

## 혈류 분리 간세포에 있어서 딜티아젬의 간클리어런스에 미치는 페노바르비탈의 영향

이용복\* · 오준교\* · 고익배

전남대학교 약학대학 \*동아제약(주) 연구소

(1996년 1월 30일 접수)

### Effect of Phenobarbital on the Hepatic Clearance of Diltiazem in Isolated Rat Hepatocytes

Yong-Bok Lee\*, Joon-Kyo Oh\* and Ik-Bae Koh

College of Pharmacy, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea  
\*Research Laboratories, Dong-A Pharmaceutical Co. Ltd., Kiheung-Up, Yongin-Gun, Kuonggi-Do, Korea 449-900, Korea

(Received January 30, 1996)

In order to study the effect of phenobarbital(PB) on the hepatic transport of diltiazem(DTZ),  $Ca^{2+}$  channel blocker, we used isolated hepatocytes of rat which was intraperitoneally pretreated with phenobarbital sodium(75 mg/kg) for four days once a day. For the isolation of rat liver cells, a modification of the two step procedure of Seglen was used. DTZ was dissolved in incubation buffer to the final DTZ concentrations of 200, 400, 600, 800 and 1000 ng/ml in order to elucidate the uptake characteristics of DTZ by hepatocytes. Reactions were stopped at 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120 and 300 sec. The initial velocity was determined by disappearance of diltiazem in the hepatocyte suspension. On the other hand, to determine the effect of PB on the *in vitro* hepatic intrinsic clearance of DTZ we obtained the metabolism rates of DTZ in the control and the PB-pretreated rat hepatocyte at various time intervals. According to pretreatment with PB, the size of hepatocyte and the amount of protein per  $10^6$  cells were significantly ( $p<0.01$ ) increased from  $26.92 \pm 0.1364$  m to  $35.31 \pm 1.00$  m and from  $468 \pm 6.5$   $\mu$ g/ $10^6$  cells to  $628.8 \pm 12.1$   $\mu$ g/ $10^6$  cells, respectively. In the case of hepatic uptake of diltiazem,  $K_m$  was not different in the normalization by cell numbers and increased from  $2.90$   $\mu$ M to  $13.89$   $\mu$ M in the normalization by protein amount.  $V_{max}$  was increased regardless of normalization by protein amount and cell numbers, from  $1.21$   $\mu$ mole/min  $\cdot$  mg protein to  $3.96$   $\mu$ mole/min  $\cdot$  mg protein and from  $2.38$   $\mu$ mole/min  $\cdot$   $10^6$  cells to  $2.83$   $\mu$ mole/min  $\cdot$   $10^6$  cells, respectively. The *in vitro* hepatic intrinsic clearance of DTZ was significantly ( $p<0.01$ ) increased from  $0.640 \pm 0.038$  ml/min  $\cdot$   $10^6$  cells to  $2.385 \pm 0.212$  ml/min  $\cdot$   $10^6$  cells due to PB-pretreatment. These results suggest that the uptake of DTZ by hepatocyte is extremely fast and PB enhances the hepatic intrinsic metabolic clearance of DTZ.

**Keywords**—Diltiazem, Phenobarbital pretreatment, Hepatic uptake, Hepatic intrinsic clearance, Rat hepatocytes.

딜티아젬(염산염, 이하 DTZ라 함)은 심장과 혈관 평균관 세포막내로의 칼슘이온 유입통로를 차단함으로써 협심증, 고혈압, 부정맥 및 편두통 등과 같은 심혈관계 질환 치료에 널리 사용되는 칼슘길항제로서<sup>1)</sup> 사람과 동물의 간에서 대사되어 수 많은 산성과 중성 및 염기성 대사체를 생성<sup>2-5)</sup>한다고 알려져 있다. 또한, DTZ는 탈아세틸화, N-탈메틸화, O-탈메틸화, 벤젠고

리 수산화 및 산성포합 반응 등의 대사경로를 통하여 N-monodesmethyldiltiazem( $M_1$ ), desacetyldiltiazem(DAD), desacetyl-N-monodesmethyldiltiazem( $M_2$ ), desacetyl-O-desmethyl-diltiazem( $M_4$ )과 desacetyl-N,O-desmethyldiltiazem( $M_6$ ) 등과 같은 염기성 대사체들을 생성하며 이들 중 MA와 DAD는 개에 있어서 관상동맥 혈관 확장 효과를 나타낸다고 보고

<sup>1)</sup>본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

6)되어 있다.

대표적인 간대상효소 유도제인 phenobarbital(PB)은 간세포내 사이토크롬 P<sub>450</sub> 산화효소계<sup>7,8)</sup>와 에스테라제<sup>9)</sup> 및 글루쿠론산 전이효소<sup>10)</sup>와 같은 포합효소들을 활성화시킬 뿐만 아니라 간혈류량 및 담즙유량을 증가<sup>11-14)</sup>시키기 때문에 병용투여된 다른 약물들의 클리어런스를 변화시킨다.

한편, 이<sup>15,16)</sup> 등의 생체내 동태 결과에 의하면, PB는 DTZ의 DAD로의 간내 형성을 촉진시키나, DAD의 간 통과율을 감소시켜 DTZ로부터 형성된 DAD의 전신순환혈 이행속도는 변화시키지 않는다고 한다. 따라서, 이러한 PB의 효과가 PB에 의한 간혈류량 증가나 간세포막 투과도 변화에 따른 간내 uptake나 release 변화요인인지, 아니면 에스테라제의 활성화 등에 의한 대사효과인지를 규명할 필요가 생겼다.

본 연구에서는 먼저 혈류에 의한 영향을 배제한 상태에서 PB에 의한 간세포막 투과도 변화가 DTZ의 간내 uptake에 미치는 영향과 PB에 의한 간대사 효소 활성도 변화가 DTZ의 간대사에 미치는 영향을 밝히고자 대조군과 PB전처리군(75 mg/kg/day, 4일간 복강내 투여) 흰쥐의 분리 간세포 분산액을 사용하여 DTZ의 간세포내 uptake에 미치는 영향과 간대사에 미치는 영향을 속도론적으로 검토하였다. 아울러, PB전처리에 따른 간세포 단백질농도의 변화와 간세포 크기 변화 등의 요인도 함께 고찰하였다.

### 실험 방법

#### 시약 및 기기

PB(나트륨염, 대원제약, KP VI), DTZ(한일약품, KP VI), 염산디펜히드라민(국제약품, KPVI), 콜라게나제 IV, 페놀레드, heptane sulfonic acid, N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethane sulfonic acid)(HEPES, 이상 Sigma사, 미국), triethylamine(Aldrich사), Folin and Ciocalteus phenol reagent(Shinyo Co., 일본) 및 HPLC용 메탄올, 아세트니트릴(이상 Merck사), n-헥산(Tedia사) 등을 사용하였으며 기타 시약은 특급 및 1급 시약을 사용하였고 증류수는 Milli Q(Millipore Co., 미국)에 통과시킨 18 megaohm-cm를 사용하였다.

실험장비 및 분석기기로써 clean bench(KMC-1400LS, Vision Co., 한국), 항온조(U3, JULABO, 독일), CO<sub>2</sub> incubator(SW-900C1, Sugong Co., 한국), masterflex pump(7016-20, Cole-Parmer Co.,

미국), 원심분리기(HSL-05A, Hanil Co., 한국), 초원심분리기(Eppendorf 5415, Brinkmann Instrument, Inc., 미국), 원심분리기(J-6B, Beckman, 영국), HPLC pump(Waters 501, Waters Co., 미국), UV spectrophotometer(Waters 484, Waters Co., 미국), particle size analyzer(Mastersizer/E, Malvern, 영국), UV spectrophotometer(Kontron 930, Kontron Co., 스위스), 현미경 사진기(Vicker Ltd., 영국), pump(DOA-V152AA, Waters Co., 미국), centrifugal evaporator(CVE-100, Tokyo Rikakikai Co., 일본), autoclave(SV-240, Tokyo Roshii Int'l Ind., 일본), hemocytometer(Neubauer, 독일) 등을 사용하였다.

#### 실험동물

한국과학기술원 실험동물 사육장에서 분양받은 체중 100~150 g의 Wistar 웅성 흰쥐를 각 실험군으로 분류하고, 물과 사료(제일 사료사)를 자유로이 공급하여 2주이상 동일조건(20~25 °C, 50~60% RH)에서 사육한 후 체중 200~250 g 범위의 것을 사용하였다.

#### 실험동물의 전처리

PB 750 mg을 생리식염수 100 ml에 녹인 액을 흰쥐 kg당 75 mg/10 ml씩 1일 1회 4일간 복강내 투여한 PB 전처리군<sup>17)</sup>과 같은 방법으로 생리식염수만을 복강내 투여한 대조군으로 나누어 실험하였다. 두 군 모두 최종 투여 후 24시간 절식시킨 다음 실험을 진행하였다.

#### 간세포의 분리

간세포 분리 방법은 Berry & Friend<sup>18)</sup>의 2단계 관류법에 기초를 두고, Seglen<sup>19-22)</sup>의 방법을 변형하여 다음과 같은 방법으로 행하였다. 절식시킨 흰쥐를 pentobarbital로 마취시킨 후, 상복부의 털을 iodine tincture로 적셔주었다. 복부의 정중선을 잘라 양쪽으로 표피를 벗겼다. 진피를 iodine tincture로 소독하고, 수술포로 수술부위를 덮어주었다. 정중선을 잘라 장은 아래부분으로 밀어내고 드러난 간 밑에 가아제를 대었다. 신장위의 하대정맥과 간문맥에 각각 봉합사를 걸고, 18 gauge catheter를 간문맥내로 삽관하였다. 그 후 간문맥내의 catheter를 통하여 0.22 μm Millipore 막을 통과시켜 멸균한 관류액을 흘려 주었고, 간이 약간 부풀면, 예리한 가위로 신장 상부의 하대정맥을 절개하여 관류된 액을 방출시켜 간내의 혈액을 제거시켰다. Masterflex pump를 사용하여 관류속도를 20~25 ml/min 정도로 유지하였으며, 항온조를 이용하여 관류액의 온도를 37°C로 유지시켰다. 약 100

ml 정도의 완충액을 관류시킨 다음 관류를 중단하고, 횡경막을 절제하여 상부 대정맥에 16 gauge catheter를 삽관하고, 하부 대정맥을 결찰하였다. 이 후 0.22  $\mu$ m Millipore 막을 통과시켜 멸균한 콜라게나제 (collagenase IV) 완충액을 순환시켜 관류를 행하였다. 이때 간이 원래의 크기보다 2배 정도 부풀고, 표피가 갈라지는 것이 육안상 관찰되던 관류를 중단하였다. 관류가 끝난 후 완충액을 100 ml 비이커에 약 50 ml 정도 넣은 후 예리한 가위로 간엽에 흡집을 내고, 흔들어 주면서 간세포를 분리해 내었다.<sup>23)</sup>

분리된 간세포에서 간 실질세포를 정제하기 위하여, 우선 분리된 간세포를 얼음에 넣고 효소작용을 억제한 다음 가아제를 두겹으로 하여 여과하였다. 여액을 두 개의 시험관에 넣고 50 g에서 5분동안 원심분리하고, 상등액은 제거하였다. 다시 차게 한 관류액에 분산시킨 후 같은 조작을 약 2회 정도 반복했다. 마지막 세포를 5~8 v/v%가 되도록 재분산하였다. 이 모든 과정은 ice bath 상에서 행하였다.<sup>24)</sup>

**세포의 viability**

세포의 viability를 측정하는 방법<sup>25,26)</sup>은 여러 가지가 있는데 여기서는 trypan blue 염색법을 사용하였다. Trypan blue 염색 시약은 등장액에 0.4%의 trypan blue를 녹인 후 여과지를 통과하였다. 세포 분산액 300  $\mu$ l에 300  $\mu$ l의 시약을 가하여 hemocytometer를 이용하여, 현미경으로 관찰하여 viability를 측정하였다. 이후 실험에 사용되는 세포 분산액은 viability가 90% 이상인 것을 사용하였다.

**단백질 정량**

간세포내의 단백질량은 Lowry 법<sup>27)</sup>에 따라 정량하였다.

**간세포 크기 측정**

Particle size analyzer를 이용하여 세포의 크기를 측정하였다. 먼저 분산제를 측정 cell 내에 넣고, 세포의 크기가 0.1~80  $\mu$ m로 예상되어, 45 mm lens를 장착하였다. 분산제에 들어있는 불순물의 간섭을 제거하기 위해 「set zero」로 맞추고, 측정 cell 내에 간세포 분산액을 150  $\mu$ l 가한 후 농도를 측정하여, 「ideal position」에 bar를 위치시켜 세포의 크기를 측정하였으며, 각 군당 3번씩 실험을 행하여 평균치를 구하였다.

**간세포내 Uptake<sup>28)</sup>**

세포 분산액을 적당히 희석하여 분산액 1 ml당 간세포의 갯수가 10<sup>6</sup>개가 되도록 하여 37°C에서 CO<sub>2</sub>:O<sub>2</sub>(95:5) 상태로 약 5분 동안 배양하였다. 시험관에

간세포 배양액을 옮긴 후, 여기에 DTZ를 녹인 HBSS (Hanks' balanced salt solution) 완충액을 가하여 최종 DTZ의 농도가 200, 400, 600, 800, 1,000 ng/ml가 되도록 하였다. 미리 25 l의 1 N HCl을 가해 놓은 Eppendorf tube에 500  $\mu$ l의 간세포 배양액을 각 시간 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 300초에 옮기는 순간 vortex mixing하여 반응을 종료<sup>29)</sup>시켰다. 그 후 1 N NaOH를 가해서 pH를 6.0~6.5가 되게 한 후 초원심분리기로 원심분리하여 상정액과 pellet을 분리하였다. 상정액 100  $\mu$ l를 취하여 HPLC로 DTZ의 농도를 측정하였다. 가라앉은 pellet중의 단백질량은 Lowry 법<sup>27)</sup>에 따라 정량하였다. 그리고 간세포 분산액내로 DTZ가 uptake되는 것을 대조군과 PB전처리군에 대해 Lineweaver-Burk plot하여 단백질량과 세포수(10<sup>6</sup> cells)로 각각 표준화하였다. 또한, 얻어진 K<sub>m</sub>과 V<sub>max</sub>를 이용하여 다음 (1)식에 따라 간고유 uptake 클리어런스(CL<sub>int,up</sub>) 값을 구하였다.

$$CL_{int,up} = \frac{V_{max}}{K_m} \left( \frac{\text{ml/min mg protein or}}{\text{ml/min } 10^6 \text{ cells}} \right) \quad (1)$$

**간세포내 대사**

세포 분산액을 적당히 희석하여 분산액 1 ml당 간세포의 갯수가 10<sup>6</sup>개가 되도록 하여 37°C에서 CO<sub>2</sub>:O<sub>2</sub>(95:5) 상태로 약 5분 동안 배양하였다. 시험관에 간세포 배양액을 옮긴 후, 여기에 DTZ를 녹인 HBSS 완충액을 가하여 최종 DTZ의 농도가 500 ng/ $\mu$ l가 되도록 하였다. 미리 n-헥산:이소아밀알코올 용액(98:2) 5 ml를 가해 놓은 시험관에 500  $\mu$ l의 간세포 배양액을 각 시간 30, 60, 90, 120, 180, 300초에 옮기는 순간 vortex mixing하여 대사반응을 종료시켰다. 이때 간세포 배양액중의 대사산물도 미변화체 상태로 남아 있는 DTZ의 농도를 이 등<sup>15,16)</sup>의 HPLC 방법에 정량하였다.

**DTZ의 정량**

간세포 분산액중의 DTZ의 농도는 이 등<sup>15,16)</sup>의 HPLC 방법에 따라 정량하였다.

**간고유클리어런스의 산출**

간세포 분산액을 이용한 간고유 대사클리어런스(CL<sub>int,m</sub>)의 값은 간세포내 대사실험 결과 얻어진 DTZ 소실농도-시간곡선상의 선형부분으로부터 Singh 등<sup>29)</sup>의 방법에 따라 다음 (2)식에 의해 구하였다.

$$CL_{int,m} = (\text{대사속도/약물농도}) \quad (2)$$

(ml/min · 10<sup>6</sup> cells)

이때 대사속도는 간세포내 대사실험 결과 각 시료채취 시간간격에서 얻어진 DTZ 소실농도-시간곡선상의 선형부분으로부터 구하였으며 약물농도는 각 시료채취 시간간격의 중간시점에서의 약물농도를 의미하고 있다.

그리고 구해진 간고유 대사클리어런스 값을 흰쥐 간 1 g당 1억2천만개의 간세포가 존재<sup>30)</sup>한다고 가정하고 흰쥐 kg당의 간 무게는 습중량을 기준으로 직접 구한 간 무게를 이용하여 흰쥐 kg당의 간고유 대사클리어런스 값으로 표준화(normalization)하였으며 본 연구자들이 생체내 실험을 통해 구한 값들<sup>15,16)</sup>과 비교하였다.

## 결 과

### 간세포의 형태와 분리

분리된 간세포의 형태를 사진기 부착 현미경으로 촬영하였다(Fig. 1). Fig. 1A는 간세포를 분리한 직후 trypan blue로 염색을 하지 않고 관찰된 형태로 각각의 세포가 잘 분리되어 있는 것을 확인할 수 있었다. Fig. 1B는 trypan blue로 염색한 결과 죽은 세포와 세포막에 손상이 있는 세포의 경우 핵이 푸르게 염색됨을 확인할 수 있었다.

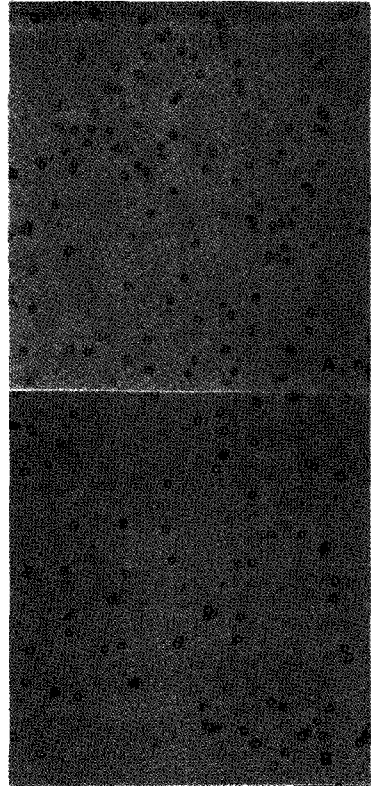
한편 분리된 간세포의 viability는 간세포 분리실험이 시간의 지체없이 순조롭게 진행되었을 때 90% 이상을 나타냈으며, 분리 후 3시간 정도 경과하면 50% 이하로 떨어졌다.

### 간세포의 크기 및 단백질량

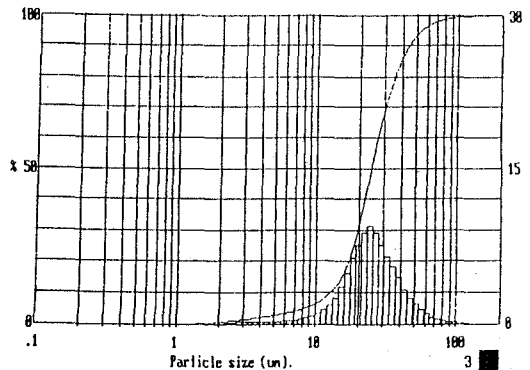
분리된 간세포의 크기를 particle size analyzer를 이용하여 측정한 결과 대조군과 PB전처리군에서 각각 Fig. 2 및 3과 같은 histogram를 얻을 수 있었으며, PB전처리에 의하여 간세포의 평균크기가 26.92±0.1364 m에서 35.31±1.00 m로 유의성(p<0.01)있게 증가함을 알 수 있었다(Table I).

또한, 간세포 분산액 중의 단백질량을 Lowry 법<sup>27)</sup>에 따라 측정하여 세포수(10<sup>6</sup> cells)로 표준화한 결과 간세포중 단백질량이 PB전처리에 의해 468.2±5.6 µg/10<sup>6</sup> cells 626.3±13.9 µg/10<sup>6</sup> cells로 유의성(p>0.01)있게 증가함을 알 수 있었다(Table I).

### DTZ의 간고유 uptake 클리어런스



**Figure 1** — Photograph of rat hepato-parenchymal cells from rat.  
Key : A: normal parenchymal cells, B: parenchymal cells treated with trypan blue dye for viability test.



**Figure 2** — Histogram of particle size in the control rat hepatocytes.

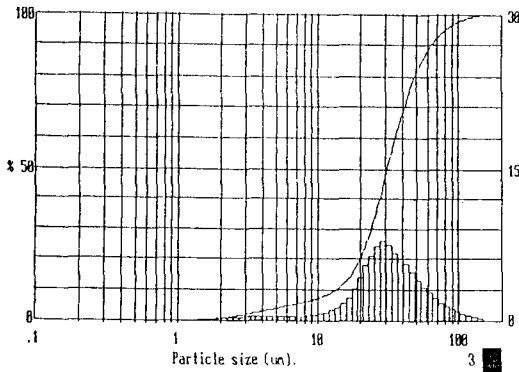
간세포 분산액내로 DTZ가 uptake되는 것을 대조군과 PB전처리군에 대해 Lineweaver-Burk plot하여 단백질량과 세포수(10<sup>6</sup> cells)로 각각 표준화한 결과를 Fig. 4 및 5에 나타내었다. 단백질량으로 표준화한 결

과에 따르면 PB전처리에 의해  $K_m$ 은 약 4.8배(2.90 → 13.89  $\mu\text{M}$ ),  $V_{max}$ 는 약 3.3배(1.21 → 3.96  $\mu\text{mole}/\text{min} \cdot \text{mg protein}$ ) 증가하였다. 한편 간세포수( $10^6$  cells)로 표준화한 결과에 따르면 PB전처리에 의해  $K_m$ 은 10.4  $\mu\text{M}$ 에서 10.3  $\mu\text{M}$ 로 거의 변화가 없었으나  $V_{max}$ 는 2.38  $\mu\text{mole}/\text{min} \cdot 10^6$  cells에서 2.83  $\mu\text{mole}/\text{min}$

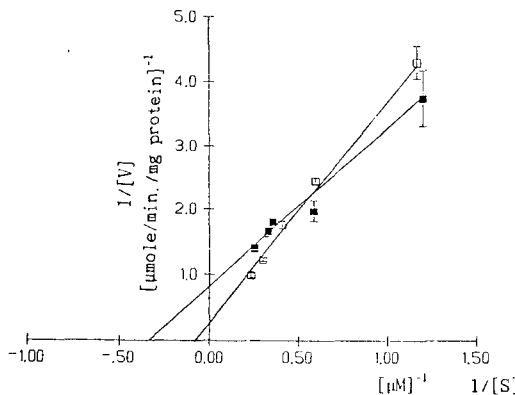
$10^6$  cells로 약 1.2배 증가하였다(Table II). 한편 (1)식에 따라 구한 간고유 uptake 클리어런스는 단백질량으로 표준화하였을 경우는 PB전처리로 인해 약 32% 감소(417 → 285  $\text{ml}/\text{min} \cdot \text{mg protein}$ )한 반면 세포수로 표준화하였을 경우는 PB전처리로 인해 약 19% 증가(229 → 272  $\text{ml}/\text{min} \cdot 10^6$  cells)하였다(Table II).

**DTZ의 간고유 대사클리어런스**

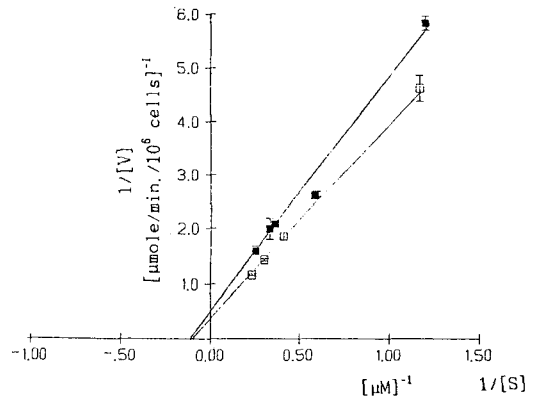
대조군과 PB전처리군 간세포 분산액중의 DTZ의 대사실험 결과 얻어진 DTZ 소실농도-시간곡선 관계를 Fig. 6에 나타내었으며 소실곡선상의 선형부분으로부터 (2)식에 따라 구한 간고유 대사클리어런스 값을 Table III에 나타내었다. 그리고 구해진 간고유 대사클리어런스 값을 흰쥐 간 1g당 1억2천만개의 간세포가 존재<sup>30)</sup>한다고 가정하고 흰쥐 kg당의 간 무게는 습중량을 기준으로 직접 구한 간 무게를 이용하여 흰쥐 kg당의 간고유 대사클리어런스 값으로 표준화하여 Table III에 나타내었다. PB전처리로 인하여 DTZ의 간고유 대사클리어런스가 3.73배(0.640 → 2.385  $\text{ml}/\text{min} \cdot 10^6$  cells) 증가함을 알 수 있었다. 한편 DTZ의 간고유



**Figure 3**—Histogram of particle size in the phenobarbital-pretreated rat hepatocytes.



**Figure 4**—Effect of phenobarbital pretreatment on diliazem disappearance in hepatocyte suspension by Lineweaver-Burk plot normalized with amounts of protein. Key : ■:Control, □:PB-pretreated.



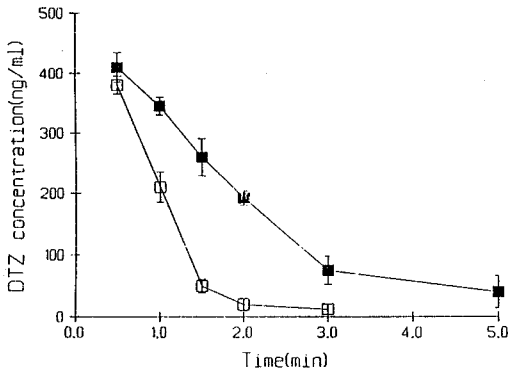
**Figure 5**—Effect of phenobarbital pretreatment on diliazem disappearance in hepatocyte suspension by Lineweaver-Burk plot normalized with  $10^6$  cells. Key : ■:Control, □:PB-pretreated.

**Table I**—Effect of Phenobarbital Pretreatment on the Particle Size and the Amount of Protein in the Liver

	Control	PB-pretreated
Liver weight(g/kg body weight)	33.27±0.77	42.42±1.19 <sup>a</sup>
Particle size( $\mu\text{m}$ )	26.92±0.14	35.31±1.00 <sup>a</sup>
Amount of protein( $\mu\text{g}/10^6$ cells)	468.20±5.63	626.31±13.94 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Mean±S.E. (n=6)

<sup>b</sup>p<0.01



**Figure 6**— In vitro metabolism of diltiazem by rat hepatocytes. Each data point is a mean of three experiments. SDs are shown by vertical lines. Key : ■ :Control, □ :PB-pretreated.

uptake 클리어런스는 간고유 대사클리어런스보다도 약 350배 이상 큰 값을 나타내고 있었으며 이로부터 DTZ의 간세포내 대사과정에서 uptake 단계는 율속단계가 아님을 알 수 있었다.

**고 찰**

**간세포의 분리**

간은 체내 대사과정에 있어서 중요한 기능을 담당하고 있고, 생명체의 생체 항상성을 유지하는 중요한 기관이므로, 간의 생리현상이나 병리현상을 연구하기 위한 많은 in vitro 연구방법들이 사용되어 왔다. 이러한

대표적인 방법들로는 isolated perfused liver,<sup>31~33)</sup> incubated liver slices, isolated hepatic parenchymal cells,<sup>20~24,34,35)</sup> hepatocyte primary culture,<sup>18)</sup> liver cell line 등을 들 수 있다. 이들 방법을 사용하여 상당히 귀중한 생체정보를 얻을 수 있지만 각 실험계는 나름대로의 기술적 한계를 가지고 있다.

한편 현재까지 동물에서의 간세포 분리 기술은 주로 Berry와 Friend<sup>18)</sup> 및 Seglen<sup>19~22)</sup>의 방법에 기초하고 있다. 그 근본 원리는 장기의 관류와 콜라게나제를 이용한 효소소화이다. 간세포는 입체구조상 콜라겐 matrix에 묻혀 있기에 간세포를 분리하기 위해서는 우선 preperfusion을 통하여 혈액을 제거한 후 콜라게나제로 콜라겐을 소화시키고 간조직을 배지 위에서 기계적인 힘을 가하여 분리하는 것이다. 이 방법의 단점으로는 첫째 세포를 분리하고자 하는 장기간 완벽한 혈관계를 갖고 있어야 하고, 둘째 작은 절편에서는 분리할 수 없으며, 셋째 동물 수술 후 perfusion이 완료될 때까지 마취약을 투여하여야 하므로 간세포가 마취약에 노출되어 있고, 넷째 recirculation시 사용되는 pump, chamber, tube 등 복잡한 장비를 필요로 하고 있다는 점 등을 들 수 있다. 장점으로는 첫째 많은 양의 간세포를 빠른 시간 내에 분리할 수 있고, 둘째 viability가 비교적 좋으며, 셋째 혈액 세포(blood cell)의 오염을 최소화시킬 수 있다는 장점이 있다. 이러한 점 때문에 아직까지 간세포 분리방법으로는 관류법이 가장 일반적으로 이용되고 있다. 본 실험에서도 Berry와 Friend<sup>18)</sup>의 2단계 관류법에 기초를 두고,

**Table II**— Normalized Kinetic Parameters of Diltiazem by Lineweaver-Burk Plot in the Isolated Rat Hepatocytes.

	Protein(mg)		Cells(10 <sup>6</sup> )	
	Control	PB-pretreated	Control	PB-pretreated
K <sub>m</sub> (μM)		2.90		13.89
V <sub>max</sub> (μmole/min)		1.21		3.96
CL <sub>int.up</sub> (ml/min)		417.24		285.10

**Table III**— In vitro and in vivo Hepatic Intrinsic Metabolic Clearance of Diltiazem<sup>a</sup>

	Control	PB-pretreated
CL <sub>int.m</sub> (ml/min · 10 <sup>6</sup> cells)	0.640±0.038	2.385±0.212 <sup>c</sup>
CL <sub>int.m</sub> (ml/min · kg) <sup>b</sup>	2555	12140
CL <sub>int.m</sub> (ml/min · kg) <sup>2</sup>	3342	12864

<sup>a</sup>Mean±S.E. (n=6). \*p<0.01

<sup>b</sup>Calculated by 120 million cells/g liver quoted from reference. (30)

<sup>c</sup>CL<sub>int</sub> calculated from hepatic intrinsic clearance (f<sub>p</sub> · CL<sub>int</sub>) of reference. (15)

Seglen<sup>19-22)</sup>의 방법을 변형하여 간세포를 분리한 결과 간세포의 viability를 일정 수준 이상으로 확보할 수 있었으며 콜라게나제의 농도를 기존의 0.05 w/v %에서 0.03 w/v %까지 낮추어도 분리가 양호함을 알 수 있었다. 그리고 간세포 분리를 시작한 후 uptake와 대사 실험을 1시간 이내에 완결시킬 수 있었다.

### 간고유 uptake와 대사 클리어런스

분리된 간세포 분산액은 현재 cytochrome P450과 관련된 약물의 대사와 일련의 생화학적인 연구를 진작시키는 계기가 되었다. 그리고 이러한 실험은 용해된 효소 혹은 분리된 소기관 분획을 이용한 연구와 전체 동물 혹은 적출된 간을 이용한 실험의 중간단계의 연구로써 유용한 수단으로 인정받고 있다.<sup>24)</sup> 특히나 분리된 간세포는 intact tissue로서의 성질을 충분히 가지고 있으며, 투과도도 간조직과 유사하므로 약물의 uptake 연구와 약물 대사의 조절, 그리고 약물 대사체의 구조 및 배설에 관한 연구에 유용하게 사용되고 있다. 더구나 전체 동물 혹은 적출된 간을 이용한 간조직내 uptake 연구는 혈류나 대사 혹은 담즙분비 등 여러 인자가 복잡하게 관여하는 반면에 isolated hepatic parenchymal cell을 가지고 간세포내 uptake 과정을 속도론적으로 연구하면 혈류나 담즙분비에 의한 영향을 배제할 수 있고 상대적으로 짧은 시간내에 여러 농도에서 실험이 가능하므로, uptake의 초기속도를 추정하고, uptake 과정의 속도론적 특성을 조사하는데 유용한 수단을 제공한다. 또한 대사 저해제, 배양 조건(예, 이온농도, pH, 온도 등), uptake 과정이 비슷한 화합물에 의한 영향 등을 실험하는 계로도 사용할 수 있다.<sup>17)</sup>

본 연구에서는 이와 같은 특징을 가지고 있는 분리 간세포 실험계를 이용하여 PB전처리가 DTZ의 간내 uptake와 대사에 미치는 영향을 속도론적으로 검토하였다. 그 결과 PB전처리로 인해 간고유 uptake 클리어런스는 단백질량으로 표준화하였을 경우는 약 32% 감소(417→285 ml/min · mg protein)한 반면 세포수로 표준화하였을 경우는 약 19% 증가(229→272 ml/min · 10<sup>6</sup> cells)하였다(Table II). 한편 PB전처리로 인해 간중량은 흰쥐 kg당 1.28배 증가(33.27→42.42 g)하고 총단백량은 간세포 10<sup>6</sup>개당 1.34배 증가(468.2→626.31 μg)하며 세포크기는 1.31배 증가(26.92→35.31 μm)하기에 간세포의 총수는 변화하지 않을 것으로 사료되었다(Table II). 따라서 간조직 전체를 기준으로 하였을 때 PB전처리로 인해 DTZ의 간고

유 uptake 클리어런스는 증가할 것으로 사료되었다. 그러나, DTZ의 간고유 uptake 클리어런스는 간고유 대사클리어런스보다도 약 350배 이상 큰 값을 나타내고 있어 DTZ의 간세포내 대사과정에서 uptake 단계는 율속단계가 아님을 알 수 있었으므로 PB전처리로 인한 DTZ의 간고유 uptake 클리어런스의 증가는 전체 클리어런스의 증가에 크게 기여하지 않을 것으로 생각되었다. 한편 PB전처리로 인하여 DTZ의 간고유 대사클리어런스는 3.73배(0.640→2.385 ml/min · 10<sup>6</sup> cells) 증가하였다(Table III). 그리고 이러한 간고유 대사클리어런스를 흰쥐 간 1 g당 1억2천만개의 간세포가 존재<sup>30)</sup>하고 흰쥐 kg당의 간 무게는 직접 구한 간 무게를 기준으로 하여 흰쥐 kg당의 간고유 대사클리어런스 값으로 표준화한 결과 PB전처리로 인하여 간고유 대사클리어런스는 2555 ml/min · kg에서 12140 ml/min · kg로 증가하였으며 이는 본 연구자들이 생체내 실험을 통해 얻은 결과<sup>15,16)</sup>인 3342 ml/min · kg에서 12864 ml/min · kg로의 증가와 거의 비슷하였다(Table III). 이로부터 PB가 DTZ의 클리어런스를 증가시키는 데에 간고유 대사클리어런스의 증가가 가장 크게 기여함을 알 수 있었으며 아울러 이러한 분리 간세포를 이용하여 구한 간고유 대사클리어런스 값은 생체내 실험 값을 추정해 내는 데에도 기여할 수 있을 것으로 사료되었다.

## 결 론

PB전처리(75 mg/kg/day, 4일간 복강내 투여)가 DTZ의 간내 uptake와 대사에 미치는 영향을 분리 간세포를 사용하여 속도론적으로 검토한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. PB전처리로 인해 간세포의 평균크기가 26.92±0.1364 μm에서 35.31±1.00 μm로 유의성(p<0.01)있게 증가하였으며 간세포중 단백질량이 468.2±5.6 μg/10<sup>6</sup> cells에서 626.3±13.9 μg/10<sup>6</sup> cells로 유의성(p<0.01)있게 증가함을 알 수 있었다.
2. PB전처리로 인해 간고유 uptake 클리어런스는 단백질량으로 표준화하였을 경우는 약 32% 감소(417→285 ml/min · mg protein)한 반면 세포수로 표준화하였을 경우는 약 19% 증가(229→272 ml/min · 10<sup>6</sup> cells)하였다. 또한, PB전처리로 인하여 DTZ의 간고유 대사클리어런스가 3.73배(0.640→2.385 ml/min · 10<sup>6</sup> cells) 증가하였다. 이로부터 DTZ의 간고유 uptake 클리어런스는 간고유 대사클리어런스보다도 약

350배 이상 큰 값을 나타내고 있어 DTZ의 간세포내 대사과정에서 uptake 단계는 율속단계가 아님을 알 수 있었다.

4. 분리 간세포 실험을 통해 얻은 간고유 대사클리어런스를 흰쥐 kg당의 간고유 대사클리어런스 값으로 표준화하여 생체내 실험을 통해 얻은 값과 비교해 본 결과 거의 비슷한 추정치를 얻을 수 있었다. 이로부터 PB가 DTZ의 클리어런스를 증가시키는 데에 간고유 대사클리어런스의 증가가 가장 크게 기여함을 알 수 있었으며 아울러 이러한 분리 간세포를 이용하여 구한 간고유 대사클리어런스 값은 생체내 실험 값을 추정해 내는 데에도 기여할 수 있을 것으로 사료되었다.

### 감사의 말씀

이 논문은 1994년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

### 문헌

- 1) M.M. Chaffman and R.N. Brogden, Diltiazem. A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy, *Drugs*, **29**, 387-399 (1989).
- 2) J. Sugihara, Y. Sugawara, H. Ando, S. Harigaya, A. Etoh and K. Kohno, Studies on the metabolism of diltiazem in man, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **7**, 24-31 (1984).
- 3) Y. Sugawara, M. Ohashi, S. Nakamura, S. Usuki, T. Suzuki, Y. Ito, T. Kume, S. Harigaya, A. Nakayo, M. Gaino and H. Inoue, Metabolism of diltiazem. I. Structures of new acidic and basic metabolites in rat, dog and man, *ibid.*, **11**, 211-218 (1988).
- 4) Y. Sugawara, S. Nakamura, S. Usuki, Y. Ito, T. Suzuki, M. Ohashi and S. Harigaya, Metabolism of diltiazem. II. Metabolic profile in rat, dog and man, *ibid.*, **11**, 224-230 (1988).
- 5) S. Nakamura, Y. Ito, T. Fukushima, Y. Sugawara and M. Ohashi, Metabolism of diltiazem. III. Oxidative deamination of diltiazem in rat liver microsomes, *ibid.*, **13**, 612-619 (1990).
- 6) H. Yabana, T. Nagao and M. Sato, Cardiovascular effects of the metabolites of diltiazem in dogs, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **7**, 152-159 (1985).
- 7) F.P. Guengerich, G.A. Dannan, S.T. Wright, M.V. Martin and L.S. Kaminsky, Purification and characterization of liver microsomal cytochromes P-450. Electrophoretic, spectral, catalytic and immunochemical properties and inducibility of eight isozymes isolated from rats treated with phenobarbital or  $\beta$ -naphthoflavone. *Biochemistry*, **21**, 6019-6026 (1982).
- 8) D.J. Waxman and C. Walsh, Phenobarbital-induced rat liver cytochrome P-450. Purification and characterization of two closely related isozymic forms, *J. Biol. Chem.*, **257**, 1046-1052 (1982).
- 9) M. Raftell, K. Berzins and F. Blomberg, Immunochemical studies on a phenobarbital-inducible esterase in rat liver microsomes, *Arch. Biochem. Biophys.*, **181**, 534-541 (1977).
- 10) K.W. Bock, D. Jasting, W. Lilieblum and H. Pfeil, Purification of rat liver microsomal UDP-glucuronyltransferase, separation of two enzyme forms inducible by 3-methylcholanthrene or phenobarbital, *Eur. J. Biochem.*, **98**, 19-26 (1979).
- 11) E.E. Ohnhaus, S.S. Thorgeirsson, D.S. Davies and A. Breckenridge, Changes in liver blood flow during enzyme induction, *Biochem. Pharmacol.*, **20**, 2561-2570 (1971).
- 12) E.E. Ohnhaus and J.Th. Locher, Liver blood flow and blood volume following chronic phenobarbital administration, *Eur. J. Pharmacol.*, **31**, 161-167 (1975).
- 13) A.S. Nies, G.R. Wilkinson, B.D. Rush, J.T. Strother and D.G. McDevitt, Effects of alteration of hepatic microsomal enzyme activity on liver blood flow in the rat, *Biochem. Pharmacol.*, **25**, 1991-1999 (1976).
- 14) C.D. Klaassen, Studies on the increased biliary flow produced by phenobarbital in rats, *J. Pharm. Exp. Ther.*, **176**, 743-750 (1971).
- 15) Y.B. Lee, I.B. Koh and M.H. Lee, The effect of phenobarbital pretreatment on the pharmacokinetics of diltiazem in rats, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **22**, 219-227 (1992).
- 16) Y.B. Lee, I.B. Koh, C.K. Shim, S.K. Kim and M.H. Lee, Effect of phenobarbital on the metabolite kinetics of diltiazem in rat, *ibid.*, **22**, 301-306 (1992).
- 17) T. Iga, D.L. Eaton, and C.D. Klaassen, Uptake of unconjugated bilirubin by isolated rat hepatocytes, *Am. J. Physiol.*, **236**, C9-C16 (1979).
- 18) M.N. Berry and D.S. Friend, High-yield pre-



- paration of isolated rat liver parenchymal cells, *J. Cell Biol.*, **43**, 506-512 (1969).
- 19) P.O. Seglen, The effect of perfusate pH on respiration and glycolysis in the isolated rat liver perfused with an erythrocyte and protein-free medium, *Biochim. Biophys. Acta.*, **264**, 398-406 (1972).
  - 20) P.O. Seglen, Preparation of rat liver cells(I. Effect of  $Ca^{2+}$  on enzymatic dispersion of isolated, perfused liver), *Exp. Cell Res.*, **74**, 450-459 (1972).
  - 21) P.O. Seglen, Preparation of rat liver cells(II. Effect of ions and chelators on tissue dispersion), *ibid*, **76**, 25-34 (1973).
  - 22) P.O. Seglen, Preparation of rat liver cells(III. Enzymatic requirements for tissue dispersion), *ibid*, **82**, 391-400 (1973).
  - 23) S.R. Wagle and W.R. Ingebresten, Isolation, purification, and metabolic characteristics of rat liver hepatocytes, *Method in Enzymol.*, **35**, 579-585 (1975).
  - 24) P. Moldeus, J. H gberg and S. Orrenius, Isolation and use of liver cells, *ibid*, **52**, 60-68 (1978).
  - 25) P.O. Seglen, Preparation of isolated rat liver cells, *Methods Cell Biol.*, **13**, 29-37 (1976).
  - 26) H. Baur, S. Kasperek and E. Pfaff, Criteria of viability of isolated liver cells, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **356**, 827-833 (1975).
  - 27) O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-273 (1951).
  - 28) S.C. Tsao, T.H. Dickinson and D.R. Abernethy, Metabolite inhibition of parent drug biotransformation : Studies of diltiazem, *Drug Metab. and Dispos.*, **18**, 180-185 (1990).
  - 29) K. Singh, S.L. Tripp, A.W. Dunton, F.L. Douglas, and A. Rakhit, Determination of in vitro hepatic extraction ratio from in vitro metabolism by rat hepatocytes, *ibid*, **19**, 990-996 (1991).
  - 30) R.N. Zhalten and F.W. Stratman, The isolation of hormone-sensitive rat hepatocytes by a modified enzymatic technique, *Arch. Biochem. Biophys.*, **163**, 600-608 (1974).
  - 31) P.V.D. Sluijs, B. Postema and D.K.F. Meijer, Lactosylation of albumin reduces uptake rate of dibromosulfophthalein in perfused rat liver and dissociation rate from albumin *in vitro*, *Hepatology*, **7**, 688-696 (1987).
  - 32) J.G. Fitz, N.M. Bass and R.A. Weisiger, Hepatic transport of a fluorescent stearate derivative : Electrochemical driving forces in intact rat liver, *Am. J. Physiol.*, **261**, 683-689 (1991).
  - 33) M. Ookhtens and N. Kaplowitz, The use of isolated perfused liver in studies of biological transport processes, *Methods in Enzymol.*, **192**, 485-491 (1990).
  - 34) R. Howard, A.K. Christensen, F.A. Gibbs, L. A. Pesch, The enzymatic preparation of isolated intact parenchymal cells from rat liver, *J. Cell Biol.*, **35**, 675-680 (1967).
  - 35) G.M. Decad, D.P.H. Hsieh and J.L. Byard, Maintenance of cytochrome P-450 and metabolism of aflatoxin B1 in primary hepatocyte cultures, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **78**, 279-285 (1977).