

Caco-2 세포 단층막 투과 실험시 교반이 약물의 투과계수에 미치는 영향

홍순선* · 유호정* · 이 흥 · 정석재 · 김대덕 · 심창구†

서울대학교 약학대학 종합약학연구소
(2005년 2월 18일 접수 · 2005년 4월 14일 승인)

Effect of Agitation on the *in vitro* Permeability of Xenobiotics across Caco-2 Cell Monolayers

Soon-Sun Hong*, Ho-Jung Yoo*, Hong Li, Suk-Jae Chung, Dae-Duk Kim and Chang-Koo Shim†

Research Institute of Pharmaceutical Sciences and College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
(Received February 18, 2005 · Accepted April 14, 2005)

ABSTRACT – The unstirred water layer (UWL), which has been known to exist in the boundary of the intestinal lumen and intestinal wall, often behaves as an absorption barrier especially for lipophilic drugs. The intestinal absorption of drugs is often characterized using Caco-2 cell monolayers grown on Transwell polycarbonate membranes. The permeability (P_{app}) of drugs across the cell monolayer might be influenced by the agitation of the donor compartment, since the width of UWL on the surface of the cell monolayer would be reduced by the agitation. In this study, the effect of agitation of the donor compartment with 60 rpm on the permeability was measured for 12 drugs with a wide range of lipophilicity and permeability. The P_{app} of mannitol, tributylmethyl ammonium, cimetidine, ranitidine, hydrocortisone, benzylpenicillin and loxoprofen was not influenced by the agitation, while the P_{app} of theophylline, propranolol, YH439, phenylpropranolamine and testosterone was increased by the agitation. There was a significant correlation between the increase of P_{app} by agitation and the lipophilicity for the compounds having $P_{app} > 2 \times 10^{-5}$ cm/sec. No correlation was observed for the difference in P_{app} by agitation and the molecular weight, or lipophilicity of the drugs. Therefore, the agitation rate of the donor compartment in the Caco-2 cell monolayer study should be carefully controlled in order to estimate P_{app} reproducibly especially for lipophilic drugs.

Key words – Caco-2, Unstirred water layer, Apparent permeability (P_{app}), Agitation

약물의 투여 경로 중 가장 널리 이용되며 편리한 것이 경구 투여이다. 경구로 투여된 약물이 체내 적용 부위에서 약효를 나타내기 위해서는 위장관에서의 흡수가 필수적인 단계이다. 그러므로 새로운 약물의 개발 단계에서 약물의 흡수에 대한 연구는 필수적이며 이를 위한 *in vitro* 실험법의 확립은 매우 중요한 과제라고 하겠다. Caco-2 세포는 사람의 대장암에서 유래한 세포주로서 사람의 소장 상피 세포와 형태학적, 생화학적으로 유사하여 약물의 소장관 흡수 정도와 기전 등을 연구하는 *in vitro* model로써 널리 이용되어 왔다.²⁻⁵⁾ 즉, Caco-2 세포를 Transwell의 polycarbonate membrane 상에 배양하면 자동적으로 분화하여 단층막을 형성한다. 이렇게 형성된 Caco-2 세포 단층막을 투과하는 약물의 겉보기 투과계수 (P_{app})로부터 소장에서의 흡수 정도를 예측한다.⁶⁻⁹⁾

경구로 투여된 약물은 일반적으로 소장관강에서 소장 상

피를 통해 흡수되어 전신 순환혈에 도달하게 된다. 실제의 장관은 유동 운동 등을 하기 때문에 내부가 어느 정도 교반되어 있다. 그러나 막 표면에는 아무리 해도 충분히 교반될 수 없는 층이 있다고 생각되는데 이것을 stagnant layer 또는 비교반수층 (Unstirred water layer)이라고 한다. 이 층의 두께는 측정 방법에 따라 다소 차이가 있지만 rat 소장의 경우 100~1000 마이크로미터 정도로 알려져 있다.¹⁰⁾ 비교반수층은 일반적으로 막을 빠르게 투과하는 약물의 또 다른 확산 장벽으로 작용하여 약물 흡수의 율속 단계가 되는 것으로 생각되고 있다.¹¹⁾

Hidalgo 등¹⁾은 diffusion chamber를 이용하여 transport buffer의 교반 정도를 변화시켜 비교반수층의 두께에 따른 Caco-2 세포 단층막을 투과하는 약물의 투과 계수 변화를 측정하였다. 대체로 투과성이 높은 지용성의 스테로이드 약물들을 대상으로 투과계수 변화를 측정한 결과 상대적으로 지용성이 낮은 약물보다 지용성이 매우 높은 약물의 경우에 교반에 의해 비교반수층이 얇아질수록 투과계수의 상승이 뚜

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 02)880-7873, E-mail : shimck@snu.ac.kr

Table I—Physicochemical Properties and Permeabilities of the Compounds

Compound	MW	logAPC ^a	P (0 rpm) ^d	P (60 rpm) ^e
1 Mannitol	182	-3.10 ^b	0.53 ± 0.06	0.35 ± 0.38
2 TBuMA	327	-1.00	2.94 ± 0.22	2.61 ± 0.12
3 Benzylpenicillin	356	1.82 ^c	2.74 ± 0.22	3.33 ± 0.14
4 Cimetidine	252	0.82 ^c	3.16 ± 0.30	3.09 ± 0.08
5 Ranitidine	314	0.66	3.73 ± 0.43	4.14 ± 0.28
6 Hydrocortisone	363	1.53 ^b	16.9 ± 2.85	16.4 ± 1.56
7 Loxoprofen	246	-0.95	24.8 ± 2.55	25.6 ± 2.00
8 Theophylline	180	-0.02	26.4 ± 3.38	30.9 ± 2.70*
9 Phenylpropanolamine	150	-0.41	23.8 ± 2.87	32.0 ± 3.75*
10 Propranolol	258	1.54 ^b	22.0 ± 3.13	32.3 ± 3.99*
11 YH439	330	1.21	26.1 ± 2.92	49.0 ± 2.39*
12 Testosterone	288	3.31 ^b	30.7 ± 2.40	40.8 ± 2.64*

^aExperimental 1-octanol / water distribution coefficient at pH 7.4

^bData from Artursson and Karlsson⁹⁾

^cData from Yee¹²⁾

^dExperimental apparent permeability (P_{app}) across Caco-2 measured under 0 rpm (control) ($\times 10^{-6}$ cm/sec, mean \pm SD, n=3)

^eExperimental apparent permeability (P_{app}) across Caco-2 measured under 60 rpm (agitation) ($\times 10^{-6}$ cm/sec, mean \pm SD, n=3, *p < 0.05) compared to P (0 rpm) or control

렸히 나타났다.

본 연구에서는 선행된 연구를 바탕으로 Caco-2 세포 단층막 투과 실험시 교반 장치로 널리 쓰이고 있는 plate shaker (shaking water bath)를 이용하여 교반을 하는 경우에도 이러한 현상이 나타나는지를 확인하고자 하였다. 교반에 의하여 겉보기 투과계수 (P_{app})가 다르게 나타나는지를 알아보기 위하여 비교적 넓은 범위의 지용성과 투과력을 갖는 12개의 약물 (Table I)을 선택하여 투과 실험 시 교반을 한 경우와 교반을 하지 않은 경우의 P_{app} 값을 비교하였다. 또한 비교반수층의 두께에 따라 투과 정도가 다르게 나타나는 것이 약물의 어떠한 특성에 의한 것인지를 알아보기 위해 교반 여부에 따른 P_{app} 차이와 약물의 분자량, 지용성 (분배계수), 투과력 (비교반시의 P_{app}) 과의 상관성을 고찰하였다.

실험 방법

시약 및 재료

Cimetidine과 phenylpropanolamine은 TCI Co. (Tokyo, Japan)로부터, propranolol은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)로부터, [¹⁴C]testosterone (57.00 mCi/mmol)은 Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, England)로부터, [¹⁴C]mannitol (51.00 mCi/mmol), [³H]hydrocortisone (78.40 Ci/mmol), [³H]theophylline (14.5 Ci/mmol), 그리고 [³H]benzylpenicillin (24.0 Ci/mmol)은 NEN Life Science

Products (Boston, MA, USA)로부터 각각 구입하여 사용하였다. Loxoprofen은 대화제약 (Seoul, Korea)으로부터, ranitidine과 YH439는 유한양행 (Seoul, Korea)로부터 각각 지원을 받아 사용하였다. [³H]TBuMA (0.2 Ci/mmol)는 과량의 tributyl amine (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI, USA) 과 [³H]methyl iodide(85 Ci/mmol, Amersham, Arlington Heights, IL, USA)의 첨가반응으로 합성하였다. 합성한 TBuMA는 NMR, Mass 및 TLC로 순도와 specific activity를 확인하였다. Fetal bovine serum은 Hyclone Laboratories (Logan, UT, USA)로부터, trypsin-EDTA는 Gibco Laboratories (Gaithersburg, MD, USA)로부터, Dulbecco's Modified Eagle's medium, non-essential amino acid solution, penicillin-streptomycin, HBSS, HEPES 및 다른 모든 시약은 모두 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

기구 및 기기

Cell culture flask (Cat. No. 156499, culture area 75 cm²)는 Nalge Nunc International (NY, USA)로부터 구입하여 사용하였고, transwell (Cat. No. 3401, insert growth area 1 cm², pore size 0.4 mm)은 Corning Costar (NY, USA)로부터 구입하여 사용하였다. TEER 값은 EVOMTM epithelial voltohmmeter (World Precision Instrument, USA)를 사용하여 측정하였다. 투과 실험시 온도와 습도를 유지하며 교반을

하기 위해 shaking water bath (HB-205SW, Han Baek Sci. Co. Ltd., Seoul, Korea)를 사용하였다. 약물을 정량하기 위한 HPLC system은 Hitachi L-7110 pump (Hitachi, Japan), Hitachi L-7200 autosampler (Hitachi, Japan), Shimadzu SPD 6AV UV-Vis detector (Shimadzu, Japan)을 사용하였고, HPLC column은 Inertsil ODS-3 (4.6 I.D. 150 mm, 5 μ m particle size, GL science, Japan)를 사용하였다. 동위원소로 표지된 약물을 정량하기 위한 liquid scintillation counter는 WALLAC 1409 (Wallac, USA)를 사용하였고, LSC cocktail은 Ultima Gold™ (Packard, Ulgersnaweg, UK)을 사용하였다.

Caco-2 cell monolayers 배양

Caco-2 세포는 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 배양액은 10% fetal bovine serum, 1% non-essential amino acid, 100 units/mL penicillin과 0.1 mg/mL streptomycin을 함유한 Dulbecco's Modified Eagle's medium을 사용하였다. 37°C에서 5% CO₂와 95% humidity 조건을 항상 유지하도록 하여 75 cm² T-flask에서 배양하였으며 80-90%의 confluency에 도달하면 0.02% EDTA와 0.05%의 trypsin을 사용하여 1:3의 비율로 subculture를 하였다. Passage number가 46-58인 Caco-2 cell을 12-transwell의 polycarbonate membrane에 1.2-1.5 $\times 10^5$ cells/cm²의 density로 seeding하여 transport 실험에 사용할 때까지 CO₂ incubator에서 배양하면서 매일 또는 2일에 한번씩 배양액을 갈아주었다.²⁾

Transport 실험

각 약물에 대하여 두 가지 다른 교반 조건으로 Caco-2 cell monolayer에서의 투과실험을 실시하였다. 한 군은 교반을 하지 않고 (0 rpm) 투과 실험을 실시하였고 다른 한 군은 plate shaker를 사용하여 60 rpm (apical side의 약물용액이 넘치지 않는 최고 rpm)으로 교반을 하여 실험하였다. 교반 조건 이외의 다른 모든 조건은 일반적인 transport 실험과 동일하게 하였다. 간략히 서술하면, Caco-2 cell monolayer는 seeding후 18-23일 동안 배양한 것을 투과 실험에 사용하였고 Transport media는 HBSS, HEPES, sodium bicarbonate, glucose를 함유한 pH 7.4의 buffer를 사용하였다. Cell monolayer를 transport media로 세번 washing한 후 37°C에서 30분간 pre-incubation하고 TEER value를 측정하였다 (300-600 $\Omega \cdot \text{cm}^2$). Transport media를 aspiration하여 제거한 후 약물 용액 0.5 ml을 apical side에 가하고 1.5 ml의 transport media를 basal side에 가하였다. 37°C 항온조에서 15분마다

cell insert를 fresh media가 들어있는 well로 옮기고 basolateral side에서 1 ml씩 sampling하여 transport된 약물량을 HPLC 혹은 LSC로 정량하였다.

Data 분석

시간에 따라 투과된 약물의 누적량 (cumulative amounts)을 plot하고 그 기울기로부터 투과속도 (transport flux, dQ/dt)를 얻었다. 겉보기 투과계수(P_{app})는 $dQ/dt \times 1/60 \times 1/A \times 1/C_0$ 로 계산하였고 단위는 cm/sec로 나타내었다. 이때 dQ/dt 는 투과속도, transport flux (mmole/min)를 나타내고, A 는 투과면적 (cm²)을 나타내며 C_0 는 약물의 초기농도(mmol/ml)를 나타낸다. 모든 실험은 적어도 세번(n=3) 수행하였고 결과는 그 평균으로 계산하였다. 실험군 간의 차이를 검정하기 위하여 student's t-test를 사용하여 $p < 0.05$ 인 경우에 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

결과 및 고찰

Plate shaker를 이용하여 60 rpm으로 교반하면서 transport

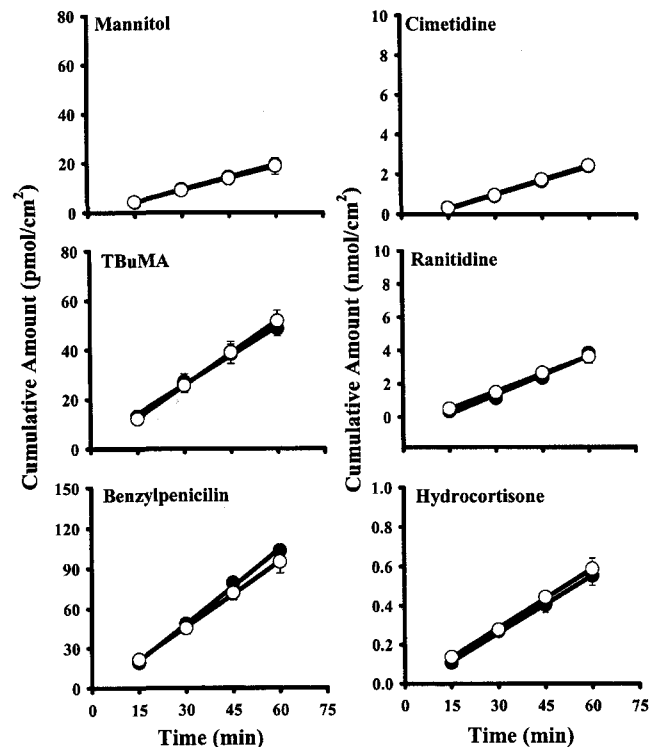


Figure 1—Time course for the cumulative amount of mannitol, TBuMA, benzylpenicillin, cimetidine and hydrocortisone transported across Caco-2 cell monolayers under 60 rpm agitation(●) using a plate shaker and control(○), respectively. Data were shown as mean \pm S.D. (n=3).

실험을 하였을 때 (shaking)와 교반을 하지 않고 transport 실험을 하였을 때 (control), 각각의 실험에서 시간에 따라 투과된 약물의 누적량을 plot하였다. 그 기울기로부터 각 약물의 Caco-2 세포 단층막 투과 속도 (dQ/dt , flux)를 비교하여 보았다. 먼저 mannitol, TBuMA, benzylpenicillin, cimetidine, ranitidine, hydrocortisone의 경우 교반에 의하여 unstirred water layer의 두께변화가 예상됨에도 불구하고 flux 차이가 나타나지 않았다(Figure 1). 이 물질들의 $\log A_{PC}$ 는 -3.1에서 1.8 사이로 비교적 지용성이 낮고 P_{app} 또한 비교적 낮은 편이다 (Table I). Loxoprofen, theophylline, propranolol, YH439, phenylpropranolamine, testosterone의 경우 60 rpm으로 교반하였을 때 control군에 비해 flux가 유의적으로 증가하였다 (Figure 2). 즉, 교반에 의하여 Caco-2 세포 단층막 표면의 unstirred water layer의 두께가 얇아짐에 따라 이들의 flux가 증가된 것으로 생각된다.

종합적으로 살펴보았을 때, 일반적으로 투과계수가 20×10^{-6} cm/sec 이상으로 상대적으로 투과가 잘 되는 약물의 경우에 교반이 약물의 겉보기 투과 계수에 영향을 미치는 것으로 나타났다 (Figure 2; Table I). 그러나 투과가 잘 되는 약물 중에서도 교반에 의해 투과계수가 차이를 보이는 경우

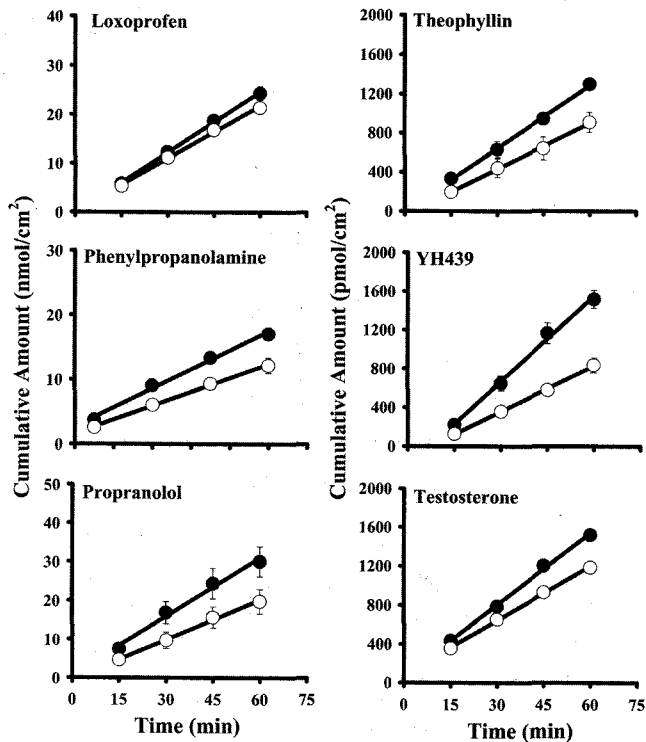


Figure 2—Time course for the cumulative amount of loxoprofen, theophylline, propranolol, YH439, phenylpropranolamine and testosterone transported across Caco-2 cell monolayers under 60 rpm agitation (●) using a plate shaker and control (○), respectively. Data were shown as mean \pm S.D. (n=3).

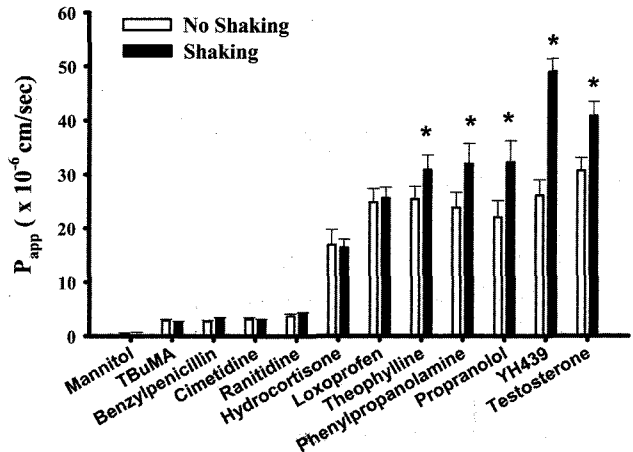


Figure 3—Apparent permeability coefficients (P_{app}) of the drugs across Caco-2 cell monolayers under the two different agitation conditions, 60 rpm agitation (black) and no agitation (white), respectively. Data were shown as mean \pm S.D. (n=3). * $p < 0.05$ compared to no agitation.

와 보이지 않는 경우가 있었는데 어떠한 요인에 의한 것인지를 고찰해 보았다.

먼저, 지용성이 교반에 미치는 영향을 알아보았다. 상대적으로 지용성이 낮으면서 지용성이 비슷한 약물인 TBuMA와 loxoprofen을 비교하면 비교반시의 P_{app} 는 각각 2.94와 24.8 ($\times 10^{-6}$ cm/sec)로 투과계수가 큰 차이를 보임에도 불구하고 교반에 의한 영향을 받지 않았다. 상대적으로 지용성이 높으면서 지용성이 비슷한 약물인 hydrocortisone과 propranolol을 비교하면 교반에 의한 영향은 상대적으로 P_{app} 가 큰 propranolol만 받았다. 이는 같은 지용성이더라도 P_{app} 가 큰 약물의 경우가 교반, 즉 비교반수층의 영향을 더 예민하게 받는다는 것을 의미한다. 그러나 지용성이 높으면서 P_{app} 가 큰 약물인 hydrocortisone의 경우 교반에 의한 영향을 받지 않았다. 이로부터 약물의 지용성 또는 투과계수만으로는 교반에 의한 약물의 P_{app} 변화를 설명할 수 없었다 (Figure 4A, 4B). 또한 약물의 분자량도 교반에 의한 약물의 P_{app} 변화에 영향을 주지 않았다 (Figure 4C).

따라서 약물의 지용성과 투과계수를 함께 고려하여 교반에 미치는 영향을 알아보았다. 투과계수 ($< 2 \times 10^{-5}$ cm/sec)가 작은 약물들은 교반에 의해 약물의 P_{app} 가 영향을 받지 않았으며 투과계수와 지용성간에 상관성을 보이지 않았다. 투과계수 ($> 2 \times 10^{-5}$ cm/sec)가 큰 약물들은 교반 시 약물의 P_{app} 가 비교반시에 비해 유의성있게 증가하였으며, 교반시 약물의 투과계수는 지용성이 증가함에 따라 증가하는 양상을 보였다 (Table I). 교반시의 투과계수는 교반에 의한 약물의 P_{app} 변화와 비교할 때 좋은 상관성을 보였다 (Figure 5). 그러나 비교반시의 투과계수는 지용성과 무관하게 유의성있는

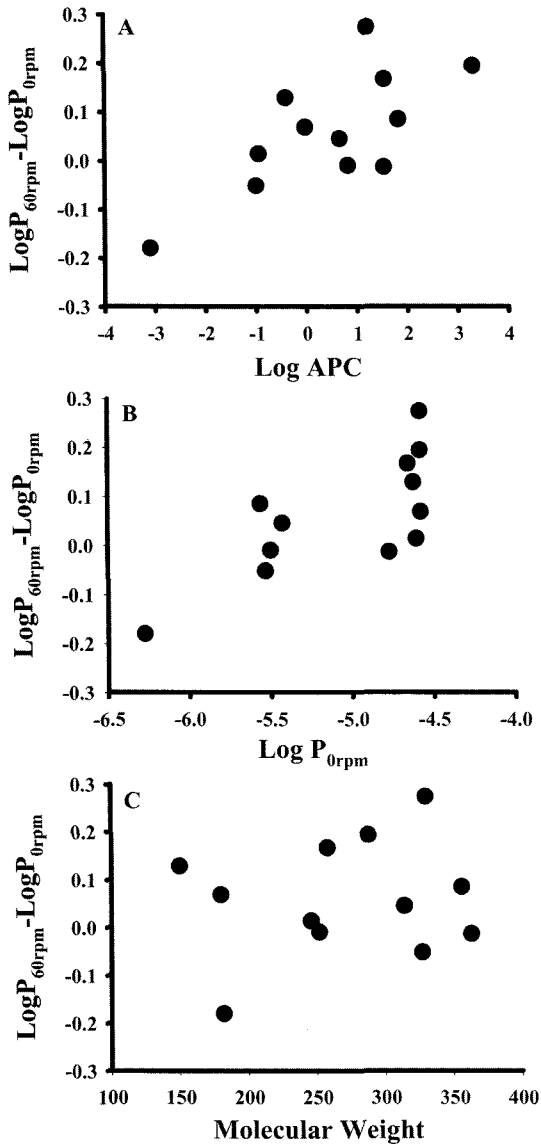


Figure 4—Relationships between the difference in P_{app} by the agitation ($\text{logP}_{60\text{rpm}} - \text{logP}_{0\text{rpm}}$) and the lipophilicity (logAPC) (A), the permeability ($\text{logP}_{0\text{rpm}}$) (B) and the molecular weight (C) of the compounds.

차이를 보이지 않았다. 이는 막 투과 속도가 빠른 경우에 비교반수층의 투과가 전체 투과의 율속 단계가 될 가능성이 높다는 사실과 대체로 일치하는 결과이다.

이상의 결과를 종합하여 교반, 즉 비교반수층의 효과를 결정짓는 인자가 무엇인지 조사하여 보았다. 교반에 의한 P_{app} 의 차는 약물의 지용성 (Figure 4A), 비교반시의 투과력 (Figure 4B), 약물의 분자량 (Figure 4C)과는 유의적인 상관성이 없었다. 그러나 P_{app} 가 2×10^{-5} cm/sec 이상인 물질들의 경우 교반의 효과 즉, 비교반수층의 효과는 약물의 지용성과 P_{app} 의 크기에 의해 결정된다는 사실을 확인하였다.

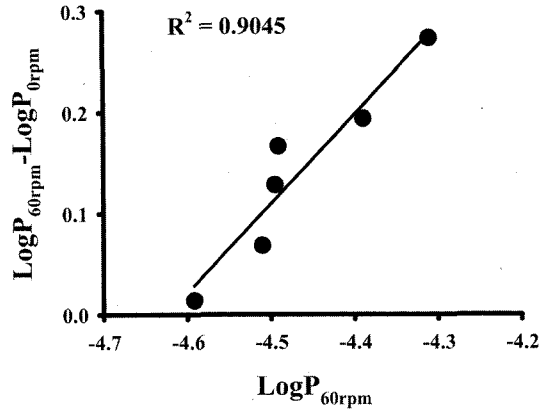


Figure 5—Relationship between the difference in P_{app} by the agitation $\text{logP}_{60\text{rpm}} - \text{logP}_{0\text{rpm}}$ and the permeability under 60 rpm agitation ($\text{logP}_{60\text{rpm}}$) of the compounds having $P_{\text{app}} > 2 \times 10^{-5}$ cm/sec.

결론

본 연구의 결과를 종합해보면, P_{app} 가 2×10^{-5} cm/sec 이상인 물질들은 교반시 지용성이 증가함에 따라 투과계수가 증가하는 것으로 추정되었다. 결론적으로 약물의 흡수를 연구하기 위하여 Caco-2 cell monolayer를 이용하여 투과실험을 할 때 투과가 잘 되는 약물의 경우 약물의 지용성이 높으면 교반 조건에 대해 특히 주의할 필요가 있으며 문헌치를 참고하는 경우에 있어서도 교반 조건이 상이한 경우에는 교반에 의한 영향을 고려해야 한다고 사료된다.

감사의 말씀

이 연구는 식품의약품 안전청의 연구비 지원에 의한 것으로 이에 감사드린다.

문헌

- 1) I.J. Hidalgo, K.M. Hillgren, G.M. Grass and R.T. Borchardt, Characterization of the unstirred water layer in Caco-2 cell monolayers using a novel diffusion apparatus, *Pharm. Res.*, **8**, 222-227 (1991).
- 2) H. Li, S.J. Chung, D.C. Kim, H.S. Kim, J.W. Lee and C.K. Shim, The transport of a reversible proton pump antagonist, 5,6-dimethyl-2-(4-fluorophenylamino)-4-(1-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoguinolone-2-yl) pyrimidine hydrochloride (YH1885), across Caco-2 cell monolayers, *Drug Metab. Dispos.*, **29**, 54-59 (2001).
- 3) W. Rubas, N. Jezyk and G.M. Grass, Comparison of the permeability characteristics of a human colonic epithelial (Caco-2) cell line to colon of rabbit, monkey, and dog intestine and human drug absorption, *Pharm. Res.*, **10**, 113-

- 118 (1993).
- 4) J.N. Cogburn, M.G. Donovan and C.S. Schasteen, A model of human small intestinal absorptive cells. 1. Transport barrier, *Pharm. Res.*, **8**, 210-216 (1991).
 - 5) B.H. Stewart, O.H. Chan, R.H. Lu, E.L. Reyner, H.L. Schmid, H.W. Hamilton, B.A. Steinbaugh and M.D. Taylor, Comparison of intestinal permeabilities determined in multiple *in vitro* and *in situ* models: relationship to absorption in humans, *Pharm. Res.*, **12**, 693-699 (1995).
 - 6) J. Karlsson and P. Artursson, A new diffusion chamber system for the determination of drug permeability coefficients across the human intestinal epithelium that are independent of the unstirred water layer, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1111**, 204-210 (1992).
 - 7) P. Artursson, K. Palm and K. Luthman, Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **46**, 27-43 (2001).
 - 8) I.J. Hidalgo, T.J. Raub and R.T. Borchardt, Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability, *Gastroenterology*, **96**, 736-749 (1989).
 - 9) P. Artursson and J. Karlsson, Correlation between oral drug absorption in humans and apparent permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **175**, 880-885 (1991).
 - 10) T. Iwatsubo, Y. Miyamoto, Y. Sugiyama, H. Yuasa and T. Iga, Effect of potential damaging agents on the microclimate-pH in the rat jejunum, *J. Pharm. Sci.*, **75**, 1162-1165 (1986).
 - 11) P.H. Barry and J.M. Diamond, Effect of unstirred layers on membrane phenomena, *Physiol. Rev.*, **64**, 763-872 (1984).
 - 12) S. Yee, *In vitro* permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict *in vivo* (small intestinal) absorption in man--fact or myth, *Pharm. Res.*, **14**, 763-766 (1997).