

## 토끼의 수종 점막 추출액중 로이신엔케팔린 및 [D-알라<sup>2</sup>]-로이신엔케팔린아미드의 효소적 분해 특성

전인구\* · 박인숙  
동덕여자대학교 약학대학  
(Received July 28, 1994)

### Enzymatic Degradation of Leucine Enkephalin and [D-Ala<sup>2</sup>]-Leucine Enkephalinamide in Various Rabbit Mucosa Extracts

In Koo Chun\* and In Sook Park  
College of Pharmacy, Dongduk Women's University, Seoul 136-714, Korea

**Abstract**—To study the feasibility of transmucosal delivery of leucine enkephalin (Leu-Enk) and [D-ala<sup>2</sup>]-leucine enkephalinamide (YAGFL), their degradation extents and pathways in various rabbit mucosa extracts were investigated by high performance liquid chromatography. The degradation of Leu-Enk and YAGFL was observed to follow the first-order kinetics. The degradation half-lives of Leu-Enk in the nasal, rectal and vaginal mucosal extracts were 1.62, 0.37 and 1.12 hrs and those of YAGFL were 30.55, 9.70 and 6.82 hrs, respectively, indicating Leu-Enk was degraded in a more extensive and rapid manner than YAGFL. But the mucosal and serosal extracts of the same mucosa showed the similar degradation rates for both pentapeptides. The degradation was most rapid in the neutral pH and increasing concentrations of substrates retarded the degradation rates. The major hydrolytic fragments of Leu-Enk were Des-Tyr-Leu-Enk and tyrosine, indicating the enzymatic hydrolysis by aminopeptidases. However, the data also suggested endopeptidases such as dipeptidyl carboxypeptidase and dipeptidyl aminopeptidase could play some role in the degradation of Leu-Enk. On the other hand, the hydrolytic fragments of YAGFL in all the mucosa extracts were mainly Tyr-D-Ala-Gly and Phe-Leu-Amide, demonstrating the hydrolytic breakdown by endopeptidases. The degradation pathways were further explored by concomitantly determining the formation of smaller metabolites of primary hydrolytic fragments of Leu-Enk and YAGFL in the mucosa extracts.

**Keywords** □ Leucine enkephalin; [D-ala<sup>2</sup>]-leucine enkephalinamide; nasal, rectal and vaginal mucosa extracts; enzymatic degradation; degradation pathway.

엔케팔린은 진통작용이 있는 내인성 펜타펩타이드<sup>1)</sup>로 신경전달물질 또는 신경조절인자로 진통, 혈압조절, 장관 운동성 변화, 진해 및 지사작용 등이 있는 것으로 알려져 있다.<sup>2-4)</sup> 그러나 이러한 효과는 생물학적 반감기가 1분 이내<sup>5)</sup>로 매우 짧으며 뇌실내 주사시에도 진통작용 등이 일시적이다. 이와 같이 천연 엔케팔린류가 체내에서 급격히 불활성화되는 것은 혈장,<sup>5,6)</sup> 뇌<sup>7)</sup>에 존재하는 여러 종류의 효소에 의한 분해에 기인하는 것으로 알려져 왔다.

Schwartz 등<sup>8)</sup>은 Tyr-Gly bond를 절단하는 아미노펩티다제류가 엔케팔린 분해의 주된 효소이며 Gly-Phe bond를 절단하는 엔케팔리나제 A와 Gly-Gly bond를 절단하는엔케팔리나제 B 및 안지오텐신 전환효소도 분해에 다소 관여한다고 보고하였다. 또한 비강, 직장 및 질 점막의 표면상태는 globlet 세포로부터 분비되는 점액 중에는 단백분해효소, 면역글로불린 등이 존재하며 이들은 점막을 통해 약물을 흡수시킬 경우 장벽으로서 역할을 하게 되며 각 부위마다 구성성분 및 점액에 존재하는 효소도 각기 다를 뿐만 아니라 이 효소들은 생체부위에 따라 그 활성에

\*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

차이가 있으며 엔케팔린 분해에 대한 상대적인 기여가 다르다고 알려져 있다.<sup>9-11)</sup> 토끼 점막의 균등질액중 천연 엔케팔린의 가수분해에 대한 연구에서 엔케팔린류가 직장과 구강 점막의 균등질에서 가장 신속하게 분해되었고 비강과 질 점막의 순서로 분해가 되었지만 분해속도에는 큰 차이가 없었다고 하였다.<sup>12)</sup> 또한 저자들은 수종의 점막 추출액중 메치오닌엔케팔린의 분해가 직장, 질, 비강의 순으로 신속히 분해되었고 [D-알라<sup>2</sup>]-메치오닌엔케팔린아미드도 분해속도는 다소 느렸으나 비강, 직장, 질 및 눈 등의 점막에 따라 분해속도에 다소 차이가 있음을 보고하였다.<sup>13-15)</sup> 한편 엔케팔린의 주 분해효소인 아미노펩티다제류에 대해 저항성이 크도록 엔케팔린의 두번째 아미노산인 글리신을 D-알라닌으로 치환한 [D-알라<sup>2</sup>]-메치오닌엔케팔린아미드 또는 [D-알라<sup>2</sup>]-로이신엔케팔린아미드 등의 합성 유사체가 만들어지게 되었으며 진통효과도 천연 엔케팔린보다 현저히 높은 것으로 보고되었다.<sup>16,17)</sup> 또 최근 엔케팔린 및 그 유사체류의 체내 수송을 위해 비강,<sup>18)</sup> 안점막,<sup>19)</sup> 소장<sup>20,21)</sup> 및 피부<sup>22)</sup> 등을 이용한 연구가 활발히 진행되어 왔다. 이상에서 기술한 바와 같이 생리활성 엔케팔린 및 그 유사체류는 그 투여부위가 비강, 직장, 질 및 눈 등 점막부위라 하더라도 투과도중 심한 효소적 분해를 받고 높은 친수성으로 인하여 체내 흡수가 어렵다.

본 연구에서는 로이신엔케팔린(Leu-EnK)과 이의 합성 유사체인 [D-알라<sup>2</sup>]-로이신엔케팔린아미드(YA-GFL)의 경점막 수송의 가능성을 검토하고자 토끼의 비강, 직장 및 질점막 등의 투여부위에서의 효소적 분해 특성을 비교 검토하고 분해경로를 추적하였다.

### 실험방법

**실험 동물**— 실험동물로는 New Zealand White계 체중 2.5~3.0 kg의 자성 토끼를 명진기계상사(서울)로부터 구입하여 사용하였다.

**재료 및 시약**— 펩타이드류로는 천연 엔케팔린으로 Leu-Enk(Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu, 초산염), 합성 유사체로 YAGFL(Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Amide, 초산염), 각기의 대사체로 Des-Tyr<sup>1</sup>-Leu-Enk(초산염), Des-Tyr-YAGFL(초산염), Tyr, Phe, Tyr-Gly, Tyr-Gly-Gly, Phe-Leu(브롬화수소산염), Tyr-D-Ala, Tyr-D-Ala-Gly, Phe-Leu-amide(브롬화수소산염)를, 효소

억제제로는 amastatin(AM, 염산염), thiorphan(TP) 등을 Sigma Chem. Co에서 구입하여 썼다. 또 헵탄 설폰산나트륨(Sigma Chem. Co.)은 이온회합제로 사용하였으며 HPLC용 아세토니트릴, 메탄올을 썼다. 물은 정제수를 초순수제조장치(Elgastat UHQ PS, Elga Ltd.)를 통과시켜 18 MΩ 이상인 것을 사용하였고 기타 시약은 시판 특급품을 썼다.

**점막의 적출 및 추출액의 제조**— 체중 2.5 kg 이상의 건강한 자성 토끼의 귀정맥에 공기를 주입하여 치사시키고 먼저 질 점막조직을 절제하여 불필요한 조직을 제거하였다. 직장은 꼬리의 연골을 따라 절제하여 직장을 노출시키고 항문으로부터 5 cm 상단에서 절제한다음 장막층의 불필요한 조직을 제거하여 사용하였다. 비강 점막은 코의 정중선을 따라 수술용 칼(#10)로 절개한 후 연골을 따라 heavy-duty scissor로 두쪽으로 잘라 비강을 노출시키고 비강 연골의 안쪽 및 아래쪽 부위를 수술용 칼로 잘라낸 다음 장갑을 착용한 엄지로 조심스럽게 박리시켰다. 적출된 점막은 생리식염액으로 가볍게 씻고 즉시 Valia-Chien 투과셀에 마운팅하고 다음의 조작에 따라 점막 추출액을 조제하였다. 적출 및 마운팅 조작은 치사후 1시간 이내에 행하였다.

신선하게 적출한 점막을 Valia-Chien 투과 장치의 half-cell 사이에 점막층이 donor 셀을 향하도록 하여 마운팅하고 donor 및 receptor cell층에 각각 등장인산염완충액(비강 : pH 8.0, 직장 : pH 7.2, 질 : pH 6.0, 장막층 : pH 7.4)을 각각 3.5 ml씩 넣어 채우고 37°C에서 8시간씩 magnetic stir-head bar로 600 rpm으로 교반하여 추출하였다. 매 추출액은 따로따로 냉장고에 보존하였다. 이와 같은 추출 조작을 3회 실시하고 모든 추출액을 합하여 donor cell로부터 취한 추출액을 점막층 추출액, receptor cell로부터 취한 추출액을 장막층 추출액으로 하였다. 모든 추출액은 최종 추출 완료후 30분 이내에 시험에 사용하였다.

**점막 추출액중 총단백 정량**— 토끼의 점막 추출액중 추출된 단백 함량을 측정 비교하고자 점막의 점막층 및 장막층으로부터 추출된 추출액중 총단백의 양을 Schosinsky 등<sup>23)</sup>의 색소법에 따라 정량하였다. 브롬페놀블루(BPB)액 2.0 ml에 시료액 0.5 ml를 넣어 섞고 610 nm에서 흡광도를 측정하고 미리 토끼 혈청 알부민을 사용하여 작성한 검량선으로부터 총단백의 양을 구하였다.

**점막 추출액 중 Leu-Enk 및 YAGFL의 효소적 분해시험**—각 점막 추출액 800  $\mu$ 에 펩타이드의 시료 원액( $1.76 \times 10^{-3}$ M; 1,000  $\mu$ g/ml) 50  $\mu$ 씩을 넣고 생리식염액을 넣어 1000  $\mu$ 로 한 다음 60 rpm으로 흔들면서 37°C에서 incubation하였다. 미리 설정된 시간 간격으로 Leu-Enk의 경우는 검액 100  $\mu$ 씩 취하여 즉시 pH 2.2 인산염완충액 400  $\mu$ 를 넣고 섞어 효소 반응을 정지시키고, YAGFL의 경우는 검액 100  $\mu$ 에 내부 표준물질로 Phe-Leu(12.5  $\mu$ g/ml)를 함유하는 pH 2.2 인산염완충액 400  $\mu$ 에 넣어 효소 반응을 정지시키고 이 액 20  $\mu$ 씩을 HPLC에 주입하여 다음의 분석법에 따라 엔케팔린류와 그 대사 분해산물을 정량하였다.

**점막 추출액중 Leu-Enk 및 YAGFL의 초기농도가 이들의 분해에 미치는 영향**—Leu-Enk과 YAGFL 각각을 생리식염수에 녹여 Leu-Enk은  $1.79 \times 10^{-3}$ M로, YAGFL은  $1.76 \times 10^{-3}$ M로 하여 시료원액으로 하고 이 액 30, 50, 100 및 200  $\mu$ 씩을 취하여 각각 비강점막 및 직장점막 추출액 각 800  $\mu$ 에 넣고 완충액(비강 pH 8.0, 직장 pH 7.2)을 넣어 1000  $\mu$ 로 한 후 60 rpm으로 흔들면서 37°C에서 incubation하였다. 일정 시간마다 검액 100  $\mu$ 씩 취하여 Leu-Enk의 경우는 pH 2.2 인산염완충액 400  $\mu$ 를, YAGFL의 경우는 내부표준물질로 Phe-Leu를 12.5  $\mu$ g/ml 함유하는 pH 2.2 인산염완충액 400  $\mu$ 에 넣고 vortexing하여 효소 반응을 정지시켰다. 이 액 20  $\mu$ 씩을 HPLC에 주입하여 YAGFL 및 Leu-Enk을 정량하고 그 잔존량을 산출하였다.

**점막 추출액의 pH가 YAGFL의 분해에 미치는 영향**—1% 수산화나트륨용액 또는 1% 인산을 사용하여 pH를 각각 3.5, 5.2, 7.2, 8.4 및 10.7로 조절된 직장점막추출액 800  $\mu$ 에 YAGFL의 시료원액( $1.76 \times 10^{-3}$ M) 50  $\mu$  및 생리식염수 150  $\mu$ 를 넣고 60 rpm으로 흔들면서 37°C에서 24 시간에 걸쳐 incubation하였다. 일정 시간마다 각각 100  $\mu$ 씩 취하여 내부표준물질로 Phe-Leu를 12.5  $\mu$ g/ml 함유하는 pH 2.2 인산염완충액 400  $\mu$ 에 넣고 vortexing하여 효소 반응을 정지시켰다. 이 액 20  $\mu$ 를 HPLC에 주입하여 YAGFL을 정량하고 그 잔존량을 산출하였다.

**점막 추출액 중 1차 분해산물의 분해실험**—점막 추출액중 Leu-Enk 및 YAGFL의 1차 대사분해물의 분해를 검토함으로써 분해경로를 밝히고자 엔케팔린

류의 초기 농도( $8.8 \times 10^{-5}$ M)와 같은 몰농도가 되도록 대사물질들의 원액( $1.76 \times 10^{-3}$ M)을 각각 50  $\mu$ 씩 취하여 각 점막 추출액 800  $\mu$ 에 넣고 생리식염액을 넣어 1000  $\mu$ 로 한 다음 37°C에서 24시간에 걸쳐 배양하였다. 일정 시간마다 시료 100  $\mu$ 씩 취하여 즉시 pH 2.2 인산염완충액 400  $\mu$ 씩을 넣고 vortexing하여 효소 반응을 정지시켰다. 이 액 20  $\mu$ 를 HPLC에 주입하고 각 펩타이드 및 그 분해산물의 양을 절대검량 선법에 따라 미리 작성한 검량선으로부터 구하였다.

**점막 추출액중 Leu-Enk, YAGFL 및 분해산물의 정량**—HPLC series 410 및 검출기 LC 90 UV spectrophotometric detector(Perkin-Elmer), 데이터처리 장치 Varian 4290 integrator를 사용하고 칼럼으로는 octadecylsilane 역상 지지체가 충전된 스테인레스 스틸칼럼(3.9 $\times$ 300 mm, 10  $\mu$ m,  $\mu$ Bondapak C18 column)을 쓰고 가드칼럼( $\mu$ Bondapak™ C18 PreColumn Insert)을 부착시켰다. 이동상으로는 펩타이드의 종류에 따라 Leu-Enk과 YAGFL 및 분해산물의 fragment가 큰 것(Des-Tyr-Leu-Enk, Des-Tyr-YAGFL, Phe-Leu, Phe-Leu-Amide)에 대해서는 0.05M 인산염완충액(pH 3.0)·아세트니트릴 혼합액(74 : 26 v/v)을 쓰고 fragment가 작은 경우(Tyr, Phe, Tyr-Gly, Tyr-Gly-Gly, Tyr-D-Ala-Gly)는 같은 성분의 90 : 10(v/v) 혼합액을 써서 정량하였다. 이동상은 모두 이온회합제로 0.1% 헵탈실폰산나트륨을 함유시켰다. 검출은 UV 214 nm에서, 유속은 1.0 ml/min으로 하였다.

## 결과 및 고찰

### 점막 추출액중 단백질 함량

토끼의 비강, 직장 및 질 점막을 적출하여 Valia-Chien permeation cell에 mounting하고 점막측과 장막측을 등장 인산염완충액으로 8시간 3회 추출하여 합한 추출액중 단백질의 함량을 BPB 색소법으로 정량하여 알부민의 양으로 산출하였다. 우혈청 알부민 및 토끼혈청 알부민을 가지고 검량선을 작성한 결과 0~200  $\mu$ g/ml에서 양호한 직선성 [우혈청:  $y = -3.928 \times 10^{-4} + 1.252 \times 10^{-3}x$ ( $r = 0.9995$ ), 토끼혈청:  $y = -1.855 \times 10^{-3} + 1.167 \times 10^{-3}x$ ( $r = 0.9998$ )]을 보여 주었다. 토끼혈청 알부민을 사용하여 얻은 검량선으로부터 구한 여러 점막 추출액중 단백질함량을 Table I에

**Table I**—Total protein concentrations in various rabbit mucosa extracts

Mucosa	Extract	Protein Conc. <sup>a)</sup> (µg/ml ± S.E.)
Nasal	Mucosal	61.90(± 10.46)
	Serosal	47.16(± 23.93)
Rectal	Mucosal	162.64(± 22.44)
	Serosal	129.70(± 11.20)
Vaginal	Mucosal	114.26(± 4.29)
	Serosal	124.97(± 9.81)

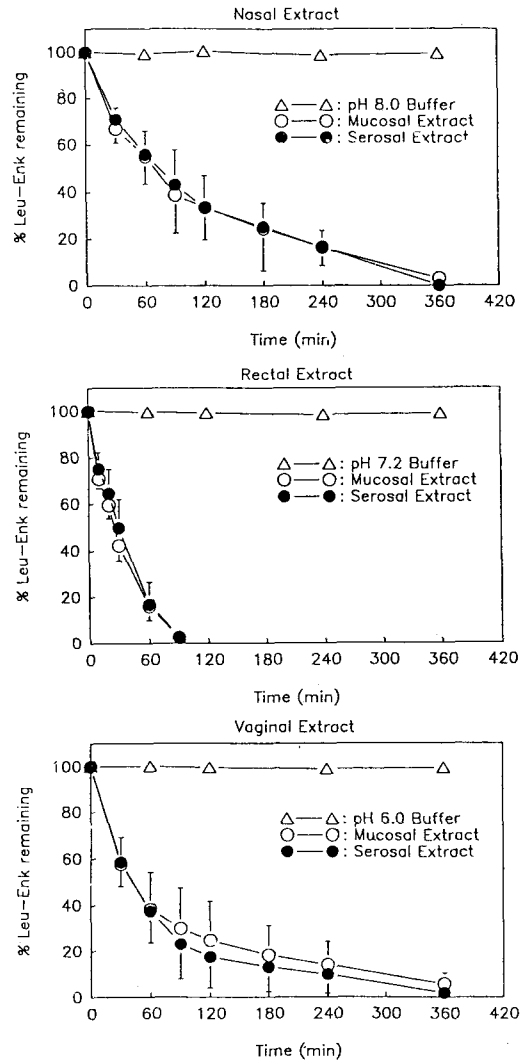
<sup>a)</sup> Expressed as the mean (± standard error, n=3) of albumin concentration. The total volumes extracted from the surface area of 0.64 cm<sup>2</sup> of each mucosa were 10.5 ml.

나타내었다. 이에서 보면 추출액중 단백질량은 동일 점막인 경우 점막측과 장막측 간에는 별다른 차이를 나타내지 않았으나 점막의 종류에 따른 단백질유량은 직장>질>비강의 순이었다.

**Leu-Enk의 효소적 분해 특성**

Leu-Enk의 경점막 수송을 검토하는 데에 있어서 선결되어야 할 과제가 투여부위인 점막부위에서 Leu-Enk이 효소장벽에 의해 분해되는 정도와 그 경로를 파악하는 일이다. 뇌와 여러 부위에서는 Leu-Enk의 대사에 관한 많은 연구가 보고되어 있으나 비경구 점막부위에서의 분해여부에 관한 정보는 별로 없다. 이러한 관점에서 본 연구에서는 점막의 균등 질액을 사용하지 않고 적출한 각 점막의 점막측 추출액과 장막측 추출액을 제조하여 각각의 추출액 중 Leu-Enk의 분해 정도와 그 분해경로를 추적하였다. 이를 위해 Leu-Enk의 소실과 여러 분해산물을 HPLC법을 써서 경시적으로 분석 검토하였다.

Fig. 1은 토끼의 비강, 직장 및 질 점막의 점막측과 장막측 추출액 중 Leu-Enk의 분해거동을 나타낸 것이다. 동시에 각 점막 추출액의 제조에 쓴 완충액 중에서의 Leu-Enk 분해도 동일 조건에서 비교 검토하였다. 이에서 보면 완충액 중에서는 Leu-Enk의 분해를 거의 인지할 수 없었으나 점막 추출액들에서는 매우 신속히 분해되었다. 이들의 분해 프로파일을 1차식에 따라 플로트한 결과 양호한 직선성 (r=0.98 이상)을 나타내어 겉보기 1차 속도로 분해됨을 알았으며 이로부터 구한 점막 및 부위별 1차 분해속도정수를 Table II에 나타내었다. Leu-Enk의 분해속도는



**Fig. 1**—Enzymatic degradation of Leu-Enk in the mucosal and serosal extracts of nasal, rectal and vaginal mucosae. Data were obtained from three rabbits and error bar indicates the standard error.

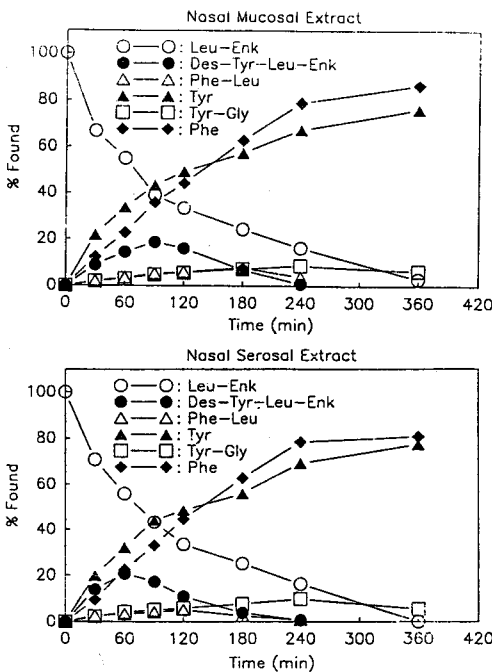
직장 점막 추출액에서 분해반감기( $t_{1/2}$ )가  $0.37(\pm 0.08)$  hr로 가장 빨랐으며 다음으로 질 점막 추출액 [ $t_{1/2} = 12(\pm 0.58)$  hr], 비강 점막 추출액 [ $t_{1/2} = 1.62(\pm 0.50)$  hr]의 순이었다. 그러나 동일 점막에 있어서는 점막측 및 장막측 추출액 간의 Leu-Enk의 분해속도에는 별다른 차이가 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 Chun 등<sup>13)</sup>이 보고한 점막 추출액중 메치오닌엔케팔린의 분해거동과 매우 유사하며 점막의 종류에 따라 추출액 중 엔케팔린 분해효소의 활성에 상당한 차이가

**Table II**—Apparent first-order rate constants (*k*) and half-lives (*t*<sub>1/2</sub>) for the degradation of Leu-Enk in the extracts of various absorptive mucosae

Mucosa <sup>a)</sup>	Extract <sup>b)</sup>	<i>k</i> (×10 <sup>3</sup> , hr <sup>-1</sup> ± SE)	<i>t</i> <sub>1/2</sub> (hr ± SE)
Nasal	Mucosal	657.4(± 263.7)	1.62(± 0.50)
	Serosal	605.7(± 223.5)	1.62(± 0.45)
Rectal	Mucosal	2085.3(± 371.0)	0.37(± 0.08)
	Serosal	1625.0(± 667.6)	0.67(± 0.28)
Vaginal	Mucosal	1310.5(± 496.7)	1.12(± 0.58)
	Serosal	1159.0(± 370.5)	1.09(± 0.52)

<sup>a)</sup>Excised freshly from New Zealand White rabbits just prior to extraction.

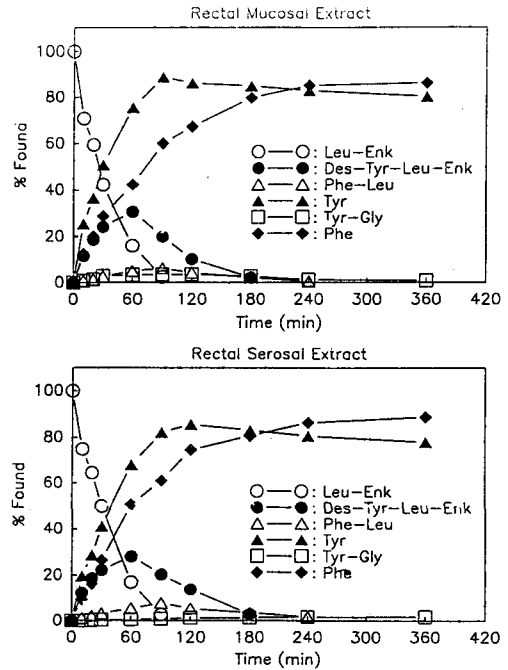
<sup>b)</sup>Exposed mucosal and serosal surfaces separately to the isotonic phosphate buffer solution adjusted to the physiological pH's for each mucosa.



**Fig. 2**—Time courses for the disappearance of Leu-Enk and the appearance of its various hydrolytic fragments in the nasal mucosal and serosal extracts.

있음을 의미한다.

Fig. 2-4에는 각각 비강, 직장 및 질 점막 추출액중 Leu-Enk을 incubation하였을 때 시간의 경과에 따른 Leu-Enk의 소실과 분해 fragment들의 생성 및 소실 프로파일을 보여 준다. Leu-Enk는 모든 추출액에 있어서 여러 종류의 분해산물을 생성하면서 심하게 분



**Fig. 3**—Time courses for the disappearance of Leu-Enk and the appearance of its various hydrolytic fragments in the rectal mucosal and serosal extracts.

해됨을 알 수 있다. Leu-Enk의 Tyr-Gly bond가 급속히 분해되어 Tyr의 생성량이 높은 농도로 증가되었다. Des-Tyr-Leu-Enk는 Tyr보다 낮은 농도이지만 60분대에 최대농도를 나타낸 다음 더 작은 fragment로 분해되면서 감소되었다. 또 한편 Gly-Gly bond의 분해로 생성된 Tyr-Gly fragment의 양은 상대적으로 낮았다. 그러나 비강의 점막층과 장막층 추출액에서는 직장과 질 점막 추출액에 비해 상대적으로 높은 농도의 Tyr-Gly fragment가 검출되었다. 즉 비강, 직장 및 질 점막 추출액에서 Leu-Enk를 360분간 incubation하였을 때 Tyr-Gly의 생성률(± S.E.)은 각각 10.00(± 0.08), 0.92(± 0.051) 및 1.07(± 0.76)%로 비강 추출액에서의 Tyr-Gly 생성율이 가장 높은 반면 Tyr의 경시적인 생성률은 비강 추출액에서 가장 낮았다. 이러한 사실은 점막의 종류에 따라 전체 Leu-Enk의 분해에 대한 아미노펩티다제류와 엔케팔리나제 B의 상대적 기여도가 다름을 의미한다. 전체적으로는 아미노펩티다제류가 Leu-Enk 분해에 주요 역할을 하고는 있지만 비강점막에서는 직장이나 질점막에 비해 엔도펩티다제류의 활성이 상대적으로 높음을 나타낸

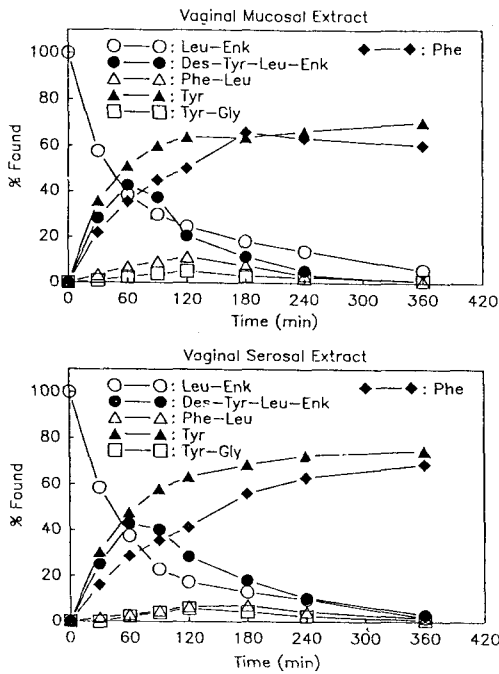


Fig. 4—Time courses for the disappearance of Leu-Enk and the appearance of its various hydrolytic fragments in the vaginal mucosal and serosal extracts.

다.

다른 한편으로 1차 분해산물(Des-Tyr-Leu-Enk, Phe-Leu, Tyr-Gly 및 Tyr-Gly-Gly)이 더욱 작은 fragment로 분해되는 속도와 분해물 생성을 검출하기 위하여 이들의 농도를 Leu-Enk의 농밀 몰농도( $8.8 \times 10^{-5}M$ )로 하여 여러 점막 추출액에 있어서의 이들의 잔존농도와 그 분해산물들의 생성농도를 경시적으로 측정하였다. 직장점막 추출액에서의 분해 profile을 Fig. 5에 나타내었고 각 1차 분해산물들의 분해속도와 반감기를 Table III에 나타내었다. 이로 볼 때 tetrapeptide인 Des-Tyr-Leu-Enk는 dipeptidyl peptidase의 작용으로 Gly-Phe bond가 분해되어 두 개의 dipeptide fragment(Gly-Gly 및 Phe-Leu)로 분해되고 이들은 이어서 구성 아미노산으로 분해되는 것으로 추정된다.<sup>12)</sup> 한편 Tyr-Gly fragment는 Tyr을 형성하면서 구성 아미노산으로 분해되었지만 다른 1차 분해산물보다는 매우 느린 속도로 분해되었다. 모든 추출액에 있어서 Leu-Enk의 분해시 Tyr-Gly fragment가 검출된 것은 이와 같이 생성된 Tyr-Gly fragment가 상대적으로 느린 속도로 분해되었기 때문에 그 잔존량이 상대적으로 높았던 것으로 생각된다.

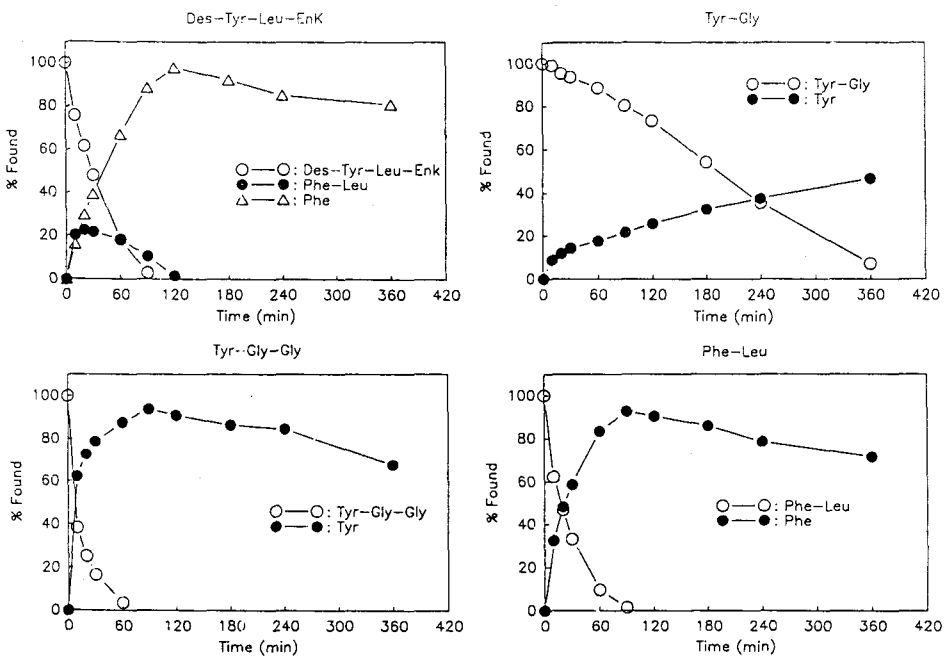


Fig. 5—Time courses for the disappearance of primary hydrolytic fragments of Leu-Enk and the appearance of smaller hydrolytic fragments in the rectal mucosa extracts.

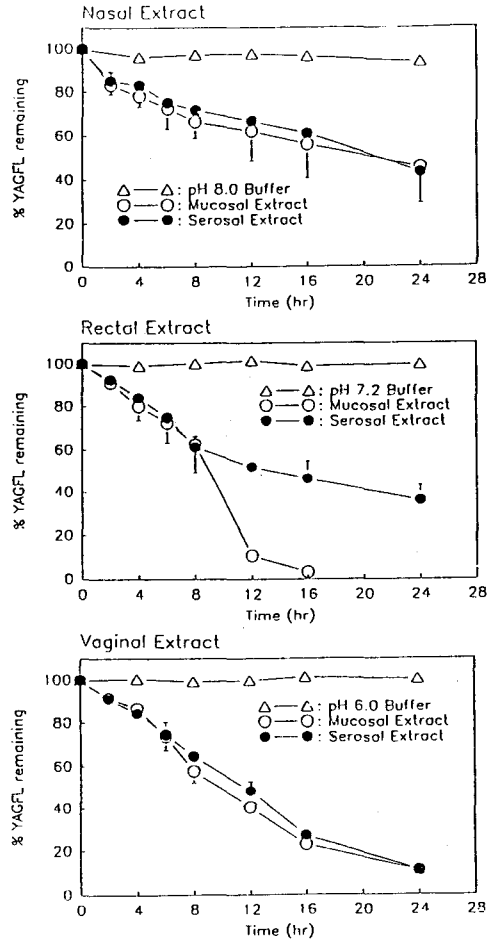
**Table III**—Apparent first-order rate constants ( $k$ ) and half-lives ( $t_{1/2}$ ) for the degradation of primary hydrolytic fragments of Leu-Enk in the rectal mucosal extracts

Hydrolytic fragment	$k$ ( $\text{hr}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (hr)
Des-Tyr-Phe-Leu	1.752	0.396
Phe-Leu	2.267	0.306
Tyr-Gly	0.254	2.725
Tyr-Gly-Gly	4.126	0.168

Tyr-Gly-Gly fragment는 Tyr을 생성하면서 급속히 가수분해되어 60분 후에는 모두 소실되었다. 이때 Tyr-Gly fragment가 검출되지 않은 점으로 보아 Tyr-Gly-Gly fragment는 Tyr-Gly bond에서 분해됨을 알았다. 점막 추출액중 Leu-Enk을 incubation한 모든 추출액에서 Tyr-Gly-Gly fragment를 검출할 수 없었던 점은 비록 엔케팔리나제 A의 작용으로 이 분해산물이 생성된다 하더라도 생성되자마자 급속히 더 작은 fragment로 분해되어 검출할 수 없었던 것으로 추정된다.<sup>13)</sup> 이상과 같이 Leu-Enk의 분해에 여러 종류의 효소류가 관여되고 있다는 점은 이의 경점막 수송을 위해서는 이들 효소류의 활성이 강력히 억제되어야 함을 의미한다. 즉 점막부위에서 Leu-Enk를 충분히 안정화시키기 위해서는 아미노펩티다제류뿐만 아니라 엔케팔리나제 A 및 B와 같은 엔도펩티다제들도 모두 억제시킬 필요가 있다.

### YAGFL의 효소적 분해 특성

**점막에 따른 분해 속도**—비강, 직장 및 질 점막 추출액 중 YAGFL의 경시 잔존률을 Fig. 6에 나타내었다. 추출액의 제조에 쓴 각기의 완충액 중에서는 pH에 관계없이 24시간까지 거의 분해가 없었으나 점막 추출액 중 YAGFL은 Leu-Enk보다는 훨씬 느린 속도이지만 비교적 신속히 분해되었다. 이는 YAGFL이 효소적 분해에 대해 저항성이 크도록 설계된 펩타이드라 하더라도 점막 추출액에서 YAGFL이 주로 효소적으로 분해되는 것을 나타낸다. 점막별로 보면 직장점막 추출액에서 YAGFL의 분해가 가장 빨라 15시간 이내에 거의 분해되었으며 비강점막 추출액에서 분해가 가장 느렸다. 또한 경시적 잔존률을 가지고 1차식에 따라 플로트한 결과 양호한 직선성을 보여 주었으며 이로부터 구한 1차 분해속도정수와 반감기를 Table IV에 나타내었다. 동일 점막에서는 본 연



**Fig. 6**—Enzymatic degradation of YAGFL in the mucosal and serosal extracts of nasal, rectal and vaginal mucosae. Data were expressed as the mean  $\pm$  standard error ( $n=3$ ).

구의 Leu-Enk 및 앞서 보고한 [D-알라<sup>2</sup>]-메치오닌 엔케팔리나미드<sup>14)</sup>와 같이 점막측과 장막측 추출액 사이에 분해속도의 차이가 별로 없었고 분해속도의 크기는 직장>질>비강 점막 추출액 순이었다.

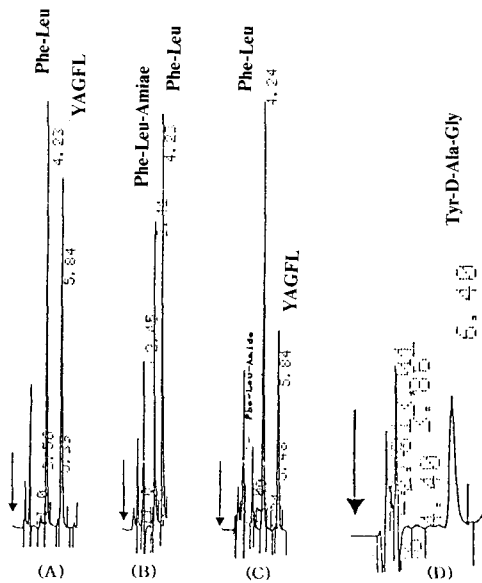
**점막 추출액중 YAGFL의 분해경로**—YAGFL의 분해경로를 규명하기 위해 각 점막 추출액중 YAGFL의 분해산물의 종류와 양에 관한 검토를 행하였다. 추출액중 YAGFL의 분해산물로 생성이 가능한 Des-Tyr-YAGFL, Phe-Leu-Amide, Tyr, Tyr-D-Ala, Tyr-D-Ala-Gly 및 Phe 등의 생성여부에 대해 추적을 행하였다. YAGFL과 이의 분해산물인 Phe-Leu-Amide 및 Tyr-D-Ala-Gly를 함유한 incubate의 액체크로마토그램을 Fig. 7에 나타낸다. 점막추출액 중 Phe-

**Table IV**—Apparent first-order rate constants (k) and half-lives ( $t_{1/2}$ ) for the degradation of YAGFL in the extracts of various absorptive mucosae

Mucosa <sup>a)</sup>	Extract <sup>b)</sup>	k ( $\times 10^3$ , hr <sup>-1</sup> ± SE)	$t_{1/2}$ (hr ± SE)
Nasal	Mucosal	30.6(± 10.7)	30.55(± 7.56)
	Serosal	29.6(± 1.3)	23.52(± 1.02)
Rectal	Mucosal	82.7(± 16.0)	9.70(± 2.30)
	Serosal	68.5(± 7.4)	10.53(± 1.28)
Vaginal	Mucosal	101.7(± 1.0)	6.82(± 0.07)
	Serosal	97.1(± 1.2)	7.14(± 0.09)

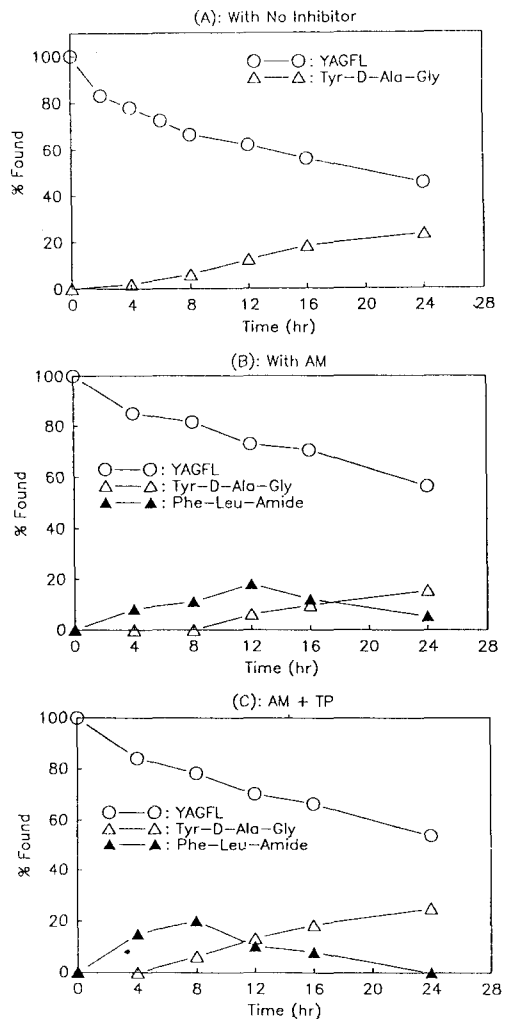
a) Excised freshly from New Zealand White rabbits just prior to extraction.

b) Exposed mucosal and serosal surfaces separately to the isotonic phosphate buffer solution adjusted to the physiological pH's for each mucosa.



**Fig. 7**—HPLC chromatograms of: (A), YAGFL standard solution (10 µg/ml) and Phe-Leu (10 µg/ml, internal standard); (B), Phe-Leu-Amide standard solution (10 µg/ml); (C), YAGFL and its hydrolytic fragment (Phe-Leu-Amide); (D), Tyr-D-Ala-Gly fragment in the rectal mucosal extract with amastatin (50 µM) after incubation of 16 hr at 37°C.

Leu-Amide은 0.05M 인산염완충액(pH 3.0)·아세트 니트릴 혼합액(74 : 26 v/v)을 이동상으로 한 조건에서 검출되었고 Tyr-D-Ala-Gly는 혼합액의 비율을 90 : 10(v/v)으로 한 조건에서 검출되었다. Fig. 8A에서와 같이 비강 점막의 점막층 추출액에서 YAGFL의



**Fig. 8**—Time courses for the degradation of YAGFL (50 µg/ml) and appearance of its hydrolytic fragments in the absence (A) and presence of enzyme inhibitors such as 50 µM AM (B) and 50 µM AM-50 µM TP (C) at 37°C.

분해에 따라 분해산물로 Tyr-D-Ala-Gly만이 경시적으로 검출되었고 추출액에 아마스타틴(AM) 단독 및 AM·TP 혼합효소억제제를 첨가한 조건(Fig. 8B 및 8C)에서만 Phe-Leu-Amide가 검출되었으나 Tyr의 생성은 크로마토그램상에서 인지할 수 없었다. 이와 같이 Phe-Leu-Amide는 효소억제제를 첨가하지 않은 경우 모든 점막 추출액에서 그 생성량이 미량이고 신속히 재분해되어 정확한량을 산출하기가 어려웠기 때문에 생성된 Phe-Leu-Amide의 2차 분해를 가급적 억제하기 위해 아미노펩티다제류의 억제제인 AM(50



$\mu\text{M}$ )을 단독 또는 AM과 엔케팔리나제 A의 억제제인 TP( $50 \mu\text{M}$ )를 혼합하여 첨가한 조건에서 생성된 Tyr-D-Ala-Gly가 24시간까지 축적되었으며 Phe-Leu-Amide는 각 점막 추출액에서 많은 양이 검출되었다. 비강 점막의 장막측 추출액에서도 점막측 추출액에서와 같이 AM 또는 AM/TP의 존재시 YAGFL의 경시적 분해에 따라 Tyr-D-Ala-Gly가 경시적으로 축적되었으나 Phe-Leu-Amide는 모두 8~16 hr에 최대 농도에 도달한 후 서서히 분해되는 것으로 나타났다. 이는 생성된 Phe-Leu-Amide의 분해에는 아미노펩티다제류 이외에 다른 분해효소가 더 관여하기 때문인 것으로 생각된다. 이와 같이 비강의 점막측과 장막측 추출액에서는 모두 분해산물로 Tyr-D-Ala-Gly와 Phe-Leu-Amide만이 검출되어 분해기구는 Gly-Phe bond를 절단하는 엔도펩티다제류의 작용에 의한 것임을 알았다.

직장 점막의 점막측 추출액과 장막측 추출액중 AM 또는 AM/TP를 첨가한 경우와 효소억제제를 첨가하지 않은 경우 YAGFL의 분해거동과 생성된 분해산물의 경시거동(그림 생략)은 비강점막 추출액에서와 같이 Tyr-D-Ala-Gly가 24시간까지 YAGFL의 분해와 함께 지속적으로 축적되었으며 Phe-Leu-Amide는 8~12시간에 최대농도에 도달한 후 서서히 분해되는 것으로 나타났다. AM( $50 \mu\text{M}$ ) 단독을 첨가한 경우와 이것에 TP( $50 \mu\text{M}$ )을 더 추가한 경우를 비교하면 YAGFL의 분해가 경시적으로 약간 지연되고 분해산물의 생성도 이에 따라 다소 적게 나타났으나 큰 차이는 없었다. 또한 질점막의 점막측 및 장막측 추출액중 AM 또는 AM/TP의 첨가 유무에 따른 YAGFL의 경시분해거동과 분해산물의 경시생성 추이(그림 생략)는 비강점막이나 직장점막 추출액과 유사하였다.

이상과 같이 비강, 직장 및 질 점막 추출액에서 YAGFL은 모두 엔도펩티다제류에 의해 Gly-Phe bond가 깨져 Tyr-D-Ala-Gly와 Phe-Leu-Amide를 생성하면서 분해되는 것을 알 수 있다. 점막의 종류 따라 YAGFL의 분해속도와 분해물의 생성량에 다소 차이가 있는 점으로 보아 YAGFL의 분해에 관여하는 엔도펩티다제의 활성정도가 점막의 종류에 따라 다소 차이를 알 수 있다. 분해산물은 추출액중 AM과 같은 효소억제제를 첨가하지 않은 조건에서는 분해속도가 느린 Tyr-D-Ala-Gly만이 검출되고 그 반대 fragment인 Phe-Leu-Amide는 생성과 더불어 신속한 분해로

검출이 어려웠으나 AM( $50 \mu\text{M}$ )의 첨가로 Phe-Leu-Amide fragment까지 경시적으로 측정할 수 있었다. 이러한 결과는 생체내 조직이나 추출액중 펩타이드류의 분해기구를 연구하는데 유용한 방법으로 활용될 수 있다고 생각된다.

#### 점막추출액 중 YAGFL의 1차 분해산물의 분해

YAGFL의 분해로 생성된 1차 분해산물의 더 작은 fragment로의 분해를 검토하기 위하여 생성 가능한 fragment인 Des-Tyr-YAGFL, Phe-Leu-Amide 및 Phe-Leu 각각을 여러 점막추출액에 YAGFL의 효소적 분해실험에서와 같은 몰농도로 첨가하고 이들 fragment들의 경시 잔존량을 측정하였다. HPLC법에 따라 이동상을 0.05M 인산염완충액(pH 3.0) · 아세토니트릴 혼합액(74 : 26 v/v)으로 하여 분리한 결과 des-Tyr-YAGFL은 5.67분, Phe-Leu-Amide는 4.84분 및 Phe-Leu는 6.13분에 검출되었다. 또한 Tyr-D-Ala-Gly 및 Tyr-Ala의 경우 이동상을 0.05M 인산염 완충액(pH 3.0) · 아세토니트릴 혼합액(90 : 10 v/v)으로 하여 정량한 결과 Tyr-D-Ala-Gly는 10.21분, Tyr-Ala는 8.41, Tyr은 4.69분 및 Phe는 7.8분에서 양호하게 분리 검출할 수 있었다.

비강점막 추출액중 Des-Tyr-YAGFL, Tyr-D-Ala-Gly, Phe-Leu-Amide 및 Phe-Leu의 경시분해 거동과 함께 이들의 분해산물의 생성을 Fig. 9에 나타내었다. 이에서 보는 바와 같이 D-Ala를 함유하는 Des-Tyr-YAGFL과 Tyr-D-Ala-Gly는 24시간에 걸쳐 거의 모두 분해되었다. 그러나 분해산물로는 Phe만이 검출되었으며 Tyr-D-Ala-Gly의 분해산물로 예상되는 Tyr과 같은 fragment를 전혀 검출할 수 없었다. 이러한 결과는 Des-Tyr-YAGFL의 경우 엔도펩티다제에 의해 Gly-Phe bond가 깨져서 생성된 D-Ala-Gly와 Phe-Leu-Amide의 2차 분해산물로 추정되는 D-Ala와 Gly가 파장 214 nm에서 검출되지 않고 Phe-Leu-Amide의 분해로 생성된 Phe만이 검출되었기 때문인 것으로 생각된다. 또 Tyr-D-Ala-Gly의 fragment에서는 D-Ala-Gly bond가 깨져 Tyr가 생성될 것으로 예상되나 Tyr가 검출되지 않은 점은 생성속도보다 빠른 속도로 다른 산화물 등으로 변화되었기 때문인 것으로 추정된다. 한편 비강점막 추출액중 Phe-Leu-Amide는 Phe를 생성하면서 4시간만에 90% 이상 분해되었으며 Phe-Leu은 분해산물로 Phe를 생성하면서 1시간 만에

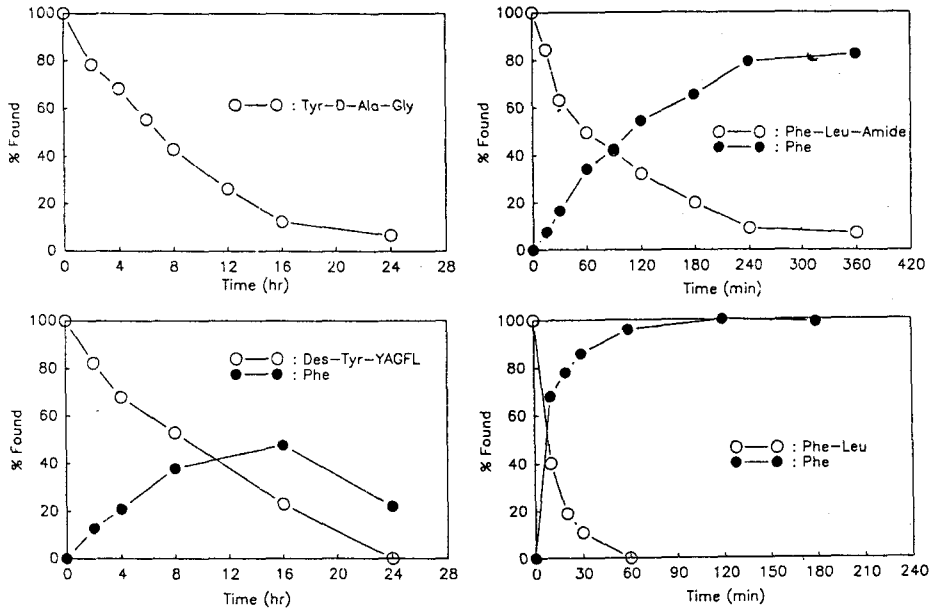


Fig. 9—Time courses for the disappearance of primary hydrolytic fragments of YAGFL and the appearance of smaller hydrolytic fragments in the nasal mucosa extracts.

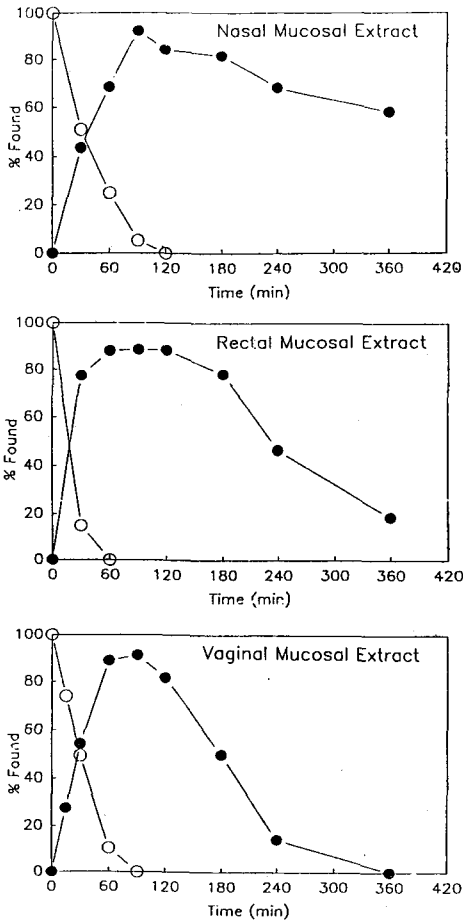
완전히 분해되었다. Fragment들중 D-Ala를 함유하는 것들은 약 24시간에 걸쳐 서서히 분해되어 효소적 저항을 보여 주었다. Phe-Leu-Amide와 Phe-Leu과 같이 L-form의 아미노산으로 이루어진 펩타이드들은 효소적으로 급속히 분해됨을 알 수 있다.

직장점막 추출에서도 비강점막에서와 마찬가지로 Des-Tyr-YAGFL은 약 8시간에 90% 이상 분해되었으며 분해산물로 Phe이 8시간대에 53.7%로 최대농도를 보인 후 24시간 대에 거의 완전히 소실되었다. Phe의 소실은 추출액 중에 존재하는 여러 효소나 미생물에 의해 분해되거나 소비되었기 때문으로 추정되나 이의 확실한 규명은 별도의 연구가 필요하다. Tyr-D-Ala-Gly는 6시간에 90% 이상 분해되었으며 Tyr나 Tyr-D-Ala와 같은 분해물의 피크가 관찰되지 않았다. 한편 Phe-Leu-Amide는 직장점막 추출액에서 90분에 모두 분해되었으며 분해산물로 Phe이 120분대에 최대생성을 보여 준 이후 서서히 감소되었다. Phe-Leu은 10분 이내에 모두 급속히 분해되었으며 같은 시점에 Phe이 거의 100% 검출되었다. 이와 같이 L-form으로 이루어진 디펩타이드류는 비강이나 질 점막에 비해 직장점막 추출에서 훨씬 신속히 분해된

점은 직장점막 추출액에 보다 많은 아미노펩티다제류가 존재하기 때문인 것으로 생각된다.<sup>13)</sup>

한편 질점막 추출에서도 Des-Tyr-YAGFL이 incubation 8시간에 14.2%밖에 잔존하지 않았으며 분해산물로 Phe이 8시간에 26.9%로 최대에 달한 후 16시간 대에 모두 소실되었다. 또 Tyr-D-Ala-Gly도 8시간에 19.7%로 분해되었으며 Tyr이나 Tyr-D-Ala와 같은 분해산물의 피크가 나타나지 않았다. 이러한 결과는 비강 및 직장점막 추출액에서와 유사한 결과이다. Phe-Leu-Amide는 급속히 분해되어 60분에 약 13.4%밖에 남지 않았으며 생성된 Phe는 120분에 72.6%로 최대농도에 달한 후 서서히 소실되었다. Phe-Leu는 60분대에 16.8%밖에 잔존하지 않았으며 Phe은 120분 대에 99.5%에 달한 후 이후 서서히 소실되었다.

다로 비강, 직장 및 질점막 추출액 중 Tyr-Ala fragment의 경시분해과정과 분해산물로 Tyr의 경시생성거동을 Fig. 10에 나타내었다. L-form의 Ala로 구성된 Tyr-Ala는 직장>질>비강점막 추출액 순으로 분해산물로 Tyr를 생성하면서 급속히 분해되었으나 모두 120분 이내에 완전히 분해되었다. 비강점막 추



**Fig. 10**—Degradation of Tyr-Ala in the nasal, rectal and vaginal mucosal extracts at 37°C.  
Key: ○, Tyr-Gly; ●, Tyr

출액의 경우 D-Ala가 치환된 Tyr-D-Ala-Gly의 분해

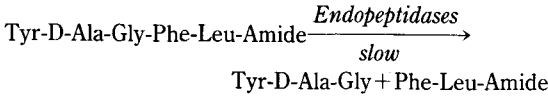
반감기는 5.85 hr로 Tyr-Gly-Gly fragment의 분해반감기인 0.574 hr임에 비추어 약 10.2배 분해속도가 지연되었다. 따라서 D-Ala체가 치환된 Tyr-D-Ala-Gly나 Des-Tyr-YAGFL의 경우 상대적으로 서서히 분해되고 생성된 Tyr이 축적되지 않고 다른 물질로 변화되기 때문에 Tyr의 fragment를 검출할 수 없었던 것으로 생각된다.

Table V에는 비강, 직장 및 질점막의 점막층 및 장막층 추출액 중 Des-Tyr-YAGFL, Tyr-D-Ala-Gly, Phe-Leu-Amide, Phe-Leu 및 Tyr-Ala의 분해속도정수와 반감기를 1차식에 따라 구하여 정리하였다. 이에서 보는 바와 같이 YAGFL의 1차 분해산물의 분해반감기를 살펴보면 D-Ala로 치환되지 않은 Phe-Leu 및 Phe-Leu-Amide의 경우는 반감기가 매우 짧아 직장점막 추출액에서 각각 약 0.36 및 0.33 hr로 매우 짧았으나 D-Ala로 치환되어 있는 Des-Tyr-YAGFL 및 Tyr-D-Ala-Gly fragment들은 각각 8.29 및 5.85 hr로 Gly-Gly-Phe-Leu 및 Tyr-Gly-Gly의 반감기(각각 0.396 및 0.168 hr)에 비해 각각 약 20.9 및 34.8배 분해속도가 느린 것을 알 수 있다. 또 C-말단을 amide화한 Phe-Leu-Amide도 Phe-Leu자체에 비해 모든 점막 추출액에서 10배 이상 분해속도가 지연되었다. 이와 같이 Leu-Enk의 두번째 아미노산인 Gly 대신 D-Ala가 치환되고 C-말단을 amide화한 YAGFL의 분해속도는 천연의 Leu-Enk보다 비강, 직장 및 질점막 추출액에서 각각 약 21.5, 25.2 및 12.9배 지연되었다. 이러한 결과는 D-Ala의 치환과 amide화가 효소공격에 대한 저항성을 향상시켰기 때문인 것으로 생각된다. 그러나 아미노펩티다제류에 대해 저항성이

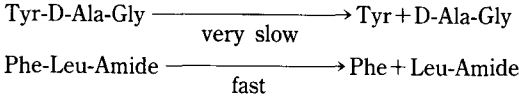
**Table V**—First-order rate constants ( $k$ ,  $\times 10^2 \text{ hr}^{-1}$ ) and half-lives ( $t_{1/2}$ , hr) for the degradation of Des-Tyr-YAGFL, Tyr-D-Ala-Gly, Phe-Leu-Amide, Phe-Leu and Tyr-Ala in the extracts of various absorptive mucosae of the NZW rabbit

Mucosa	Extract	Des-Tyr-YAGFL		Tyr-D-Ala-Gly		Phe-Leu-Amide		Phe-Leu		Tyr-Ala	
		k	$t_{1/2}$	k	$t_{1/2}$	k	$t_{1/2}$	k	$t_{1/2}$	k	$t_{1/2}$
Nasal	Mucosal	8.36	8.29	11.86	5.85	3.35	2.07	3.94	0.18	2.26	0.31
	Serosal	7.42	9.35	11.04	6.28	3.75	1.85	5.03	0.14	1.65	0.42
Rectal	Mucosal	39.10	1.77	54.68	1.27	18.87	0.36	26.17	0.03	4.85	0.14
	Serosal	12.47	5.56	11.61	5.97	5.54	1.25	5.63	0.12	1.78	0.39
Vaginal	Mucosal	27.20	2.55	12.47	5.56	12.87	0.54	2.20	0.31	3.15	0.22
	Serosal	35.53	1.95	7.12	9.73	4.34	1.60	6.19	0.11	3.27	0.21

**Primary Degradation:**



**Secondary Degradation:**



**Scheme I**—Major degradation pathway of YAGFL in the extracts of nasal, rectal and vaginal mucosae of rabbits.

크도록 설계된 합성 유사체라 하더라도 엔도펩타다제류에 의해 분해를 상당히 받기 때문에 경점막 수송을 도모하기 위해서는 이의 안정화 대책을 강구할 필요가 있다. 최근 엔도펩타다제-24.11의 환취의 위장관내 분포가 공장>십이지장>회장>맹장의 순이고 엔도펩타다제-2의 분포는 회장>공장>십이지장>맹장의 순이었으며 YAGFL의 분해에는 엔도펩타다제-24.11만이 관여하였다고 보고되었다.<sup>24)</sup> 이상과 같이 여러 점막의 점막측 및 장막측 추출액 중 YAGFL의 경시분해거동과 여러 fragment들의 분해속도를 종합해 보면 YAGFL은 Scheme I과 같이 Gly-Phe bond가 1차 절단되고 이어 생성된 Tyr-D-Ala-Gly와 Phe-Leu-Amide가 2차적으로 분해되어 구성 아미노산으로 분해되고 더욱 아미노산류도 효소적 및 비효소적으로 다른 분해물로 변화되는 것으로 추정된다.

**점막 추출액의 pH가 YAGFL의 분해에 미치는 영향**

점막 추출액중 YAGFL의 분해에 미치는 pH의 영향을 검토하기 위하여 분해속도가 가장 크게 나타난 직장 점막 추출액을 택하여 인산 또는 수산화나트륨액으로 추출액의 pH를 3.5, 5.2, 7.4, 8.4 및 10.7로 조절한 다음 24시간 incubation하여 그 잔존률을 가지고 YAGFL의 1차 분해속도정수(k, ×10<sup>3</sup> hr<sup>-1</sup>)를 구한 결과 각각 7.3, 10.7, 39.9, 20.6 및 7.6으로 나타났다. 이러한 결과는 점막 추출액중 엔케팔린 분해 효소활성이 중성 부근에서 최대임을 의미하며 산성이나 알칼리 영역으로 갈수록 효소활성이 급격히 감소하여 YAGFL의 분해가 억제됨을 알 수 있다. 이러한 결과는 엔케팔린을 분해하는 아미노펩타다제류와 엔

**Table VI**—Effect of initial peptide concentration on the first-order rate constant (k, hr<sup>-1</sup>) and half-lives (t<sub>1/2</sub>, hr) degradation of Leu-Enk and YAGFL in the rectal mucosal extracts

Initial concentration (µg/ml)	Leu-Enk		YAGFL	
	k	t <sub>1/2</sub>	k	t <sub>1/2</sub>
30	3.7	0.19	0.088	7.9
50	2.4	0.29	0.062	11.3
100	1.6	0.40	0.051	13.5
200	0.5	1.30	0.030	23.4

케팔리나제의 최적 pH가 중성 부근이라는 보고<sup>25)</sup>와 일치한다.

**점막 추출액중 Leu-Enk 및 YAGFL의 초기농도에 따른 분해 특성**

Leu-Enk 및 YAGFL의 분해가 점막으로부터 추출된 효소류에 의한 것으로 확인됨에 따라 펩타이드의 초기농도를 30, 50, 100 및 200 µg/ml로 달리 하여 비강 및 직장 점막 추출액에 첨가하고 경시 잔존률을 측정하여 1차 분해속도정수를 구하여 Table VI에 나타내었다. 이에서 보는 바와 같이 비강 및 직장 점막 추출액 모두에서 기질의 초기농도가 증대됨에 따라 점차 분해속도가 지연되었다. 이는 기질의 농도가 증가함에 따라 효소분해반응에 포화현상이 있음을 의미한다.

**결 론**

로이신엔케팔린(Leu-Enk)과 이의 합성유사체인 [D-알라<sup>2</sup>]-로이신엔케팔린아미드(YAGFL)를 모델 생리활성 펩타이드로 하여 토끼의 비강, 직장 및 질 점막 추출액 중에서의 효소적 분해거동을 속도론적으로 측정하였다. 그 결과 얻은 주된 결론은 다음과 같다.

1. Leu-Enk는 등장 인산염 완충액중 37°C에서 6시간까지 아무런 분해가 없었으나 직장 점막 추출액에서 약 90분 이내에, 비강 및 질 점막 추출액에서는 6시간 이내에 1차식에 따라 효소적으로 모두 분해되었으며 동일 점막의 점막측과 장막측 추출액 간에는 분해속도에 별다른 차이가 없었다. 분해산물로는 Tyr, Des-Tyr-Leu-Enk, Phe-Leu, Tyr-Gly, Tyr-Gly-Gly, Phe 등이 검출되었으며 이들의 생성 속도와 2차 분해속도의 검토로 Leu-Enk의 분해는 주로 아미노펩타다제류에 의하여였으며 엔케팔리나제 A와 B가 분해에 일부 관여하였음을 알았다.

2. YAGFL은 등장 인산염 완충액중 37°C에서 24시간 후 분해가 거의 없었으나 비강, 직장 및 질 점막 추출액에서는 24시간 후 50% 이하의 잔존률을 보여 주었다. 분해속도의 순서는 직장>질>비강>점막 순이었으나 동일 점막의 점막측과 장막측 추출액 간에는 분해속도에 별다른 차이가 없었다. 또한 점막 추출액중 YAGFL의 분해속도는 pH 7.0 부근에서 가장 컸으며 펜타펩타이드의 농도가 낮을수록 분해가 빨랐다. YAGFL의 분해산물로는 Tyr-D-Ala-Gly 및 Phe-Leu-Amide만이 검출되어 이의 분해는 주로 YAGFL의 Gly-Phe bond를 절단하는 엔도펩티다제류에 의하였다.

### 감사의 말씀

이 연구는 한국과학재단 특정기초 연구과제 (91-05-00-07)의 연구지원에 의해 이루어졌다. 이에 감사드린다.

### 문헌

- Hughes, J., Smith, T. W., Kosterlitz, H. W., Fothergill, L. T., Morgan, B. A. and Horries, H. R.: Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* **158**, 295-308 (1975).
- Brownstein, M. J.: Peptidergic pathways in the central nervous system. *Proc. R. Soc. B* **210**, 133-149 (1980).
- Miller, R. J. and Cartresas, P.: The enkephalins: peptides with morphine-like activity. *Naturwissenschaften* **65**, 508-514 (1978).
- Dzolic, E. D. and Dzolic, M. R.: Modification of morphine withdrawal in rats by alterations of the endogenous opioid system: effects of actinonin and GEMSA. *Drug Dev. Res.* **18**, 255-261 (1989).
- Frederickson, J.C.A. and Geary, L. E.: Endogenous opioid peptides: review of physiological, pharmacological and clinical aspects. *Prog. Neurobiol.* **19**, 16-69 (1982).
- Hambrook, J. M., Morgan, B. A., Rance, M. J. and Smith, L.F.C.: Mode of deactivation of the enkephalins by rat and human plasma and rat brain homogenates, *Nature* **262**, 782-783 (1976).
- Hersh, L. B. and McKelvy, J. F.: An aminopeptidase from bovine brain which catalyzes the hydrolysis of enkephalin. *J. Neurochem.* **36**, 171-178 (1981).
- Schwartz, J. C., Malfroy, B. and De La Baume, S.: Biological inactivation of enkephalins and the role of enkephalin dipeptidyl-carboxypeptidase ("enkephalinase") as neuropeptidase. *Life Sci.* **9**, 1715-1740 (1981).
- Carson, J. L., Collier, A. M., Knowles, M. R., Boucher, R. C. and Rose, J. C.: Morphometric aspects of ciliary distribution and ciliogenesis in human nasal epithelium. *Pro. Natl Acad. Sci. USA* **78**, 6996 (1981).
- Eidelman, S. and Lagunoff, D.: The morphology of the normal human rectal biopsy. *Human Pathol.* **3**, 389 (1972).
- Rackoff, A. E., Feo, L. G. and Goldstein, L.: The biologic characteristics of the normal vagina. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **47**, 467 (1944).
- Dodda-Kashi, S. and Lee, V.H.L.: Enkephalin hydrolysis in homogenates of various absorptive mucosae of the albino rabbit: similarities in rates and involvement of aminopeptidase. *Life Sci.* **38**, 2019-2028 (1986).
- Chun, I. K. and Chien, Y. W.: Transmucosal delivery of methionine enkephalin I. kinetics of degradation in buffered solution and metabolism in various mucosal extracts. *J. Pharm. Sci.* **82**, 373-378 (1993).
- Chun, I. K. and Yang, Y. J.: Degradation and stabilization of [D-ala<sup>2</sup>]-methionine enkephalinamide in various rabbit mucosa extracts. *J. Kor. Pharm. Sci.* **22**, 173-183 (1992).
- Lee, C. H., Lee, K. J., Chun, I. K., Sung, Y. G. and Shin, Y. H.: Degradation and stabilization of methionine enkephalin and [D-ala<sup>2</sup>]-methionine enkephalinamide in the corneal extracts of rabbits. *J. Kor. Pharm. Sci.* **24**, 1-9 (1994).
- Coy, D. H., Kastin, A. J., Schally, A. V., Morin, O., Caron, N. G., Labrie, F., Walker, J. M., Fertel, R., Bertson, G. G. and Sandman, C. A.: Synthesis and opioid activities of stereoisomers and other D-amino acid analogs of methionine enkephalin. *Life*

- Sci.* **73**, 632-638 (1976).
- 17) Pert, C. B., Pert, A. Chang, J. K. and Fong, B.T.W.: [D-Ala<sup>2</sup>]<sup>2</sup>-met-enkephalinamide; a potent, long-lasting synthetic pentapeptide analgesic. *Science* **194**, 330-332 (1976).
- 18) Faraj, J. A., Hussain, A. A., Aramaki, Y., Iseki, K., Kagoshima, M. and Dittert, L. W.: Mechanism of nasal absorption of drugs. IV: Plasma levels of radioactivity following intranasal administration of (<sup>3</sup>H)leucine enkephalin. *J. Pharm. Sci.* **79**, 768-770 (1990).
- 19) Stratford, R. E., Carson, L. W. Dodda-Kashi, S. and Lee, V.H.L.: Systemic absorption of ocularly administered enkephalinamide and insulin in the albino rabbit: extent, pathways and vehicle effects. *J. Pharm. Sci.* **77**, 838-842 (1988).
- 20) Kerchner, G. A. and Geary, L. E.: Studies on the transport of enkephalin-like oligopeptides in rat intestinal mucosa. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **226**, 33-38 (1983).
- 21) Friedman, D. I. and Amidon, G. L.: Oral absorption of peptides: influence of pH and inhibitors on the intestinal hydrolysis of leu-enkephalin and analogues. *Pharm. Res.* **8**, 93-96 (1991).
- 22) Choi, H. K., Flynn, G. L. and Amidon, G. L.: Transdermal delivery of bioactive peptides: the effects of decylmethyl sulfoxide and pH on enkephalin transport. *Pharm. Res.* **7**, 1099-1106 (1990).
- 23) Schosinsky, K. H., Vargas, M., Esquivel, A. L. and Chavarria, M. A.: Simple spectrophotometric determination of urinary albumin by dye-binding with use of bromphenol blue. *Clin. Chem.* **33**, 223-226 (1987).
- 24) Bai, J.P.F.: Distribution of brush-border membrane peptidases along the rat intestine. *Pharm. Res.* **11**, 897-900 (1994).