

## 유리간세포를 사용한 ANS의 간내 이행에 관한 연구 : ANS의 간내 이행과정에 단백질 매개 기구가 존재하는가?

정연복<sup>†</sup> · 육동연 · 한 건

충북대학교 약학대학  
(1991년 3월 5일 접수)

### Characterization of the Hepatic Uptake of 1-Anilino-8-naphthalene sulfonate(ANS) by Isolated Rat Hepatocytes : Is Serum Protein Essential for Hepatic Uptake of ANS in the Liver ?

Youn Bok Chung<sup>†</sup>, Dong Yeon Yuk and Kun Han  
College of Pharmacy, Chungbuk National University  
(Received March 5, 1990)

The hepatic uptake of an anionic fluorescence probe, 1-anilino-8-naphthalene sulfonate (ANS) was characterized using isolated rat hepatocytes. The initial uptake rate of ANS by isolated hepatocytes was determined. The uptake process of ANS was fitted well to the Michaelis-Menten equation with a saturable component. The  $V_{max}$  and  $K_m$  values were  $2.9 \pm 0.1$  nmol/min/mg protein and  $29.1 \pm 3.2$   $\mu$ M, respectively. The uptake clearance ( $CL_{up}$ ) based on the ratio of  $V_{max}$  to  $K_m$  was 11.7 ml/min/g liver, revealing the good coincidence with that assessed from the analysis of the plasma disappearance curve in previous report. Furthermore, the effect of serum protein on the hepatic uptake of ANS into isolated hepatocytes was investigated. The permeability clearances ( $PS_{int}$ ) of ANS uptake were much higher than those predicted based on the unbound fractions in the presence of serum. These suggested that the hepatic uptake of extensively serum protein-bound ANS is mediated not only by the unbound form of ligand but also by the serum protein-mediated uptake mechanism.

**Keywords**—Hepatic uptake, 1-anilino-8-naphthalene sulfonate (ANS), protein-mediated uptake, isolated rat hepatocytes, serum protein.

약물의 간수송에 관한 연구는 주로 유기음이온계 약물, 담즙산 및 유리지방산을 이용하여 여러 실험계에서 이루어져 왔다. 예를 들면, 동물을 이용한 *in vivo* 실험,<sup>1-4)</sup> 간관류법,<sup>5-9)</sup> 유리간세포(isolated hepatocytes)를 이용한 실험<sup>10-14)</sup> 및 막 vesicle을 이용한 실험<sup>15-18)</sup> 등이 있다. 이러한 실험결과에 의하면, 간기능 검사약으로 사용되고 있는 sulfobromophthalein(BSP), indocyanine green(ICG) 및 rose bengal(RB) 등의 유기음이온계 약물들은 혈

관측에 접해있는 sinusoidal 막의 담체에 의해 혈중으로부터 신속하게 간내로 이행된다고 보고되고 있다.<sup>5,6,10,11)</sup> 간세포 내에서는 ligandin 등의 세포질내 단백질과 강력히 결합한다.<sup>19-21)</sup> 일부는 대사되고 비결합형 약물의 일부는 혈액측으로 efflux 되기도 한다.<sup>8)</sup> 간세포내로 이행된 약물은 담즙으로 배설되는데 이 과정도 canaliculark막에 존재하는 담체에 의한 것으로 생각되고 있다. 일반적으로 유기음이온류는 담즙산 및 유리지방산과는 별도의 담체에

<sup>†</sup>본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

의해 간내로 이행되며, 담즙배설도 서로 다른 경로를 경유한다고 알려져 있다.<sup>5)</sup>

대부분의 유기음이온계 약물들이 순환 혈중에서 알부민과 강력히 결합(99% 이상)하고 있음에도 불구하고 선택적이고도 신속히 간내로 이행되는 현상을 설명하기 위해 “알부민 매개 이행기구(albumin-mediated transport mechanism)”의 가설이 제안되었다. 즉, 최근 혈중 단백질과 강력히 결합하는 약물들의 간내 이행속도가 혈중 비결합형 농도로부터 예상되는 이행 속도보다 현저하게 증가한다는 사실을 근거로 하여, “약물의 생체막 투과과정에 비결합형 약물농도만이 관여한다”는 종래의 개념이 모든 경우에 적용될 수는 없다는 사실이 밝혀지고 있다.<sup>22-27)</sup> 그러나, 이러한 현상에 대해서는 아직 그 기구가 확립되지 않은 실정으로, 현재 여러 가설이 제안되어 활발한 논의가 진행중에 있다.<sup>28)</sup>

최근, Sugiyama 등<sup>14)</sup>은 유기음이온계 약물인 1-anilino-8-naphthalene sulfonate(ANS)가 BSP, ICG 등과 담체를 공유하여 유리간세포내로 이행된다는 사실을 보고하였다. 또한, ANS는 대부분의 유기음이온계 약물들과 ligandin 등의 간세포내 결합단백의 동일부위에 결합하는 성질을 이용하여 결합율의 측정에 이용되어 왔다.<sup>29-32)</sup> 이러한 ANS는 형광양자 수율이 상당히 높은 형광색소이므로, 보다 넓은 농도범위에 걸쳐서 해석이 가능하다는 장점이 있는 약물이다. 따라서 본 연구에 있어서는, 유리간세포를 사용한 실험계에 있어서 ANS를 모델약물로 설정하여 간내 이행에 관해 속도론적으로 해석하고자 하였다. 그 중에서도 ANS의 간내 이행에 미치는 혈청단백의 영향에 관해 검토하여, 알부민 등의 단백질 매개 이행기구가 ANS에 있어서도 존재하는가에 대해 밝히고자 하였다.

## 실험 방법

### 시약 및 실험동물

<sup>14</sup>C-inulin과 <sup>3</sup>H-H<sub>2</sub>O는 New England Nuclear Co. (Boston, MA)로부터 구입하였다. ANS(Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) 및 Bovine Serum Albumin(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)을 사용하였으며, 기타 시약은 모두 특급을 사용하였다. 실험동물로는 웅성 SD계 랫트(240~280g)를

오산동물센터(오산, 경기도)로부터 구입하여 사용하였다.

### 유리간세포(isolated hepatocytes)의 분리

유리간세포는 collagenase 간 판류법을 이용한 Baue 등<sup>33)</sup>의 방법에 따라, 그 개량법<sup>34)</sup>으로 조제하였다. 분리된 간세포를 0°C에서 약 10 mg protein/ml가 되도록 Krebs-Henseleit 완충액에 분산시켜 실험에 사용하였다. 각 실험에 사용된 간세포의 viability는 trypan blue exclusion test에 의해 측정하였으며, 95% 이상의 viability를 나타내는 세포만을 사용하여 실험하였다.

### ANS의 간세포내 이행에 관한 실험

유리간세포(2.4~3.4×10<sup>6</sup> cells/ml)를 함유한 배양혼합액 중에 소량 용적의 ANS를 가하여 간세포내로 이행되는 초속도(V<sub>0</sub>)를 산출하였다. 즉, 37°C에서 5분간 전(前) 배양한 후, ANS(50 μM)를 배양액 중에 가하여 반응을 시작하였다. 배양액 중의 ANS 초농도는 5~70 μM의 범위내로 하였다. 이 실험에 사용된 배양액은 137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.25 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.8 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4.2 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM HEPES 및 5 mM 글루코오스를 함유한 완충액(pH 7.4)을 사용하였다. 배양 혼합물을 경시적으로(20, 40, 60, 90, 120, 300 sec) 채취(500 μl)하여 원심여과법으로 cell과 배양액을 분리하였다. 즉, 100 μl의 glycerol위에 500 μl의 silicone : mineral oil (밀도 : 1.015)이 들어 있는 원심용 튜브에 샘플을 가하여, 탁상용 원심분리기(Beckman Instruments, Fullerton, CA)를 사용하여 20초간 원심분리하였다. 간세포가 용해된 glycerol층의 ANS를 3 ml 에탄올로 추출하여 간세포내로 이행된 양을 형광광도계를 이용하여 측정하였다(E<sub>m</sub> : 480, E<sub>x</sub> : 400). 부착수 용적(adherent water volume)은 <sup>14</sup>C-inulin과 3H<sub>2</sub>O를 사용하여 산출하였으며, 세포내로 이행된 ANS의 양을 보정하였다. 또한, 단백질농도는 BSA를 표준물질로 사용한 단백질정량용 키트(Bio-Rad Co. Ltd.)를 사용하여 측정하였다.

ANS의 간내 이행에 미치는 혈청단백의 영향에 관해 검토하기 위해, 배양액 중의 ANS 농도를 일정(10 μM)하게 유지시키고, 배양액 중의 혈청농도를 변화시켰다(1~5%). ANS의 간세포내 이행에 관한 초속도는 전술한 방법에 의해 측정하였다.

간내 이행에 관한 속도론적 해석

ANS의 유리간세포내 이행에 관한 속도론적 파라메타는 식 (1)에 나타낸 Michaelis-Menten식에 따라 구하였다.

$$V_o = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

여기서,  $V_o$  및  $[S]$ 는 각각 간세포내 이행에 관한 초속도 및 배양액 중의 ANS의 농도를 나타낸다.  $V_{max}$  및  $K_m$ 은 각각 최대 이행속도(nmol/min/mg protein) 및 Michaelis-Menten 정수( $\mu\text{M}$ )를 나타낸다.  $V_{max}$  및  $K_m$ 값은 식 (1)을 사용하여 비선형 최소자승법(nonlinear least squares method)<sup>35)</sup>으로 최종적으로 산출하였다.

간세포내 이행에 있어서 ANS의 막투과 클리어런스 [permeability clearance( $PS_{inj}$ ): ml/min/g liver]는 다음의 식으로부터 산출하였다. 단, 1 mg 단백질 중에는  $1.1 \times 10^6$  cells을, 1g 간 중에는  $1.3 \times 10^8$  cell을 함유한다고 가정하였다.

$$PS_{inj}(\text{ml}/\text{min}/\text{g liver}) =$$

$$\frac{V_o(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg protein}) \times (1.3 \times 10^8)(\text{cells}/\text{g liver})}{C(\text{nmol}/\text{ml}) \times (1.1 \times 10^6)(\text{cells}/\text{mg protein})} \quad (2)$$

여기서  $V_o$ 와  $C$ 는 각각 세포내 이행에 관한 초속도 및 배양액 중의 ANS 농도를 나타낸다.

결과 및 고찰

ANS의 유리간세포내 이행

유리간세포내로 이행된 ANS의 시간적 변화량을 Fig. 1에 나타내었다. ANS의 세포내 이행은 각 농도(5~70  $\mu\text{M}$ )에 있어서 60초 이내에서 직선성을 나타내었으므로, ANS의 이행에 관한 초속도를 이 직선영역에서의 선형최소자승법으로 산출하였다. ANS 초농도에 대해 이행에 관한 초속도를 플롯트하면 Fig. 2A에 나타낸 것처럼 hyperbolic 곡선이 됨을 알 수 있었다. 이 데이터를 Eadie-Hofstee 플롯트로 나타내면 직선을 나타낸다(Fig. 2B). 따라서 식 (1)에 의해 비선형최소자승법<sup>35)</sup>으로 데이터를 fitting한 결과, 최대 이행속도( $V_{max}$ ) 및 Michaelis-Menten

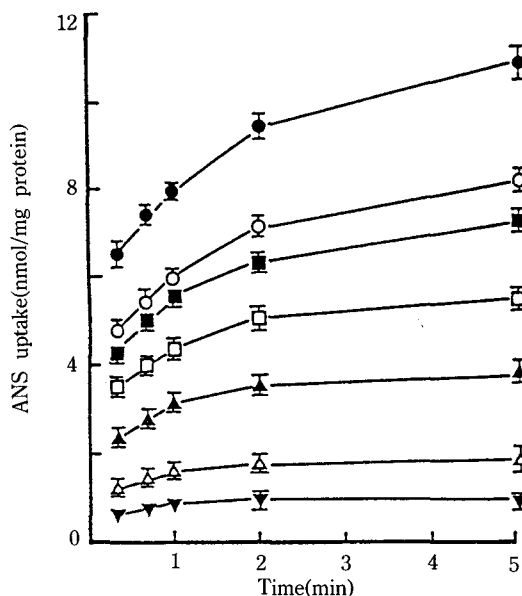
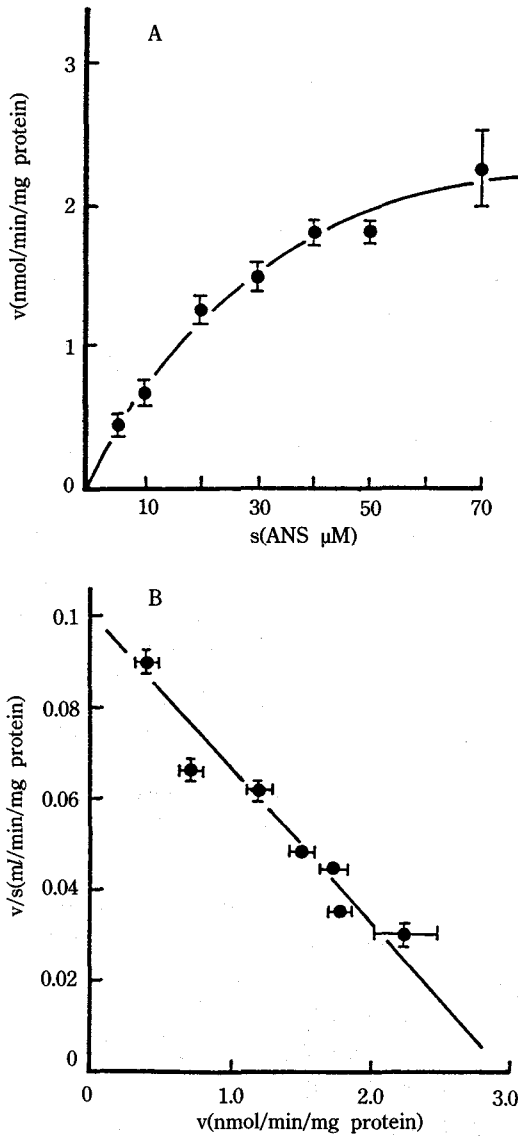


Figure 1—Time course of ANS uptake into isolated hepatocytes. Hepatocytes ( $2.4 - 3.6 \times 10^6$  cells/ml) were preincubated for 5 min at  $37^\circ\text{C}$  prior to the addition of ANS. The initial concentrations were ranged from 5  $\mu\text{M}$  to 70  $\mu\text{M}$ . Each point represents the Mean  $\pm$  S.E. of three independent experiments.

Keys: ( $\blacktriangledown$ ), 5  $\mu\text{M}$ ; ( $\triangle$ ), 10  $\mu\text{M}$ ; ( $\blacktriangle$ ), 20  $\mu\text{M}$ ; ( $\square$ ), 30  $\mu\text{M}$ ; ( $\blacksquare$ ), 40  $\mu\text{M}$ ; ( $\circ$ ), 50  $\mu\text{M}$ ; ( $\bullet$ ), 70  $\mu\text{M}$ .

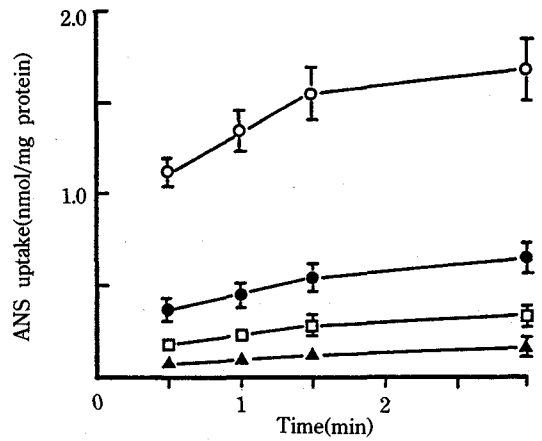
정수( $K_m$ )는 각각  $2.9 \pm 0.1$ (nmol/min/mg protein) 및  $29.1 \pm 3.2$ ( $\mu\text{M}$ )이었다. 이러한 결과는 형광광도의 변화로부터 유리간세포내로의 ANS 이행속도를 측정 한 Sugiyama 등<sup>14)</sup>의 결과와 일치하는 값이다. 한편, 5분 후 정상상태에 거의 도달하였다고 가정될 때의 ANS의 간세포내 농도는 배양액 중 초농도가 5, 30, 70  $\mu\text{M}$ 일 때 각각 125, 96, 65배가 배양액 농도보다 높게 나타났다. 따라서, ANS의 간세포내 이행과정에는 세포외로부터 세포내로의 농축기구가 존재한다는 사실을 알 수 있었다.

또한, ANS의 세포내 이행에 관한 파라메타( $V_{max}$ ,  $K_m$ )로부터 클리어런스( $CL_{up}$ )를 산출하였다. 본 실험에서  $K_m$ 에 대한  $V_{max}$ 의 비율로 계산된  $CL_{up}$ 는 11.7 ml/min/g liver의 값을 나타냈다. 한편, 정 등<sup>36)</sup>의 보고에 의하면, ANS를 정맥투여 후 혈장중 농도추이로부터 계산된  $CL_{up}$ 는 10 ml/min/g liver를 나타내어, 본 실험에 있어서의 결과와 일치되는 결과를 보여주고 있다. 따라서, 유리간세포를 사용한 본 실험

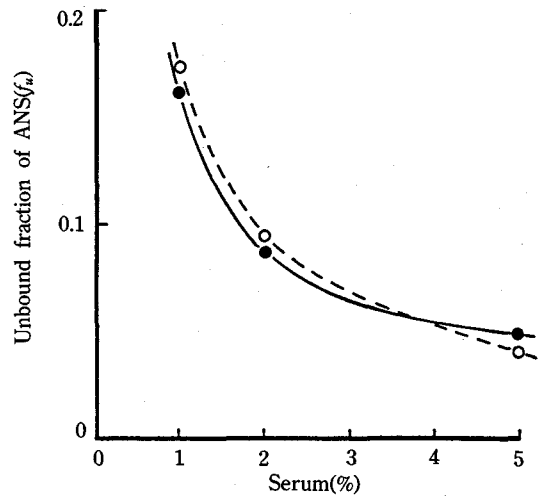


**Figure 2**—Kinetics of ANS uptake into isolated hepatocytes. (A) Plot of initial uptake rate vs. ANS concentration. (B) Eadie-Hofstee plot of ANS uptake into isolated hepatocytes. Initial uptake rate was measured within 1 minute of incubation, and was calculated by linear regression. Each point represents the mean±S.E. of three independent experiments.

혈에 있어서의  $CL_{up}$ 가 *in vivo*에 있어서의 막투과 (permeability)를 반영하는 것이라고 생각되었다. 또한, 이러한 사실들은 유리간세포를 사용한 ANS의 간내 이행에 관한 본 실험의 타당성과 정확성을



**Figure 3**—Time course of ANS uptake into isolate hepatocytes in the absence (○) and in the presence of serum (●, 1%; □, 2%; ▲, 5% in the medium). The initial concentration of ANS was 10 μM. Each point represents the Mean±S.E. of three independent experiments.



**Figure 4**—Relationship between unbound fraction of ANS (10 μM) determined by ultrafiltration method (●) and that calculated by the binding parameters ( $R_1=787.5 \mu\text{M}$ ,  $R_2=4171 \mu\text{M}$ ,  $Kd_1=1.7 \mu\text{M}$ ,  $Kd_2=837 \mu\text{M}$ )<sup>36</sup>) (○) (see text for details).

나타내 주는 결과라고 할 수 있다.

ANS의 간세포내 이행에 미치는 혈청단백의 영향  
혈청단백(1~5%)이 배양액 중에 존재할 경우, ANS(10 μM)의 간세포내 이행에 관한 시간적 변화량을 Fig. 3에 나타냈다. 배양액 중의 혈청단백의 양이 증가할수록 간세포내 이행속도는 감소하였으나

**Table I**—Change in the permeability clearance( $PS_{inf}$ ) of ANS uptake into isolated hepatocytes with varied serum concentrations compared with that predicted based on the unbound fraction of ANS.

serum concentration (%)	unbound fraction ( $f_u$ ) <sup>a</sup>	$V_{o(obs)}$ <sup>b</sup> (nmol/min/mg protein)	$V_{o(cal)}$ <sup>c</sup> (nmol/min/mg protein)	$PS_{inf(obs)}$ <sup>d</sup> (ml/min/g liver)	$PS_{inf(cal)}$ <sup>e</sup> (ml/min/g liver)
0	1.000	0.632	0.743	8.60	8.60
1	0.162	0.284	0.153	3.86	1.40
2	0.087	0.156	0.084	2.13	0.75
5	0.050	0.077	0.048	1.05	0.43

<sup>a</sup>Unbound frction( $f_u$ ) was determined by ultrafiltration method.

<sup>b</sup>Observed  $V_o$  was determined at a ANS concentration( $C_i$ ) of 10  $\mu$ M in the medium.

<sup>c</sup>Calculated  $V_o$  was obtained by the following equation based on the assumption that the uptake of ANS is driven exclusively by the unbound ANS:  $V_{o(cal)} = V_{max} \cdot f_u \cdot C_i / (K_m + f_u \cdot C_i)$ , where  $C_i$  is 10  $\mu$ M and the parameters for the uptake of unbound ANS were determined separately (see text for details;  $K_m = 29.1 \mu$ M,  $V_{max} = 2.9$  nmol/min/mg protein)

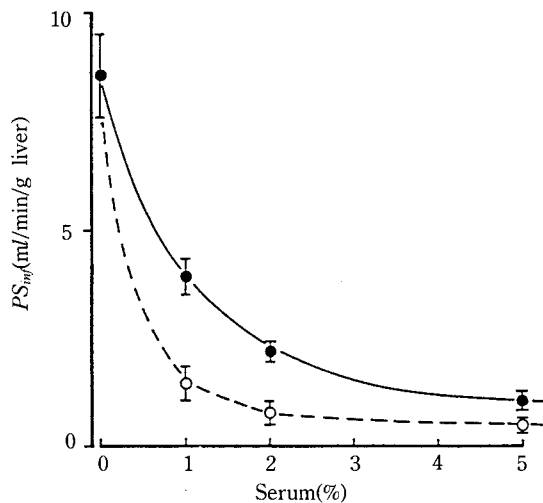
<sup>d</sup>Observed influx clearance was calculated by the equation (2)

<sup>e</sup>Calculated influx clearance was obtained by the equation:  $PS_{inf(cal)} = V_o / C_i / f_u$ . where  $V_o$  is initial uptake rate in the absence of serum (0%).

60초까지 직선성을 나타내어, 초속도를 60초까지의 데이터를 사용하여 선형최소자승법으로 산출하였다.

ANS의 간세포내 이행에 관한 혈청단백의 영향에 관해 보다 정량적으로 해석하기 위해 ANS의 혈청 단백질 결합률을 측정하였다. 본 실험에 있어서 단백질 결합률은 한외여과법으로 측정하였다. 또한, 100% 혈청을 이용하여 평형투석법으로 구한 단백질 결합에 관한 파라메타( $R_1 = 787.5 \mu$ M,  $R_2 = 4171 \mu$ M,  $Kd_1 = 1.7 \mu$ M,  $Kd_2 = 837 \mu$ M)<sup>36</sup>)로부터 산출한 값과 비교·검토하였다. 한외여과법으로 실측한 혈청중의 ANS 비결합형 분율 및 단백질결합에 관한 파라메타<sup>36</sup>)로부터 산출한 비결합형 분율을 각각 실선 및 점선으로 나타내었다(Fig. 4). 서로 큰 차이를 나타내지 않는 사실로부터 혈청의 희석에 의한 단백질결합에 관한 효과는 없는 것으로 생각되었다.

약물의 생체막 투과과정에 비결합형 약물농도만이 관여한다는 일반적인 가정으로부터, ANS의 간세포내 이행에 관한 초속도( $V_{o(cal)}$ )를 혈청중의 비결합형 분율로부터 예측하여 Table I에 나타내었다. ANS의 간세포내 이행에 관한 초속도( $V_{o(obs)}$ )는  $V_{o(cal)}$  보다 현저하게 증가된 사실을 알 수 있었다. 또한 ANS의 간세포내 이행에 관한 초속도로부터 산출한 막투과 클리어런스( $PS_{inf(obs)}$ )와 비결합형 분율로부터 예상한  $PS_{inf(cal)}$ 를 Table I에 각각 나타냈다.  $PS_{inf}$ 는 비



**Figure 5**—Permeability clearance ( $PS_{inf}$ ) of ANS uptake into isolated hepatocytes with varied serum concentrations (1-5%).

Keys: (●) Influx permeability clearance calculated by the equation 2. (○) Influx permeability clearance calculated by the following equation:  $PS_{inf} = V_o / C_i / f_u$ , where  $V_o$  is the observed initial uptake rate of ANS into isolated hepatocytes,  $C_i$  is the ANS initial concentration (10  $\mu$ M) in the medium and  $f_u$  is the unbound fraction.

결합형 분율로부터 예측한 값(점선)보다도 실측치(실선)가 2배 이상 높다는 것을 알 수 있었다(Table

I, Fig. 5). 따라서, ANS의 간내 이행과정에는 단백질 매개 이행기구(protein-mediated uptake mechanism)가 존재한다고 추정되었다. 한과 심<sup>28)</sup>은 그들의 종설에서 약물의 간내 이행에 있어서 단백질 매개 이행기전에 관한 여러 가설들에 대해 보고하였다. 그들은 이러한 현상에 대한 여러 가설들 중에서 어느 한 가지 기구만으로 설명되는 것이 아니라 각 기구가 복잡하게 관련되었을 가능성을 배제할 수 없다고 하였다. 또한 당초 알부민에서만 일어나는 것으로 여겨졌던 이 현상이 다른 혈청단백에 의해서도 나타난 점으로부터 알부민 특이성은 인정되지 않는다고 보고하였다.<sup>28)</sup> 현재, 가장 널리 인정되고 있는 개념으로는, 간세포 표면에 단백질과 결합하는 부위를 가정하여, 간세포 표면에 결합한 단백질-약물 복합체가 구조적 변화를 일으키는 것에 의해, 특이적으로 간세포 표면에서 약물이 해리되어 간내로 이행된다고 설명되고 있다. 한편, 정 등<sup>37)</sup>의 Sephadex G-200에 의한 gel 여과 실험에 의하면, ANS는 혈청단백중 대부분이 알부민과 결합한다고 보고하였다. 따라서, 본 실험에서 관찰된 ANS의 간내 이행에 대한 혈청단백의 영향은, 혈청단백 중에서도 알부민을 매개로 하는 이행기구가 존재하는 사실을 나타내 주는 것이라고 생각된다. 그러나, 현재로서는 ANS의 간내 이행에 관한 이러한 현상에 대해, 알부민 이외의 다른 혈청단백의 영향을 배제할 수 없다고 생각된다. 아울러, ANS 뿐만 아니라 약물이 간내로 이행되어 담즙으로 배설되기까지의 전 과정에 있어서, 이러한 단백질 매개 이행과정이 차지하는 기여율을 밝히는 것은 의미가 있는 일이라고 생각된다.

## 결 론

1. ANS의 유리간세포내로의 이행에 관한 초속도로부터, 최대 이행속도( $V_{max}$ ), Michaelis-Menten 정수( $K_m$ )를 산출하여 각각  $2.9 \pm 0.1$  (nmol/min/mg protein) 및  $29.1 \pm 3.2$  ( $\mu M$ )의 값을 얻었으며, 이행에 관한 클리어런스( $CL_{up} = 11.7$  ml/min/g liver)를 산출하였다. 이러한 결과들은 ANS 정맥투여 후의 혈장중 농도추이로부터 계산된 값과 일치하는 것으로 *in vivo*와의 좋은 상관성을 나타내었다.

2. ANS의 유리간세포내로의 이행에 미치는 혈청

단백(1~5%)의 영향에 관해 검토한 결과, 혈청단백 존재하에서의 막투과 클리어런스( $PS_{ij}$ )의 값은, 실측치가 비결합형 분율로 예측한 이론치보다 높았다. 따라서, ANS의 간내 이행과정에는 단백질 매개 이행기구(protein-mediated uptake mechanism)가 존재한다고 추정되었다.

## 문 헌

- 1) B.F. Scharschmidt, J.G. Waggoner and P.D. Berk, Hepatic organic anion uptake in the rat, *J. Clin. Invest.*, **56**, 1280 (1975).
- 2) B.F. Goresky, Initial distribution and rate of uptake of sulfobromophthalein in the liver, *Am. J. Physiol.*, **207**, 13 (1964).
- 3) J-C. Glasinovic, M. Dumont, M. Duval and S. Erlinger, Hepatocellular uptake of taurocholate in the dog, *J. Clin. Invest.*, **55**, 419 (1975).
- 4) T. Iga and C.D. Klaassen, Hepatic extraction of nonmetabolizable xenobiotics in rats, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **211**, 690 (1979).
- 5) G. Paumgartner and J. Reichen, Different pathways for hepatic uptake of taurocholate and indocyanine green, *Experientia(Basel)*, **32**, 306 (1975).
- 6) G. Paumgartner and J. Reichen, Kinetics of hepatic uptake unconjugated bilirubin, *Clin. Sci. Mol. Med.*, **51**, 169 (1976).
- 7) J. Reichen and G. Paumgartner, Uptake of bile acids by perfused rat liver, *Am. J. Physiol.*, **231**, 734 (1976).
- 8) A.W. Wolkoff, C.A. Goresky, J. Sellin, Z. Gatmaith and I.M. Arias, Role of ligandin in transfer of bilirubin from plasma into liver, *Am. J. Physiol.*, **236**, E638 (1979).
- 9) U. Gartner, R.J. Stockert, W.G. Levine and A. W. Wolkoff, Effect of Nafenopin on the uptake of bilirubin and sulfobromophthalein by isolated perfused rat liver, *Gastroenterology*, **83**, 1163 (1982).
- 10) L. Schwarz, R. Burr, M. Schwenk, E. Pfaff and H. Greim, Uptake of taurocholic acid into isolate rat-liver cells, *Eur. J. Biochem.*, **55**, 617 (1975).
- 11) M. Schwenk, R. Burr, L. Schwarz and E. Pfaff,

- Uptake of Bromosulphthalein by isolated liver cells, *Eur. J. Biochem.*, **64**, 189 (1976).
- 12) M.S. Anwer, R. Korcker and D. Hegner, Cholic acid uptake into isolated hepatocytes, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **357**, 1477 (1976).
  - 13) S.C. Tsao, Y. Sugiyama, K. Shinmera, Y. Sawada, S. Nagase, T. Iga and M. Hanano, Protein-mediated hepatic uptake of rose bengal in analbuminemic mutant rats (NAR), *D. Meta. Disposi.*, **16**, 482 (1988).
  - 14) Y. Sugiyama, S. Kimura, J.H. Lin, M. Izukura, S. Awazu and M. Hanano, Effects of organic anions on the uptake of 1-anilino-8-naphthalene sulfonate by isolated liver cells, *J. Pharm. Sci.*, **72**, 8, 871 (1983).
  - 15) M. Inoue, R. Kinne, T. Tran and I. M. Arias, Taurocholate transport by rat liver sinusoidal membrane vesicles, *Hepatology*, **2**, 572 (1982).
  - 16) C.D. Michael, B.L. Blitzer and J.L. Boyer, Direct determination of the driving forces for taurocholate uptake into rat liver plasma membrane vesicles, *J. Clin. Invest.*, **72**, 1470 (1983).
  - 17) B.L. Blitzer, C. Terzakis and K.A. Scotl, Hydroxyl/bile acid exchange, *J. Biol. Chem.*, **261**, 12042 (1986).
  - 18) P.D. Berk, B.J. Potter and W. Stremmel, Role of plasma membrane ligand-bound organic anions, *Hepatology*, **7**, 165 (1987).
  - 19) A.J. Levi, Z. Gatmaitan and I.M. Arias, Two hepatic cytoplasmic protein fractions, Y and Z, and their possible role in the hepatic uptake of bilirubin, sulfobromophthalein, and other anions, *J. Clin. Inves.*, **48**, 2156 (1969).
  - 20) G. Litwack, B. Ketterer and I.M. Arias, Ligandin: a hepatic protein which binds steroids, bilirubin, carcinogens and a number of exogenous organic anions, *Nature*, **234**, 466 (1971).
  - 21) W.H. Habig, M.J. Pabst and G. Fleischner, Z. Gatmaitan, I.M. Arias and W.B. Jakoby, The identity of glutathion S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **71**, 3879 (1974).
  - 22) R. Weisiger, J. Gollan and R.K. Ockner, Receptor for albumin on the liver cell surface may mediate uptake of fatty acids and other albumin-bound substances, *Science*, **211**, 1048 (1981).
  - 23) R.K. Ockner, R.A. Weisiger and J.L. Gollan, Hepatic uptake of albumin-bound substances: the albumin receptor concept, *Am. J. Physiol.*, **245**, 613 (1983).
  - 24) E.L. Forker and B.A. Luxon, Albumin helps mediate removal of taurocholate by rat liver, *J. Clin. Inves.*, **67**, 1517 (1981).
  - 25) E.L. Forker and B.A. Luxon, Hepatic transport and binding of rose bengal in the presence of alumin and gamma globulin, *Am. J. Physiol.*, **248**, G702 (1985).
  - 26) E.L. Forker and B.A. Luxon, Effects of unstirred disse fluid, nonequilibrium binding, and surface-mediated dissociation on hepatic removal of albumin-bound organic anions, *Am. J. Physiol.*, **248**, G709 (1985).
  - 27) R.A. Weisiger Dissociation from albumin: A potentially rate-limiting step in the clearance substaces by the liver, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **82**, 1563 (1985).
  - 28) 한용해, 심창구, 약물의 간내 이행기전과 알부민의 역할, 약제학회지, **20**, 179 (1990).
  - 29) L. Stryer, Fluorescence spectroscopy of proteins. Fluorescent probes provide insight into the structure, interactions, and dynamics of proteins, *Science*, **162**, 526 (1968).
  - 30) B. Rabalcava, D. Martinez de Munoz and C. Gitler, Interaction of fluorescent probes with membranes. I, Effect of ions on erythrocyte membranes, *Biochemistry.*, **8**, 2742 (1969).
  - 31) P.A.G. Fortes and J.F. Hoffman, Interactions of the fluorescent anion ANS with membrane charge in human red cell ghosts, *J. Membr. Biol.*, **5**, 154 (1971).
  - 32) S. Cheng and D. Levy, The interaction of the anionic fluorescence probe, ANS, with hepatocytes and hepatoma tissue culture cells, *Biochem. Biophys. Acta.*, **511**, 419 (1978).
  - 33) H. Baur, S. Kasperek and E. Pfaff, Criteria of viability of isolated liver cells, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **356**, 827-838 (1975).
  - 34) T. Iga, D.L. Eaton and C.D. Klaassen, Uptake of unconjugated bilirubin by isolated rat hepatocytes, *Am. J. Physiol.*, **236**, C9-C14 (1979).

- 35) T. Nakagawa, Y. Koyanagi and H. Togawa, "SALS, a Computer Program for Statistical Analysis with Least Squares Fitting." Library program of the University of Tokyo Computer Center, Tokyo, Japan, 1978.
- 36) Y.B. Chung, S. Miyauchi, Y. Sugiyama, H. Harashima, T. Iga and M. Hanano Kinetic Analysis of the Dose-Dependent Hepatic Handling of 1-Anilino-8-Naphthalene Sulfonate in rats, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **18**, 313-333 (1990).
- 37) Y.B. Chung, S. Miyauchi, Y. Sugiyama, H. Harashima, T. Iga and M. Hanano, Effect of various organic anions on the plasma disappearance of 1-anilino-8-naphthalene sulfonate, *J. Hepatology*, **11**, 240-251 (1990).