

제조 방법에 따른 간 모세담관막 소포계의 수송 특성 비교

송임숙 · 정석재 · 심창구[†]

서울대학교 약학대학
(1999년 1월 21일 접수)

Comparative Study on the Transport Characteristics of Canalicular Liver Plasma Membrane Vesicles Prepared by Two Different Methods

Im-Sook Song, Suk-Jae Chung and Chang-Koo Shim[†]

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

(Received January 21, 1999)

ABSTRACT—Canalicular liver plasma membrane vesicles (cLPM) were prepared according to two different methods (Inoue method and Meier method), and were evaluated for their protein yield, enzyme activity and transport characteristics. No difference was found between the methods in the protein yield (i.e., 0.14 ± 0.031 and 0.15 ± 0.050 mg/g liver for Inoue method and Meier method, respectively). The activity of alkaline phosphatase, a marker enzyme of canalicular membrane, was significantly ($P < 0.05$) higher in the vesicles of Meier method (3.52 ± 0.91 mmol/mg/hr) than in the vesicles of Inoue method (2.28 ± 0.94 mmol/mg/hr) indicating that more purified cLPM were obtained from Meier method compared with Inoue method. ATP-dependent vesicular uptake of taurocholate and tributylmethylammonium (TBU₃MA) was observed for vesicles of both methods, and the kinetic parameters responsible for the transport were similar between the vesicles of both methods (for example, V_{max} : 9.72 nmol/mg protein/30sec and K_m : 0.63 mM for Inoue method; V_{max} : 10.1 nmol/mg protein/30sec and K_m : 0.70 mM for Meier method). A pH gradient dependent counter transport of TBU₃MA was also observed for both vesicles with similar kinetic characteristics. Either the uptake of taurocholate in the absence of ATP or that of TBU₃MA in the absence of pH gradient, which may represent passive diffusion of respective compound into the vesicles, was more rapid for the vesicles of Meier method than for the vesicles of Inoue method. For example, passive diffusion rate constants (K_d) for TBU₃MA uptake into the vesicles were 0.00030 and 0.00052 μ l/mg protein/min for the vesicles of Inoue method and Meier method, respectively. It may indicate that more leaky vesicles are obtained from the Meier method compared with the Inoue method. These aspects together with the time necessary to prepare the vesicles (i.e., 8 hr for Inoue method and 23 hr for Meier method) should be considered before selecting an appropriate method for the preparation of cLPM.

Keywords—Canalicular liver plasma membrane vesicles (cLPM), Inoue method, Meier method, Uptake, Taurocholate, TBU₃MA, ATP, pH-gradient

생체 내로 흡수된 약물 또는 이의 대사물은 생체에 대한 이물로서 마침내 체외로 배설된다. 그 배설경로는 약물에 따라 다르긴 하지만 대개는 신장을 통해 요 중으로, 또는 간을 통해 담즙으로 배설된다. 따라서 담즙배설은 약물의 중요한 체내 소실 경로의 하나이다. 약물이 담즙으로 배설되기 위해서는 간세포를 경유하지 않으면 안되고, 간세포를 경유하려면 간세포막을 통과하지 않으면 안된다. 간세포막은 유동측막(basolateral membrane)과 모세담관막(canalicular membrane)으로 나눌 수 있는데, 이들 막 중 모세담관막은 약물이 담즙으로 배설되는 과정 중에서 최종적으로 통과하게 되는 막이다. 최근 이 모세담관 막에 간세포내의 여러 가지 물질을 능

동적으로 담즙 중으로 수송하는 수송계들(예; 담즙산 수송담체, cMOAT, P-glycoprotein)이 존재한다는 사실이 밝혀지면서 약물의 담즙배설에 미치는 이 막의 중요성이 더욱 부각되고 있다. 따라서 이 막에 존재하는 어떤 수송계가 무엇을 구동력(driving force)으로 하여 어떤 약물(기질)을 얼마나 신속히 담즙 중으로 수송하고 있는지를 밝히는 연구가 큰 관심을 끌게 되었다. 이러한 연구를 수행하기 위한 실험계로 근래 각광을 받고 있는 것은 간세포로부터 모세담관막만을 분리하여 모세담관막 소포계(canalicular liver plasma membrane vesicles, cLPM)를 제조한 후 여러 가지 조건하에서 이 소포내로 약물이 uptake되는 양상을 측정하는 *in vitro* 실험계이다. 실제로 많은 연구자들이 모세담관막 소포(cLPM)를 이용하여 약물의 모세담관막 투과기전을 규명하고 있다.^{1-2,7-11} 현재까지 대부분의 연구자들은 N₂ cavitation 및

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : (02)880-7878, E-mail : shimck@plaza.snu.ac.kr

Ca²⁺ 침전을 주 방법으로 하는 Inoue 법¹⁾이나 모세담관막 소포와 유동층막 소포를 동시에 제조하는 Meier 법²⁾을 사용하여 모세담관막 소포를 조제하여 실험에 사용하고 있다. 이 두 가지 모세담관막 소포 조제법이 반응되고 있음에도 불구하고, 이 두 가지 조제법의 차이점, 특히 약물 수송 특성의 차이를 체계적으로 비교한 보고가 없다. 각기 다른 방법으로 만든 소포를 사용하여 얻은 수송 특성을 이와 같은 비교가 없는 상태에서 직접적으로 비교한다는 것은 경우에 따라서는 잘못된 결론을 유도할 우려가 있다고 생각된다.

따라서 본 연구에서는 Inoue 법 및 Meier 법에 따라 모세담관막 소포를 조제한 다음, 소포내의 단백질 함량과 효소활성을 비교하고, 나아가 모델 약물인 taurocholate와 tributyl methyl ammonium(TBuMA)이 모세담관막 소포내로 uptake되는 특성을 비교하였다. 여기에서 taurocholate는 ATP 의존적으로 모세담관막을 투과하는 물질의 모델로, 또 TBuMA는 ATP 및 pH gradient의존적으로 수송되는 물질의 모델로 선택하였다.^{3,10-11)} 본 실험을 통하여 두 방법은 이들 물질이 모세담관막 소포내로 수송되는 기본 특성을 연구하는 데에는 아무런 차이가 없지만, 소포를 만드는데 소요되는 시간, 소포체의 순도 등의 면까지 고려한다면 다소간의 차이가 있음을 알았다.

실험방법

시약

³H-TBuMA(0.2 Ci/mmol)는 tributylamine(Aldrich, Milwaukee, WI)과 ³H-Methyl iodide(85 Ci/mmol, Amersham, Arlington Heights, IL)를 첨가 반응시켜 합성하였다.³⁾ ³H-Taurocholate(3.7 Ci/mmol)는 NEN Life Science products (Boston, MA)에서 구입하였으며 기타 모든 시약은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO)에서 구입하여 사용하였다. 모세담관막 소포로의 uptake 실험을 할 때 사용한 incubation buffer의 조성은 다음과 같다. (1) ATP의존성 실험의 경우, 250 mM sucrose, 10 mM Hepes, 10 mM Tris, 10 mM MgCl₂, 0.2 mM CaCl₂(pH 7.4)이었고, (2) pH gradient에 관련된 실험의 경우, 82 mM sucrose, 100 mM K⁺-gluconate, 91 mM MES, 14 mM Hepes, 29 mM Tris, 0.2 mM Ca-gluconate(pH 5.9)와 70 mM sucrose, 100 mM K⁺-gluconate, 76 mM Hepes, 70 mM Tris, 0.2 mM Ca-gluconate(pH 7.9)이었다.

모세담관막 소포로의 uptake 실험에서 uptake를 중지시키거나 filter를 씻을 때 사용한 ice cold stop solution의 조성은 다음과 같았다. (1) ATP 의존성 실험의 경우, 250 mM sucrose, 10 mM Hepes, 10 mM Tris, 10 mM MgCl₂,

0.2 mM CaCl₂, 1 mM TBuMA or Taurocholate(pH 7.4) 이고, (2) pH gradient에 관련된 실험의 경우, 204 mM sucrose, 150 mM K⁺-gluconate, 10 mM Hepes, 10 mM Tris, 5 mM Mg-gluconate, 0.2 mM Ca-gluconate, 1 mM TBuMA 또는 taurocholate(pH 7.5)이었다.

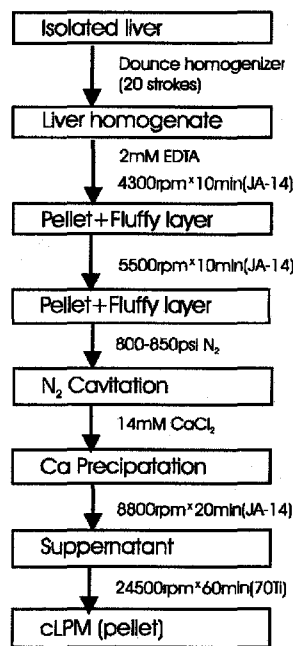
모세담관막 소포의 제조

다음과 같은 두 가지 방법에 따라 모세담관막 소포를 제조하였다. 각 방법에 따라 모세담관막 소포를 제조하는 과정을 Scheme I에 정리하였다.

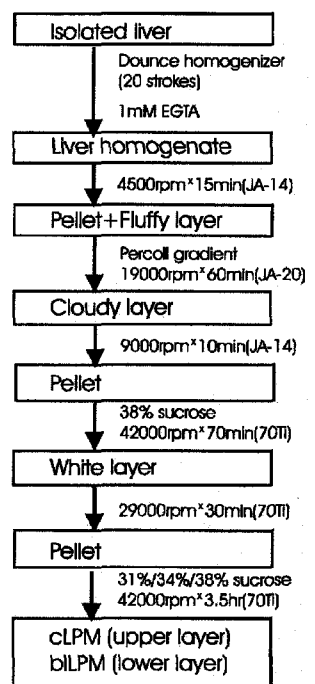
1) Inoue 법(제 I 법 : N₂ cavitation and Ca²⁺ precipitation 법)에 의한 제조¹⁾

Inoue의 방법에 따랐다. 모든 실험기구와 시약은 냉각시켜 사용하였고, 모든 과정은 ice bath상에서 수행하였다. 웅성 흰쥐(SD rat, 240-270 g, 대한 실험 동물) 4마리의 간을 생리 식염수로 관류하여 탈혈시켜 적출하고 가위로 잘게 자른 뒤, 간 3g에 buffer A(250 mM sucrose, 10 mM Hepes, 10 mM Tris, 0.2 mM CaCl₂, pH 7.4) 20 ml의 비율로 Dounce homogenizer(Wheaton, Millville, NJ)에 넣어 20 회 상하운동으로 homogenization하였다. 이 액을 거즈로 여과시킨 뒤 buffer A를 가하여 500 ml이 되도록 희석시키고, 최종 농도가 2 mM이 되도록 EDTA를 가하였다. 이 때 가

Method I (Inoue method)



Method II (Meier method)



Scheme I—Flow chart of the preparation methods of cLPM.

해진 EDTA는 Ca^{2+} 이온을 chelation 하여 간세포의 tight junction을 약화시킨다. 충분히 교반한 뒤 효소정량과 단백질량을 위해 2 ml를 남겨두고, 나머지는 4300 rpm에서 10분간(JA-14 rotor, Beckman, Palo Alto, California) 냉각원심하였다. 원심분리 과정에서 얻어진 pellet과 fluffy layer를 250 ml buffer A에 현탁시킨 뒤 5500 rpm에서 10분간(JA-14 rotor) 냉각원심하였다. Pellet과 fluffy layer를 100 ml buffer A에 재현탁시킨 뒤 N_2 cavitation 장치(Parr, Moline, IL)에 넣었다. N_2 압력을 800-850 psi로 높여 현탁액을 15분간 교반한 뒤 압력을 갑자기 낮추면 대기와 N_2 cavitation 장치간의 압력차에 의해 간세포가 완전히 파괴된다. 이 액을 다시 14 mM $CaCl_2$ 를 포함한 320 ml buffer A로 희석시켜 15분간 교반(Ca^{2+} 에 의해 유동층막은 침전되고 모세담관막만 상층에 남게 된다)한 다음, 8800 rpm에서 20분간(JA-14 rotor) 냉각원심하여 얻은 상층을 다시 24500 rpm에서 60분간(70 Ti rotor, Beckman) 초원심하여 pellet을 얻었다. 이 pellet이 모세담관막 소포이다. 이 pellet을 소량의 buffer A에 현탁시켜, 실험전까지 $-70^{\circ}C$ 에서 보관하였다.

2) Meier 법(제 II 법 : 모세담관막 소포, 유동층막 소포 동시제조법)에 의한 제조²⁾

I 법에서와 동일한 과정으로 웅성 흰쥐(SD rat) 5마리로부터 간을 적출하고, homogenization 시킨 뒤, buffer B(250 mM sucrose, 1mM EGTA, 5 mM Hepes)로 희석시켜 1000 ml이 되도록 하였다. 이중 2 ml는 단백질량과 효소정량을 위하여 남겨두고, 나머지는 4500 rpm에서 15분간(JA-14 rotor) 냉각원심하였다. 형성된 pellet과 fluffy layer를 buffer B 500 ml에 현탁시킨 후 percoll 67.3 ml를 가하여 잘 섞어 19000 rpm에서 60분간(JA-20 rotor, Beckman) 냉각원심하였다. 상층의 바로 아래층(흰색층)을 파스테르 피펫으로 조심스럽게 취한 뒤 buffer C(250 mM sucrose, 50 mM Tris) 500 ml에 희석시키고 9000 rpm에서 10분간(JA-14 rotor) 냉각원심하였다. 형성된 pellet을 다시 400 ml buffer C에 현탁시켜 38% sucrose로 42000 rpm에서 70분간(70 Ti rotor) 초원심하였다. 형성된 계면의 흰색층을 파스테르 피펫으로 취한 뒤 29000 rpm에서 30분간(70Ti rotor) 초원심하였다. 다시 형성된 pellet을 buffer C로 현탁시켜, 38% 8 ml, 34% 5 ml, 31% 5 ml의 sucrose 층에 7 ml씩 loading하고, 42000 rpm에서 3.5 시간(70 Ti rotor) 초원심하였다. 형성된 윗층(모세담관막 소포, cLPM)과 아래층(유동층막 소포, bLPM)을 분취하여, 각각을 29000 rpm에서 30분간(70 Ti rotor) 초원심하였다. 다시 형성된 윗층 pellet을 소량의 buffer A에 현탁시켜, 실험전까지 $-70^{\circ}C$ 에서 보관하였다.

모세담관막 소포의 평가

1) 단백질량

간 homogenates와 모세담관막 소포 중의 단백질량을 protein assay kit(Sigma, St. Louis, MO)을 사용하여 Lowry 법에 따라 정량하였다.⁴⁾ 이때 단백질의 standard로는 bovine serum albumin을 사용하였다.

2) 효소정량

I 법과 II 법에 의해 제조한 모세담관막 소포의 순도를 알아보기 위하여 Pakarthy 등의 방법에 따라 모세담관막의 marker enzyme인 alkaline phosphatase(ALP)의 활성을 측정하였다.⁵⁾ 이 때 ALP의 기질로는 p-nitrophenol phosphate를 사용하였다.

I 법과 II 법에 의해 제조한 모세담관막 소포의 inside out configuration을 측정하기 위하여 Warren의 방법에 따라 sialic acid의 양을 측정하였다.⁶⁾

3) 모세담관막 소포로의 수송실험

모든 수송실험은 '신속 여과 기술'(Rapid filtration technique)을 이용하여 수행하였다.⁷⁾ $-70^{\circ}C$ 에서 보관한 모세담관막 소포를 $37^{\circ}C$ 수욕상에서 재빨리 녹인 후 1~1.5 mg/g liver의 단백질농도가 되도록 buffer A를 사용하여 희석시켰다. 이 희석액 20 μ l를 $37^{\circ}C$ 에서 4분간 incubation 시킨 뒤, 1 μ M 3H -taurocholate(0.30 μ Ci) 또는 5 μ M 3H -TBuMA(0.080 μ Ci)가 포함된 incubation buffer(시약항 참조) 80 μ l를 가하고 재빨리 vortexing하여 정해진 시간동안 incubation 시켰다. Incubation 개시 후 일정 시간이 지난 후, ice cold stop solution(시약항 참조) 4 ml를 가하여 반응을 종결시키고, ice cold stop solution에 미리 적셔둔 0.45 μ m MF-MEMB 25 mm filter(Seoul Science, Seoul)를 써서 재빨리 여과시켰다. 여과 후 4 ml ice cold stop solution으로 두 번 씻은 다음 필터를 떼어내 바이알에 넣은 후, 4 ml의 scintillation cocktail(Ultima gold, Packard, Turku)을 가하여 잘 혼합하여 Wallac 1409 liquid scintillation counter를 이용하여, 이 액 중의 방사활성을 측정하였다. ATP를 구동력으로 한 TBuMA uptake의 농도의존성을 실험하기 위하여서는 0.01~1 mM의 3H -TBuMA 80 μ l(0.16 μ Ci)를 모세담관막 소포계에 가하여 동일한 uptake실험을 하였다.

Data 분석

단백질량과 효소정량은 Student's t-test를 통하여 유의성을 검정하였고, 모세담관막 소포로의 uptake 실험은 two-way ANOVA를 사용하여 유의성을 검정하였다. $P < 0.05$ 인 경우에만 통계적으로 유의적인 것으로 판정하였다.

TBuMA의 uptake 실험에 있어서 얻어진 데이터는 다음

식에 fitting하여 kinetic parameter를 구하였다.

$$V = \frac{V_{max} \cdot S}{K_m + S} + K_d \cdot S \quad (1)$$

V : substrate uptake velocity

S : substrate concentration

K_d: passive diffusion constant

결과 및 고찰

모세담관막 소포 중의 단백질 농도 및 효소 활성

모세담관막 소포중 단백질 수득률은 I 법(Inoue 법)의 경우 0.14±0.031 mg/g liver이고 II 법(Meier 법)의 경우 0.15±0.050 mg/g liver로 두 방법간에 차이가 없었다(Table I). 이는 문헌에 보고된 값^{1,2)}(0.12 mg/g liver)에 비하여 양호한 단백질수득률이었다.

Alkaline phosphatase(ALP)는 모세담관막에만 존재하는 marker enzyme이다.^{1,2)} 모세담관막 소포중의 ALP 활성이 간 homogenate중 ALP 활성에 비하여 50배 이상 증가했다면, 제조된 모세담관막 소포는 다른 부분의 오염없이 모세담관막이 고농도로 농축되었음을 나타낸다.⁵⁾ I 법과 II 법에 의하여 제조된 모세담관막 소포 중의 효소활성은 각각의 간 homogenate에 비하여 52배 및 80배 증가하였다. 즉 I 법이나 II 법으로 순도 높은 모세담관막 소포를 제조할 수 있음을 알았다. 그러나, II 법에 의하여 제조된 모세담관막 소포 중의 ALP 활성 (3.52 mmol/mg/hr)이 I 법에 의하여 제조된 소포중의 ALP 활성 (2.28 mmol/mg/hr)보다 높았다 (p<0.05)(Table I). 따라서 순도가 높은 모세담관막 소포를 제조하기 위해서는 II 법이 더 유리한 것으로 생각되었다. 이는 II 법의 경우 sucrose gradient를 이용하여 막을 분리

Table I—Protein Content and Alkaline Phosphatase (ALP) Activity in cLPM Prepared by Methods of Inoue (Method I) and Meier (Method II)^a

		Method I (Inoue method)	Method II (Meier method)
Protein yield (mg/g liver)	homogenates	180 ± 23.2	180 ± 23.2
	cLPM	0.14 ± 0.031	0.15 ± 0.050
ALP activity (mmol/mg/hr)	homogenates	0.044 ± 0.012	0.044 ± 0.012
	cLPM	2.28 ± 0.94	3.52 ± 0.91*
	enrichment	52	80
Inside-out(%)	cLPM	30	33

a : Each data point is expressed as means ± S.D.

* : P<0.05 from Studnets t-test

하는 과정을 2 회 반복하는 등 정제 과정이 많았기 때문이라 생각된다.

세포막의 바깥 부분에만 존재하는 sialic acid의 양을 측정하면 모세담관막 소포의 inside-out configuration의 비율을 알 수 있다.⁶⁾ I 법과 II 법에 의하여 제조된 모세담관막 소포의 inside-out configuration의 비율은 각각 30%와 33%이었다. ATP를 구동력으로 하는 일차성 능동수송계의 경우 ATP binding site가 세포막의 안쪽에 존재하므로 inside-out configuration의 모세담관막 소포에서만 능동수송된다. 그러므로 가능한 한 inside-out configuration의 비율이 높은 모세담관막 소포를 얻는 것이 중요하다.

모세담관막 소포로의 수송 실험

1) Taurocholate uptake

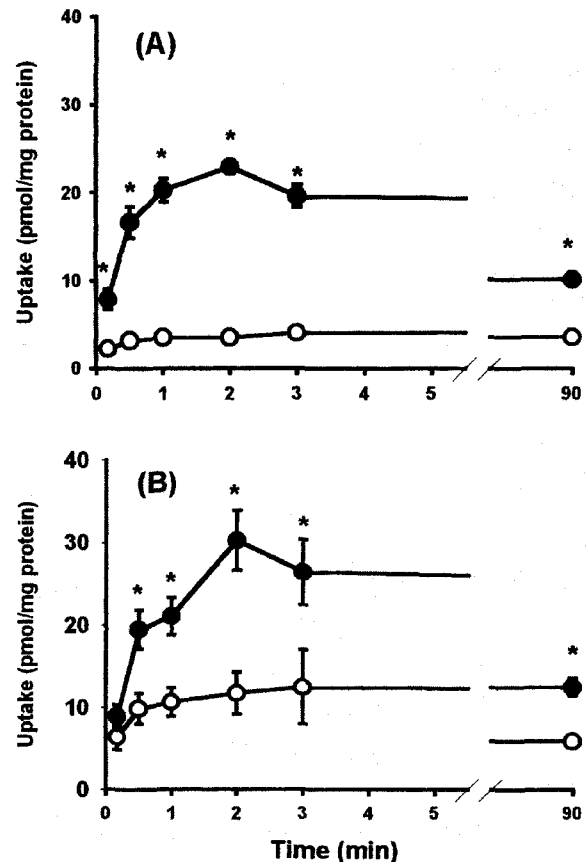


Figure 1—Uptake of 1 μM ³H-taurocholate into cLPM in the presence (●) and absence (○) of 1.2 mM ATP and an ATP regenerating system (3 mM phosphocreatine and 3.6 μg/100 μl creatine phosphokinase). (A) ; cLPM from Inoue method (Method I; N₂ Cavitation and Ca²⁺ Precipitation method), (B) ; cLPM from Meier method (Method II). Each data point is expressed as means ± S.D. of triplicate measurements for three different vesicle preparations. * : p<0.05 from two-way ANOVA.

Taurocholate는 담즙산의 주요 성분으로 생체내 pH에서 99%이상이 이온형으로 존재하기 때문에 주로 ATP 의존적 능동수송에 의해 모세담관막을 통과하여 담즙 중으로 배설되는 물질이다(이온형의 수동확산은 거의 없음).⁸⁾ 1 μM 의 ^3H -taurocholate를 사용하여 uptake를 경시적으로 측정하였을 때, I 법 및 II 법으로 제조한 모세담관막 소포는 모두 ATP 존재시의 uptake-시간 profile이 ATP 의존적 uptake에 전형적인 overshoot을 보였으며, ATP 존재시의 uptake가 ATP 비존재시의 uptake에 비해 약 5배정도 증가하였다(Figure 1). 이로부터 I 법과 II 법에 의하여 제조된 모세담관막 소포는 모두 ATP 의존적 능동수송에 의해 taurocholate를 수송하는 수송담체(Bile acid transporter)를 가지고 있음을 확인할 수 있었다. Uptake profile에서 overshoot의 높이는 II 법(Figure 1-B)이 I 법(Figure 1-A)보다 다소 높았다. 모세담관막 소포내로의 uptake에 있어서 ATP의존적 uptake는 inside-out configuration의 수송담체에 의해서만 uptake되므로,^{9,10)} II 법에 따라 만든 모세담관막 소포로의 uptake가 높다는 것은 II 법으로 만든 소포가 inside-out configuration의 수송담체의 비율이 높다는 것을 의미한다. 그러나 II법에서의 overshoot 높이가 정말로 높은지 여부는 taurocholate의 농도를 높여가면서 uptake 실험을 하여 그 결과로부터 V_{max} 나 K_m 등을 구하여 해석해야 할 것으로 생각된다.

한편 ATP 비존재시의 taurocholate uptake 역시 II 법에 따른 모세담관막 소포가 높았다(Figure 1-B). ATP 비존재시의 taurocholate의 uptake는 수동확산을 의미하며 모세담관막 소포가 leaky할수록 수동확산에 의한 uptake 양이 높기 때문에, II 법으로 만든 모세담관막 소포가 I 법으로 만든 모세담관막 소포보다 더 leaky하다고 생각할 수 있다.

2) TBuMA uptake

TBuMA는 투여량의 약 40%가 담즙 중으로 배설되는 유기 양이온으로 체내에서 대사되지 않고 단백질과 결합하지 않기 때문에 유기양이온의 모세담관막 투과과정을 연구하기에 좋은 모델화합물이다.^{3,11,12)} Voltage-clamped 조건(K^+ ionophore인 valinomycin을 5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein 농도로 전처리하여 소포막 내외의 $\text{K}^+_{\text{in}}=\text{K}^+_{\text{out}}$ 되게 한 조건)하에서 소포 내외에 pH gradient(pH 5.9 in/pH 7.9 out)를 주고 5 μM ^3H -TBuMA의 소포내 uptake를 측정하였을 때, 그 uptake 값은 pH gradient가 없을 때(pH 5.9 in/pH 7.9 out)의 uptake 값보다 높았으며, I 법과 II 법에 의해 제조한 소포에 관계없이 동일하였다(Figure 2-A, B). 이로부터 이 소포에는 이 pH gradient를 구동력으로 하여 TBuMA를 능동수송하는 H^+/TBuMA 대향수송담체(proton/organic cation exchanger)가 존재함을 추정할 수 있었다. 이 수송계는 2차성 능동 수송계

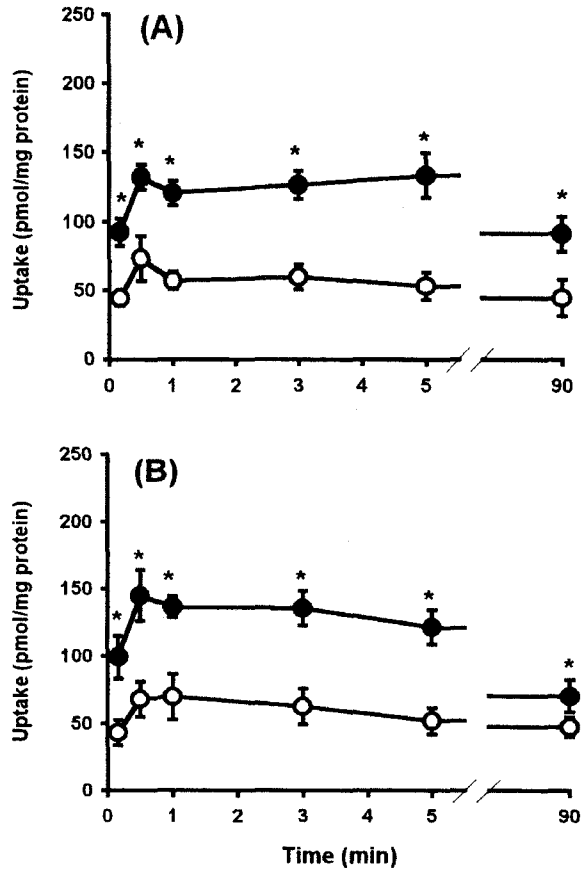


Figure 2—Uptake of 5 μM ^3H -TBuMA into cLPM in the presence (●) and absence (○) of an outwardly directed pH gradient. Membrane vesicles were treated with valinomycin (5 mg/mg protein) for 10 min at 37°C. (A) ; Inoue method, (B) ; Meier method. Each data point is expressed as means \pm S.D. of triplicate measurements for three different vesicle preparations. *: $p < 0.05$ from two-way ANOVA.

로 bile acid transporter에 의해 능동수송된 담즙산들에 의해 간세포내와 담관내의 pH가 다르게 되고 이 pH 차이를 구동력으로 유기 양이온들이 능동 수송된다.

이 수송계는 막 안쪽과 바깥쪽의 방향성이 없어 trans-stimulation 현상을 보이는 수송계(symmetric transporter)이므로¹¹⁾ 제조된 소포의 inside-out configuration에 관계없이 두 모세담관막 소포에서 비슷한 uptake를 보이는 것으로 사료되었다.

문헌에 보고된 생체내 pH값에 의하면 간세포 안쪽의 pH는 7.0 이고, 담관쪽의 pH는 7.25 이므로¹³⁾ H^+/TBuMA 대향수송계는 간세포에서 담관쪽으로의 excretion에 관여하기보다는 담관에서 간세포내로의 reabsorption에 관여한다고 볼 수 있을 것이다.

한편 5 μM ^3H -TBuMA는 ATP가 첨가되었을 때가 ATP가 첨가되지 않았을 때에 비하여 유의성 있게 증가하였고¹²⁾ (Figure 3), 이러한 현상은 I 법에 의하여 제조된 모세담관막 소포(Figure 3-A)에 비하여 II 법의 모세담관막 소포(Figure

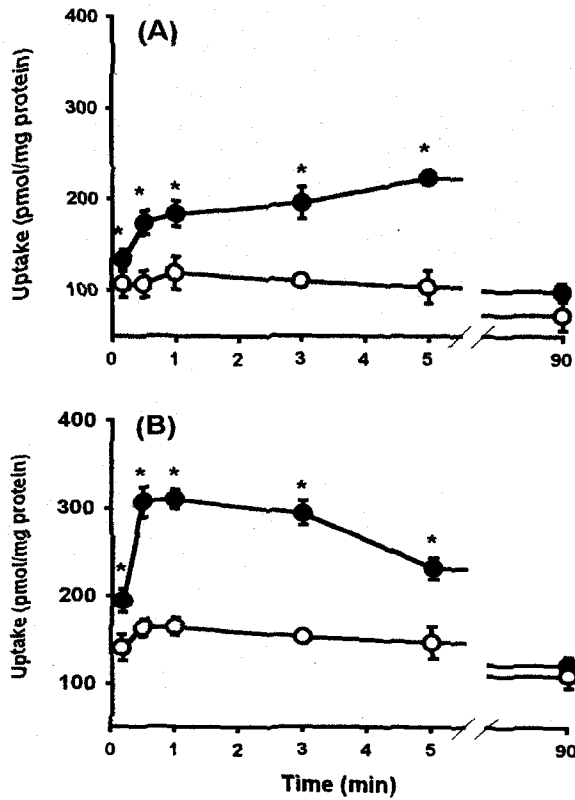


Figure 3—Uptake of 5 μM ³H-TBuMA into cLPM in the presence (●) and absence (○) of 1.2 mM ATP and an ATP regenerating system (3 mM phosphocreatine and 3.6 μg/100 μl creatine phosphokinase). (A); Inoue method (B); Meier method. Each data point is expressed as means ± S.D. of triplicate measurements for three different vesicle preparations. * : p<0.05 from two-way ANOVA.

3-B)에서 현저하였다. 이 수송계는 간 모세담관막에 존재하는 P-glycoprotein과 연관이 있는 것으로 보고되었다.¹²⁾ 이는 Figure 1에서 taurocholate의 ATP 의존성 uptake 실험에서 관찰된 결과와 일치하였다. ATP가 첨가되지 않았을 때의 TBuMA uptake 값이 II 법에서 더 높은 것으로부터 taurocholate의 경우와 마찬가지로의 결론을 얻을 수 있었으며, 같은 약물에 대해 overshoot이 나타나는 시간이 짧은 것도 II 법에 의한 모세담관막 소포가 더 leaky하다고 생각할 수 있는 증거가 된다.

Figure 4는 uptake 실험 초기 30초 동안(TBuMA의 모세담관막 소포내로의 uptake가 직선적으로 증가하는 시간)에 모세담관막 소포내로 uptake되는 TBuMA 양을 농도에 따라 플롯한 그림이다. 그림에서 위의 점선은 겉보기 uptake를, 아래 점선은 ATP 비존재하에서의 uptake(즉 수동확산에 의한 uptake)를 나타내며, 그 점선 값의 차이(즉 그림에서 실선)는 ATP 의존적 TBuMA uptake를 나타낸다. Figure 4로부터 ATP의존적 uptake는 TBuMA의 농도가 증가함에 따라 포화됨

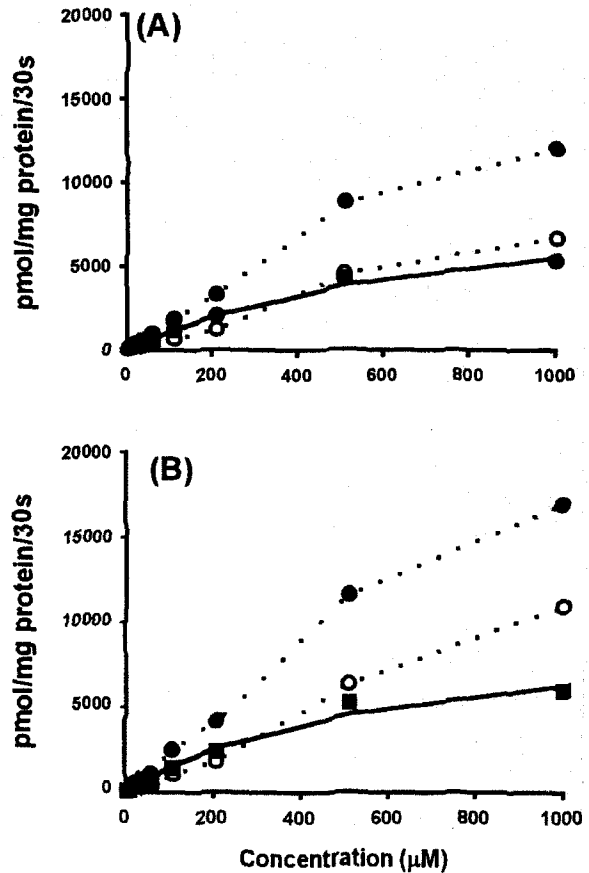


Figure 4—Substrate concentration (0.005-1 mM) dependency of TBuMA uptake into cLPM in the presence (●) and absence (○) of 1.2 mM ATP and an ATP regenerating system (3 mM phosphocreatine and 3.6 μg/100 μl creatine phosphokinase). (A); Inoue method, (B); Meier method. ATP-related carrier mediated uptake (■) was estimated by subtracting TBuMA uptake in the absence of ATP (○) from that in the presence of ATP (●). Each data point is expressed as means ± S.D. of triplicate measurements for three different vesicle preparations.

을 알았다.¹²⁾ 그림에서 겉보기 uptake 값과 그때의 TBuMA 농도를 (1)식에 fitting하여 속도 파라미터를 구하여 Table II에 정리하였다. 이로부터 I 법 소포(Figure 4-A)와 II 법 소포는 ATP 의존적 uptake 특성에는 차이가 없으나 ATP 비 의존적 uptake(즉 수동확산에 의한 uptake) 특성은 II 법 소포(0.00052 μl/mg protein/min)가 I 법 소포(0.00030 μl/mg protein/min)보다 다소 높았다. 이로부터 taurocholate 실험에서의 마찬가지로 II 법 소포가 I 법 소포보다 leaky한 것으로 생각되었다.

결론

I 법(Inoue 법)은 실험과정이 비교적 간단하고 시간이 적

Table II— Kinetic Parameters of ATP Dependent TBuMA Uptake into cLPM

Parameters	Method I (Inoue method)	Method II (Meier method)
V_{max} (nmol/mg protein/30 sec)	9.72	10.1
K_m (mM)	0.63	0.70
K (μ /mg protein/min)	0.0030	0.0052

For meaning of each parameter, see Equation 1.

게 소요되는(약 8 hr 소요) 반면, II 법(Meier 법)은 실험과정이 복잡하고 시간이 많이 소요되는(약 23 hr 소요) 모세담관막 소포 제조방법이다. I 법은 II 법에 비해 정제과정이 적어 II법에 비하여 순도가 낮다(Table I의 ALP 활성).

Sialic acid 정량으로부터 측정한 inside-out configuration의 비율은 I 법 소포보다 II 법 소포가 약간 높다(Table I의 inside-out configuration). 이 결과는 ATP 존재하 taurocholate와 TBuMA의 uptake가 II 법 소포에서 I 법 소포보다 높은 것(Figure 1, Figure 4)과 일치하는 결과이다. Table II에서 TBuMA의 ATP 의존적 수송담체의 속도론적 파라미터 중 V_{max} 의 값도 이를 반영하고 있다.

한편 taurocholate(Figure 1)와 TBuMA uptake(Figure 2, 3 및 Table II의 K_d 값)에 있어서 ATP 비의존적인 uptake(즉 수동확산에 의한 uptake)는 II 법 소포가 I 법 소포보다 컸다. 이는 II 법 소포가 I 법 소포보다 leaky하다는 것을 시사하는 것이다.

이상과 같이 모세담관막 소포의 제조방법에 따라 약물의 uptake 특성에 다소 차이를 보였다. 이러한 점과 소포를 제조하는데 걸리는 시간 및 순도가 제법에 따라 크게 다르다는 점을 함께 고려하여 실험 목적에 부합하는 제조 방법을 선택하여야 할 것이다. 즉, 약물 수송담체가 asymmetric하여 약물 binding site나 driving force 발현 장소가 막의 한쪽에만 존재한다면 inside-out configuration의 비율이 높은 모세담관막 소포 제조 방법을 선택해야 할 것이고, 약물이 lipophilic하여 passive diffusion이 많은 약물의 능동 수송과 driving force를 실험하고자 한다면 leakage가 낮은 모세담관막 소포 제조 방법을 선택해야 할 것이다.

감사의 말씀

본 연구는 보건복지부의 보건의료기술연구 개발사업(HMP-96-D-2-1035) 연구비와 서울대학교 약학대학부속 종합약학연구소의 지원으로 수행되었으며 지원에 감사를 드립니다.

문 헌

- 1) M. Inoue, R. Kinne, T. Tran, L. Biempica and I.M. Arias, Rat liver canalicular membrane vesicles, Isolation and topological characterization, *J. Biol. Chem.*, **258**, 5183-5188 (1983).
- 2) P.J. Meier, E.S. Sztul, A. Reuben and J.L. Boyer, Structural and functional polarity of canalicular and basolateral plasma membrane vesicles isolated in high yield from rat liver, *J. Cell. Biol.*, **98**, 991-1000 (1984).
- 3) C. Neef, K.T.P. Keulemans and D.K.F. Meijer, Hepatic uptake and biliary excretion of organic cations-1 : Characterization of three new model compounds, *Biochem. Pharmacol.*, **33**, 3977-3990 (1984).
- 4) O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 5) J.M. Pakarthy, J. Short, A.I. Lansing and I. Liegerman, Function and control of liver alkaline phosphatase, *J. Biol. Chem.*, **247**, 1767-1774 (1972).
- 6) L. Warren, The thiobarbituric acid assay of sialic acids, *J. Biol. Chem.*, **234**, 1971-1975 (1959).
- 7) B.L. Blitzer and C.B. Donovan, A new method for the rapid isolation of basolateral plasma membrane vesicles from rat liver : Characterization, validation and bile acid transport studies, *J. Biol. Chem.*, **259**, 9295-9301 (1984).
- 8) M. Neghab, H. Handman, R.J. Edwards and N.H. Stacey, Inhibition by trichloroethylene and 1,1,2-trichloro-1,2,2-trifluoroethane of taurocholate uptake into basolateral rat liver plasma membrane vesicles, *Toxic. in Vitro*, **10**, 665-674 (1996).
- 9) T. Nishida, Z. Gatmaitan, M. Che and I.M. Arias, Rat liver canalicular membrane vesicles contain an ATP-dependent bile acid transport system, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **88**, 6590-6594 (1991).
- 10) P.J. Meier, A.S. Meier-Abt, C. Barrett and J.L. Boyer, Mechanisms of taurocholate transport in canalicular and basolateral rat liver plasma membrane vesicles : Evidence for an electrogenic canalicular organic anion carrier, *J. Biol. Chem.*, **259**, 10614-10622 (1984).
- 11) R.H. Moseley, H. Smit, B.G.H. Van Solkema, W. Wang and D.K.F. Meijer, Mechanisms for the hepatic uptake and biliary excretion of tributyl methyl ammonium : Studies with rat liver plasma membrane vesicles, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **276**, 561-567 (1996).
- 12) I.S. Song, S.J. Chung and C.K. Shim, Different activity of ATP dependent transport across the canalicular membrane for tributyl methyl ammonium and triethyl methyl ammonium as a potential mechanism of the preferential biliary excretion, *Pharm. Res.*, **16**, 540-544 (1999).
- 13) J.L. Boyer, A. Gautam and J. Graf, Mechanisms of bile secretion : Insights from the isolated rat hepatocyte couplet, *Semin. liver Dis.*, **8**, 308-316 (1988).