

## 적혈구내 비용혈 약물봉입과 약물방출

함성호, 고건일, 김재백, 손동환\*  
원광대학교 의약자원연구센터, 약학대학

### Nonhemolytic entrapping method into red blood cells and its release pattern

Seong ho Ham, Jae Baek Kim, Geon Il Ko and Dong Hwan Sohn

*Medicinal Resources Research Center, and College of Pharmacy, Wonkwang University, Iksan, Korea*

Drug delivery by red cells was established to maintain the release of drugs in the blood. The entrapment method by amphotericin B was re-examined and evaluated for obtaining the suitable entrapment conditions without hemolysis. The amphotericin B treatment below  $10\mu\text{g/ml}$  induced the non-hemolysis to entrap daunorubicin into red cells within 10min. Under these conditions intracellular ATP level was decreased as 18%. Membrane fluidity and the shape factor of red cells were maintained. To maintain intracellular ATP, ATP and sodium pyruvate were added during the entrapment procedure because hemolysis during the release test would reflect the loss of intracellular ATP that would be postulate the decrease of the viability *in vivo*. Consequently, the addition of ATP in the reaction solution can raise the intracellular level of ATP.

#### 서론

약물의 부작용 감소와 효율성을 증대시키기 위해 각종 약물전달 방법이 다양하게 제시되고 있다. 비경구용의 방출제어용 제제의 경우 약물의 생체적용을 위해서는 정확한 방출제어 뿐 아니라, 체내 적합성이 요구된다. non-immunogenic 및 biodegradable한 제제를 만들기 위해 각종 합성 고분자와 생체기원의 단백질 혹은 세포등에 대한 연구가

시도되고 있다.

이러한 목적으로 이용되는 적혈구는 골수에서 생성되는 stem cell이 분화되어 만들어지고 초기에는 유핵세포(nucleated cell)이나 무핵세포(unnucleated cell)상태로 존재한다. 핵이 없기 때문에 효소계가 대부분 존재하지 않고 그 단순성으로 생체막 연구의 좋은 대상으로 이용되고 있다. 약물을 적혈구에 봉입시켜 체내로 전달할 경우 생체에 적합성이 뛰어나고 생존기간이 90-120일이 되기

때문에 서방형 방출제어 시스템으로도 여러연구자에 의해 연구되었다.<sup>1,2)</sup>

적혈구에 약물을 봉입하는 방법으로는 preswelling technique<sup>3-5)</sup>, dialysis<sup>6-10)</sup>, electroporation<sup>12)</sup> 등을 이용하되, 이러한 방법이 기계적 혹은 전기적 그리고 화학적으로 pore를 만들어서 약물의 봉입을 유도하게 된다. 봉입 도중 hemoglobin 이나 세포의 homeostasis의 유지에 필수적인 물질이 손실되 세포의 생존기간 감소와 macrophage에 의한 phagocytosis 촉진이 예상된다. 따라서 봉입과정에서의 지나친 손상은 적혈구의 생존기간에 영향을 주고 적혈구내에 봉입된 약물의 빠른 방출을 유도해 약물의 체내거동 예측에 어려움을 주게 된다.<sup>13)</sup> 이러한 점에 착안해 저자들은 적혈구 손상을 극소화 시킨 새로운 preswelling technique을 이용한 약물봉입에 대해 이미 보고한바 있다.<sup>14)</sup> 본논문에서는 ionopore인 amphotericin B를 이용한 약물의 봉입시 세포의 viability유지가 약물방출에 미치는 영향에 대해 실험하였다.

## 실험방법

### 실험재료 및 기기

본 실험에서 사용한 시료로는 daunorubicin (Farmitalia, Carlo Erba, Lot No. n2001, Italy), Hank's balanced salt solution(이하 HBSS로 약함), red blood cell lysing buffer solution, adenosine-5-triphosphate disodium salt(Sigma Chem. Co., MO, USA), sodium pyruvate(Life Tech. Inc., USA)를 사용하였으며, 기타 다른 시약들은 모두 특급 혹은 세포배양용을 사용하였다. 실험기기로는 spectrophotometer(MPS-5000, Shimadzu Instr. Co., Japan), spectrofluorometer(SFM 25, Kontron Instr. Co., Swiss), high performance liquid chromatograph Set (Waters, USA)를 사용하였고 검출기로는 model 440 absorbance detector 및 model

420 AC fluorescent detector를 사용하였다. microcentrifuge(Centrifuge 5415 C., Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Germany), table top centrifuge(VS-6000 CF, Vision Scientific Co., Ltd, Korea)anchored cell analysis and sorting system(ACAS 570, Meridian Instr. Co., MS, USA)를 사용하였다.

### 실험동물 및 채혈

본 실험에 이용한 실험동물로는 Rabbit(체중 3.0~3.5kg의 웅성 Newzealand white, Hanil Animal Co., Geonbuk, Korea)를 사용하였으며, 본 대학의 실험동물실에서 사육하였다. 채혈은 heparin 처리된 주사기로 rabbit의 귀정맥으로부터 약 10cc를 채혈한 다음, 4℃에서 3000rpm으로 15분간 원심분리 한 뒤, 혈장과 buffy coat를 흡인 제거하였다. 여기에 4℃의 Hank's balanced salt solution(이하 HBSS라고 약함)으로 3회 세척(원심분리, 4℃, 1000 rpm, 5 min.)한 뒤, 최종적으로 hematorit 치(10000rpm, 15min., in capillary tube)가 50%(이하 50% 적혈구 suspension이라 표기함)가 되도록 조절하였다.

### Daunorubicin의 봉입방법 및 ATP정량

본 실험에서 이용되는 50%의 적혈구 suspension은 모두 sucrose medium (sucrose 250mM, KCl 18.9 mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM, glucose 10mM in 2mM phosphate buffered solution(pH 7.4))으로 치환하여 실험하였다. amphotericin B 10.0mg을 정밀히 달아 0.1%의 sodium deoxycholate 용액에 녹여 10ml가 되게 하였고 이것을 sucrose media로 희석하여 사용하였다. 4℃의 적혈구 suspension 1ml(in sucrose medium)에 10µg/ml(in sucrose medium)의 amphotericin B용액 1ml를 가하고, 4℃에서 일정시간 동안 방치후, 원심분리하여 상정액중의 hemoglobin 농도는 cyanomethemoglobin

## 적혈구내 비용혈 약물봉입과 약물방출

법에 따라 540nm에서 흡광도측정법으로 daunorubicin은 형광광도측정법에 따라 정량하였다. daunorubicin 용량 의존적 봉입실험에서는 농도를 각각 5, 10, 25, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$ (in sucrose medium)로 하였고 daunorubicin이 봉입된 각각의 적혈구 suspension 1 ml에 red cell lysing buffer 1ml를 가하고 2분간 심하게 진탕시켰다. 이 용액에 다시 동량의 acetonitrile을 가하고 진탕시킨 다음 14,000rpm으로 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 원심분리하여 그 상정액중의 daunorubicin을 형광광도 측정법에 따라 정량하였다.

적혈구 생존력 증가실험을 위해 사용되는 ATP와 pyruvate는 ATP2Na(MW 551.2) 551mg, sodium pyruvate(MW 110.06) 110.06mg을 정밀히 달아 100% cold HBSS에 녹여 각각 1mM이 되게 하였다. 이 용액을 cold HBSS로 희석하여 ATP의 농도는 500, 100, 50, 10 $\mu\text{M}$ 이 되게 하였으며, sodium pyruvate는 100, 50, 10, 5, 1 $\mu\text{M}$ 이 되게 희석하여 사용하였다. 이 stock solution은 사용중 4 $^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다.

적혈구내 ATP는 A.D.Flora의 방법에 따라 HPLC로 정량하였다.<sup>15)</sup> 이를 간단히 설명하면 적혈구 suspension 1ml에 RBC lysing buffer solution 1 ml를 가하여 용혈시킨 다음, 4.5M-HClO<sub>4</sub>ml를 가하고 14000rpm으로 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 원심분리하였다. 이 상정액 1ml에 1.5M-NaOH 1ml를 가하여 중화시킨 다음, 다시 14000rpm으로 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30 분간 원심분리한 다음, 그 상정액 50 $\mu\text{l}$ 를 HPLC로 정량하였다. 이때의 HPLC 분석조건은 다음과 같다. Column은 Bondapak C-18(25 Cm x id 4.6 mm)를 사용하였고 이동상은 0.1M 인산완충용액 (pH 3.6)으로 1.2 ml/min의 유속에서 0.05 aufs로 254nm 에서 측정하였다.

## Daunorubicin의 방출 및 용혈실험

Daunorubicin이 봉입된 적혈구 suspension 1

volume에 10 mM phosphate buffered saline (이하 PBS로 약함, pH 7.4), HBSS 및 각 개체 자신의 혈청을 각각 9.0 volume씩 가한 다음, 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 방치하면서 1, 2, 4, 6, 7, 12, 18, 24, 48시간에 이 시료 200 $\mu\text{l}$ 씩을 취하여 방출액중 daunorubicin을 정량하였다. 즉 200 $\mu\text{l}$ 의 시료를 5000rpm으로 10분간 원심분리하여 상정액 50 $\mu\text{l}$ 에 동량의 acetonitrile을 가하고 14000rpm으로 20분간 원심분리한 상정액 50 $\mu\text{l}$ 을 HPLC로 정량하였다. 즉  $\mu$ -Bondapak C-18 컬럼으로 acetonitrile:H<sub>2</sub>O:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>(=30:70:0.1)의 이동상을 사용하였고 fluorescence detector로 excitation 480nm emission 530nm에서 유속 2.0ml/min로 해서 정량하였다.

## Image analysis 및 membrane fluidity의 측정

적혈구 시료들의 형태관찰을 위하여 Wang YL<sup>16)</sup>등의 방법으로 ACAS-570을 이용하여 Image analysis를 하였다. 적혈구 suspension 1ml를 poly-L-lysine이 coating된 직경 35mm의 plastic culture dish에 가하고 37 $^{\circ}\text{C}$ 의 CO<sub>2</sub> incubator(5% CO<sub>2</sub>)에서 1시간 동안 방치한 다음, 다시 5-darboxyfluorescein diacetate (20 mg/ml in acetone)용액 10 $\mu\text{l}$ 를 가하여 30분간 방치하고, cold PBS로 3회 세척한 다음, ACAS를 써서 image analysis program을 이용하여 측정하였다.

Wang JL과 Koppel DE<sup>17, 18)</sup> 등의 방법으로 적혈구막의 lateral mobility를 측정하였다. 즉 적혈구 suspension 1 ml를 culture dish에 넣고, NBD-pc solution (2mg/ml in acetone) 10 $\mu\text{l}$ 를 가한 다음, 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 방치하고, cold HBSS로 3회 세척하여 ACAS의 FRAP program (Fluorescent recovery after photobleaching)을 이용하여 적혈구의 membrane fluidity를 측정하였다.

## 실험 결과 및 고찰

Amphotericin B 처리에 의한 daunorubicin의 용입

4°C의 50% 적혈구 suspension 1ml에 10µg/ml (in sucrose medium)의 amphotericin B 용액 1ml를 가한 뒤, 5, 10, 15, 30분간 방치하고 원심분리하여 상정액중의 hemoglobin을 정량한 결과는 Fig. 1과 같다.

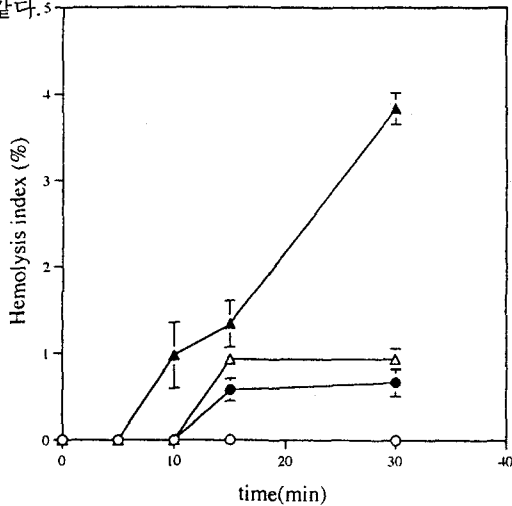


Fig. 1. Hemolysis index(%) induced by amphotericin B one ml solution in 0 (○), 50µg/ml(●), 10µg/ml(△) and 20µg/ml(▲) was added one ml of 50% red cells suspension and placed at 4°C in designated time.

amphotericin B를 처리하지 않을 경우 30분 후에도 용혈이 없었으나, 5.0µg/ml이 되게 가했을 경우는 15분 후에 0.58%의 용혈이 있었으며, 30분 후에는 0.67%의 용혈이 발생되었다. 10µg/ml의 농도로 amphotericin B를 가하였을 경우에도 5.0µg/ml 보다는 약간 많은 양의 용혈이 유발되었지만, 이 농도에서는 시간이 지남에 따라 용혈정도의 큰 변화가 없었다. 그러나 20µg/ml가 되게 가했을 경우 10분 후 0.98% 발생되었고, 30분 후에는 대단히 상승하여 3.84%의 용혈이 있었다.

sucrose medium, HBSS, PBS( 10 mM, pH 7.4, )에 현탁된 각각의 50% 적혈구 suspension 1 ml에 amphotericin B를 2 - 40µg/ml가 되게 가하고 10

분간 방치한 다음 hemolysis index를 측정한 결과는 Fig. 2과 같다.

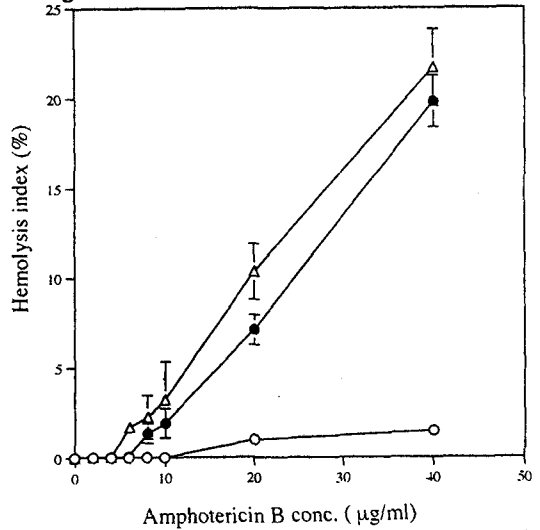


Fig. 2. Effect of media on hemolysis index induced by amphotericin B. 50% red cells suspension and amphotericin B solution were substituted to sucrose medium (○), 10mM-PBS (●) and HBSS (△). One ml of amphotericin B solution was added into one ml of 50% red ceels suspension and placed at 4°C for 10 min.

PBS의 경우 amphotericin B를 4µg/ml가 되게 가했을 때 0.04%의 용혈이 유발되었으나 sucrose medium에서는 10µg/ml의 농도에서도 용혈이 일어나지 않았으며 20µg/ml에서도 단지 0.98% 정도만 용혈되었다. 그러나 PBS와 HBSS의 경우는 20 µg/ml에서 각각 7.10% 및 10.34% 정도의 용혈이 일어났고, 40µg/ml에서는 19.81%, 21.69%만큼 용혈이 일어났다.

sucrose medium에 현탁된 50% 적혈구 suspension 1 ml에 amphotericin B(5, 10, 20µg/ml)가 함유된 daunorubicin 용액(100µg/ml) 1 ml을 가한 다음 일정 시간마다 각 시료를 원심분리하여 상정액중 daunorubicin을 정량한 결과는 Fig. 3와 같다.

적혈구내 비용혈 약물봉입과 약물방출

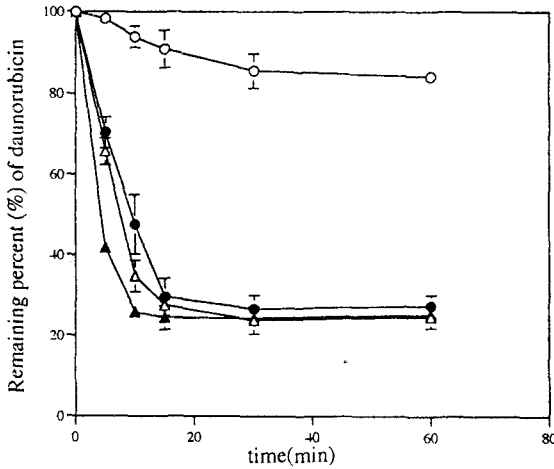


Fig. 3. Effect of amphotericin B on the remaining percent of daunorubicin. One ml of daunorubicin solution without amphotericin B (○) or with amphotericin B in 5µg/ml (●), 10µg/ml (△) and

20µg/ml (▲) was added into one ml of 50% red cells suspension.

amphotericin B를 처리하지 않았을 경우 상정액 중 흡수율(100-잔존율)을 보면, 5분 후에는 1.8%, 15분후에는 9.2%였으며, 60분에는 15.9%였다. 그러나 amphotericin B를 5, 10, 20µg/ml을 처리했을 때, 5분 후에는 각각 29.6%, 34.3%, 58.2%만큼 흡수되었으며, 15분 후에는 70.5%, 72.5%, 75.5%만큼 흡수되었고 이 시간 이후부터는 평형에 도달하였다.

50% 적혈구 suspension 1 ml에 amphotericin B를 각각 0, 5, 10, 20µg/ml씩 함유하는 5, 10, 25, 50, 100, 200, 400µg/ml의 daunorubicin 용액 1 ml를 가하여 봉입실험을 한 결과는 Table I 과 같다.

Table I. Daunorubicin(µg/10<sup>10</sup> cells) entrapped in red cells by Amphotericin B treatment depending on the loaded amount of daunorubicin.

Daunorubicin (µg/ml)	Amphotericin B concentration(µg/ml)			
	None	5.0	10.0	20.0
5	1.30 ± 0.13	1.45 ± 0.23	1.93 ± 0.22	2.11 ± 0.11
10	2.29 ± 0.14	2.90 ± 0.34	3.25 ± 0.11	3.85 ± 0.34
25	3.57 ± 0.24	4.56 ± 0.46	5.01 ± 1.10	5.23 ± 0.13
50	4.23 ± 1.63	5.03 ± 0.97	7.89 ± 1.65	8.82 ± 1.13
100	11.07 ± 1.59	17.14 ± 2.11	20.54 ± 3.32	23.56 ± 2.23
200	16.45 ± 2.35	26.89 ± 1.13	34.26 ± 2.21	39.22 ± 2.31
400	46.95 ± 2.17	65.13 ± 3.11	72.55 ± 3.34	83.22 ± 2.31

Data was shown as mean ± SD calculated form 12 experiments.

amphotericin B를 처리하지 않은 대조실험의 경우 10µg/ml의 daunorubicin용액 1 ml을 가했을 때 평균 2.29µg/10<sup>10</sup> cells이 봉입되었으며, 400µg/ml인 경우 46.95µg/10<sup>10</sup> cells 만큼 봉입되었다. 그러나 amphotericin B를 5, 10, 20µg/ml이 되게 가했

을 때, amphotericin B의 농도 의존적으로 DNR의 봉입량이 증가하였다.

Amphotericin B 처리에 의해 daunorubicin을 봉입한 적혈구내의 ATP를 측정 한 결과는 Table II 와 같다.

Table II. Comparison of intracellular ATP content in each experimental conditions.

Treatment	conc	ATP content(nmole/ml packed cells)
Amphotericin B treatment (Amphotericin B $\mu\text{g/ml}$ )	0	1436.48 $\pm$ 21.35
	5	1293.86 $\pm$ 18.40
	10	1257.04 $\pm$ 24.50
	20	1217.12 $\pm$ 23.78
control		1547.52 $\pm$ 18.44

The data was shown as mean  $\pm$  SD calculated from 12 experiments.

혈액을 가토로부터 채혈한 뒤 cold HBSS로 세척하여 50% 적혈구 suspension을 만들었을때, ATP의 농도는 평균 1547.52 nmole/ml packed cells 이었으며, amphotericin B를 5, 10, 20  $\mu\text{g/ml}$ 로 처리하였을 경우에도 각각 16.4, 18.77, 20.7%씩

감소하였다.

Image Analysis 및 Membrane fluidity

ACAS를 이용하여 적혈구의 image analysis를 한 결과는 Table III 과 같다.

Table III. Image analysis parameters of red cells.

Conditions	red cell No. (n)	ACAS parameters	
		Perimeter( $\mu\text{m}$ )	Shape factor
Amphotericin B(10 $\mu\text{g/ml}$ )	527	10.18 $\pm$ 3.02	1.31 $\pm$ 0.16
Normal	564	10.17 $\pm$ 3.65	1.30 $\pm$ 0.14

The data was shown as mean  $\pm$  SD calculated from red cells number(n)

100% HBSS중에서 적혈구의 perimeter는 10.17  $\mu\text{m}$ 이며 amphotericin B를 10 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리할 경우 그 크기는 10.18  $\mu\text{m}$ 로 적혈구의 크기에는 영향이 없었다. 세포의 형태계수(shape factor)를 보면, 100% HBSS의 등장액에 있을 경우 1.30으로 구형 세포임을 알수 있었고 amphotericin B(10 $\mu\text{g/ml}$ )를 처리할 경우에도 shape factor가 1.31로 정상적인 형태로 유지되고 있다. membrane fluidity를 Flu-

orescent recovery after photobleaching (FRAP) method에 따라 측정하였다 100% HBSS에 현탁된 적혈구의 membrane fluidity는  $7.37 \times 10^{-8} \text{cm}^2/\text{sec}$ 였으며, sucrose medium중에서 amphotericin B를 처리한후 membrane fluidity를 측정한 결과, amphotericin B의 농도가 0일경우  $7.48 \times 10^{-8} \text{cm}^2/\text{sec}$ 로 100%HBSS와 동일하였으며, amphotericin B의 농도를 각각 5, 10, 20 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리할 경우 5.

적혈구내 비용혈 약물봉입과 약물방출

91 x 10<sup>-8</sup>, 2.91 x 10<sup>-8</sup> cm<sup>2</sup>/sec로 감소하였으며, 이를 다시 세척하여 sucrose medium에 현탁시켰을 경우에는 7.12 x 10<sup>-8</sup>cm<sup>2</sup>/sec 로 정상적인 적혈구의 membrane fluidity를 갖게 되었다. 또한 fluorescent recovery를 보면, amphotericin B를 처

리하지 않은 경우에는 77.84%였으나, 5, 10, 20μg/ml로 처리할 경우에는 74.29%, 65.0% 및 56.0%로 감소하였으나 amphotericin B를 세척하여 다시 sucrose medium으로 현탁시켰을 경우에는 71.45%로 정상치로 회복되었다(Table IV).

Table IV. Membrane fluidity parameters of red cells under each experimental condition.

Method	Condition	mobility(x 10 <sup>-8</sup> , D)	recovery(%)
Amphotericin B treatment	0 μg/ml	7.48 ± 2.57	77.84 ± 20.14
	5 μg/ml	5.91 ± 4.01	74.29 ± 23.48
	10 μg/ml	2.91 ± 2.71	65.00 ± 23.11
	20 μg/ml	2.89 ± 2.15	56.00 ± 27.63
	After washing	7.12 ± 3.68	72.45 ± 23.56

Mean ± SD calculated from 21 experiments.

Daunorubicin의 방출 및 Hemolytic index

Amphotericin B를 이용하여 daunorubicin을 봉입시킨 경우 20.54μg/10<sup>10</sup> cells 의 daunorubicin을 함유하고 있으며 이 suspension을 개체자신의 serum중에서 방출실험을 한 결과 6시간에는 12.37%, 12시간에는 31.33%, 24시간에는 52.99%, 48시간에는 71.89%만큼 방출이 되었다. 또한 HBSS와 PBS에서 방출율을 보면 6시간에는 11.16%, 13.01%였으며, 12시간에는 34.67%, 29.01%였으며, 24시간에는 54.43%, 52.07%, 48시간에는 각각 75.55%, 87.77%였다(Fig 4)

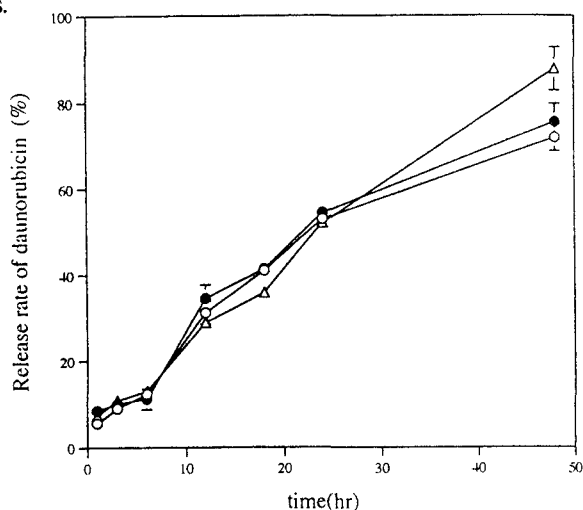


Fig. 4. Release rate(%) of daunorubicin entrapped by amphotericin B treatment. One ml of red cells suspension was added into nine ml of serum (○), HBSS(●) and PBS (△), respectively.

daunorubicin을 함유한 적혈구로부터 방출실험을 하면서 방출 media중에서 일정시간마다 hemolysis를 측정 한 결과는 Table V과 같다.

Table V. Hemolysis index(%) during daunorubicin release in serum, PBS and HBSS at 37°C

Entrapment method	Release media	Time(hr)					
		0	6	12	18	24	48
Amphotericin B treatment	Serum	0.0	0.28	0.37	0.48	1.14	1.68
	HBSS	0.0	1.29	2.39	3.51	7.24	9.06
	PBS	0.0	1.23	2.36	4.54	8.61	10.67

\* Relative standard deviation(RSD) in all data was within maximal 5%, which was calculated from 12 experiments.

serum중에서는 24시간에 1.14%였으며, 48시간에는 1.68%만큼 용혈이 일어났다. HBSS 및 PBS 에서는 24시간에 각각 7.24%, 8.61%만큼 용혈이 일어났으며, 48시간에는 각각 9.06%, 10.67%만큼 용혈이 발생되었다. 방출실험시 사용한 media에 따라 hemolysis의 발생율이 변화되었음을 알 수 있었는데, 이는 viability유지를 위한 ATP의 결핍과, 에너지원으로 사용되고 있는 glucose의 함량과 관계가 있다고 사료된다.<sup>19-21)</sup> PBS의 경우 등장 상태지만, 장기간 보관하거나 배양을 하고자 할 경우에는 viability를 유지시켜줄 수 있는 에너지원, 즉 ATP나 glucose가 없으나, HBSS에는 100mg/dl만큼 존재하고 있고, serum중에는 107.5 ± 10.3mg/dl(n=6) 만큼 들어있다. 적혈구중에 함유된 ATP의

농도를 정량한 결과(Table V)에 따르면 amphotericin B(10 µg/ml)를 처리할 경우 18.77%만큼 intracellular ATP의 함량이 감소한다. 따라서 amphotericin B처리시 hemolysis발생율이 높으며, 결과적으로 방출율이 크게 나타나게 되었다. 따라서 적혈구에 봉입된 약물의 방출 실험에서는 반드시 homeostasis를 유지시키는 것이 중요하다고 사료된다.

ATP 및 sodium pyruvate첨가의 영향

Amphotericin B용액에 ATP 또는 sodium pyruvate가 함유된 용액으로 daunorubicin을 봉입한 경우, 적혈구중에 함유된 ATP를 정량한 결과는 Table VI과 같다.

Table VI. Effect of the addition of ATP and sodium pyruvate(SPV) on intracellular ATP level (nmole/ml packed cell) in red cells during entrapping daunorubicin by amphotericin B treatment.

Addition (µM)	Am B treatment	
	None	10 µg/ml
None	1536.48 ± 21.35	1257.04 ± 24.50
APT	10	1521.48 ± 24.65
	5	1540.68 ± 34.56
	1	1536.70 ± 23.14
	0.5	1513.56 ± 30.12
	0.1	1526.90 ± 18.56
SPV	1	1540.68 ± 23.22
	0.5	1530.90 ± 23.45
	0.1	1516.66 ± 43.24
	0.05	1507.12 ± 45.22
	0.01	1496.88 ± 32.45
		1377.30 ± 35.78
		1388.88 ± 32.45
		1360.90 ± 34.22
		1276.90 ± 23.55
		1265.52 ± 30.24

\* p < 0.1 against non-treatment of ATP and sodium pyruvate. The data show as mean ± SD calculated from 6 experiments.



## 적혈구내 비용혈 약물봉입과 약물방출

대조실험의 경우 1536.48 nmole/ml packed cell 이었으며, ATP를 가하지 않은 경우에는 1257.04 nmole/ml packed cell로 감소하였다. 그러나 ATP를 10.5 umole/ml씩 가하였을 때 각각 2368.44 nmole/ml이 되게 가했을 경우에는 amphotericin B를 가하지 않은 경우에 비해 대조실험과 유사하였다. Sodium pyruvate를 첨가한 경우 amphotericin B만을 사용한 경우에 비하여 유의성은 없으나 ATP를 상승시키는 것을 볼 수 있었다.

## 결 론

생체 적합성을 가지며, 서방형제제를 만들기 위하여 적혈구에 모델약물로 심장독성이 큰 daunorubicin을 사용하여 ionopore 인 amphotericin B를 이용하여 봉입하였으며, 이 조건에서 적혈구의 기능과 관련한 hemolysis 및 생존율에 대한 직접적인 parameter로서 intracellular ATP 와 membrane fluidity를 측정하여 얻은 결과는 다음과 같다.

1. Daunorubicin의 봉입시 용혈이 일어나지 않으려면 250mM sucrose medium을 써서 amphotericin B 10 $\mu$ g/ml이하의 농도로 처리하는 조건이었다.

2. 이 조건에서 적혈구의 형태와 막의 유동성은 원래의 적혈구와 유사하였다. 그러나 세포내의 ATP 양은 약 18%가 감소하였다.

3. daunorubicin 방출율은 48시간후에 serum, HBSS및 PBS에서 각각 71.89%, 75.55%, 87.77%였다.

4. 봉입시 감소된 적혈구내의 ATP 양은 봉입용액에 1 $\mu$ M이되게 가했을 때 정상적인 값으로 유지되었다.

## 감사의 글

본논문의 일부는 1995년 원광대학교 교내연구

비에 의해 수행되었습니다.

## References

1. 日本生化学會, 血液, 상/하 권, 東京生化学同人, (1985).
2. Richard D, Irons, Toxicology of the Blood and Bone Marrow, Raven Press, (1985).
3. Tyrrell, DA and Ryman, BE, *Biochem.Soc. Trans.*, 4, 677 - 680(1976).
4. Rechsteiner, MC , *Exp. Cell. Res.*, 93, 487 - 492 (1975).
5. DeLoach, JR , Barton C and Culler, K , *Am. J. Vet. Res.*, 42, 667 - 669(1981).
6. DeLoach, JR , Harris, RL and Ihler, GM , *Anal. Biochem.*, 102, 220 - 227(1980).
7. Hubbard, AR , Sprandel U and Chalmers, RA , *Biochem. Soc. Trans.*, 7, 958 -959(1979).
8. Zocchi, E , Guida, L , Benatti, U , Canepa, M , Borgiani, L , Zanin, T and Flora, AD , *Biotech. Appl. Biochem.*, 9, 423 - 434(1987).
9. Dale, GL , Villacorte, DG and Beutler, E , *Biochem. Med.*, 18, 220 - 225(1997).
10. Eichler, HG , Gasic, S , Bauer, M , Korn, A and Bacher, S , *Clin. Pharmacol. Ther.*, 40, 300 - 303(1986).
11. DeLoach, J , Peters, S , Pinkard, O , Glew, R and Ihler, G , *Biochim. Biophys. Acta*, 496, 507 - 515(1977).
12. Mitchell, DH , James, GT and Cruse, CA , *Biotech. Appl. Biochem.*, 12, 264 - 275(1990).
13. Jung, KY , Uchida, S and Endou, H , *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 100, 369 - 382(1989).
14. Ham, SH , Song, K , Ko, GI , Kim, JB , Sohn, DH , *J. Kor. Pharm. Sci.*, 24, 1311-1137(1994)
15. Ghosh, MK , HPLC met hods on drug

- analysis, Springer-Verlag 1996년 1월 11일, 1992.
16. Wang, YL and Taylor, LD , Fluorescence microscopy of living cells in culture : Fluorescent analogs, labeling cells and basic microscopy, Academic Press, Inc., (1989).
  17. Wang, JL , Quantitative fluorescence analysis : Digital image and statistical analysis at the level of single cells; Application Note No. B-1 (supplied from Meridian Instr., Inc.) (1992).
  18. Koppel, DE and Sheetz, MP , *Biophys. J.*, 30, 187 (1980).
  19. Kim, HD , Sergeant, S , Forete, LR , Sohn, DH and Im, JH , *Am. J. Physiol.*, 256, C772 - C778 (1989).
  20. Sergeant, DH , Sohn, DH and Kim, HD , *J. Membrane Biol.*, 109, 209 - 220 (1989).
  21. Sohn, DH and Kim, HD , *J. Cell. Physiol.*, 146, 318 - 324 (1991).