

Rat의 intestine 각 부위에 수술적으로 투여 된 insulin 제제에 의한 혈당 변화

김남중*, 김명철¹

LGCI 생명과학기술연구원 동물의학연구소*, 충남대학교 수의과대학¹
(게재승인 : 2002년 5월 28일)

Blood glucose change after surgical administration of insulin formula into rat intestinal regions

Nam Joong Kim* and Myung-Cheol Kim¹

*LGCI Life Science R&D, Animal Health Research

¹College of Veterinary Medicine, Chungnam National University

(Accepted : May 28, 2002)

Abstract : The present study was carried out to examine the effect of insulin formula on blood glucose change in normal Sprague-Dawley male rats. Also, this study was performed to investigate the feasibility of oral insulin formula development. To administrate the insulin formula into intestine, the surgical technique, celiotomy, was performed in rats. Insulin formula was administrated at a dose of 24.5 IU/kg via duodenum, ileum, and colon of the rats, and the blood glucose level was measured. For the comparison, the vehicle without insulin was administrated into ileum via celiotomy. Also, this insulin formula was administrated into rats orally using sonde and the same parameter was measured. The bloods of all groups were collected from tail veins using syringes at given time interval. Orally administrated group did not show the change of blood glucose level and control group slightly show the change of blood glucose level at 1 hour after celiotomy. All intestinally administrated groups showed the change of blood glucose level. Among the tested groups, ileac administration group and colonic administration group showed the significant change of blood glucose level. Particularly, ileac administration group showed the lowest blood glucose level. To calculate the bioavailability of intestinal and oral administration, insulin solution was injected subcutaneously, common insulin injection route, into another normal rats. The bioavailability of ileac group was 8.3% when compared with subcutaneous injection, duodenal group was 1.8%, colonic group was 4.2%, and oral group was 0.2%, respectively.

Key words : insulin, blood glucose, intestinal absorption, celiotomy

서 론

약물의 많은 종류의 것들은 위장관에서 적절히 흡수 되지 못하므로 주사 등의 비경구적인 방법에 의해 투여 되고 있다. 특히 단백질 약물들은 위장관에서 쉽게 분해 될 뿐만 아니라 장점막을 통과하지 못하기 때문에 임상

적으로는 주로 근육이나 피하 주사로 활용되고 있다. 그 중에 대표적인 약물로서는 오래 전부터 당뇨병 치료제로 사용되고 있는 insulin으로서 주로 피하 주사로 투여 되고 있다^{2,3}. 그러나 insulin과 같은 약물은 빈번하게 주사로 투여하여야 하므로 통증을 수반할 뿐만 아니라 상당한 번거로움이 따른다. 그러므로 insulin을 포함한

* Correspond author : Dr. Nam Joong Kim, Phone : +82-42-866-2268, Fax : +82-42-861-2566 (E-mail : njkimb@lgci.co.kr)

단백질 약물들의 단점을 보완할 수 있는 주사 이외의 다른 투여 방법들이 활발하게 연구가 진행되고 있다^{4,5}. 그럼에도 불구하고 현재까지 대부분의 연구에서는 단백질 약물의 생체 이용률 (bioavailability)이 매우 낮게 나타나고 있는 실정이다⁶. 본 연구에서는 당뇨병 치료제로 활용되고 있는 insulin을 적절한 부형제들을 사용하여 intestine에서 쉽게 흡수될 수 있도록 제조하여, 경구 투여와 intestine의 각 부위에 개복술을 통해 insulin 제제를 투여하여 혈당 변화를 측정하므로 위장관 내 투여된 insulin의 효과를 조사하였으며, insulin의 주 투여 경로인 피하 주사 대비 생체 이용률을 구하였다.

재료 및 방법

공시 동물

시험 동물로서 Sprague-Dawley 수컷 rat들을 사용하였다. 시험을 시작하기 전 24시간 동안 물만은 자유로이 먹도록 하고 사료는 주지 않았다. 시험에 사용하고자 하는 rat들보다 많은 수의 rat들을 준비하여 몸무게가 180-250g의 범위에 들고 초기의 혈액 중 당 농도가 정상적인 범위에 드는 것만 골라서 시험에 사용하였다. 30마리의 rat들은 insulin의 피하 투여에 대비한 생체 이용률을 구하고자 투여 용량에 따라 6개의 시험군으로 5마리씩 무작위로 나누어 하나의 시험군으로 실험하였다. 또한 20마리의 rat들은 5마리씩 무작위로 나누어 oral 및 수술적 투여 방법을 사용하여 intestine 각 부위에 insulin 제제를 투여하였으며, 5마리 rat들은 insulin이 포함되지 않은 제제 비히클을 수술적 방법으로 intestine에 투여하므로 수술에 의한 혈당 변화를 비교하기 위한 대조군으로 사용하였다.

Insulin 제제 제조

Tocopherol acetate와 polyoxyethylene-20-cethyl ether를 유리 용기에 넣고 온도를 60°C까지 천천히 상승시키면서 혼합하였다. 이 혼합물의 온도를 실온으로 내리고, 결정성 Zn-insulin (24.5 IU/mg, Sigma)을 49 IU/g이 되도록 첨가하여 얼음이 함유된 수욕 중에서 강력한 힘을 가진 교반기로 고르게 분산시켜 insulin 제제를 제조하였다.

피하 투여 및 혈액 채취 방법

Oral 및 intestine 투여에 의한 insulin의 생체 이용률을 구하기 위해 다음과 같은 방법으로 실험하였다. Zn-insulin을 주사용 증류수 5ml에 각각 0, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 IU의 농도로 제조하였으며, 이렇게 제조된 각 농도의 insulin 주사액을 5 마리 rat들의 피하에 체중 kg 당 0,

0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 IU이 되도록 주사하였다. 투여가 끝난 rat들은 자유로이 활동할 수 있도록 고안된 철망 케이지에 넣어 두었으며, 물은 자유로이 먹도록 하였다. 투여 후 4시간까지 매시간 마다 heparin 처리된 1ml 주사기를 사용하여 tail vein에서 대략 100l의 혈액을 채취하였으며, 원심 분리하여 20l의 plasma로 glucose oxidase method를 사용하여 혈액 중의 glucose 농도를 측정하였다.

Oral 투여 및 intestine 투여

Ether 마취 하에서 rat들의 복부 중앙선을 절개하여 intestine을 꺼낸 다음, 한 군은 위의 바로 아래 duodenum 부위에 (duodenum 투여군), 한 군은 cecum의 10cm 위 쪽의 ileum 부위에 (ileum 투여군), 그리고 다른 한 군은 cecum의 5cm 아래 쪽의 colon 부위에 (colon 투여군), 18G 바늘이 달린 주사기를 통하여 insulin 제제를 0.5 g/kg (insulin 24.5 IU/kg)을 투여하였다. 또한 insulin이 포함되어 있지 않은 vehicle을 ileum 부위에 투여하였다(대조군). 투여 부위는 의과용 접착제를 사용하여 투여액이 새어 나오지 않도록 한 후 복부 근육 및 피부를 interrupted suture 방법으로 폐쇄하였다. 그리고 나머지 한 군은 rat 경구용 존데를 통해 같은 양의 insulin 제제를 경구 투여 하였다(oral 투여군). 수술 및 경구 투여가 끝난 rat들은 위와 같은 방법으로 관리하였으며, 또한 같은 방법으로 혈액을 채취하여 분석하였다.

통계 처리

대조군과 각각의 투여군의 결과들은 평균치와 표준편차로 표기 (mean SD) 하고, 통계 처리는 ANOVA (분산 분석)을 시행하였으며, 유의성이 인정된 경우에 유의수준을 0.05로 채택하여 Duncan's multiple range test를 실시하여 확인하였다.

결 과

Insulin의 피하 투여에 의한 초기 혈당 농도에 대한 백분율과 시간 그래프를 Fig 1에 나타내었다. 투여량과 혈당 농도의 상관 관계를 구하기 위해 log[투여량]과 Fig 1에서 area under curve (AUC)와의 관계를 Fig 2에 나타내었으며, 이로부터 다음 식으로 표시되는 상관 관계를 구하였다.

$$\text{Log[투여량]} = 0.004669(\text{AUC}) - 1.035 \quad (r = 0.9986)$$

여기서, AUC는 초기 혈당 농도에 대한 백분율과 시간 그래프 (Fig 1)에서 곡선과 X=100%인 직선 사이의

Table 1. Blood glucose changes after administration of insulin formula at intestine regions in rats (mean S.D.)

Time(hrs)	Control	Oral	Duodenum	Ileum	Colon
0	104.4 ± 2.5 ^{a, c}	104.9 ± 3.2 ^{a, c}	101.5 ± 3.2 ^{a, c}	97.6 ± 2.9 ^{a, c}	98.7 ± 3.4 ^{a, c}
1	123.3 ± 8.1 ^{b, c}	100.0 ± 10.5 ^{a, d}	99.8 ± 11.5 ^{a, d}	47.3 ± 7.5 ^{b, d}	67.4 ± 10.0 ^{b, d}
2	101.4 ± 8.0 ^{a, c}	104.8 ± 4.4 ^{a, c}	79.7 ± 8.8 ^{b, d}	16.3 ± 4.7 ^{b, d}	58.2 ± 9.9 ^{b, d}
3	108.9 ± 6.3 ^{a, c}	106.1 ± 1.4 ^{a, c}	78.0 ± 4.9 ^{b, d}	35.3 ± 10.1 ^{b, d}	64.4 ± 7.4 ^{b, d}
4	106.2 ± 2.1 ^{a, c}	103.9 ± 4.1 ^{a, c}	94.9 ± 3.1 ^{b, d}	40.2 ± 9.6 ^{b, d}	76.7 ± 7.6 ^{b, d}

^{a, b} Means with different superscripts in the same vertical line differ significantly ($p < 0.05$) and ^{c, d} means with different superscripts in the same row line differ significantly ($p < 0.05$).

Table 2. Bioavailability after administration of insulin formula of intestine regions compare with subcutaneous injection

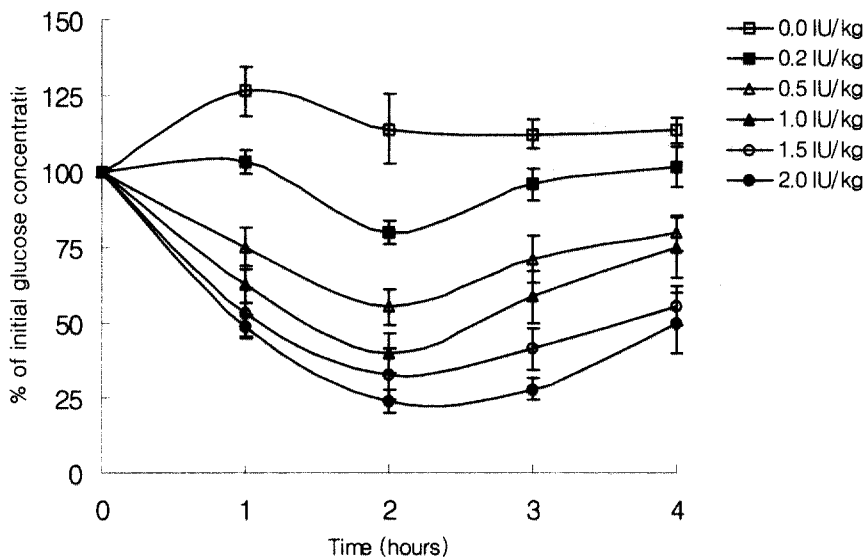
	Control	Oral	Duodenum	Ileum	Colon
Bioavailability (%)	0	0.2	1.8	8.3	4.2

면적을 말한다.

수술적 방법을 통해 rat들의 각 intestine 부위에 투여 된 insulin 제제의 혈당 변화는 Table 1에 나타내었다. Table 1에서 나타났듯이, 대체로 insulin 제제를 intestine 부위에 투여한 경우 투여 후 1시간부터 혈당 감소가 나타나 투여 후 2-3시간째에 가장 낮은 혈당 농도를 나타내었다. 특히 ileum 부위와 colon 부위에 insulin이 투여된 경우에 2시간째에 혈당 농도의 변화가 초기 혈당 농도에 비해 가장 낮게 나타났으며, 각각 83.7%와 41.8%가 감소하였다. 이에 반해 duodenum 부위는 투여 후 3시간

대에 가장 낮은 혈당 변화를 나타냈지만, 초기 혈당 농도에 비해 22.0%가 감소하였다. 또한 경구로 투여 된 insulin 제제는 혈당 변화가 나타나지 않았으며, vehicle을 투여한 대조군에서는 수술 직후 스트레스에 의한 혈당 상승이 나타났으나, 수술 2시간 이후에는 초기 혈당 농도에 비해 혈당 농도의 변화가 없는 것으로 판단되었다.

Insulin의 피하 투여에 의해 구해진 방정식과 경구 및 intestine 투여에 의해 얻어진 혈당 변화의 결과를 이용하여 insulin의 생체 이용률을 구하였으며, 그 결과는 Table 2에 나타내었다. Insulin의 피하 투여에 대비 생체

**Fig 1.** Changes in blood glucose concentration after insulin solution injection into subcutis of rats.

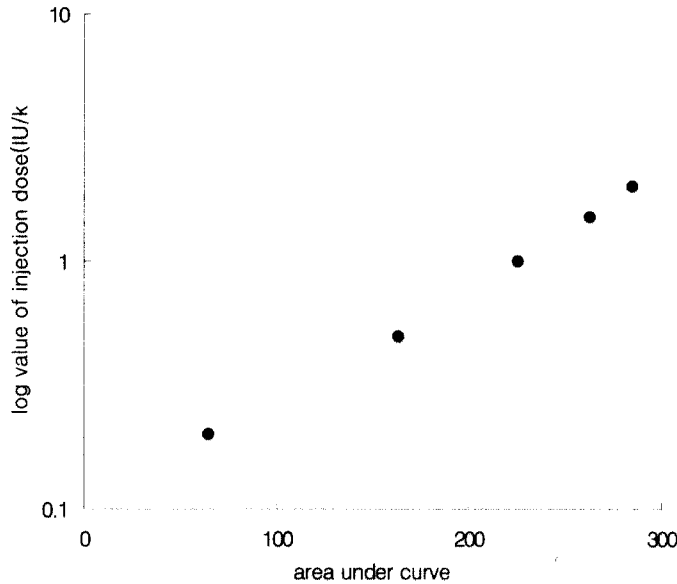


Fig 2. Regression line and equation of administration dose and area under curve after subcutaneous injection.

이용률은 각각 경구 투여 0.2%, duodenum 1.8%, ileum 8.3%, colon 4.2%로 ileum 부위의 생체 이용률이 가장 우수하였다.

고 찰

오늘날에는 당뇨병을 치료하기 위한 시도들은 insulin을 주사하는 방법 외에도 pancreas의 β -cell을 수술적으로 이식하는 방법 등, 여러 관점에서 매우 폭넓게 진행되고 있다⁷. 그 중에 한 가지 관점으로는 insulin을 주사 이외의 보다 편리한 투여 방법으로 적용하려는 연구들이 꾸준히 진행되어 왔다. Ishida *et al*⁸은 구강의 협착 점막을 통해 인슐린을 투여할 수 있다고 보고하였다. Hydroxypropylcellulose와 cabopol-934의 혼합물에 insulin, coconut butter 및 sodium cholic acid를 첨가하여 구강의 협착 점막에 점착 시킬 수 있도록 만들어 개에서 실험한 결과 인슐린이 구강의 협착 점막을 통과하여 흡수되기는 하였지만 근육 주사에 대비하여 0.5%라는 불량한 생체 이용률을 나타내었다. 또한, Longenecker *et al*⁹은 insulin을 비강에 투여하는 방법을 연구하였는데, 푸시딘 산 유도체를 흡수촉진제로 하여 양의 비강에 투여한 결과, 비교적 높은 생체 이용률을 나타내었다고 보고하였다. 그러나 비강 투여법은 편리한 투여 방법이 아닐 뿐만 아니라 비강 점막에 대한 자극이 심하기 때문에 장기적으로 투여할 때는 비강 점막이 손상을 입는 등 부작용이 생

길 우려가 있다. 또 다른 연구로서는 Galinsky⁹가 왁스 등의 물질에 식물성 오일을 첨가하여 계면 활성제와 insulin을 포함시켜 좌제를 제조하여 투여하여 5.1%의 비교적 높은 생체 이용률을 나타내었다고 보고하고 있다. 이러한 여러 연구들과는 달리 보편적이고 손쉬운 투여 방법인 경구 투여 방법을 연구한 여러 보고들도 있으나, 단백질 약물들은 경구 투여할 경우 위장 내의 단백질 분해 효소에 의해 쉽게 분해되므로 약리 활성을 상실하게 된다¹⁴. 이런 문제점을 해결하기 위해, Bai *et al*¹⁰은 polyacrylic polymer들을 사용하여 트립신과 키모트립신으로 대표되는 단백질 분해 효소로부터 위장 내 단백질 분해 작용을 어느 정도 방지하였다고 보고하였다. 또한 단백질 약물이 intestine으로 흡수되지 않는 또 다른 원인으로 단백질 분자 자체가 너무 거대하여 원형대로 장점막을 통과하지 못하는데 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여, Kidron *et al*¹¹과 Radwan¹²은 bile acid, bile salt, sodium cholate 등의 흡수 촉진제를 사용하여 insulin을 경구로 투여하였을 경우 혈당을 감소시켰다고 보고하고 있다. 그러므로 본 연구에서는 보편적이고 손쉬운 투여 방법인 경구 투여 방법을 목표로 연구하게 되었으며, 경구 투여 시 insulin의 target 흡수 부위를 선정하기 위해 수술적인 방법을 사용하여 intestine 각 부위의 insulin 흡수 정도를 조사하였다. 소량의 흡수 촉진제와 초산 토크페롤을 사용하여 insulin 제제를 제조하여 수술적 방법을 통해 intestine의 여러 부위로 직접

투여하였다. 이렇게 수술을 통해 intestine 내로 투여하는 방법은 비현실적으로 받아들여지지만, 최근에 drug delivery system의 발달로 원하는 intestine 부위에서 터질 수 있도록 고안된 장용성 capsule들이 보고되고 있다.^{13, 14} 그러므로 본 연구에서는 수술적 투여 방법으로 insulin 제제를 투여하여 intestine 각 부위의 흡수 차이를 구명 하므로써, 경구 투여용 insulin 제제의 개발 시 흡수 부위의 target 부위를 제공하고자 하였다. Fernandes-Moreno et al¹⁵은 intestine 각 부위의 상피 세포에서 insulin receptor가 차이가 있다고 발표하였으며, 본 연구의 결과에서도 intestine 각 부위 중 ileum 부위가 insulin의 흡수에 가장 효과적인 것으로 판단되었으며, colon 부위도 insulin의 흡수에 어느 정도 효과적인 것으로 판단되었다. 그러나 insulin의 주된 투여 경로인 피하 주사 대비 생체 이용률은 기존의 발표된 보고들보다는 다소 우수한 결과를 나타내었지만, 투여 방법 및 조건 등에서 차이가 있어 절대적인 비교 대상은 될 수 없는 것으로 판단되었다. 경구용 insulin 제제가 실용화 되려면 보다 많은 연구가 종합적으로 수행되어야 하지만, 우선적으로 선행되어야 할 두 가지 연구 과제로서는 첫째, 생체 이용률이 보다 더 향상된 insulin 제제의 개발 필요성이 제기되며, 둘째, 수술을 통하지 않고 ileum과 colon을 target 부위로 봉합 될 수 있는 장용성 capsule의 개발이 병용되어야 할 것으로 판단된다.

결 론

이 연구는 정상인 Sprague-Dawley 수컷 rat들의 intestine 각 부위에 수술적으로 insulin 제제를 투여하여 혈당 변화를 조사하므로써, 경구용 인슐린 제제의 개발 가능성을 조사하고자 수행하였다. 인슐린 제제를 intestine 내에 투여하기 위해 개복술을 수행하였으며, intestine의 duodenum, ileum, colon 부위에 24.5 IU/kg의 insulin 제제를 투여하여 혈당 변화를 조사하였다. 또한 같은 용량의 insulin 제제를 경구용 존데를 사용하여 경구로 투여하였다. 수술이 혈당의 변화에 영향을 미치는 지를 조사하기 위해 insulin이 포함되지 않은 vehicle을 개복술을 통해 ileum 부위에 투여되었다. 모든 군들은 미정맥에서 1시간 간격으로 혈액이 채취되었다. 경구로 투여된 군에서는 혈당 변화가 나타나지 않았으며, vehicle 투여군은 개복술이 수행된 1시간 후에 약간의 혈당 증가를 나타내었으나, 2시간 이후부터는 수술 전 혈당 수준을 유지하였다. Intestine에 투여 된 모든 군들에서는 혈당 변화를 나타내었지만, ileum 부위와 colon 부위에 투여 된 군들은 1시간 후부터 유의성 있는 혈당

변화를 나타내었다. 특히 ileum 부위에서 insulin의 흡수가 가장 효과적이었다. Intestine과 경구로 투여 된 insulin의 생체 이용률을 구하기 위해 또 다른 rat들에게 insulin의 주된 투여 경로인 피하 주사로 체중 kg당 0에서 2.0 IU까지 insulin 주사액을 투여하여, 투여량과 AUC의 상관 관계식을 구하였다. Ileum 부위 투여 군의 생체 이용률은 8.3% 이었으며, colon 부위 투여 군은 4.2%, duodenum 부위 투여 군은 1.8%, 경구 투여 군은 0.2%을 나타내었다.

참고문헌

1. Foster TP. Protein/peptide veterinary formulations. In: *Development and formulation of veterinary dosage forms*, 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 231-282, 1998.
2. Charman SA, McLennan DN, Edwards GA et al. Lymphatic absorption is a significant contributor to the subcutaneous bioavailability of insulin in a sheep model. *Pharm Res*, 18(11):1620-6, 2001.
3. Tokihiro K, Arima H, Tajiri S et al. Improvement of subcutaneous bioavailability of insulin by sulphobutyl ether beta-cyclodextrin in rats. *J Pharm Pharmacol*, 52(8):911-7, 2000.
4. Heinemann L, Pfutzner A, Heise T. Alternative routes of administration as an approach to improve insulin therapy: update on dermal, oral, nasal and pulmonary insulin delivery. *Curr Pharm Des*, 7(14):1327-51, 2001.
5. Wang H, Li Y, Sun Q et al. Oral administration of insulin to female nonobese diabetic mice inhibited diabetes and induced Fas ligand expression on islets of Langerhans. *Chin Med J (Engl)*, 113(5):433-436, 2000.
6. Ishida M, Machida Y, Nambu N et al. New mucosal dosage form of insulin. *Chem Pharm Bull*, 29:810-816, 1981.
7. Levitan DM. Transplantation for the treatment of diabetes mellitus. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)*, 12(4):268-273, 1997.
8. Longenecker JP, Moses AC, Flier JS et al. Effects of sodium taurodihydrofusidate on nasal absorption of insulin in sheep. *J Pharm Sci*, 76(5):351-355, 1987.
9. Galinsky AM. Composition and method for making a suppository for introducing a hypoglycemic agent into a mammal. *US Patent 4164573*, 1979.
10. Bai JP, Chang LL, Guo JH. Effects of polyacrylic

- polymers on the degradation of insulin and peptide drugs by chymotrypsin and trypsin. *J Pharm Pharmacol*, 48(1):17-21, 1996.
11. Kidron M, Ziv E, Bar-On H *et al.* Pharmaceutical compositions containing insulin. *US Patent 4579730*, 1986.
 12. Radwan MA. Enhancement of absorption of insulin-loaded polyisobutyrylcyanoacrylate nanospheres by sodium cholate after oral and subcutaneous administration in diabetic rats. *Drug Dev Ind Pharm*, 27(9):981-989, 2001.
 13. Murthy KS, Kubert DA, Fawzi MB. In vitro release characteristics of hard shell capsule products coated with aqueous- and organic-based enteric polymers. *J Biomater Appl*, 3(1):52-79, 1988.
 14. Thomson AB, Kirdeikis P, Lastiwka R *et al.* Pharmacokinetics and pharmacodynamics during treatment with the omeprazole 20 mg enteric-coated tablet and 20 mg capsule in asymptomatic duodenal ulcer patients. *Can J Gastroenterol*, 11(8):657-660, 1997.
 15. Fernandez-Moreno MD, Serrano-Rios M, Prieto JC. Identification of insulin receptors in epithelial cells from duodenum, jejunum, ileum, caecum, colon and rectum in the rat. *Diabete Metab*, 13(2):135-139, 1987.