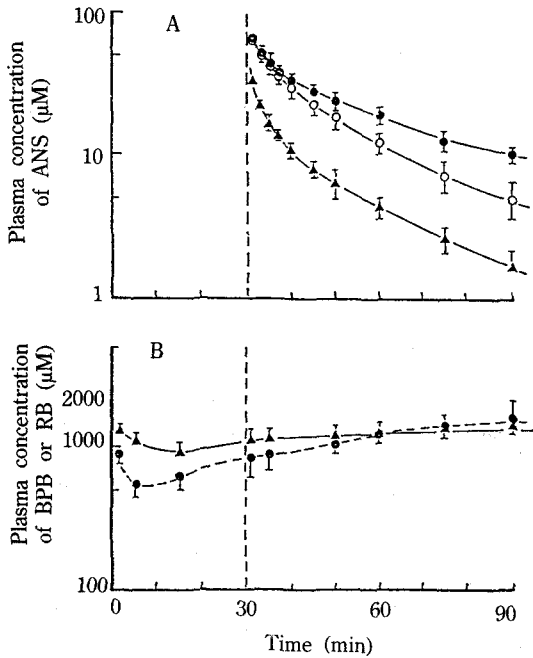


Figure 4—Effect of infusion of organic anions (BSP or RB) on the plasma disappearance curves of ANS. ANS (3 µmol/Kg) was administered intravenously to rats after infusion of organic anions. Each point represents the mean ± S.E. of three rats.

Key: (A) plasma concentration-time profiles of ANS. (○) ANS only, (●) infusion of BPB, (▲) infusion of RB. (B) plasma concentration-time profiles of BPB (●) and RB (▲)

Table II—Effect of Infusion of BSP or RB ($C_{ss}=1$ mM) on the Pharmacokinetic Parameters of ANS after Its I.V. Administration (3 µmol/kg) to rats.

| Parameters ^{a)} | Control (ANS only) | +BPB | +RB |
|-------------------------------|--------------------|-----------------|----------------|
| V_1 (ml/kg) | 41.0 ± 1.2 | 39.4 ± 2.1 | 75.7 ± 6.1** |
| V_2 (ml/kg) | 49.4 ± 1.4 | 58.9 ± 13.8 | 139 ± 21** |
| V_{dss} (ml/kg) | 90.5 ± 2.5 | 98.4 ± 15.9 | 215 ± 26** |
| k_{12} (min ⁻¹) | 0.131 ± 0.010 | 0.106 ± 0.017 | 0.185 ± 0.006* |
| k_{21} (min ⁻¹) | 0.057 ± 0.004 | 0.054 ± 0.022 | 0.055 ± 0.012 |
| k_{el} (min ⁻¹) | 0.052 ± 0.005 | 0.025 ± 0.007** | 0.047 ± 0.006 |
| CL_{up} (ml/min/kg) | 5.38 ± 0.56 | 4.13 ± 0.46 | 14.0 ± 0.8** |
| CL_{tot} (ml/min/kg) | 2.57 ± 0.29 | 1.37 ± 0.02* | 6.61 ± 1.16** |

^{a)} Mean S.E. of three rats. *Significantly different from the control value ($p < 0.05$). **Significantly different from the control value ($p < 0.001$).

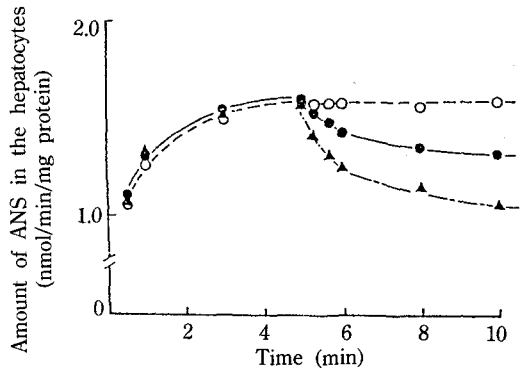


Figure 5—Counter-transport study using a small aliquot of buffer (○), 50 µM BPB (●), or 50 µM RB (▲) added to the cell suspensions (3 mg cellular protein/ml) after incubation with 10 µM ANS for 5 min. Each point represents the mean of two different preparations.

어서 관찰된 *in vivo* 대항수송현상에는 대추효과가 일어나지 않는 것으로 추정되었다

ANS의 유리간세포내 이행에 관한 유기 음이온류의 저해효과

랫트를 사용한 실험에서 약물의 간장내 이행 또는 주입시에는 약물의 소실이 동시에 이루어지고 있으며, 혈장단백결합 및 간세포내 단백질합 등의 과정이 관여하므로 정확히 그 혈장농도를 가정하고 또한 결과를 해석하는데 많은 어려움이 따른다. 따라서 이러한 요인들을 제거하기 위해 유리간세포를 사용한 실험을 통하여 간세포내·외로의 약물이행과정을 분리하여 평가하였다.

ANS의 유리간세포내로의 이행에 대한 다른 유기 음이온류의 저해효과를 실험한 결과, BPB 또는 RB에 의해서 세포내로 이행된 ANS 양이 감소한다는 사실을 알 수 있었다(Fig. 5). 초기의 급격한 변화는 BPB 또는 RB에 의한 막표면에서의 단백질합 저해에 의한 것으로 생각된다. 그 후 점차 감소한 것은 세포내로 이행되었던 ANS가 반응액 증으로 efflux되는 것을 반영한 것으로, 대항수송현상을 나타낸 것이라고 할 수 있다. 이러한 현상은 *in vivo*에 있어서의 혈장농도가 일시적으로 증가한다는 대항수송현상^{9,15,16)}에 대응되는 결과라고 볼 수 있다.

ANS의 간세포내 이행 및 Efflux 과정에 미치는 유기 음이온류의 영향

ANS의 간세포내 이행에 BPB 또는 RB의 이행효과를 Fig. 6에 나타내었다. BPB 또는 RB를 유리

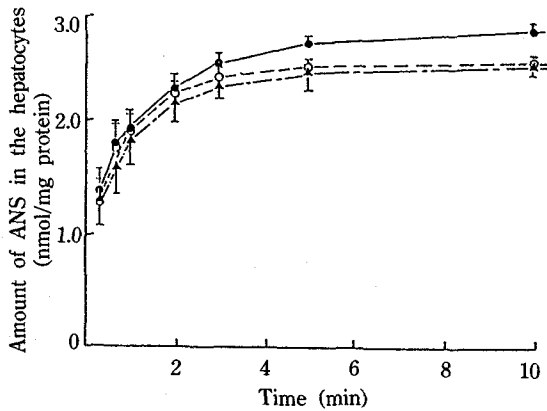


Figure 6—Uptake of ANS after incubation with BPB or RB for 10 min. After the cell suspensions (8 mg cellular protein/ml) were preincubated at 37°C for 5 min, small aliquot of buffer (○), BPB (●) or RB (▲) at a final concentration of 50 M were added. After this incubation at 37°C for 10 min, cells were washed in 1% BSA and washed twice in buffer at 0°C. 1 ml of cell suspensions were added to 3 ml of the prewarmed uptake medium containing ANS at a final concentration of 10 μM. 0.5 ml samples were then withdrawn and immediately centrifuged at times indicated. Each point represents the mean ± S.E. of three different preparations.

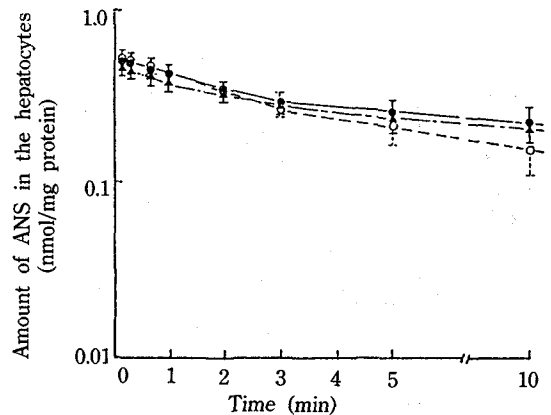


Figure 7—Efflux of ANS in the presence of BPB or RB. After the cell suspensions (8 mg cellular protein/ml) were preincubated at 37°C for 5 min, small aliquot of ANS at a final concentration of 20 μM were added. After this incubation at 37°C for 5 min, cells were washed in 1% BSA and washed twice in buffer at 0°C. 1 ml of cell suspensions were added to 3 ml of the prewarmed uptake medium containing buffer (○), BPB (●), or RB (▲) at a final concentration of 50 μM. 0.5 ml samples were then withdrawn and immediately centrifuged at times indicated. Each point represents the mean ± S.E. of three different preparations.

간세포 내에 고농도로 이행시킨 후 ANS의 세포내 이행에 관한 초속도는 대조군과 유의한 차이를 나타내지 않았다 세포내로부터 세포외로의 ANS efflux 과정에 미치는 BSP 또는 RB의 영향을 Fig. 7에 나타내었다. ANS를 유리간세포내로 이행시킨 다음 반응액 중에 BPB 또는 RB를 과량 가한 후 측정된 ANS의 efflux 과정에 관한 초속도도 대조군과 유의한 차이를 나타내지 않았다. 따라서, *in vivo*^{15,16)} 및 유리간세포 실험계(Fig. 5)에서 관찰된 ANS의 대향수송과정에는 대측효과가 관여하지 않는 것으로 생각된다.

일반적으로 대향수송현상은 혈액측에 가해진 과량의 약물 B에 의해 막내 비결합형 담체의 분포가 간장측에 풍부하게 된 결과, 같은 담체에 의해 수송되는 약물 A의 efflux가 촉진된다고 생각되고 있다. Scharschmit 등⁹⁾은 *in vivo*에 있어서의 overshoot 현상, 즉 혈액측에 가해진 과량의 약물 B에 의해 간장내로 이행되었던 약물 A가 혈중으로 efflux되어 일시적으로 약물 A의 혈장농도가 높아지는

현상도 이러한 결과에 기인한 것이라고 설명하고 있다. 또한 이러한 가정은 약물과 결합한 담체의 막내확산속도정수(P₁)가 비결합형 담체의 막내확산속도정수(P₂)보다 클 때 일어나는 대측효과를 말하는 것이다. 그러나 본 연구에 있어서의 이론적 해석 및 실험결과에 의하면, P₁이 P₂보다 작은 경우(대측역제효과) 또는 P₁이 P₂와 같이 경우에 있어서도 overshoot현상이 관찰되었다. 또한 “대측효과”가 관찰되지 않은 경우에 있어서도 대향수송현상이 일어날 수 있다고 생각되었다. 따라서 Scharschmit 등⁹⁾이 제안한 *in vivo*에 있어서의 대향수송현상을 해석하는 데는 좀더 신중한 자세가 필요하며, 대측효과가 관찰되지 않은 경우에 있어서도, 대향수송과정의 담체순환 및 두 약물이 담체를 공유할 수 있다는 사실을 배제할 수는 없다고 추정되었다.

결론

이상의 실험결과로부터 다음과 같은 결론을 얻었

다.

1. 담체의 막내·외 순환에 의한 대항수송과정에 있어서, 약물과 결합한 담체의 막내확산속도정수(P_1)가 비결합형 담체의 막내확산속도정수(P_2)보다 커야 한다는 조건은 대항수송현상을 일으키기 위한 필요조건이 아니라는 사실을 알 수 있었다.

2. BPB 또는 RB을 유리간세포내에 미리 이행시킨 후 ANS의 세포내 이행 초속도 및 ANS를 세포내에 이행시킨 후 저해제의 반응액 존재하에서 ANS의 efflux 초속도는 대조군과 유의한 차이를 나타내지 않았다. 또한, *in vivo* 실험에 있어서도 초기혈장농도소실이 변화하지 않은 사실로부터 ANS의 담체에 의한 대항수송과정에 있어서는 “대측효과”가 일어나지 않은 것으로 생각되었다.

3. 간장내에 저해제를 미리 이행시킨 후, 목적약물이 간으로 이행되는 초속도의 변화를 조사하여 “대측효과”의 유·무를 밝히는 것은 약물의 생체막투과과정에 있어서 담체순환 및 두 약물이 담체를 공유한다는 대항수송현상의 유용한 판단기준이 될 수 있으나, “대측효과”가 관찰되지 않은 경우에 있어서도 대항수송현상이 일어날 가능성을 배제할 수는 없다고 생각되었다.

감사의 글

이 연구는 1992년도 한국과학재단 연구비지원(과제번호 921-1600-002-1)에 의해 수행되었으며 이에 감사드린다.

문헌

- 1) G. Paumgartner and J. Reichen, Different pathways for hepatic uptake of taurocholate and indocyanine green, *Experientia* (Basel), **32**, 306 (1975).
- 2) G. Paumgartner and J. Reichen, Kinetics of hepatic uptake unconjugated bilirubin, *Clin. Sci. Mol. Med.*, **51**, 169 (1976).
- 3) L. Schwarz, R. Burr, M. Schwenk, E. Pfaff and H. Greim, Uptake of taurocholic acid into isolate rat-liver cells, *Eur. J. Biochem.*, **55**, 617 (1975).
- 4) M. Schwenk, R. Burr, L. Schwarz and E. Pfaff,

Uptake of bromosulphophthalein by isolated liver cells, *Eur. J. Biochem.*, **64**, 189 (1976).

- 5) A.J. Levi, Z. Gatmaitan and I.M. Arias, Two hepatic cytoplasmic protein fractions, Y and Z, and their possible role in the hepatic uptake of bilirubin, sulfobromophthalein, and other anions, *J. Clin. Invest.*, **48**, 2156 (1969).
- 6) G. Litwack, B. Ketterer and I.M. Arias, Ligandin: A hepatic protein which binds steroids, bilirubin, carcinogens and a number of exogenous organic anions, *Nature*, **234**, 466 (1971).
- 7) W.H. Habig, M.J. Pabst, G. Fleischer, Z. Gatmaitan, I.M. Arias and W.B. Jakoby, The identity of glutathion S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **71**, 3879 (1974).
- 8) A.W. Wolkoff, C.A. Goresky, J. Sellin, Z. Gatmaitan and I.M. Arias, Role of ligandin in transfer of bilirubin from plasma into liver, *Am. J. Physiol.*, **236**, E638 (1979).
- 9) B.F. Scharschmidt, J.G. Waggoner and P.D. Berk, Hepatic organic anion uptake in the rat, *J. Clin. Invest.*, **56**, 1280 (1975).
- 10) Y. Sugiyama, S. Kimura, J.H. Lin, M. Izukura, S. Awazu and M. Hanano, Effects of organic anions on the uptake of 1-anilino-8-naphthalene sulfonate by isolated liver cells, *J. Pharm. Sci.*, **72**, 871 (1983).
- 11) L. Stryer, Fluorescence spectroscopy of protein: Fluorescent probes provide insight into the structure, interaction, and dynamics of proteins, *Science*, **162**, 526 (1968).
- 12) B. Rabalcava, D. Martinez de Munoz and C. Gitler, Interaction of fluorescent probes with membranes: I. Effect of ions on erythrocyte membranes, *Biochem.*, **8**, 2742 (1969).
- 13) P.A.G. Fortes and J.F. Hoffman, Interaction of the fluorescent anion ANS with membrane charge in human red cell ghosts, *J. Membr. Biol.*, **5**, 154 (1971).
- 14) S. Cheng and D. Levy, The interaction of anionic fluorescence probe, ANS, with hepatocytes and hepatoma tissue culture cells, *Biochem. Biophys. Acta.*, **511**, 419 (1978).
- 15) Y.B. Chung, S. Miyauchi, Y. Sugiyama, H. Harashima, T. Iga and M. Hanano, Kinetic analy-

- sis of the dose-dependent hepatic handling of 1-anilino-8-naphthalene sulfonate in rats, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **18**, 313 (1990).
- 16) Y.B. Chung, S. Miyauchi, Y. Sugiyama, H. Harashima, T. Iga and M. Hanano, Effect of various organic anions on the plasma disappearance of 1-anilino-8-naphthalene sulfonate, *J. Hepatology*, **11**, 240 (1990).
- 17) T. Nakagawa, Y. Koyanagi and H. Togawa, "SALS, a Computer Program for Statistical Analysis with Least Squares Fitting." Library Program of the University of Tokyo Computer, Tokyo, Japan, 1978.
- 18) H. Baur, S. Kasperek and E. Pfaff, Criteria of viability of isolated liver cells, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **356**, 827 (1975).
- 19) T. Iga, D.L. Eaton and C.D. Klaassen, Uptake of unconjugated bilirubin by isolated rat hepatocytes, *Am. J. Physiol.*, **236**, C9-C14 (1979).