

Liposome-Insulin의 토끼直腸投與에 있어서 血糖値의 變化

金成鎬·崔俊植·白采善

朝鮮大學校 藥學大學

Change in Blood Glucose Value of Rectal Administration of Liposome-Insulin to Rabbits

Sung Ho Kim, Jun Sick Choi, and Chae Sun Back.

(Received April 20, 1982)

Insulin administration rectally with the liposome has the hypoglycemic effect in the rabbits. The reduction in blood sugar was maximum at about 60 minutes after administration and continued for 4 hrs. at low level in these experiments. No hypoglycemic effect was observed in control administered rectally without liposome.

Rectal absorption of insulin has been effected by addition of the bile salt, as the protective agent which prevented denaturation and the phase transition of insulin in liposome-encapsulation.

As a matter of the fact, a significant hypoglycemic action was obtained when the insulin-liposome was given by rectal administration.

The use of this agent to enhance insulin absorption offers the possibility of a new approach to rectal insulin therapy.

Insulin 같이 peptide 結合을 하고 있는 hormone劑는 胃腸管內에서 protease에 依해서 加水分解되어 生物化學的 力價가 감소되고 소실되기 때문에 糖尿病 患者의 治療에는 非經口의 方法인 注射劑로서만 投與하고 있다. 그러나 糖尿病 患者들은 長期間 insulin을 注射함으로써 四頭筋 均縮症과 같은 여러가지 問題가 나타남으로 注射劑 以外の 劑型開發에 많은 研究者들이 努力하고 있다^{1,2,3,4}. 一般적으로 直腸에서 吸收된 藥物은 一次循環을 經유함으로 肝·腸內에서 不活性化가 일어나지 않고 胃腸管內의 消化酵素에 依해서 加水分解가 일어나지 않으며 直腸內의 pH가 一定함으로써 安全하게 吸收될수 있다. 藥物의 吸收率이 乳化劑에 依해서 變化될수 있으며 特히 ion性 乳化劑나 非 ion性 乳化劑가 動物 및 사람의 消化管 또는 直腸에서 inulin을 吸收시킬수 있다고 報告하였다^{4,5}.

Liposome-entrapped insulin을 直接 直腸에 投與한 研究는 報告된바 없으므로 著者들은 insulin 요법에 새로운 劑型으로 利用할수 있음을 착안하여 本연구를 始作하였으며 liposome-

College of Pharmacy, Cho Sun University

entrapped insulin이 血糖에 미치는 効果を 檢討하기 위해서 血糖値의 變動을 觀察하였다.

實驗 方法

Liposome 調劑—Liposome의 調劑는 GreGoriads⁶⁾의 方法을 약간 變型하여서 調劑하였으며 egg lecithine (L- α -phosphatidyl choline, Sigma Co.), cholesterol (Kowa Co.), cholic acid (Sigma Co.), cholic-Na (Sigma Co.)을 다시 精製하여 標準 TLC의 Rf 値에 一致된 것을 Table I과 같은 組成에 따라서 CHCl₃ (Merk Co.)에 용해시키고 N₂-gas하에서 CHCl₃을 完全히 제거한 後에 真空 건조기에서 20°C하에서 24時間 동안 完全히 건조한 後에 insulin(녹십자)과 생리식염수(동인화학)을 使用하여 liposome에 insulin을 entrapped시키고 non-entrapped된 insulin을 分離시키지 않고서 供試하였으며 直腸內에 投與한 liposome-insulin은 0.1M liposome에 insulin量이 35unit/ml, 16unit/ml로 調劑하였다.

動物 實驗—供試한 動物은 2.0kg 전후의 白色토끼를 雌雄區別 없이 使用하였으며 實驗前에 24時間 동안 絶食시켰으나 물을 충분히 섭취토록 하였다.

이때의 麻酔는 pentobarbitalsod. (대원제약) 30.0mg/kg를 耳정맥에 IV주사하여 麻酔된 토끼를 動物固定臺에 固定한 後에 一定한 體溫을 維持하기 위해서 白熱燈을 계속 照射시켰으며 藥物을 直腸內에 投與한 後에 藥物이 밖으로 나오는것을 防止하기 위해서 肛門을 閉쇄하였다.

血液의 採取는 右側 大腿 動脈血管에 polyethylen管을 通하여 藥物의 投與前, 藥物投與後 1時間, 2時間, 3時間, 4時間, 및 5時間의 各時間마다 血液약 3mL.을 取하여 遠心分離(3000 rpm, 1hr.)하여 얻은 血清을 試料로 하였으며 血糖値는 O-toluidine方法⁷⁾을 使用하여 Collman spectrophotometer (630 μ)로 測定하였다.

結果 및 考察

Neutral liposome-entrapped insulin群에서 投與後 1時間 後에는 最低血糖値를 나타내고 이때 初期의 血糖値에 比較하면 $77.19 \pm 2.25\%$ 였고 이 後 부터는 漸次的으로 回復되어 4時間 後에는 正常으로 되었다. 이 群에 使用된 neutral liposome-entrapped insulin이 直腸內에서 遊離(release)되어 膜을 通하여 吸收되는 過程에 여러가지의 物理的, 生理的 因子들에 의해서 變化를 받고 있음을 暗示하며 insulin自體가 直腸內에서 吸收가 되지 않는 것에 比較하여 보면 吸收는 되나 血糖値의 變動時間으로 보아서 持續的인 血糖低下 作用을 하지 못함을 나타내며 直腸內에서 insulin의 變性和 分解를 억제하는 데는 liposome에 依한 것으로 思料된다. 即 surfactantmicelle은 溶解된 分子를 單離(isolate)하거나 酵素의 接觸을 감소시키지만 micelle system은 liposome-entrapped insulin의 構造와는 全く 다르며 liposome 調劑時에 使用된 lipide와 insulin이 特殊한 相互作用을 나타내고⁸⁾ 있으며 直腸內의 物質들에 依해서 insulin이 保護받지 못하거나 entrapped된 insulin이 release되지 못하는 것으로 보인다. 어떤 경우에는 insulin-surfactant micelle을 形成할지라도 micelle solubilization은 藥物의 吸收를 보다더 감소시키며 分子量이 큰 藥物의 micelle은 膜의 通過를 기대 할수 없으나⁹⁾ peptidase가 存在치 않은 腔이나 直腸의 經路를 通하여 乳化劑를 利用하면 insulin 吸收가 促進되며¹⁰⁾ 乳化劑가 membrane permeability에 影響을 미친다고 하였다¹¹⁾. 그러므로 直腸에서 liposome-entrapped insulin의 吸收率과 mechanism은 乳化劑를 利用한 것과는 다

큰 것으로 생각되며 liposome-entrapped insulin이 直腸에서 release되는 速度에 關係되는 것으로 보이며 membrane permeability에 큰 영향을 미치지 못한 것으로 보인다.

Insulin과 liposome사이의 作用을 觀察하기 위해서 liposome構成 成分을 다르게 하여 同一한 單位의 insulin을 投與하였다(Table I).

Table I—Blood Glucose in Rabbits Treated with Insulin Entrapped in 0.1M Liposome

Preparation of Liposome (mole ratio)	Units of Insulin Entrapped in Liposome/Kg Body Weight	Blood Sugar, Mean±SE (% of values before treatment)				
		1 hr.	2 hrs.	3 hrs.	4 hrs.	5 hrs.
Neutral Liposome Lecithine Cholesterol (7:3)	20	77.19±2.25	87.61±2.45	89.04±3.65		
Acidity Liposome Lecithine Cholesterol Cholic acid (7:2:1)	20	78.71±2.35	82.97±3.45	87.13±2.40	89.95±2.65	
Alkalidity Liposome Lecithine Cholesterol Na-cholate (7:2:1)	20	65.44±2.25	73.35±2.45	70.58±2.23	73.80±2.23	70.70±3.15
	40	95.17±2.03	92.12±2.35	82.04±2.25	74.32±2.25	63.80±2.25

Each run was carried out on the 6 rabbits.

Neutral liposome-entrapped insulin에 있어서 hypoglycemic effect을 1時間에서 (77.19±2.25%) 나타내면서 漸次的으로 回復하면서 4時間에는 正常으로 되었다. 한편 acidity liposome-entrapped insulin群에서는 1時間에서 hypoglycemic effect을 (78.19±2.35%)나

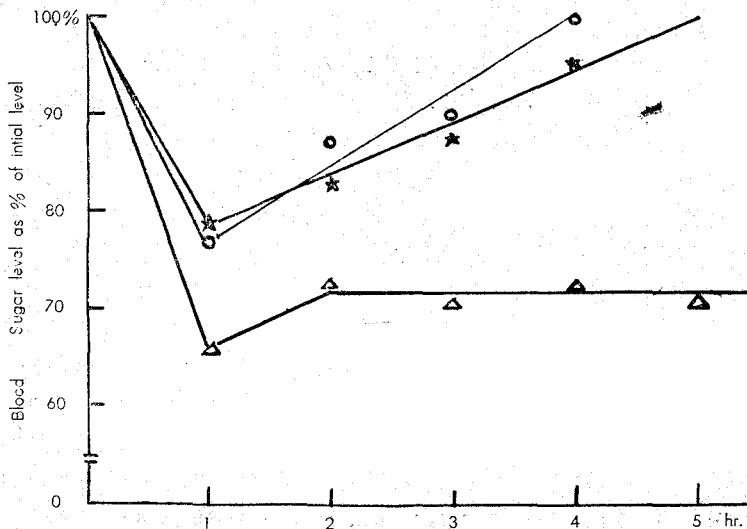


Figure 1—Change of blood sugar after rectal administration 20 units of insulin entrapped in liposome per Kg. of body weight.

Key: -○-○-, Insulin entrapped in neutral liposome; -★-★-, insulin entrapped in acidity liposome; -△-△-, insulin entrapped in alkalidity liposome.

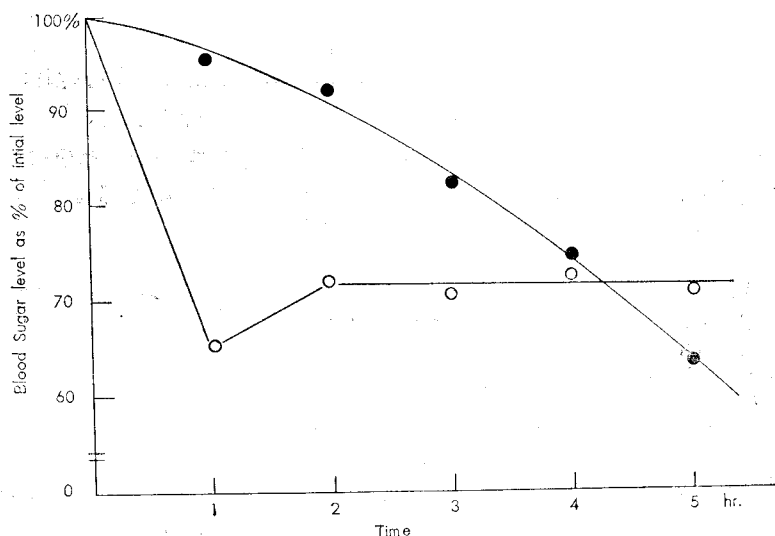


Figure 2—Change of blood sugar after rectal administration of insulin entrapped in liposome.

Key: ○—○—, 20 units of insulin entrapped in liposome/Kg of body weight; ●—●—, 40 units of insulin entrapped in liposome/Kg. of body weight.

타내고 漸次的으로 回復되는 현상을 보이고 물에 可溶性이며 生理的 洗淨劑인 Bile salt의 一種인 Na-cholate을 使用한 alkalidity liposome-entrapped insulin群에서는 1時間에서 hypoglycemic effect을 ($65.44 \pm 2.25\%$) 나타내며 5時間 동안 一定한 hypoglycemic effect을 持續하였다. 이것은 直腸內의 分泌液 量, 分泌狀態 등의 物理的 變化와²⁾ phasetransition 溫度에서 腸內 bile salt에 依해서 liposome이 파괴되어 liposome內에 entrap된 모든 物質들의 uptake을 높이는 反面에 lipide와 結合치 않는 藥品에 對해서는 liposome에 entrap된 物質들을 遊離하는 效果를 가지고 있음으로¹⁰⁾ bile salt을 포함한 liposome內에 entrap된 insulin이 bile salt에 依해서 매우 천천히 release되면서 insulin의 uptake가 일어나며 同時에 liposome-entrapped insulin을 經口投與時, 變化를 받지 않고 一部分은 吸收됨으로¹¹⁾ 直腸內에서도 同一한 mechanism이 일어남을 나타내고 있다(Fig. 1.).

한편 alkalidity liposome-entrapped insulin群에서 投與한 insulin量과의 關係를 比較하였던바, 20units kg^{-1} 群에서는 120分後 부터 一定한 血糖値를 維持하였으며 40units kg^{-1} 에서는 약 $0.134\% \text{ min}^{-1}$ 씩 감소되는 현상이 5時間 동안 계속되었다(Fig. 2.). 이 hypoglycemic effect는 liposome內에 entrap된 insulin이 bile salt에 의해서 insulin이 一定한 濃度를 維持되도록 release가 이루어 지면서 變性받지 않은 狀態로 吸收가 進行되는 同時에 liposome entrapped insulin型 自體의 吸收가 insulin濃度가 낮은 濃度 보다는 높은 濃度에서 잘 일어나며 일단 體內에 吸收된 liposome內에 entrap된 insulin이 遊離되어 生理的 活性型으로 變하는 速度가 매우 천천히 일어 남으로서 血糖値가 一定한 速度로 감소되는 것으로 보인다.

結 論

Liposome에 entrap된 insulin을 直腸에 투여하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

- 1) Neutral liposome-insulin은 hypoglycemic effect을 나타내나 지속성을 나타내지 못하

였다.

- 2) Acidity liposome-insulin은 neutral liposome-insulin에 比하여 hypoglycemic effect를 더 나았으나 一定한 hypoglycemic effect를 나타 내지 못하였다.
- 3) Alkalidity liposome-insulin에서, insulin濃도가 낮은 狀態에서는 持續的인 hypoglycemic effect를 나타내는 反面에 높은 濃度에서는 一定한 速度로 血糖値가 감소하는 현상을 나타냈다.

文 獻

- 1) Y. Nishioka, T. Kawamura, *Yakuzaigaku*, **37**, 119 (1977)
- 2) Y. Nishioka, T. Kawamura, *ibid.*, **37**, 88 (1977)
- 3) Y. Nishioka, T. Kawamura, *ibid.*, **38**, 67, (1978)
- 4) E. Touitou, Donbrow, and E. and Azaz, *J. Pharm. Pharmaco.*, **30**, 662 (1978)
- 5) E. Touitou, M. Donbrow, A. Rubinston, *ibid.*, **32**, 108 (1980)
- 6) G. Gregorias, *FEBS Letters*, **36**, 292 (1973)
- 7) W.L. White, M.M. Erikson, S.C. Steven, *Chemistry for the Chemical Lab.*, Mosby Co., London, p.96. (1976)
- 8) H.N. Patel, and B.E. Ryman, *FEBS Letters*, **62**, 60 (1976)
- 9) M. Gibaldi and S. Feldman, *J. Pharm. Sci.*, **59**, 579 (1970)
- 10) M.H. Richard and C.R. Gardner, *Biochimica et Biophysica Acta*, **543**, 508 (1978)
- 11) G. Dapergolas, and G. Gregoriadis, *Lancet*, **16**, 824 (1976)