약제학회지(1992), 제22권 제1호
J. Kor. Pharm. Sci., Vol. 22, No. 1, 11-21(1992)

유기 음이온계 약물의 간내 이행과정에 있어서 Cytoskeleton의 역할에 관한 속도론적 연구

정연복† · 한 건 · 육동연
충북대학교 약학대학
(1992년 2월 15일 접수)

Kinetic Analysis of the Hepatic Transport of Organic Anions: Role of Intracellular Cytoskeleton

Youn Bok Chung†, Kun Han and Dong Yeon Yuk
College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 360-763, Korea
(Received February 15, 1992)

The effects of colchicine on the plasma elimination and biliary excretion of various organic anions in rats were examined. Elimination of indocyanine green (ICG) or rose bengal (RB) from plasma was significantly delayed when rats were treated with colchicine (3 mg/kg body weight) 3 hr prior to the administration of the dye. On the other hand, disappearance of sulfobromophthalein (BSP) or bromophenol blue (BPB) from plasma was not influenced by colchicine. The plasma disappearance and biliary excretion of organic anions were kinetically analyzed based on a compartment model, in which the deep compartment and the unknown disposition are incorporated. The transfer rate constants of ICG or RB, k_{23} (from the liver to the deep compartment) and k_{3B} (from the deep compartment to the bile), were decreased by colchicine, but those of BSP or BPB were not changed. A mechanism for the decrease in the k_{23} and k_{3B} values for ICG and RB might be explained by a inhibition of colchicine to the intracellular cytoskeleton. The hepatocellular distribution of RB or BPB was then determined. BPB mainly distributed to the cytosolic fraction, but RB distributed to each hepatocyte organelle. Taken together, it was suggested that ICG or RB is transported through hepatocytes into bile with the aid of the cytoskeleton, whereas BSP or BPB is handled by hepatocytes in a different way.

Keywords—Organic anions, biliary excretion, indocyanine green, rose bengal, colchicine, sulfobromophthalein, bromophenol blue, cytoskeleton, hepatocyte.

약물의 간수송에 관한 연구는 주로 유기음이온계 약물, 담즙산 및 유리지방산을 이용하여 여러 실험계에서 이루어져 왔다. 예를 들면, 동물을 이용한 ***in vivo*** 실험,[1-4] 간관류법,[5-9] 유리간세포(isolated hepatocytes)[10-14] 또는 막 vesicle[15-18]을 이용한 실험 등이 있다. 이러한 실험결과에 의하면, 간기능 검사약으로 사용되고 있는 sulfobromophthalein (BSP), indocyanine green(ICG), rose bengal(RB) 및 bromophenol blue(BPB) 등의 유기음이온계 약물들은 혈관측에 접해 있는 sinusoidal 막의 담체에 의해 혈중으로부터 신속하게 간내로 이행된다고 보고되고 있다.[5,6,10,11,19] 간세포내로 이행된 이들 유기음이온계 약물들은 ligandin 등의 세포질내 단백질과 강력히 결합함으로써, 간세포로부터 혈액측으로의 efflux를 저해하여 약물의 간내 이행을 촉진시킨다고도 보고되고 있다.[20,21] 또한, 간세포내로 이행된 약물의 일부는 대사되고, 나머지 일부는 세포내 수송(intracellular transport)을 거쳐서 담즙으로 배설

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

된다.

담즙배설 과정에 있어서도, bile 측애 접해 있는 형질막인 canalicular막에 존재하는 담체에 의해 수송된다고 알려져 있으나 세포내 수송과 담즙분비에 관한 연구는 아직 미지의 부분이 많이 있는 실정이다. 그 원인으로서는, (i) 분리세포에서는 수송방향성이 소실되므로 연구수단으로 사용하는 것이 불가능한 점, (ii) *in vivo*계, 관류계에서는 혈액 중이나 관류액 중에 약물을 투여한 후에 담즙배설을 측정하여도 그 중간에 간장이라고 하는 콤파트멘트가 존재하는 관계로 그 해석이 용이하지 않는 점, (iii) 이러한 점을 극복하기 위해서는 간내의 약물농도와 담즙배설량의 추이를 동시에 측정하는 것이 필요하나, 간장중 약물량의 추이를 측정하기 위해서는 동물 한마리 당 한 점의 데이타 밖에 얻을 수 없기 때문에 실험이 곤란하다는 점 등을 들 수 있다. 유기음이온의 담즙배설 기구에 관한 지금까지의 통설은 담체가 관여하는 수송과정으로 일어나며, 또한 담즙산의 담체와는 다르지만 유기음이온 간에는 공통의 담체를 공유하는 것으로 생각되고 있다.[4]

최근 doublet cell을 사용한 Philips 등[21]의 연구에 의해 약물의 담즙분비에 cytoskeleton이 관여함이 밝혀졌으며, 또한 대부분의 고분자성 물질의 세포내 수송 및 담즙배설에도 cytoskeleton이 관여한다는 사실이 보고되고 있다.[22] Cytoskeleton은 일반적으로 섬유상 단백질에 의해 구성된 일종의 초분자적 구조체(supramolecular structure)라고 정의되며, microfilament, microtubule, 그리고 직경이 이들의 중간인 중간경 filament(intermediated filament)로 분류된다. 실제로 담즙산의 세포내 수송 및 담즙배설에 관한 cytoskeleton의 역할이 중요시되고 있으며,[23] colchicine, cytochalasin, vinblastine, phalloidin 등의 저해제를 사용한 실험을 통하여 담즙산, bilirubin, biliary lipid 등의 세포내 수송 및 담즙배설에 관한 cytoskeleton의 관련성이 밝혀져 왔다.[25]

Mori 등[26]은 최근의 *in vivo* 연구에서 colchicine 등의 cytoskeleton 저해제로 전처리한 랫트에 간기능 검사약인 ICG 및 BSP의 간으로의 이행을 측정한 결과 ICG의 담즙배설만이 저해된다고 보고하였다. 그러나 이러한 사실은 속도론적 관점으로 보면 해석이 불충분 할 뿐 아니라 간장내에서 어떤 과정이 주로 저해되었는가에 관해서도 명확하지 않다.

따라서 본 연구에서는 이러한 cytoskeleton 저해제를 사용하여 약물의 세포내 수송 및 담즙배설에 관한 cytoskeleton의 역할을 검토하였다. 특히 담즙배설 양상이 서로 다르다고 알려진 수종의 유기음이온계 약물을 모델약물로 사용하여, cytoskeleton 저해제로 전처리한 랫트에 정맥투여한 후 얻어진 혈중농도 추이와 담즙배설 추이를 속도론적으로 해석함으로써 저해가 일어나는 과정을 명확히 밝히고자 하였다.

실험 방법

시약 및 기기

Sulfobromophthalein 및 indocyanine green은 Diichi Chemical Co.(Tokyo, Japan)으로부터 구입하여 사용하였다. Rose bengal(Wako Pure Chemical Co., Tokyo, Japan), bromophenolblue(Tokyo Chemical Industries, Co., Tokyo, Japan), bovine serum albumin 및 colchicine(Sigma Chemical Co., Osaka, Japan)을 사용하였으며 기타 시약은 도두 특급을 사용하였다.

각 유기음이온계 약물들의 정량을 위해 흡광광도계(Cecil Instruments Ltd, England)를 사용하였으며, 채취한 혈액은 탁상용 원심분리기(Beckman Industries, Fullerton, CA)를 사용하여 혈장을 분리하였다.

실험동물 및 동물 실험방법

물(상수)과 사료(천하사)를 자유로이 공급하면서 사육한, 체중 200-280g의 웅성 S.D.계 랫트(오산동물센타, 경기도)를 사용하였다.

실험하기 3시간 전에 cytoskeleton 저해제(colchicine)를 3 mg/kg(체중)씩 복강내에 투여하여 전처리한 랫트를 에텔로 가볍게 마취시킨 후 좌측 대퇴부 동맥 및 정맥에 폴리에칠렌 튜브(PE-50, Intramedic®, Clay Adams, U.S.A)를 삽관하고, 또한 개복하여 담관에 PE-10 카테터를 삽입하고 고정하였다. 랫트가 마취로부터 회복된 후에 각 유기음이온(ICG, BSP, RB, BPB ; 10 μmol/kg)을 대퇴정맥으로 투여한 다음 혈액과 담즙을 각각 대퇴동맥 및 담관으로부터 경시적으로 채취하였다. 채혈시에는 약 200 μl의 혈액을 마이크로튜브에 받아서 탁상용 원심분리기를 사용하여 원심분리 후 얻어진 혈장 70 μl를 담즙(50 μl)과 함께 정량에 사용하였다. 실험 중에는

heat lamp를 사용하여 rat의 체온을 37℃로 유지시켜 주었다. 담즙의 용량은 담즙의 비중을 1.0으로 하여 담즙의 중량으로부터 환산하였다.

혈장중 유기음이온류의 정량

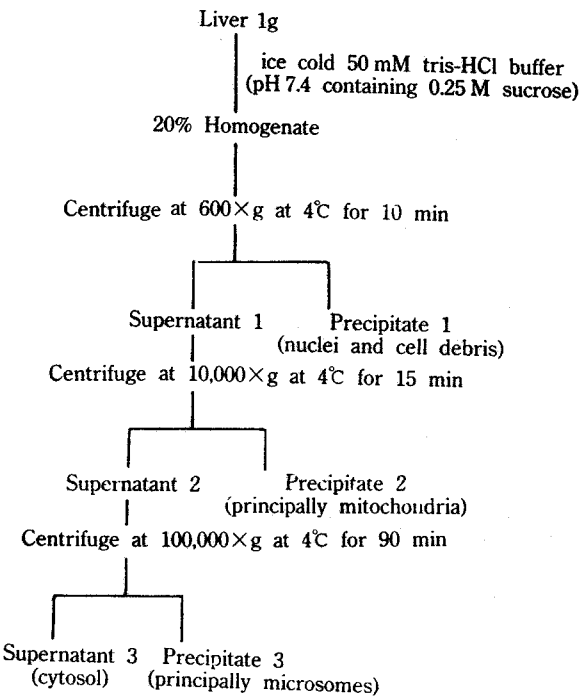
혈장 70 μl 및 담즙 50 μl를 취하여 3 ml의 증류수(RB의 경우), 0.05 N NaOH(BSP의 경우), 50 mM tris-HCl 완충액(pH 7.4 ; BPB의 경우) 및 50 mM tris-HCl 완충액(pH 7.4, 1% BSA 함유 ; ICG의 경우)으로 각각 희석하여 가볍게 진탕한 후, 최대 흡수파장(RB : 560 nm, BSP : 578 nm, BPB : 600 nm 및 ICG : 800 nm)에서 각각 흡광도를 측정하였다.

유기음이온류의 간세포내 분포측정

각 유기음이온계 약물(RB 및 BPB : 60 μmol/kg)을 랫트에 정맥투여한 15분 후, 간장을 적출하여 여과지로 습기를 제거한 후 중량을 달았다. 곧 이어 얼음으로 냉각시킨 50 mM tris-HCl 완충액(pH 7.4, 0.25 M sucrose 함유)에 넣어 세척한 후 homogenizer(A glass Potter-Elvehjem-type with a Teflon pestle)를 사용하여 20% 균질액으로 하였다. 얻어진 균질액 일정 소량을 사용하여 Scheme I에 나타낸 방법으로 간세포내 각 분획을 분취하였다. 즉, 4℃에서 10분간 원심분리(600×g)하여 침전물(nuclei 및 cell debris)을 얻고, 그 상징액을 4℃에서 15분간 원심분리(10,000×g)하여 미토콘드리아 분획을 얻었다. 또한 그 상징액을 4℃에서 90분간 초원심분리(100,000×g)를 하여 마이크로솜 분획을 얻었다. 100,000×g 상징액은 간세포질(cytosol)로서 사용하였다. 얻어진 각 분획을 50 mM tris-HCl 완충액(pH 7.4, 0.25 M sucrose 함유)을 사용하여 각각 50% 균질액으로 한 후, 그 균질액 0.4 ml 및 세포질 0.4 ml에 3.6 ml 에탄올을 가하여 추출, 원심분리(3500 rpm, 15분간)하였다. 그리고 상징액 중의 유기음이온계 약물의 정량은 각각의 흡수극대파장에서 흡광도를 측정하여 행하였다. 각 분획으로부터 에탄올의 추출에 의한 RB 및 BPB의 회수율은 95% 이상을 나타내었으며, 전술한 혈장 및 담즙 중 약물 정량시와는 별도의 검량선을 사용하였다.

혈청 GOT 및 GPT 측정

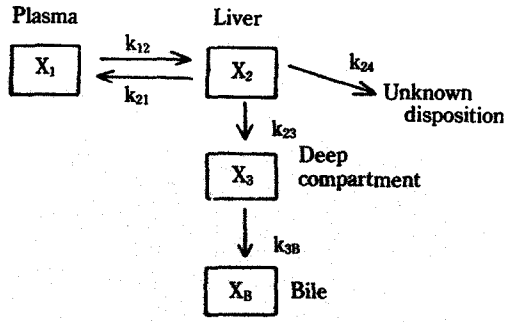
Colchicine 투여에 의한 랫트의 혈청 중 GOT와 GPT의 변화여부를 검토하였다. Colchicine 또는 생리식염수를 투여하여 3시간이 지난 후 랫트를 에테르로 가볍게 마취시키고, 혈액의 용혈을 방지하기 위해 경동맥에 PE-50 catheter를 삽입하여 tube 기벽을 따라 조심스럽게 혈액을 취하였다. 채취한 혈액을 30분간 방치한 후 탁상용 원심분리기를 사용하여 혈청을 분리하였다. 혈청 GOT 및 GPT는 Reitman Frankel법을 이용하여 측정하였다. 즉, GOT의 경우 기질액 1 ml를 37℃의 수조에서 2-3분간 가온한 후 피검혈청 0.2 ml를 가해 37℃ 수조에서 60분 동안 작용시켰다. 그리고 발색액 1 ml를 가해 20분간 방치하고 0.4 N NaOH 10 ml를 충분히 혼합한 후 증류수를 대조로 하여 505 nm에서 흡광도를 측정하였다. GPT의 경우도 같은 방법으로 하되 피검혈청 0.2 ml를 가한 후 37℃ 수조에서 30분간 작용시킨 뒤 GOT와 동일한 방법으로 측정하였다.



Scheme I—*Subcellular fraction of the liver. Nuclei and cell debris, mitochondria, microsomes and cytosol fractions are obtained from the precipitate 1, 2, 3 and the supernatant 3, respectively.*

혈장중 약물농도 및 담즙배설 추이의 속도론적 해석

혈장중 농도 추이 및 담즙배설 데이타로부터 약물의 간장내 거동을 해석하기 위해 Scheme II에 나타낸 모델을 사용하였다. 본 실험에 사용된 유기



Scheme II—*Pharmacokinetic model for hepatic transport of organic anions.*

음이온계 약물은 혈중으로부터 대부분이 간으로 이행되어 배설되므로[20,21] 콤파트멘트 2는 간장내에 해당된다고 가정하였다.

각 콤파트멘트내의 약물에 대한 mass balance를 식으로 나타내면 다음과 같다.

$$\frac{dX_1}{dt} = -k_{12}X_1 + k_{21}X_2 \quad (1)$$

$$\frac{dX_2}{dt} = k_{12}X_1 - (k_{21}+k_{23}+k_{24})X_2$$
$$= k_{12}X_1 - K_2X_2 (\text{단, } K_2 = k_{21}+k_{23}+k_{24}) \quad (2)$$

$$\frac{dX_3}{dt} = k_{23}X_2 - k_{3B}X_3 \quad (3)$$

(1), (2), (3)식을 변환하면 각각 (4), (5), (6)식으로 나타낼 수 있다.

$$C_1 = \frac{D(\alpha-K_2)}{V_1(\alpha-\beta)}e^{-\alpha t} + \frac{D(K_2-\beta)}{V_1(\alpha-\beta)}e^{-\beta t}$$
$$= Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t} \quad (4)$$

$$X_2 = Dk_{12}\left(\frac{1}{\alpha-\beta}e^{-\alpha t} - \frac{1}{\alpha-\beta}e^{-\beta t}\right) \quad (5)$$

$$X_3 = Dk_{12}k_{23}\left\{\frac{1}{(\alpha-\beta)(\alpha-k_{3B})}e^{-\alpha t} + \frac{1}{(\beta-k_{3B})(\beta-\alpha)}e^{-\beta t} + \frac{1}{(\beta-k_{3B})(\alpha-k_{3B})}e^{-k_{3B}t}\right\} \quad (6)$$

한편 $X_B = \int k_{3B} X_3 \, dt$로 나타낼 수 있으므로 (6)식으로부터 (7)식을 유도할 수 있다.

$$X_B = Dk_{12}k_{23}k_{3B}\left\{\frac{1-e^{-k_{3B}t}}{k_{3B}(\alpha-k_{3B})(\beta-k_{3B})} + \frac{1-e^{-\alpha t}}{\alpha(k_{3B}-\alpha)(\beta-\alpha)} + \frac{1-e^{-\beta t}}{\beta(k_{3B}-\beta)(\alpha-\beta)}\right\} \quad (7)$$

여기서 D는 투여량이고 A 및 B는 체순환 콤파트멘트중 약물의 분포 및 소실상에서 $t=0$일 때의 값을 나타내고, 또한 α 및 β는 분포 및 소실상의 기울기를 나타낸다.

혈중농도-시간 추이 및 누적담즙배설량 데이타를 식 (4)-(7)에 비선형 최소자승법[27]으로 동시에 피팅(fitting)하여 각 파라메타(A, B, α, β, k_{12}, k_{21}, k_{23}, k_{24}, k_{3B})를 산출하였다. 각 파라메타의 관계식 및 기타 파라메타를 구하는 식은 다음과 같다.

$$V_1 = \text{Dose}/(A+B) \quad (8)$$

$$V_2 = V_1 \cdot k_{12}/(k_{21}+k_{el}) \quad (9)$$

$$k_{12} = (A\alpha + B\beta)/(A+B) \quad (10)$$

$$k_{21} = (\alpha+\beta) - (k_{12}+k_{el}) \quad (11)$$

$$k_{el} = k_{23}+k_{24} = \alpha\beta/k_{12} \quad (12)$$

$$CL_{up} = k_{12} \cdot V_1 \quad (13)$$

$$CL_{tot} = \text{Dose}/AUC = \text{Dose}/(A/\alpha + B/\beta) \quad (14)$$

여기서, V_1과 V_2는 각각 체순환 콤파트멘트와 간의 분포용적(ml/kg)을, k_{12}, k_{21}, k_{el}을 각각 total 약물에 대한 influx, efflux, elimination 속도정수(min^{-1})를, CL_{up}, CL_{tot}는 각각 total 약물에 대한 uptake 및 전신클리어런스(ml/min/kg)를 나타낸다.

결 과

유기음이온계 약물의 혈장중 소실 및 담즙배설에 미치는 Colchicine의 영향

유기음이온계 약물의 혈장중 농도 추이에 미치는 세포내 골격계(intra-cellular cytoskeleton), 저해제(colchicine)의 영향을 Fig. 1에 나타내었다. Colchicine 3 mg/kg을 랫트의 복강내 투여한 3시간 후 각 약물(10 μmol/kg 체중)을 정맥주사한 결과를 대조군과 함께 나타내었다. Colchicine의 전처리에 의해

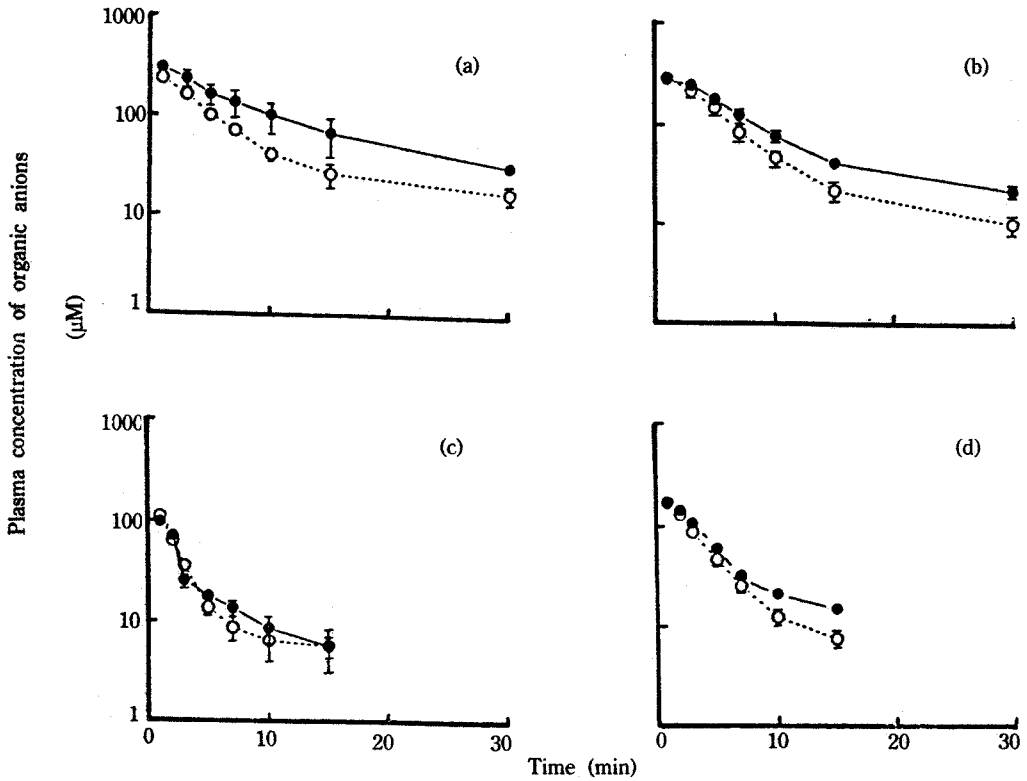


Figure 1—Effect of colchicine on the plasma disappearance curves of organic anions. Colchicine (3 mg/kg) was injected intraperitoneally 3 hr prior to the administration of each organic anions at a dose of 10 μmol/kg (●; colchicine treated group, ○; control group). Each point represents the mean± SE of three rats. Panels: (a) RB, (b) ICG, (c) BSP, (d) BPB

RB의 혈장중 소실 패턴이 현저히 감소된다는 것을 알 수 있었다. 또한 ICG도 저해제에 의해 혈장중 소실패턴이 약간 감소되었다. 한편 BSP, BPB는 분포후상에서 대조군과 차이를 나타내고 있으나 저해제의 영향을 크게 받지는 않는다고 생각되었다. 각 유기음이온계 약물의 담즙배설 추이에 미치는 저해제의 영향을 Fig. 2에 각각 나타내었다. 랫트 체중당 배설량을 시간 간격으로 나타내었는데, RB 및 ICG는 비교적 담즙배설이 늦게 나타난 반면, BSP 및 BPB는 담즙배설 속도가 빠르다는 것을 알 수 있었다. 또한 비교적 담즙배설이 느린 RB 및 ICG는 대조군에 비해 저해제에 의해 담즙배설이 현저히 감소되었으나 BSP 및 BPB의 담즙배설은 저해제에 의한 유의한 차이를 나타내지 않았다.

유기음이온계 약물의 혈장중 소실 추이 및 담즙배설 추이에 대한 속도론적 해석

이러한 유기음이온계 약물들이 혈중으로부터 담즙으로 배설되는 과정에 있어서 차이점을 속도론 모델에 의해 해석하였다. 특히 간장내에서의 세포내 수송 및 담즙배설과정에 있어서 deep compartment 및 unknown disposition을 고려한 모델을 구축하여, 식 (4)-(7)에 의해 혈장중 농도 및 담즙배설 데이타를 비선형 최소자승법[27]으로 동시에 fitting하여 속도론적 파라메타를 산출하였다(Table I-IV). 혈장중소실 및 담즙배설이 비교적 느린 RB 및 ICG의 경우는 저해제에 의해 k_{23}(간장내에서 deep compartment로의 이행을 나타내는 속도정수) 및 k_{3B}(담즙배설과정의 속도정수)가 현저히 저하된다는 사실을 알 수 있었으나, 혈장중소실 및 담즙배설이 비교적 빠른 BSP 및 BPB의 경우는 k_{23}, k_{3B} 및 k_{24} 모두 유의한 차이를 나타내지 않았다.

유기음이온계 약물의 간세포내 분포

Fig. 3은 혈장중 소실 및 담즙배설이 비교적 느린 RB 및 두 과정이 비교적 빠른 BPB의 간세포내

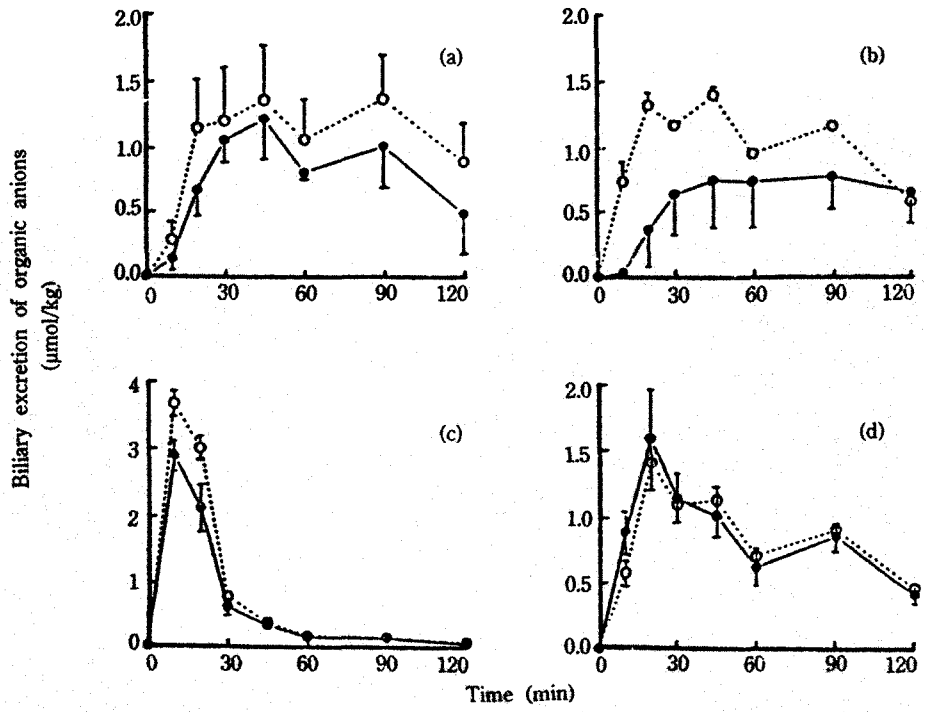


Figure 2—Effect of colchicine on the biliary excretion of organic anions. Colchicine (3 mg/kg) was injected intraperitoneally 3 hr prior to the administration of each organic anion at a dose of 10 μmol/kg (●; colchicine treated group, ○; control group). Each point represents the mean± SE of three rats. Panels: (a) RB, (b) ICG, (c) BSP, (d) BPB

Table I—*Effect of Colchicine on the Pharmacokinetic Parameters of RB after its i.v. Administration (10 μmol/kg).*[a]

Parameters	Control	Colchicine
V_1 (ml/kg)	32.2± 3.3	29.0± 1.9
V_2 (ml/kg)	118.3± 1.1	120.5± 3.7
V_{dss} (ml/kg)	150.5± 3.9	149.6± 3.1
K_{12} (min^{-1})	0.177± 0.026	0.188± 0.038
K_{21} (min^{-1})	0.017± 0.001	0.030± 0.007*
K_{23} (min^{-1})	0.009± 0.004	0.005± 0.001*
K_{24} (min^{-1})	0.021± 0.003	0.013± 0.007*
K_{3B} (min^{-1})	0.080± 0.009	0.024± 0.003**
CL_{up} (ml/min/kg)	5.55± 0.72	5.70± 1.40
CL_{tot} (ml/min/kg)	3.52± 0.83	2.13± 0.59*

[a]Mean± S.E. of three rats.
*Significantly different from the control rats ($p<0.005$).
**Significantly different from the control rats ($p<0.001$)

Table II—*Effect of Colchicine on the Pharmacokinetic Parameters of ICG after its i.v. Administration (10 μmol/kg).*[a]

Parameters	Control	Colchicine
V_1 (ml/kg)	23.9± 0.5	26.9± 3.1
V_2 (ml/kg)	82.2± 12.0	89.8± 7.2
V_{dss} (ml/kg)	106.0± 13.0	116.7± 10.0
K_{12} (min^{-1})	0.361± 0.014	0.329± 0.009
K_{21} (min^{-1})	0.022± 0.003	0.031± 0.003*
K_{23} (min^{-1})	0.018± 0.002	0.007± 0.001**
K_{24} (min^{-1})	0.071± 0.010	0.054± 0.005*
K_{3B} (min^{-1})	0.069± 0.007	0.048± 0.012*
CL_{up} (ml/min/kg)	8.66± 0.50	8.80± 0.85
CL_{tot} (ml/min/kg)	6.87± 0.58	6.07± 0.65

[a]Mean± S.E. of three rats.
*Significantly different from the control rats ($p<0.05$).
**Significantly different from the control rats ($p<0.01$)

분포를 각각 나타낸 것이다. RB은 세포질 뿐아니라 각 분획으로의 분포도 큰 반면, BPB는 주로(70% 이상) 세포질에 분포함을 알 수 있었다. 따라서, RB 및 ICG는 간장내에서 미세기관 등의 분비과립에 의해 수송이 되기 때문에 담즙배설이 비교적 느린 반면, BPB 및 BSP는 주로 세포질과 결합하여 쉽게

Table III—*Effect of Colchicine on the Pharmacokinetic Parameters of BSP after its i.v. Administration (10 μmol/kg).*[a]

Parameters	Control	Colchicine
V_1 (ml/kg)	38.4± 3.2	32.6± 1.1
V_2 (ml/kg)	285.8± 16.0	124.1± 7.8*
V_{dss} (ml/kg)	324.2± 18.0	156.8± 6.7*
K_{12} (min^{-1})	0.829± 0.060	0.959± 0.091
K_{21} (min^{-1})	0.032± 0.006	0.123± 0.002*
K_{23} (min^{-1})	0.019± 0.001	0.019± 0.002
K_{24} (min^{-1})	0.075± 0.007	0.081± 0.022
K_{3B} (min^{-1})	0.338± 0.001	0.412± 0.107
CL_{up} (ml/min/kg)	31.9± 3.94	31.0± 1.77
CL_{tot} (ml/min/kg)	22.9± 5.01	15.7± 1.03*

[a]Mean± S.E. of three rats.
*Significantly different from the control rats ($p<0.05$)

Table IV—*Effect of Colchicine on the Pharmacokinetic Parameters of BPB after its i.v. Administration (10 μmol/kg).*[a]

Parameters	Control	Colchicine
V_1 (ml/kg)	36.9± 0.9	32.7± 2.3
V_2 (ml/kg)	174.6± 48.7	121.1± 17.2*
V_{dss} (ml/kg)	211.5± 48.5	153.9± 19.5*
K_{12} (min^{-1})	0.412± 0.009	0.423± 0.012
K_{21} (min^{-1})	0.027± 0.010	0.042± 0.001*
K_{23} (min^{-1})	0.012± 0.003	0.011± 0.004
K_{24} (min^{-1})	0.069± 0.015	0.065± 0.008
K_{3B} (min^{-1})	0.088± 0.034	0.108± 0.019
CL_{up} (ml/min/kg)	15.2± 0.25	13.8± 0.57
CL_{tot} (ml/min/kg)	11.6± 0.41	8.77± 0.13*

[a]Mean± S.E. of three rats.
*Significantly different from the controi rats ($p<0.05$)

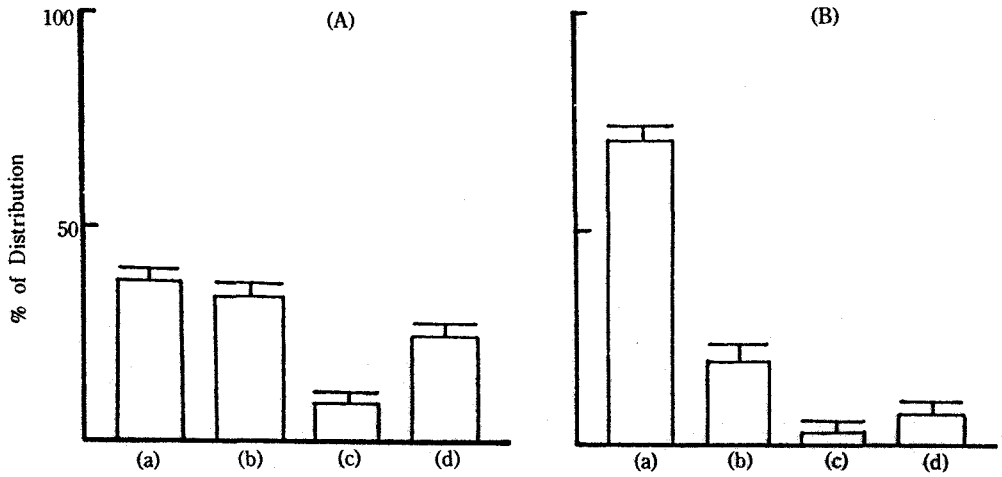


Figure 3—Hepatocellular distribution of RB (A) or BPB (B) at 15 min after its i.v. bolus administration (60 μmol/kg). The results were expressed as the percentage of the amount of organic anions in a subcellular fraction to the total amount in the liver. Each value represents the mean± SE of three rats.
Key: (a) Cytosol, (b) Nuclei and cell debris, (c) Microsome, (d) Mitochondria.

bile canalicular 막 측으로 수송되기 때문에 담즙 배설이 비교적 빠르게 나타나는 것으로 추정되었다.

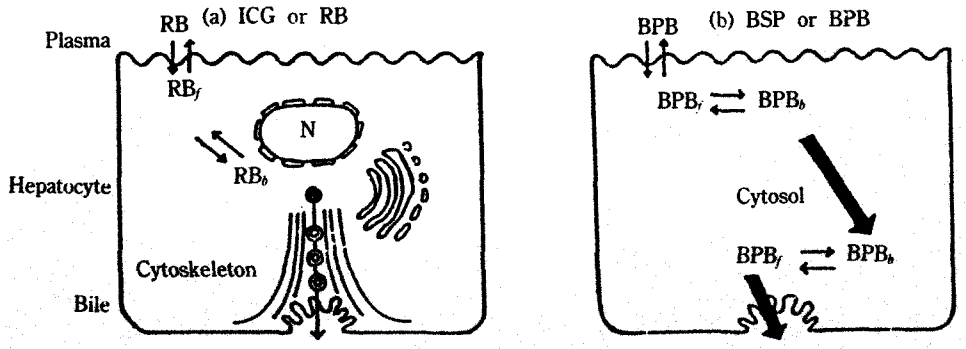
혈청 GOT 및 GPT치에 대한 Colchicine의 영향

Colchicine을 투여하여 3시간이 지난 후 측정한 랫트의 혈청 GOT 및 GPT치를 Table V에 나타내었다. 혈청 GOT 및 GPT치는 colchicine 처리에 의해 유의성있게 증가되었다. 그러나 이러한 결과는 Dubin 등[28]의 보고와 일치하는 것으로, 간세포장해에

Table V—*Changes of the Serum GOT and GPT in Colchicine Treated Rats.*[a]

	GOT(IU/ml)	GPT(IU/ml)
Control	40± 1.0	18± 1.0
Colchicine	141± 4.0*	109± 1.0*

[a]The changes of GOT and GPT value were determined by Reitman Frankel method (n=3). For more details, see text.
*Significantly different from the control rats ($p<0.01$)



Scheme III—Hepatic transport system of organic anions. ICG of RB is transported through hepatocytes into bile with the aid of the cytoskeleton, whereas BSP or BPB is handled by hepatocytes in a different way.

대한 현미경 관찰결과 간세포의 변성이나 괴사가 관찰되지 않았고 또한 조직학적으로도 변화가 없었다는 보고[28]와 담즙분비장해가 시간이 경과함에 따라 회복된 사실 등을 고려할 때, colchicine에 의한 RB 및 ICG의 혈장소실 및 담즙배설 억제효과는 간세포장해 보다는 colchicine이 cytoskeleton의 기능을 저해함으로 일어난 것으로 생각되었다.

고 찰

마이크로튜불은 세포골격을 형성하여 세포고유의 형태를 유지하는 역할을 할 뿐만 아니라, 간세포, 췌장세포 및 갑상선 세포에서 합성된 색소과립,[29] 지방과립[30] 및 호르몬[31] 등의 세포내 이동 및 분비과정에 관여하고 있다고 알려져 있다. 소포체 등의 미세구조내에 존재하는 이러한 물질들은 소포체막에서 유래하는 분비과립(vesicle) 내로 이행되어 결국 모세담관측에서 이동 후 exocytosis나 분자투과 혹은 담체에 의해 세포외로 분비된다. 따라서 분비과립의 세포내 수송에는 마이크로튜불이 관여하고 있다고 생각되고 있다. 마이크로튜불은 직경 250Å 전후의 관상구조물로서 튜불린을 주요 구성단백질로 하고 있으며, MTOC(microtubule organizing center)를 중심으로 담관면을 향해 방사선상으로 분포하고 있다.

세포내골격계에 의한 내인성물질이나 약물의 세포내 수송 및 담즙배설에 대해서는 다음과 같은 가설들이 있다. 첫째, 마이크로튜불은 분비과립의 방향성만 제시하며 수송은 마이크로필라멘트에 의한다는 것, 둘째 마이크로튜불의 중합·탈중합설로서 마이크로튜불은 plus end에서 튜불린이 중합하여 생성되며 minus end에서 탈중합하여 단축되는데 이러한 일련의 중합·탈중합에 의한 마이크로튜불의 이동으로 분비과립이 운반된다는 것, 그리고 세째 마이크로튜불과 분비과립이 단백질을 매개로 결합하여 이 단백질이 마이크로튜불 위를 이동하는 것에 의해 분비과립이 수송된다는 것 등이다. 최근 들어 Allen 등[32]은 세포내에서 분비과립의 이동시 ATP가 필요하며, 마이크로튜불 또는 그 관련단백들이 이러한 에너지 생성에 관여한다고 보고하였다. 한편, colchicine은 튜불린 분자의 특정부위에 결합하여 튜불린의 중합 및 탈중합을 방해함으로 마이크로튜불의 기능을 저해한다.[33] 또한 소포체에서 합성되어 분비과립에 의해 수송되어 배설되는 인지질의 담즙배설을 colchicine이 저해한다는 사실[34]로부터, colchicine은 분비과립에 의한 수송을 저해한다고 생각된다.

현재 간기능 검사약으로 쓰이고 있는 BSP 및 ICG을 혈중에 투여하였을 때 혈중으로부터의 소실이 거의 같다는 점으로부터, bilirubin과 같은 대사경로를 갖는 것으로 생각하여 널리 사용되어 왔다. 그러다 연구가 진행됨에 따라 이 두 약물이 혈중 단백결합, 간내대사 등에 있어서 성상이 다르다고 보고되고 있다. 특히 체질성 ICG 배서이상증(constitutional ICG excretory defect)에서 BSP의 담즙배설은 정상인과 같으나 ICG만 혈중에 정체하는 증상이 나타난다. 이러한 증상에 있어서는 간세포내 마이크로튜불이 정상인에서 보다 현저히 감소된다고

보고되고 있다.[35]

세포내 수송에 있어서 deep compartment를 고려한 모델에 의해 유기음 이온계 약물들의 혈장중 소실 및 담즙배설 추이를 속도론적으로 해석한 결과, 비교적 혈장중 소실 및 담즙배설이 느린 RB 및 ICG에 있어서 deep compartment의 존재가 확인되었다(Table I-IV). 또한 RB은 각 미세기관(organelle)으로의 분포가 큰 반면 BPB는 주로 세포질에 분포함을 알 수 있었다. 간세포내 미세기관에서 ICG의 존재가 확인된 사실[37] 및 BSP가 주로 세포질내에 분포한다는 보고[38]를 고려할 때, ICG 및 RB의 세포내수송 및 담즙배설은 마이크로튜불의 영향을 받는다고 생각된다. 또한 이러한 약물들이 분비과립을 통해 수송되는 기구는 불분명하지만 적어도 부분적으로는 분비과립에 의해 수송된다고 추정된다.[39,40] 한편 간세포질내에 주로 분포하는 BSP 및 BPB는 마이크로튜불에 의해 수송이 일어날지라도 전 수송과정 중 차지하는 비율은 무시할 수 있을 정도라고 생각된다(Scheme III).

이상의 실험결과로부터 RB 및 ICG에 있어서 담즙배설이 늦은 것은 간장내 deep compartment를 나타내는 마이크로튜불 등의 세포내 골격계에 의한 수송에 의하기 때문이라고 생각된다. 또한 BSP 및 BPB는 간세포 내에서 주로 세포질과 결합하여 bile canalicular막 측으로 수송되어 비교적 빠르게 담즙배설이 일어나는 것으로 추정된다.

결 론

1. RB 및 ICG의 혈장소실 패턴이 cytoskeleton 저해제(clochicine)의 전처리에 의해 감소됨을 알 수 있었으나, BSP 및 BPB는 저해제의 영향을 크게 받지 않는 것으로 생각되었다. 그리고 또한 비교적 담즙배설이 느린 RB 및 ICG는 대조군에 비해 저해제의 전처리로 담즙배설이 현저히 감소되었으나, BSP 및 BPB의 담즙배설은 저해제에 의해 유의한 차이를 나타내지 않았다.

2. RB 및 ICG에 있어서는 저해제에 의해 k_{23}(deep compartment로의 이행을 나타내는 속도정수) 및 k_{3B}(담즙배설과정의 속도정수)가 현저히 감소하였으나, BSP 및 BPB의 경우에 있어서는 유의한 차이를 나타내지 않았다.

3. RB은 세포질 이외의 각 분획으로의 분포가 큰 반면, BPB는 주로 세포질에 분포함을 알 수 있었다.

4. RB 및 ICG는 간내에서 세포내골격계 등의 분비과립에 의한 수송으로 인해 담즙배설이 늦은 반면, BPB 및 BSP는 주로 세포질과 결합하여 bile canalicular막 측으로 수송되기 때문에 담즙배설이 빠르게 나타나는 것으로 추정되었다.

감사의 글

본 연구는 1990년도 문교부 지원 한국학술 진흥재단의 자유공모과제 학술연구조성비에 의하여 수행되었으며 이에 감사를 드린다.

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. Gatmaitan 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 isolated rat-liver cells, *Eur. J. Biochem.*, **55**, 617 (1975).

11) M. Schwenk, R. Burr, L. Schwarz and E. Pfaff, Uptake of Bromosulfophthalein by isolated liver cells, *Eur. J. Biochem.*, **64**, 189 (1976).

12) M.S. Anwer. R. Korker and D. Hegner, Cholic acid uptake into isolated hepatocytes, *Hoppeseyler'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), *Drug Metabol. Dis.*, **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, Hydroxy/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) Y.-H. Han and C.-K. Shim, Albumin-Mediated Hepatic Uptake of Drugs, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **20**, 179 (1990).

20) 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 (1990).

21) 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 (1990).

22) S. Watanabe, M. Miyairi, C. Oshio, C.R. Smith and J. Phillips, Phalloidin alters bile canalicular contractility in primary monolayer culture of rat liver, *Gastroenterology*, **85**, 245 (1983).

23) J.M. Crawford and J.L. Gollan, Hepatocyte contransport of taurocholated and bilirubin giucuronides: role of microtubles, *Am. J. Physiol.*, **255**, G121 (1988).

24) J. Reichen, M.D. Berman and P.D. Berk, The role of microfilament and of microtubules in taurocholate uptake by isolated rat liver cells, *Biochim. Biophy. Acta*, **643**, 126 (1981).

25) R.L. Kacich and R.H. Renston, Effects of cytochalasin D and colchicine on the uptake, translocation and biliary secretion of horseradish peroxidase and [^{14}C] sodium taurocholate in the rat, *Gastroenterology*, **85**, 385 (1983).

26) M. Mori, M. Oyamada, F. Sakauchi and K. Ogawa, Effects of colchicine on the hepatocellular transport of indocyanine green in the rat, *Virchows Arch B*, **53**, 37 (1987).

27) T. Nakagawa, Y. Koyanagi and H. Togawa, "SALS, a Computer Program for Stastical Analysis with Least Squares Fitting." Libray Program of the University of Tokyo Computer, Tokyo, Japan (1978).

28) M. Dubin, M. Maurice and G. Feldmann, Influence of colchicine on bile secretion and hepatic ultrastructure in the rat: Possible interaction between microtubules and microfilaments. *Gastroenterol.*, **79**, 649 (1980).

29) D.B. Murphy, The mechanism of microtubule-dependent movement of pigment granules in telcost chromatophores. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **253**, 693 (1975).

30) S.L. Howell and M. Tyhurst, Role of microtubules in the intracellular transport of growth hormone. *Cell Tiss. Res.*, **190**, 163 (1978).

31) E.P. Reaven and G.M. Reaven, Distribution and content of microtubules in relation to the transport of lipid. *J. Cell Biol.*, **75**, 559 (1977).

32) R.D. Allen, D.G. Weiss, J.H. Hayden, D.T. Brown, H. Fujiwake and M. Simpson, Gliding

movement of and bidirectional transport along single native microtubules from squid axoplasm: Evidence for an active role of microtubules in cytoplasmic transport. *J. Cell Bio.*, **100**, 1736 (1985).

33) E.P. Reaven and G.M. Reaven, Evidence that microtubules play a permissive role in hepatocyte very iow density lipoprotein secretion. *J. Cell Biol.*, **84**, 28 (1980).

34) T. Kawamoto, T. Akino, M. Nakamura and M. Mori, Metabolism of individual molecular species of phosphatidylcholine in the liver subcellular membranes and bile: Origin of bile phosphatidylcholine, *Biochim. Biophys. Acta*, **619**, 35 (1980).

35) K. Okuda, H. Okhkubo, H. Musha, K. Kotoda, H. Abe and K. Tanikawa, Marked delay in indocyanine green plasma clearance with a near-normal bromosulphophthalein retention test: A constitutional abnormality ?, *Gut*, **17**, 588 (1976).

36) M. Mori and S. Ohta, Microtubules in hepatocytes of constitutional ICG excretory defect. *J. Clin. Electron Microscopy*, **11**, 696 (1978).

37) T. Namihisa, T. Hissauchi and H. Kuroda, Electron microscopic observations of indocyanine green (ICG) in rat liver. *Med. Chir. Dig.*, **3**, 113 (1974).

38) U. Gärtner, R.J. Stocket, V.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).

39) R.H. Renston, D.G. Maloney, A.L. Jones, G.T. Hradek, K.Y. Wong and I.D. Golfine, Bile secretory apparatus: Evidence for a vescular transport machanism for proteins in the rat, using horseradish peroxidase and (^{125}I) insulin. *Gastroenterology*, **78**, 1373 (1980).

40) A.L. Jones, R.H. Renston and S.J. Burwen, Uptake and intracellular disposition of plasma-derived proteins and apoproteins by hepatocytes. In: H. Popper and F. Schaffner (eds) Progress in liver desease, Vol.7, Grune and Stratton, New York, pp.51-69 (1982).