

치로트로핀 유리 호르몬의 점막 투과 증진

전인구* · 신동원
동덕여자대학교 약학대학

Enhanced Transmucosal Permeation of Thyrotropin-releasing Hormone

In Koo CHUN* and Dong Won SHIN

College of Pharmacy, Dongduk Women's University, Seoul 136-714, Korea

(Received September 1, 1999; accepted September 31, 1999)

Abstracts—The *in vitro* permeation of thyrotropin-releasing hormone (TRH) through rabbit nasal, rectal and duodenal mucosae was studied in the absence and presence of an enzyme inhibitor and permeation enhancer. TRH in the donor and receptor solutions was assayed by HPLC. When thimerosal (TM, 0.5 mM) was added to the donor cell as an inhibitor, the permeation rate of TRH (200 µg/ml) increased linearly as a function of time. Fluxes of TRH through the nasal, rectal and duodenal mucosae were found to be 33.3 ± 5.9 , 11.8 ± 1.9 and 9.6 ± 0.7 µg/cm²/hr, respectively. The addition of sodium glycocholate, glycyrrhizic acid ammonium salt, sodium taurodihydrofusidate or L- α -lysophosphatidylcholine to the donor solution containing TM did not result in the significant increase of permeation flux except for the duodenal mucosa, comparing with that in the presence of TM alone. Consequently, it was suggested that the nasal route was advantageous for systemic delivery of TRH, and the addition of TM and/or an enhancer was necessary to maximize the transmucosal permeation of TRH.

Keywords □ thyrotropin-releasing hormone, nasal, rectal, duodenal mucosa, enzyme inhibitor, enhancer, permeation

생물공학의 발전과 펩티드 및 단백질에 대한 생리기능에 관한 지식이 증가됨에 따라 종래의 주사와 같은 비경구 투여법을 대체할 수 있는 투여의 필요성이 더욱 중요하게 되었다. 가장 편리한 투여경로는 경구이지만 펩티드와 단백질에 대해서는 효소 장벽, 난흡수성 및 간초회통과효과로 인하여 효과적이지 못하다. 따라서 경구투여의 대체투여경로로 비강, 직장, 구강, 질, 폐, 눈 등의 점막을 이용한 경로가 많이 연구되어 왔다(Chien, 1992; Chun 등, 1996).

치로트로핀 유리 호르몬(L-pyroglutamyl-L-histidyl-L-proline amide, TRH)은 갑상선 기능의 진단에 임상적으로 사용되는 트리펩티드이다. TRH는 치로트로핀의 합성과 뇌하수체 전엽으로부터의 분비를 조절하는 hypothalamic peptide로 여러 내분비계 및 중추 관련 생리활성이 있고 우울증, 속크 및 정신분열증과 같은 신경 및 신경정신 장애의 치료 약물로서의 가능성이 제시되어 왔다(Metcalf, 1982; Loosen, 1988; Metcalf와 Jackson, 1989). 그러나 TRH는 혈장중에서는 주로 pyroglutamyl aminopeptidase류에 의해 N-말단의 pyroglutamyl 잔기가 급속히 제거되어 생물학적 반감기가 약 6~9분으로 매우 짧다(Morley 등,

1979; Iversen, 1988; Møss와 Bundgaard, 1990). 조직내에서도 이들 효소에 의해 신속히 분해가 일어나며 뇌로의 이행이 적다는 문제점(Hichens, 1983; Loosen, 1988)이 있으며, 소장이나 구강에서는 주로 prolyl endopeptidase에 의해 proline amide 잔기가 분해되어 TRH-OH를 생성하면서 분해되는 것으로 보고되었다(Møss 등, 1990; Dowty 등, 1992). 따라서 TRH의 치료적 적응증을 확대시키기 위해서는 비경구 이외의 대체 투여경로에 관해 TRH의 수송 가능성을 검토해 볼 필요성이 크다.

비강 등의 점막은 위장관에 비해 효소 활성이 낮고 점막의 두께가 얇으며 점막 아래는 혈관계가 잘 발달되어 있어 펩티드 및 단백질의 유망한 대체 투여경로로 검토되어 왔다(Pontiroli, 1998). 그러나 펩티드류의 점막 수송을 도모하기 위해서는 투과 또는 흡수되기 전 점막 부위에서의 펩티드류의 분해정도를 측정하고 안정화를 도모할 필요가 있다. Jørgensen과 Bechgaard(1994)는 사람의 비강 세척액에서는 TRH의 효소적 분해가 느린 반면 토끼의 비강 점막 균등질액과 상정액에서는 분해가 빨랐다고 보고하였다. 또한 이러한 분해는 글리코콜린산나트륨의 첨가에 의해 90% 이상 억제시킬 수 있었다고 하였다.

*To whom correspondence should be addressed.

저자 등(Chun과 Shin, 1997)은 토끼의 비강, 직장 및 십이지장 점막의 추출액을 제조하고 추출액중 TRH의 분해 정도를 검토하여 분해 반감기가 각각 67.6, 12.5 및 1.1 hr로 십이지장 점막에 비해 대체 경로인 비강 점막에서 분해가 매우 느림을 보고하였고, 각 점막 추출액에서 TRH의 안정화를 도모하기 위해 수종의 효소억제제를 검토한 결과 치메로살과 염화벤잘코늄이 농도 의존적으로 TRH의 분해를 효과적으로 억제시킴을 보고한 바 있다. 본 연구에서는 TRH의 경점막 수송을 도모하고자 토끼의 적출 비강, 직장 및 십이지장 점막 투과에 미치는 효소억제제 및 투과 촉진제류의 영향을 검토하였다.

실험방법

실험동물

체중 2.5~3.5 kg의 건강한 New Zealand White계 자성 토끼를 서울대병원 동물사육실에서 구입하여 사용하였다.

시약

재료 및 시약으로 TRH(초산염), Phe-Leu, 치메로살(TM), 글리코폴린산나트륨(SGC), 글리시리진산암모늄(GAA), L- α -리소포스파티딜콜린(LPC), 토끼 알부민(Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.), 타우로디히드로부시딘산나트륨(STDHF, Scios-Nova Inc., Mountain View, U.S.A.), 브롬페놀블루(BPB)(Junsei Chemical Co., Japan)를 사용하였다. HPLC용 아세토니트릴은 Lab-Scan Ltd.의 것을 사용하였고 기타 시약은 시판 특급품을 썼다. 물은 정제수를 초순수제조장치(UHQPS, Elgastat, England)를 통과시켜 18 M 이상인 것을 사용하였다.

기기 및 장치

사용한 기기 및 장치로는 고속액체크로마토그래프(Series 410, Perkin-Elmer, U.S.A.), 흡광도 측정기(Lambda 4A, Perkin-Elmer, U.S.A.), 항온진탕수욕장치(D-6072, Karl Kolb, Germany) 등을 사용하였고, 점막 투과시험에는 Valia-Chien permeation system(Biocrown Glass, NJ, U.S.A.) (Chun과 Yang, 1992)을 사용하였다.

점막의 적출

토끼의 귀정맥에 공기를 주입하여 치사시킨 후 십이지장 및 직장 점막조직을 절개한 다음 heavy scissors로 비강을 노출시켰다. 비강연골의 상단, 기저 및 하단부위를 수술용 칼(#10)로 조심스럽게 적출하여 생리식염수로 가볍게 씻고 장갑을 낀 엄지 손가락으로 연골에 부착된 비강 점막을 한 쪽 끝부터 조심스럽게 밀어올려 박리하였다. 적출 및 절제 조작은 토끼를 치사시킨 후 30분 이내에 완료하였다.

TRH의 점막투과 시험

신선하게 적출된 비강, 직장 및 십이지장 점막을 half-cell 사이에 점막측이 donor cell을 향하도록 하고 장막측이

receptor cell을 향하도록 각각 장착하였다. TRH를 생리식염수에 녹여 원액(4,000 $\mu\text{g/ml}$)을 제조하고 이 원액 150 μl 및 등장 인산염 완충액(비강 pH 8.0, 직장 pH 7.2 및 십이지장 pH 7.4) 2,850 μl 를 donor cell에 넣어 TRH의 농도를 200 $\mu\text{g/ml}$ 로 하였다. Receptor cell에는 pH 7.4 등장 인산염 완충액 3.0 ml를 넣어 24시간 동안 magnetic star-head bar를 이용하여 600 rpm으로 교반하면서 37°C 항온을 유지하였다. 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16 및 24시간에 점막측 및 장막측에서 각각 50 μl 를 취하여 내부표준물질로 Phe-Leu를 6 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 함유하는 pH 2.2 인산염 완충액을 450 μl 를 넣고 vortexing하여 효소반응을 정지시켰다. 이 액 20 μl 를 HPLC에 주입하고 donor cell에서의 TRH의 잔존량과 re-ceptor cell로의 투과량을 미리 작성한 검량선으로부터 구하였다. 초기량에 대한 투과량의 백분율을 투과율(%)로 하고 3회 시험하여 그 평균값으로 나타내었다.

효소억제제가 TRH의 점막투과에 미치는 영향

TRH 원액(4,000 $\mu\text{g/ml}$) 150 μl , 10 mM TM 150 μl 및 등장 인산염 완충액(비강 pH 8.0, 직장 pH 7.2 및 십이지장 pH 7.4) 2,700 μl 를 각 점막측의 donor cell에 넣고 10 mM TM 150 μl 및 등장 인산염 완충액(pH 7.4) 2,850 μl 를 receptor cell에 넣은 다음 24시간 동안 magnetic star-head bar를 이용하여 600 rpm으로 교반하면서 37°C 항온을 유지하면서 위에서와 같이 조작하여 투과시험을 행하였다.

효소억제제의 존재시 흡수촉진제가 TRH의 점막투과에 미치는 영향

TRH(4,000 $\mu\text{g/ml}$) 150 μl , 10 mM TM 150 μl 및 인산염 완충액(비강 pH 8.0, 직장 pH 7.2 및 십이지장 pH 7.4) 1,200 μl 를 각 점막측의 donor cell에 넣고 여기에 흡수촉진제로 30 mM SGC 용액, 30 mM GAA 용액, 30 mM STDHF 용액 또는 1% LPC 용액을 각 1,500 μl 씩 첨가하고, receptor cell에는 10 mM TM 150 μl 및 인산염 완충액(pH 7.4) 2,850 μl 를 넣어 37°C에서 24시간 동안 magnetic star-head bar를 사용하여 600 rpm으로 교반하면서 위에서와 같이 조작하여 투과시험을 행하였다.

겉보기 투과계수(P_{app})는 다음 식을 사용하여 계산하였다.

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \frac{1}{CA} (\text{cm/s})$$

단, dQ/dt 는 회귀직선의 기울기($\mu\text{g/s}$), C는 donor cell중 약물의 양(μg), A는 노출된 점막의 표면적(0.64 cm^2)이다.

점막 투과액중 단백질 함량 측정

Schossinsky 등(1987)의 방법을 준용하여 추출액중 단백질 함량을 측정하였다. 생리등장 인산염 완충액(각각 pH 8.0, 7.2 및 7.4) 각각에 토끼 혈청 알부민을 녹여 1 mg/ml의

농도로 제조한 후 각기의 완충액으로 0~500 µg/ml 희석시키고 이 액 500 µl에 BPB 용액 2.0 ml를 넣어 섞고 파장 610 nm에서 공시험액을 대조로 표준액의 흡광도를 측정하여 각각 검량선을 작성하였다. 비강, 직장 및 십이지장 점막을 통한 투과시험 직후 donor 및 receptor액을 취하여 각 500 µl에 BPB 용액 2.0 ml를 넣어 섞고 흡광도를 측정하고 검량선으로부터 단백질량을 정량하였다.

TRH의 정량

HPLC Series 410(Perkin-Elmer) 및 검출기(LC 90 UV spectrophotometric detector, Perkin-Elmer), 데이터 처리장치 Varian 4290 integrator를 사용하고 칼럼으로는 Zorbax C8 QC(4.6 mm ID×25 cm) 칼럼을 사용하고, 이동상으로 0.05 M 인산염 완충액(pH 7.0) 및 아세트니트릴 혼합액(98:2 v/v)을 사용하였다. 유속 1.0 ml/min, 파장 214 nm에서 20 µl를 주입하였다. 따로 TRH의 농도를 0~100 µg/ml로 순차로 달리 하여 만든 표준액과 각각에 내부표준물질로서 Phe-Leu(10 µg/ml)을 넣어 얻은 HPLC 크로마토그램으로부터 피크높이비를 구하여 검량선을 작성하고 이로부터 검체 중의 TRH의 잔존량과 투과량을 구하였다.

통계처리

실험결과는 평균치와 표준편차로 나타내었고, 대조와의 차이는 Student t-test로 검정하였다. p 값이 5% 미만일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판단하였다.

결과 및 고찰

점막 투과시험 중 Donor Phase에서의 TRH의 분해 및 투과

Valia-Chien 투과 시스템에 토끼의 비강, 직장 및 십이지장 점막을 신선하게 적출하여 장착하고 투과시험을 행하여 donor cell중 TRH의 잔존률과 receptor cell로의 투과량을 Fig. 1에 나타내었다. 이에서 보는 바와 같이 비강 점막의 경우 donor측에서는 시간이 경과함에 따라 TRH가 점차 감소하였고 receptor cell에서는 시간이 경과함에 따라 투과량이 약간씩 증가하였으나 12시간째에 22.4%를 기점으로 감소하였다. 한편 직장 점막의 경우 donor측에서는 시간이 지남에 따라 TRH가 점차 감소하여 16시간에 69.9%, 24시간에 17.1%를 나타낸 반면 receptor cell로의 투과는 1시간대부터 검출되기 시작하여 3.5%를 나타낸 후 16시간에 21.5%를 기점으로 다시 감소하기 시작하였다. 십이지장 점막의 경우도 donor cell에서 시간이 경과함에 따라 TRH의 잔존량이 점차 감소되었고 receptor cell로의 투과량은 1시간대에 3.6% 투과되어 16시간까지 24.1% 투과된 후 다시 감소되었다.

얻어진 결과로부터 볼 때 점막측에서 TRH는 점막의 종류에 관계없이 투과 12-16시간까지는 70% 이상 잔존하였

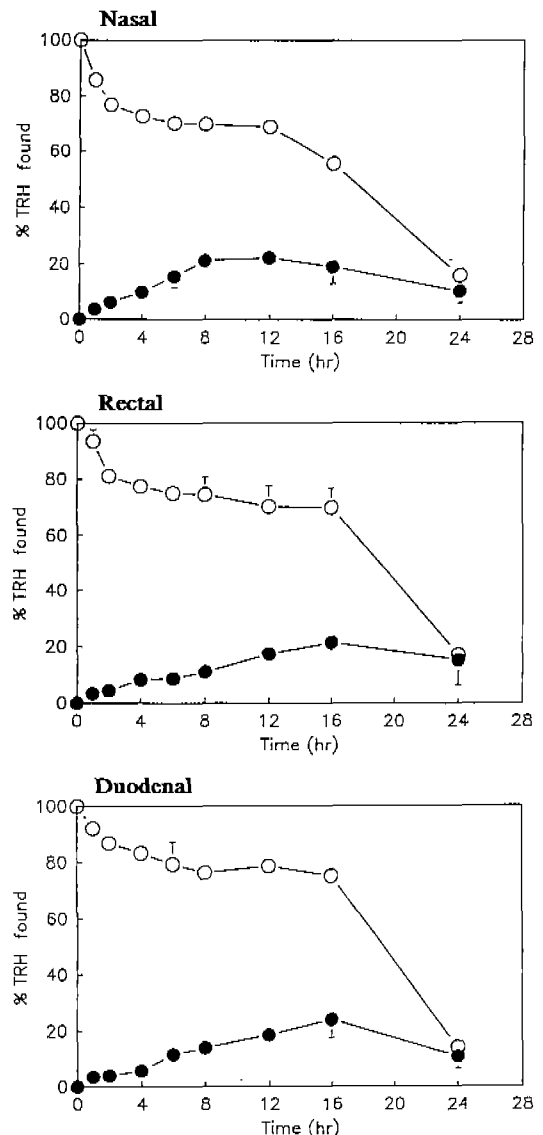


Fig. 1. Time-course disappearance (○) of TRH (200 µg/ml) in the donor phase and permeation (●) of TRH into the receptor cell through the nasal, rectal and duodenal mucosae in the absence of inhibitor. Each point represents mean ± S.D. (n=3).

으나 이후 급격히 분해 또는 소실되는 경향을 보여주었다. Receptor cell로의 투과는 비강이 12시간대에, 직장과 십이지장 점막에서는 16시간대에 최대 투과량에 도달한 후 투과량이 감소되었다. 따라서 점막을 통해 receptor cell로 투과가 이루어졌다고 하더라도 receptor 용액 중으로 추출되어 나온 TRH 분해효소에 의해 분해되기 때문에 정확한 투과량을 알기 위해서는 효소억제제와 같은 안정제의 첨가가 필요하다.

효소억제제가 TRH의 점막 투과에 미치는 영향

저자 등(Chun과 Shin, 1997)은 TM과 염화벤잘코늄이 비강, 직장 및 십이지장 점막 추출액중에서 TRH의 분해

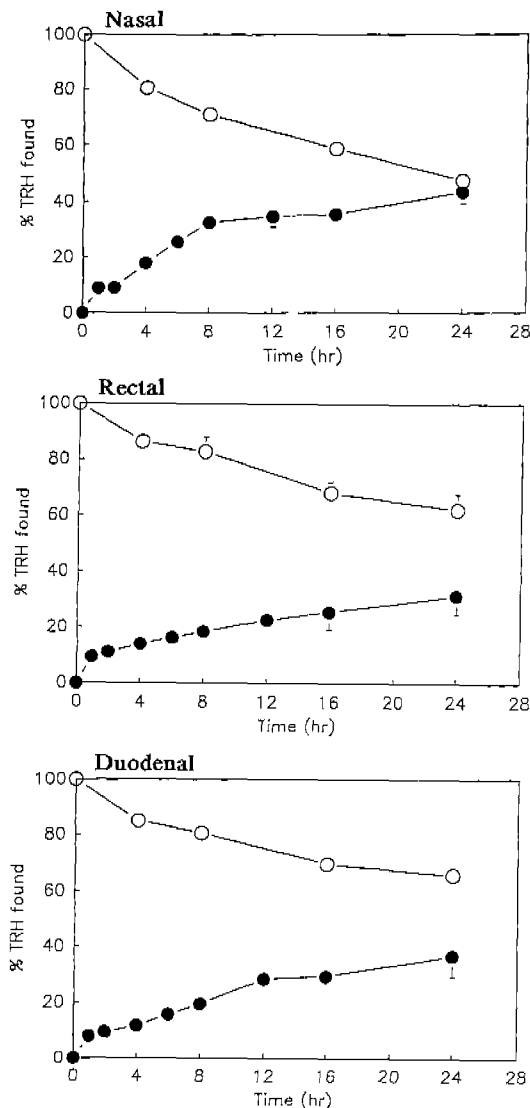


Fig. 2. Effect of TM (0.5 mM) on the time-course disappearance (○) of TRH (200 µg/ml) in the donor phase and permeation (●) of TRH into the receptor cell through the nasal, rectal and duodenal mucosae. Each point represents mean \pm S.D. (n=3).

억제 효과가 뛰어난 것으로 보고한 바 있다. 따라서 이 연구에서는 TM을 TRH 분해효소 억제제로 사용하였다. 양측 cell에 TM을 0.5 mM 농도로 첨가하고 TRH의 비강, 직장 및 십이지장 점막 투과시험을 행한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 이에서 보는 바와 같이 비강, 직장 및 십이지장의 점막측에서는 효소억제제를 사용하지 않은 경우(Fig. 1)와 비교하여 분해가 상당히 억제되었으며 24시간 후의 잔존량도 각각 52.3, 78.6 및 61.6%이었다. 또한 24시간까지의 투과율도 거의 직선적으로 증가되어 비강, 직장 및 십이지장 점막에서 각각 44.7, 21.8 및 38.9%에 달하였다. 이는 효소억제제가 첨가되지 않은 경우에 비해 현저히 증가된

것이다. 효소억제제를 사용하지 않았을 때에는 약물이 receptor cell로 투과되어도 그 곳에 추출되어 존재하는 효소활성으로 인해 분해를 상당히 받았으나, 효소억제제의 존재로 투과된 TRH가 재분해되는 것을 충분히 억제할 수 있는 것으로 나타났다. TRH의 점막투과 증진에는 분해효소 억제효과 뿐 아니라 점막의 투과성 변화도 관여하였을 것으로 생각된다.

투과촉진제가 TRH의 점막투과에 미치는 영향

경점막 수송을 목표로 TRH의 투과에 미치는 효소억제제 및 흡수촉진제의 영향을 검토하였다. 효소억제제로는 TM을 사용하였다. 투과촉진제로는 담즙산염이 점막의 porosity를 증가시킴으로써 약물투과가 용이해진다는 보고(Hirai 등, 1981; Gordon 등, 1985; Morimoto 등, 1985; Uchida 등, 1991)에 의해 담즙산염으로 SGC를 사용하고, 여러 펩티드류에 대해 투과촉진효과가 큰 것으로 보고된 GAA, STDHF 및 LPC 등(Behl, 1998) 4종을 선택하여 비강, 직장 및 십이지장 점막 투과에 미치는 영향을 검토하였다.

SGC의 존재시 비강, 직장 및 십이지장 점막을 통한 TRH의 투과율과 donor측 half-cell에서의 잔존율을 경시적으로 측정된 결과 receptor cell로 투과된 약물량은 24시간대에 비강 점막은 44.7%, 직장 점막은 21.0% 및 십이지장 점막에서 29.7%의 투과율을 나타내었다. GAA의 존재시는 비강, 직장 및 십이지장 점막을 통한 TRH의 경시투과율과 donor cell 내의 잔존율을 경시적으로 측정된 결과 receptor cell로의 투과율이 24시간대에 비강 점막에서 39.4%, 직장 점막에서 20.6% 및 십이지장 점막에서 23.9%로 나타나 효소억제제만을 사용한 경우와 비교해 그다지 큰 차이가 없음을 알 수 있다. STDHF의 첨가시는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 receptor cell로의 TRH 투과율이 24시간대에 비강 점막에서 43.5%, 직장 점막에서 31.5% 및 십이지장 점막에서 36.8%로 나타났다. 직장 점막에서만 효소억제제와 STDHF를 함께 사용함으로써 투과율이 다소 증가하였다. LPC의 첨가시에는 receptor cell로 투과된 약물량은 24시간대에 비강 점막은 46.1%, 직장 점막은 31.8% 및 십이지장 점막은 30.1%로 나타났다. STDHF와 유사하게 첨가제를 넣지 않은 경우에 비해 직장 점막에서만 투과율이 약간 증가되었다.

이상의 투과 프로파일들로부터 TRH의 투과 flux를 구하여 Table I에 나타내었다. 이에서 볼 때 TM을 효소억제제로 첨가함으로써 첨가하지 않은 것에 비하여 비강 점막의 투과 flux는 1.4배 증대되었으나 직장 점막에서는 유의성 있는 차이가 없었고, 십이지장 점막에서는 오히려 감소되는 경향을 나타내었다. TRH의 투과 flux는 TM만을 사용한 경우와 비교하여 STDHF를 추가하였을 때 비강 및 직장 점막에서는 유의성 있는 차이가 없었으나 십이지장 점

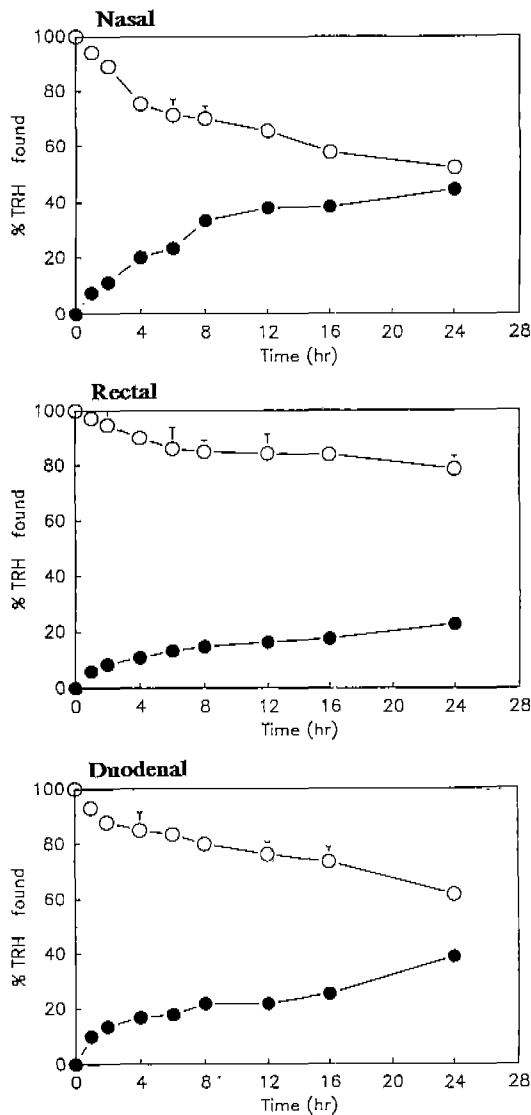


Fig. 3. Effect of STDHF (15 mM) on the time-course disappearance (○) of TRH (200 µg/ml) in the donor phase, and permeation (●) of TRH into the receptor cell through the nasal, rectal and duodenal mucosae. Donor and receptor solution contained 0.5 mM TM. Each point represents mean ± S.D. (n=3).

막에서는 1.9배 증가시켰다. SGC, GAA 및 LPC 등의 촉진제류는 TM만을 사용한 경우와 비교하여 비강, 직장 및 십이지장 점막에서 투과속도를 유의성 있게 증가시키지 못하였다.

비강 점막이 직장과 십이지장 점막에 비해 투과 flux를 TM의 존재시 각각 약 2.8 및 3.5배 유의성 있게 증대시켰다. 각 점막에 대하여 TRH의 겔보기 투과계수를 구하여 Table II에 나타내었다. Møss 등(1990)은 흰쥐의 소장을 적출하여 Ussing chamber(Bechgaard 등, 1992)를 이용하여 공장, 회장 및 결장을 통한 TRH의 겔보기 투과계수가 각각 8.9×10^{-6} , 7.4×10^{-6} 및 5.8×10^{-6} cm/s이었다고 보고

Table I. Effects of various enhancers on the steady-state permeation fluxes of TRH through rabbit absorptive mucosae

Enhancers used	Flux (µg/cm ² /hr)		
	Nasal	Rectal	Duodenal
No additive	23.6 ± 2.2	11.3 ± 0.3	14.2 ± 2.3
TM	33.3 ± 5.9*	11.8 ± 1.9	9.6 ± 0.7
TM+SGC	22.4 ± 1.7	9.2 ± 3.8	12.3 ± 0.4
TM+GAA	19.3 ± 0.2	4.1 ± 1.4**	14.8 ± 5.4
TM+STDHF	36.3 ± 0.1*	11.4 ± 1.6	18.3 ± 1.4**
TM+LPC	25.2 ± 0.6	13.1 ± 2.0	14.9 ± 3.2

^{a)}The concentration of enhancers was all 15 mM except 0.5% for LPC. The pHs of donor solutions were 8.0, 7.2 and 7.4 for the nasal, rectal and duodenal mucosae. Data were expressed as mean ± S.D. (n=3). *p<0.05 and **p<0.01 vs no additive.

Table II. Influence of thimerosal (TM) and enhancers on apparent permeability coefficients for the transmucosal permeation of TRH

Additives	Papp (× 10 ⁻⁶) (cm/s)		
	Nasal	Rectal	Duodenal
No additive	10.9 ± 1.0	5.0 ± 0.1	6.6 ± 1.1
TM	15.4 ± 2.7*	7.1 ± 1.1	4.4 ± 0.3
TM+SGC	10.4 ± 0.8	4.8 ± 2.0	5.7 ± 0.2
TM+GAA	8.9 ± 0.1	1.9 ± 0.6**	6.8 ± 2.5
TM+STDHF	16.8 ± 0.1*	5.3 ± 0.7	8.5 ± 0.6*
TM+LPC	11.7 ± 0.3	6.1 ± 0.9	6.9 ± 1.5

Experiments were conducted in Valia-Chien permeation system mounted with rabbit nasal specimen. Data were expressed as mean ± S.D. (n=3). *p<0.05 and **p<0.01 vs no additive.

하였고. Lundin 등(1991)은 Caco-2 cell의 단층막을 통한 겔보기 투과계수가 약 1.5×10^{-6} cm/s이었다고 하였다. 토끼의 구강 점막을 통한 TRH의 투과계수는 0.14×10^{-6} cm/s로 보고되었다(Dowty 등, 1992). Ussing chamber를 사용한 경우 토끼 비강 점막의 투과계수는 촉진제로 1% SGC를 가한 경우의 투과계수가 12.6×10^{-6} cm/s로 가하지 않은 경우(4.9×10^{-6} cm/s) 보다 약 2.6배 컸다고 보고되었다(Jørgensen과 Bechgaard, 1994). Valia-Chien 투과셀을 사용한 본 연구에서 TM이 첨가되지 않은 경우의 TRH의 비강 점막 투과계수는 Caco-2 cell 보다 약 7배 컸으며, 구강 점막보다는 78배 컸다. 한편 Jørgensen과 Bechgaard (1994)이 Ussing chamber를 사용하여 보고한 비강 점막 투과계수와 비교할 때 본 연구의 비강 점막 투과계수가 약 2.2배 크게 나타났다. 이는 산소 공급을 유지시키는 Ussing chamber에서는 적출 비강 점막의 구조적 특질이 오래 유지되는 반면 산소 공급이 제한된 투과셀에서는 시간의 경과와 함께 점막의 특질이 변화하기 때문으로 생각된다.

투과촉진제류가 투과액중 단백 추출량에 미치는 영향

투과시험을 종료한 24시간 후의 donor cell 및 receptor

Table III. Comparison of protein concentrations in the donor and receptor solutions after 24 hr-permeation study using nasal, rectal and duodenal mucosae in the absence and presence of TM and various enhancers

Inhibitor or enhancers used ^{a)}	Protein conc. ($\mu\text{g/ml}$)					
	Nasal		Rectal		Duodenal	
	Donor	Receptor	Donor	Receptor	Donor	Receptor
No additive	253 \pm 4	255 \pm 4	330 \pm 26	166 \pm 47	490 \pm 41	194 \pm 19
TM	243 \pm 23	240 \pm 36	317 \pm 21	161 \pm 27	503 \pm 37	212 \pm 18
TM+SGC	371 \pm 73*	263 \pm 17	727 \pm 71**	196 \pm 12	1106 \pm 23*	258 \pm 3
TM+GAA	303 \pm 44	241 \pm 36	368 \pm 26	173 \pm 19	563 \pm 35	225 \pm 28
TM+STDHF	260 \pm 33	239 \pm 17	324 \pm 17	155 \pm 18	511 \pm 20	188 \pm 37
TM+LPC	268 \pm 38	157 \pm 33	308 \pm 11	118 \pm 9	497 \pm 12	130 \pm 2

^{a)}The concentration of enhancers was all 15 mM except 0.5% for LPC. The pHs of donor solutions were 8.0, 7.2 and 7.4 for the nasal, rectal and duodenal mucosae. Data were expressed as mean \pm S.D. (n=3). *p<0.05 vs no additive.

cell 내의 투과액중 단백질량을 측정된 결과는 Table III과 같다. 비강, 직장 및 십이지장 점막의 점막측(장막측) 투과액 중 추출 단백질량은 등장 완충액에 TM을 첨가한 경우 완충액만을 사용한 것에 비해 각각 0.96(0.94), 0.96(0.97) 및 1.03(1.09)배로 별다른 변화가 없었다. 또 TM만을 첨가한 경우와 비교하여 SGC, GAA, STDHF 및 LPC와 같은 투과촉진제를 함께 사용한 경우 비강, 직장 및 십이지장 점막의 점막측 donor cell중 단백질량은 SGC>GAA>STDHF>LPC의 순이었으나 전체적으로는 그다지 크지는 않았다. SGC를 첨가한 donor phase중 단백질이 억제제만 첨가한 경우에 비해 약 2.2배의 증가를 나타내어 타 흡수촉진제에 비해 점막에 존재하는 단백질의 추출효과가 높은 것으로 나타났다. SGC의 투과촉진 기전은 점액의 점도와 탄성을 감소시키고(Martin 등 1978), 분해효소를 억제시키며 막구조를 변화시키는 것으로 보고되어 왔다(Hirai 등, 1981). 그러나 히드록실기를 2개 가진 테옥시콜린산나트륨(SDC)이 점막으로부터의 단백질추출효과가 매우 컸던 저자 등의 결과(비강 점막: 1867 \pm 41 $\mu\text{g/ml}$, 직장 점막: 1415 \pm 60 $\mu\text{g/ml}$)와 타 연구자들의 보고(Team과 Phillips, 1972; Hirai 등, 1981; Ennis 등, 1990)를 고려할 때 SGC는 SDC보다 점막 조직에 대한 손상이 훨씬 적을 것으로 생각된다. 따라서 단백질추출효과가 SGC보다 낮게 나타난 LPC, GAA 및 STDHF는 점막 손상이 매우 적을 것으로 예상된다.

투과 방향에 따른 점막 투과속도

TRH의 분해억제 효과가 뛰어난 것으로 밝혀진 효소억제제인 TM을 선택하여 비강, 직장 및 십이지장 점막에서의 TRH의 투과 방향에 따른 투과속도의 차이를 검토하였다. Receptor cell에 10 mM TM 150 μl 을 넣고 등장 인산염 완충액(pH 7.4) 2,700 μl 및 TRH 원액(4,000 $\mu\text{g/ml}$) 150 μl 를 넣고, donor cell에는 10 mM TM을 150 μl 넣고 등장 인산염 완충액(비강 pH 8.0, 직장 pH 7.2 및 십

Table IV. Effect of permeation direction on the flux of TRH through various rabbit mucosae

Permeation direction	Flux ($\mu\text{g/cm}^2/\text{hr}$)		
	Nasal	Rectal	Duodenal
Mucosal \rightarrow Serosal	33.3 \pm 5.9	11.8 \pm 1.9	9.6 \pm 0.7
Scrosal \rightarrow Mucosal	13.6 \pm 2.0*	6.0 \pm 2.2*	9.6 \pm 0.1

Data were expressed as mean \pm S.D. (n=3). *p<0.05 vs normal direction.

이지장 pH 7.4) 2,850 μl 를 넣은 다음 37°C 항온을 유지하면서 양측 half-cell로부터 경시적으로 검체를 취해 HPLC법으로 장막측에서 점막측으로의 투과량을 측정하였다. 그 결과를 Table IV에 나타내었다. 이로부터 비강, 직장 및 십이지장 점막에서 투과 방향에 따라 투과 flux는 점막측에서 장막측으로 투과되는 속도가 장막측에서 점막측으로 투과되는 속도보다 각각 2.5, 2.0 및 1.0배 컸다. 십이지장 점막에서는 투과 flux에 유의한 차이가 없었다. TRH의 구강 점막 투과가 주로 단순확산에 의한다고 보고되었고(Dowty 등, 1992), 소장에 tripeptide의 능동적 수송 기구의 존재(Friedman과 Amidon, 1990)와 토끼 비강 점막에서의 폴리펩티드의 능동수송(Cremaschi 등, 1990)이 보고되었지만, 본 연구에서의 결과에 대한 그 원인과 기전에 관해서는 더욱 검토해 볼 필요가 있다.

결 론

생리활성 펩티드인 TRH의 점막 수송 가능성을 검토하고자 토끼의 수종 점막을 통한 막투과시험을 행하고 효소억제제와 수종의 흡수촉진제가 TRH의 점막투과에 미치는 영향을 검토하였다. 그 결과 얻은 주된 결론은 다음과 같다.

1. 비강, 직장 및 십이지장 점막을 통한 TRH(200 $\mu\text{g/}$

ml)의 투과 정도를 검토한 결과 donor cell 내의 TRH 잔존률이 시간이 경과함에 따라 급격히 감소하였으며, receptor cell로의 투과는 비강, 직장 및 십이지장 점막에서 각각 12시간대에 22.4%, 16시간에 21.5%, 및 16시간대에 24.1%의 최대 투과율을 나타내었으며 그 이후는 효소 분해로 투과량이 감소되었다.

2. TM을 효소억제제로 첨가한 조건에서 비강, 직장 및 십이지장 점막을 통한 TRH의 투과시험을 행한 결과 24시간후 donor cell내 각각 52.3, 78.6 및 61.6%가 잔존하여 점막 부위에서의 현저한 분해억제효과가 확인되었다.

3. TM의 존재시 TRH의 점막투과는 24시간까지 서서히 증가하여 24시간후 비강, 직장 및 십이지장 점막에서 각각 44.7, 22.8 및 38.9%의 투과량을 나타내어 비강 점막을 통한 TRH 수송 가능성이 제시되었다.

4. TM(0.5 mM)의 존재시 TRH의 점막투과에 미치는 SGC, GAA, STDHF 및 LPC의 영향을 검토한 결과 STDHF와 LPC가 다소의 투과 촉진 효과를 나타내었다. 대체적으로 투과촉진제의 효과는 TM만을 첨가한 경우에 비해 그다지 크지 않았다.

참고문헌

- Bechgaard, E., Gizurason, S., Jørgensen, L. and Larsen, R. (1992). The viability of isolated rabbit nasal mucosa in the Ussing chamber, and the permeability of insulin across the membrane. *Int. J. Pharm.* **87**, 125-132.
- Behl, C. R., Pimplaskar, H. K., Sileno, A. P., Xia, W. J., Gries, W. J., deMaireles, J. C. and Romeo, V. D. (1998). Optimization of systemic nasal drug delivery with pharmaceutical excipients. *Adv. Drug Del. Rev.* **29**, 117-133.
- Chien, Y. W. (Ed.), (1992). Systemic delivery of peptide-based pharmaceuticals, In *Novel Drug Delivery Systems*, 2nd. ed., Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 631-745.
- Chun, I. K., Kim, D. D., Wang, Y. J. and Chien, Y. W. (1996). Permeation enhancement of methionine enkephalin by combinations of enzyme inhibitors and enhancers. *S.T.P. Pharma Sci.* **6**, 148-156.
- Chun, I. K. and Shin, D. W. (1997). Enzymatic degradation and stabilization of thyrotropin releasing hormone in various rabbit mucosa extracts. *J. Kor. Pharm. Sci.* **27**, 99-108.
- Chun, I. K. and Yang, Y. J. (1992). Degradation and stabilization of [D-ala²]-methionine enkephalinamide in various rabbit mucosa extracts. *J. Kor. Pharm. Sci.* **22**, 173-183.
- Cremaschi, D., Rossetti, C., Draghetti, M. T., Manzoni, C. and Aliverti, V. (1990). Active transport of polypeptides in rabbit respiratory nasal mucosa. *J. Controlled Release* **13** (Suppl.), 319-320.
- Dowty, M. E., Knuth, K. E., Irons, B. K. and Robinson, J. R. (1992). Transport of thyrotropin releasing hormone in rabbit buccal mucosa in vitro. *Pharm. Res.* **9**, 1113-1122.
- Ennis, R. D., Borden, L. and Lee, W. A. (1990). The effects of permeation enhancers on the surface morphology of the rat nasal mucosa: a scanning electron microscopy study. *Pharm. Res.* **7**, 468-475.
- Friedman, D. I. and Amidon, G. L. (1990). Characterization of the intestinal transport parameters for small peptides drugs. *J. Controlled Release* **13**, 141-146.
- Gordon, G. S., Moses, A. C., Silver, R. D., Filer, J. S. and Carey, M. C. (1985). Nasal absorption of insulin: enhancement by hydrophobic bile salts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**, 7419-7423.
- Hichens, M. (1983). A comparison of thyrotropin-releasing hormone with analogs: Influence of disposition upon pharmacology. *Drug Metab. Rev.* **14**, 77-98.
- Hirai, S., Yashiki, T. and Mima, H. (1981). Mechanisms for the enhancement of the nasal absorption of insulin by surfactants. *Int. J. Pharm.* **9**, 173-184.
- Iversen, E. (1988). Intra- and extravascular turnover of thyrotropin releasing hormone in normal man. *J. Endocrinol.* **118**, 511-516.
- Jørgensen, L. and Bechgaard, E. (1994). Intranasal permeation of thyrotropin-releasing hormone: in vitro study of permeation and enzymatic degradation. *Int. J. Pharm.* **107**, 231-237.
- Loosen, P. T. (1988). TRH: behavioral and endocrine effects in man. *Progr. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiat.* **12**, S87-S117.
- Lundin, S., Møss, J., Bundgaard, H. and Artursson, P. (1991). Absorption of thyrotropin-releasing hormone (TRH) and a TRH prodrug in a human intestinal cell line (Caco-2). *Int. J. Pharm.* **76**, R1-R4.
- Martin, G. P., Marriott, C. and Kellaway, I. W. (1978). Direct effect of bile acids and phospholipids on the physical properties of mucus. *Gut* **19**, 103-107.
- Metcalf, G. (1982). Regulatory peptides as a source of new drugs-the clinical prospects for analogues of TRH which are resistant to metabolic degradation. *Brain Res. Rev.* **4**, 389-408.
- Metcalf, G. and Jackson, I. M. D. (1989). Thyrotropin-releasing hormone. Biomedical significance. *Ann. NY Acad. Sci.* **553**, 16-31.
- Morley, J. E., Garvin, T. J., Pekary, A. E., Utiger, R. D., Nair, M. G., Baugh, C. M. and Hershman, J. M. (1979). Plasma clearance and plasma half-disappearance time of exogenous thyrotropin releasing hormone and pyroglutamyl-N-methyl-histidyl proline amide. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **48**, 377-380.
- Morimoto, K., Akatsuchi, H., Morisaka, K. and Kamada, A. (1985). Effect of non-ionic surfactants in a polyacrylic acid gel base on the rectal absorption of [Asu¹⁻⁷]-eel calcitonin in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* **37**, 759-760.
- Møss, J. and Bundgaard, H. (1990). Kinetics and pattern of degradation of thyrotropin-releasing hormone (TRH) in human plasma. *Pharm. Res.* **7**, 751-755.
- Møss, J., Buur, A. and Bundgaard, H. (1990). Prodrugs of peptides. 8. In vitro study of intestinal metabolism and penetration of thyrotropin-releasing hormone (TRH) and its

- prodrugs. *Int. J. Pharm.* **66**, 183-191.
- Pontiroli, A. E. (1998). Peptide hormone: review of current and emerging uses by nasal delivery. *Adv. Drug Del. Rev.* **29**, 81-87.
- Uchida, N., Maitani, Y., Machida, Y., Nakagaki, M. and Nagai, T. (1991). Influence of bile salts on the permeability of insulin through the nasal mucosa of rabbits in comparison with dextran derivatives. *Int. J. Pharm.* **74**, 95-103.
- Schosinsky, K. H., Vargas, M., Esquivel, A. L. and Chavarria, M. A. (1987). Simple spectrometric determination of urinary albumin by dye-binding with use of bromphenol blue. *Clin. Chem.* **33**, 223-226.