

## 약물의 *in vitro* 투과 실험을 위한 사람의 비강점막상피세포 단층막의 일차배양

유진욱 · 김유선<sup>1</sup> · 이민기<sup>1</sup> · 노환중<sup>1</sup> · 이치호 · 김대덕<sup>†</sup>

부산대학교 약학대학, <sup>1</sup>부산대학교 의과대학

(2002년 1월 7일 접수 · 2002년 2월 18일 승인)

### Primary Culture of Human Nasal Epithelial Cell Monolayer for *In Vitro* Drug Transport Studies

Jin-Wook Yoo, Yoo-Sun Kim<sup>1</sup>, Min-Ki Lee<sup>1</sup>, Hwan-Jung Roh<sup>1</sup>, Chi-Ho Lee and Dae-Duk Kim<sup>†</sup>

College of Pharmacy, Pusan National University, Pusan 609-735, South Korea

<sup>1</sup>College of Medicine, Pusan National University, Pusan 602-739, South Korea

(Received January 7, 2002 · Accepted February 18, 2002)

**ABSTRACT**—The primary culture of human nasal epithelial cell monolayer was performed on a Transwell. The effect of various factors on the tight junction formation was observed in order to develop an *in vitro* experimental system for nasal transport studies. Human nasal epithelial cells, collected from human normal inferior turbinates, were plated onto diverse inserts. After 4 days, media of the apical surface was removed for air-liquid interface (ALI) culture. Morphological characteristics was observed by transmission electron microscopy (TEM). A polyester membrane of 0.4  $\mu\text{m}$  pore size was determined as the most effective insert based on the change in the transepithelial electric resistance (TEER) value as well as the <sup>14</sup>C-mannitol transport study. The ALI method was effective in developing the tight junction as observed in the further increase in the TEER value and reduction in the permeability coefficient ( $P_{\text{app}}$ ) of <sup>14</sup>C-mannitol transport. Results of the transport study of a model drug, budesonide, showed that the primary culture system developed in this study could be further developed and applied for *in vitro* nasal transport studies.

**Keywords**—human nasal epithelial cell, primary culture, transport, TEER, budesonide

비강점막을 통한 약물의 전신투여(systemic drug delivery)는 주사제와 경구투여를 대체할 수 있는 좋은 투여방법으로서 과거 60년이 넘는 동안 많은 연구자들이 관심을 보여오고 있다.<sup>1)</sup> 비강점막 경로를 통한 약물 투여가 구강, 직장, 질점막 및 경피와 같은 비경구적 경로보다 상대적으로 높은 생체이용율을 나타내면서 근육주사와 비교되는 빠른 흡수속도를 보이고 또한 무엇보다도 환자들이 간편하고 통증없이 약물을 투여할 수 있다는 점에서 약제학적으로 효용성이 높기 때문이다.<sup>2)</sup> 실제 경구 투여가 힘든 펩타이드 제제의 경우 비강점막을 통한 약물의 투여는 아주 흥미있는 비경구투여의 한 방법으로 알려져 있다.<sup>1)</sup> 또한, 비강점막은 비염과 같은 질환에서 mucin의 분비를 억제시키는 약물의 국소적 적용을 위한 연구에도 필요하다.

현재 비강점막 경로를 이용한 제제들이 시판되고 있지만, 그 투여량과 흡수량등이 정확하지 못하게 적용되고 있는 실정이다. 이것은 동물의 조직을 이용하거나 *in situ*에서의 약

물의 송달은 실제 사람에게 있어서의 결과와 일치하지 않고, *in vivo*에서 약물의 transport를 적용시키는데는 실험상의 어려움이 많아 정확한 데이터를 얻기가 어려운데 기인한다. 이러한 점을 해결하기 위해 *in vivo*에서의 재현성 있는 nasal transport model이 절실히 필요하게 되었고, 그 방법으로서 경구 흡수의 패턴을 연구하는데 중요한 역할을 하고 있는 Caco-2 cell culture와 같은 방법을 이용한 nasal epithelial cell culture model이 보고되고 있다.<sup>3)</sup> 그러나, 비강점막상피세포는 그 성장과 분화가 Caco-2 cell 만큼 용이하지 않으므로 human nasal cell line(RPMI 2650), excised nasal epithelium 등의 연구에서는 좋은 결과를 나타내지 못했고, 오직 primary nasal cell culture만이 유일한 대안인 것으로 보고되고 있다.<sup>4)</sup>

Transport 연구를 위한 정상세포의 성공적인 일차세포배양을 위해서는 많은 조건과 기술들이 필요한데, 조직이나 cell의 처리과정, seeding density, inserts의 종류와 재질, 배지의 조성(분화와 성장의 개선), feeding regimen, 배양기간, confluent(tight junctions), 전기적 성질, cell의 형태 및 passage 횟수 등과 같은 복잡한 조건을 만족시켜야만 한다.<sup>4)</sup>

<sup>†</sup>본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
Tel : (051) 510-2800, E-mail : ddkim@pusan.ac.kr

본 연구자 등은 최근에 ALI 상태에서 사람의 비강점막상피 세포를 Transwell의 insert위에 단층막으로 일차배양하는 기술을 확립하여 보고한 바 있다.<sup>5)</sup> 본 연구의 목적은 이를 약물의 투과실험에 적용하기 위해서 견고한 tight junction을 확립하기 위한 최적의 배양 조건을 찾고 이를 평가하는데 있다.

## 실험방법

### 시약 및 재료

사람의 비강점막세포는 부산대학교 의과대학의 이비인후과에서 공급받았다. 부테소나이드(budesonide)는 시그마(St. Louis, 미국)에서 구입하였고, HPLC용 메탄올과 아세트니트릴은 Merck(Damstadt, FRG)에서 구입한 후 0.22 µm membrane으로 여과하고 sonication하여 기포를 충분히 제거한 후 사용하였다. 그 외 다른 시약들은 특급시약 이상을 구입하여 더 이상 정제하지 않고 사용하였다.

### 비강점막상피세포의 분리 및 배양

사람의 비강점막세포는 부비강염 환자의 내시경을 이용한 부비동 수술중에 정상 하비갑개의 점막을 채취하였으며, 조직의 배양은 본 연구자 등이 보고한 방법<sup>5)</sup>을 약간 변형하여 이용하였다. 채취한 조직은 1% protease(type XIV, Sigma)와 penicillin(50 IU/mL) 및 streptomycin(50 µg/mL)을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium과 Ham's nutrient F12의 1:1 혼합액(DMEM/F12)에 넣어 4°C에서 16-20시간동안 처리하였다. 분리된 세포를 항생제를 포함한 DMEM/F12에서 3번 씻은 후, 항생제와 10% fetal bovine serum(FBS)를 함유한 DMEM/F12에 부유시킨 다음, 플라스틱 dish에 평판하여 37°C에서 1시간동안 정치해 점막상피세포외의 섬유아세포, 내피세포 및 근세포를 바닥에 부착시켜 제거하였다. 부유된 점막세포들은 직경 10 cm의 plastic tissue culture dish에  $3 \times 10^4$  cells/dish의 밀도로 seeding 시켰다. 점막세포의 수는 hemocytometer를 사용하여 측정했다. 배지는 bronchial epithelial growth medium(BEGM; Clonetics Corp., San Diego, CA)을 사용하였으며, 보충액은 hydrocortisone(0.5 µg/mL), insulin(5 µg/mL), transferrin(10 µg/mL), epinephrine(0.5 µg/mL), triiodothyronine(6.5 µg/mL), gentamycin(50 µg/mL)과 amphotericin B(50 µg/mL)을 Clonetics에서 구입하여 사용하였고, epidermal growth factor(25 ng/mL; Collaborative Research, Bedford, MA), all-trans retinoic acid ( $10^{-7}$ M; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), bovine serum albumin(1.5 µg/mL; Sigma)과 bovine pituitary extract

(1% v/v; Pel-Freez Biologicals, Rogers, AR)도 보충하였다. 배양조건은 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% 상대습도를 유지하였으며, 배지는 seeding 다음날 교환한 후 이틀마다 교환해 주었다.

### Transwell에서의 배양

Petri dish에서 배양한 비강점막상피세포가 50-60%의 밀도를 이루었을 때, Clonetics사에서 제공하는 trypsin-EDTA를 사용하여 dish에 부착된 세포를 분리하였다. 비강점막상피세포의 단층막을 통한 약물의 수송을 관찰하기 위해 Transwell(Corning Costa, 미국)의 insert에 분리된 세포를 seeding하였다. 이 때, insert의 직경(1.2 cm), 재질(polyester와 polycarbonate), pore size(0.4 µm와 3.0 µm) 및 cell의 밀도( $8 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>과  $4 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>) 등을 달리하여 최적의 배양 조건을 찾도록 하였다. 위의 BEGM 배지를 apical쪽에 0.4 mL, basolateral 쪽에 1.0 mL씩 각각 넣고 5% CO<sub>2</sub>, 95% 상대습도를 유지하며 37°C에서 배양하였다. 배지는 이틀마다 교환해 주었다.

ALI 상태를 만들기 위해서 seeding 4일째 되는 날부터 apical 쪽의 배지를 제거하고 공기에 노출시켰으며, basolateral 쪽의 배지만 교환하였다.

세포단층의 integrity를 확인하기 위해, insert에 세포를 seeding한 날부터 Endohm electrodes를 포함한 voltohmmeter(EVOM, World Precision Instruments)를 사용해서 trans-epithelial electrical resistance(TEER)값을 매일 측정하였다. 유효값(ohm × cm<sup>2</sup>)은 총 TEER값(insert + 세포단층)에서 insert만의 TEER값을 빼서 세포단층만의 TEER값을 구한 후, insert의 면적을 곱하여 구하였다. 각 실험은 3개의 well의 값을 각각 측정하여 평균값을 구하였다.<sup>6)</sup>

### Budesonide 및 <sup>14</sup>C-mannitol의 투과 실험

비강점막상피세포가 insert의 표면에 confluent layer를 형성했을 때(seeding 4일 후), budesonide의 투과실험을 시행하였다. 우선 투과완충액(transport buffer; 15mM의 glucose를 포함한 Hank's balanced salt solution)으로 monolayer를 씻은 후, 투과 완충액을 넣어 약 30분간 배양기에 넣어 안정화 시켰다.<sup>6)</sup> Budesonide(Sigma사, 20 µg/mL) 혹은 <sup>14</sup>C-mannitol(Amersham Pharmacia Biotech, specific activity of 56.0 Ci/mmol)을 함유한 transport buffer를 준비한 후, basolateral 쪽에 약물이 없는 투과 완충액 1.0 mL를 먼저 넣고 apical 쪽에 약물이 있는 transport buffer 0.4 mL를 각각 넣었다. 미리 정해진 시간 간격으로 basolateral 쪽에서 1.0 mL을 채취하고 다시 새로운 투과 완충액 동량을 채워 넣었다. 마지막에 mass balance를 측정하기 위하여 apical

쪽의 남은 액을 채취하였다.

ALI 상태에서의 투과 실험은, ALI를 만든 3일 및 6일 후에 위와 같은 방법으로 시행하였다.

<sup>14</sup>C-mannitol은 시료 300 µL에 cocktail(Ultima Gold, PACKARD) 2.0 mL를 넣고 잘 섞은 후, liquid scintillation analyzer(TRI-CARB 2200CA, PACKARD, USA)를 사용하여 분석하였다. Budesonide sample은 high-performance liquid chromatography(HPLC)를 사용하여 분석하였다. 사용한 HPLC는 binary pump(Gilson Model 305 and 306), automatic injector(Gilson Model 234), UV detector(Gilson Model 118)로 구성되어 있다. Column은 Merck C18 LiChroCART 125-4 column(5 µm, 125 × 4 mm, Merck, Darmstadt, Germany)를 사용하였다. 이동상은 70%(v/v) methanol을 사용했다. 유속은 1.0 mL/min, 시료주입량은 20 µL로 하였으며, 검출과장은 242 nm로 하였다. 이 조건에서 budesonide의 피크는 약 4.2분에서 검출되었다.

단층막을 통과한 budesonide 및 mannitol의 시간에 따른 단위면적당의 누적투과량(µg/cm<sup>2</sup>)을 계산한 후, 겔보기투과계수(P<sub>app</sub>, cm/s)는 다음 식을 이용하여 구하였다:

$$P_{app} = \frac{1}{C_0} \frac{dQ}{dt}$$

여기서 dQ/dt는 약물의 투과속도(µg/cm<sup>2</sup>/hr)이고, C<sub>0</sub>는 apical 쪽의 초기 약물농도(µg/mL)를 의미한다. 또한, 세포단층 자체만을 통한 약물의 투과계수(P<sub>c</sub>)를 구하기 위해 다음 식을 사용했다:

$$\frac{1}{P_c} = \frac{1}{P_{app}} - \frac{1}{P_i}$$

여기서, P<sub>i</sub>는 cell이 없는 insert만을 통한 약물의 투과계수이고, P<sub>app</sub>는 insert위에 점막상피세포의 단층막을 형성한 후의 약물의 투과계수이다. 모든 실험은 최소 3회 이상을 측정 후 평균±표준편차로 나타내었다.

**Transmission Electron Microscopy (TEM)**

Insert 위에 배양한 비강점막세포를 PBS로 씻고, 2.5% glutaldehyde로 4°C에서 4-6시간 동안 고정시킨 후, 1% OsO<sub>4</sub>(osmium teroxide)를 사용하여 4°C에서 1시간 동안 처리한 다음 ethanol로 단계적으로 탈수시키고 Epon 812에 포매하였다. 포매한 조직을 toluidine blue로 염색하고 적당한 부분의 선택하기 위해 semithin section(1000 nm)으로 자른 후, light microscopy로 관찰하였다. 그런 후 ultrathin section(50-60 nm)은 uranyl acetate와 lead citrate로 차례로 각각

6분과 3분간 염색하여 투과전자현미경(JEM 1200 EX II electron microscopy)을 사용하여 관찰하였다.<sup>5)</sup>

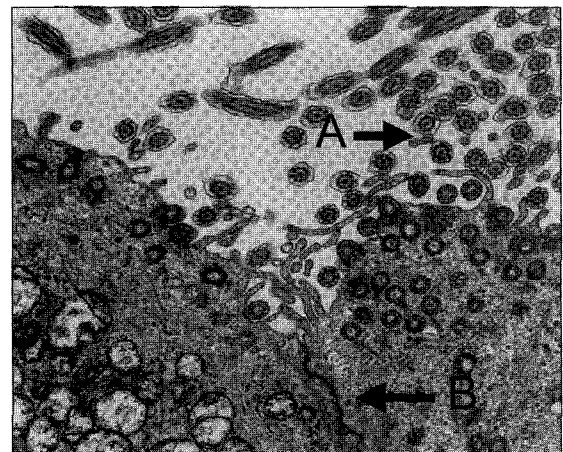
**결 과**

**Morphology**

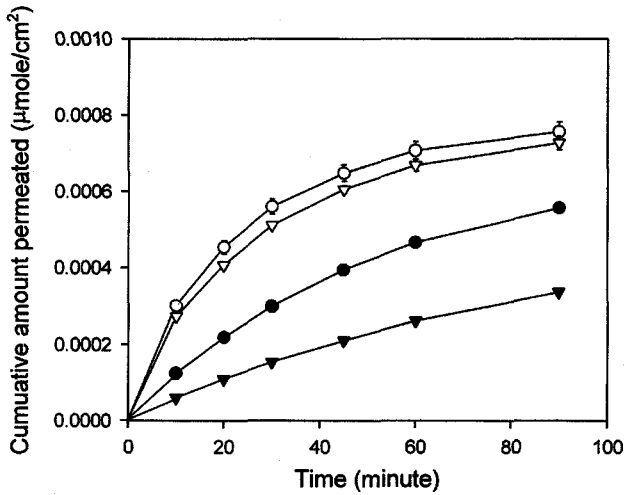
비강점막세포를 Transwell에 seeding한 3-4일 후에 완전한 합류를 이루었으며 위상차 현미경으로 관찰하였을 때 전형적인 상피세포의 형태를 나타내며 단층막을 형성하였다(data not shown). 이후에는 apical 쪽의 배지를 제거하여도 basolateral 쪽의 배지가 새어나오지 않은 것으로부터 tight junction이 형성되었음을 일차적으로 알 수 있었다. TEM 사진을 통하여 tight junction과 섬모의 형성을 육안으로 관찰할 수 있었다(Figure 1).

**Inserts의 영향**

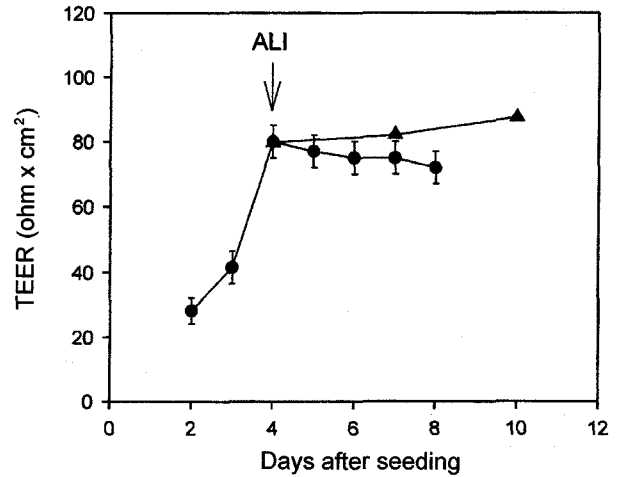
비강점막세포의 일차배양시 tight junction의 형성과 세포의 부착을 가장 잘 시킬 수 있는 insert를 찾기 위하여 Tranawell 3401(polycarbonate, 0.4 µm), 3402(polycarbonate, 3.0 µm), 3460(polyester, 0.4 µm), 3462(polyester, 3.0 µm)에 세포를 각각 seeding한 후 <sup>14</sup>C-mannitol의 transport를 관찰하여 tight junction의 형성 여부를 확인하였다. Figure 2에서는 시간에 따른 mannitol의 투과정도를 나타내었고 Figure 3에서는 세포의 단층막만을 통한 mannitol의 permeability coefficient를 계산한 결과를 종합하였다. Insert의 pore size와 재질에 따라 mannitol의 transport는 큰 차이를 나타내었는데 우선, pore size가 0.4 µm인 3401과 3460이 pore size가



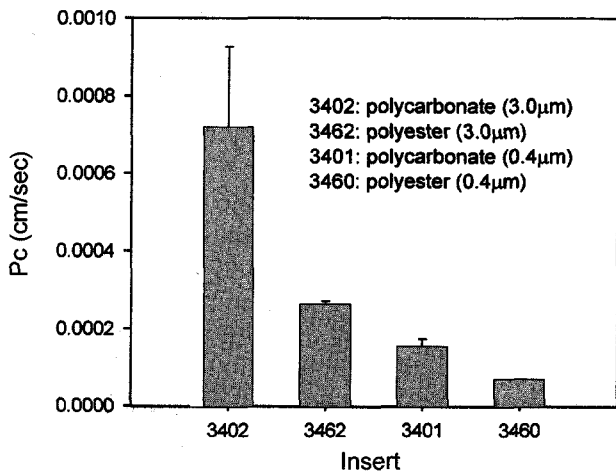
**Figure 1**—Transmission electron microscopy (TEM) of primary cultured human nasal epithelial cell monolayer. The cultured cells formed cellular sheets exhibiting cilia (A) and tight junction (B) (× 12,000).



**Figure 2**—<sup>14</sup>C-Mannitol transport through the primary cultured human nasal cell monolayer 4 days after seeding on various inserts: ○, 3402 (polycarbonate, 3.0 µm); ▽, 3462 (polyester, 3.0 µm); ●, 3401 (polycarbonate, 0.4 µm); ▼, 3460 (polyester, 0.4 µm). Each value is the mean ± SD of three determinations.



**Figure 4**—Changes in the transepithelial electrical resistance (TEER) during the primary culture of human nasal cells with (▲) and without (●) ALI condition, 4 days after seeding on 3460 insert. Each value is the mean ± SD of three determinations.



**Figure 3**—Effect of inserts on the calculated permeability coefficient of <sup>14</sup>C-mannitol through the primary cultured human nasal cells (Pc). Each value is the mean ± SD of three determinations.

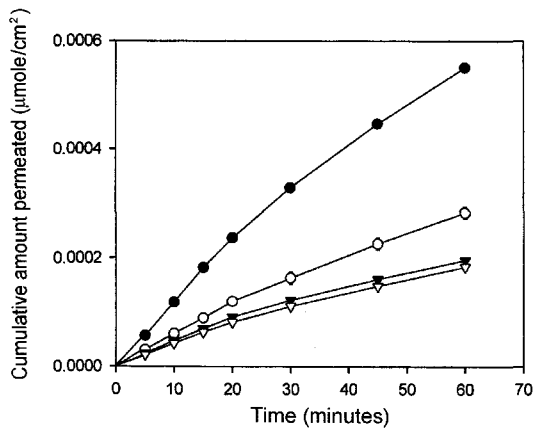
3.0 µm인 3402와 3462보다 mannitol의 투과가 덜함을 보여주고 있다. Pore size가 작을수록 cell들이 바닥에 더 잘 붙고, 잘 자란다는 것을 알 수 있었다. 또한, polyester 재질의 3460과 3462가 polycarbonate 재질의 3401이나 3402보다 tight junction을 형성하기에 더 적합함을 알 수 있다. Pore size가 0.4 µm이고 polyester 재질을 가진 3460 insert에 비강점막세포를 seeding하였을 때 mannitol의 permeability coefficient가  $6.61 \times 10^{-5}$  cm/s로서 가장 낮았으므로 비강점막 상피세포의 일차배양에 가장 적합함을 알 수 있었고 앞으로의 실험은 모두 이 insert를 사용하기로 하였다.

**ALI의 영향**

ALI 상태는 apical 쪽이 공기와 접촉하고 있기 때문에 생체와 더욱 유사한 형태와 생리학적 및 생화학적 특징을 가진 세포로의 분화를 유도한다는 것으로 알려져 있다.<sup>7-10</sup> 따라서, insert에 비강점막세포를 seeding 한 후 4일째 되는 날 apical 쪽의 배지를 제거하고 ALI상태를 유지하였을 때, tight junction의 변화여부가 약물의 투과에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

TEER값 Figure 4는 3460 insert에 세포를 seeding 후부터의 TEER값의 변화를 보여주고 있다. Seeding 후 TEER값은 점차 상승하여 4일째 되는 날에 최대값(80 ohm x cm<sup>2</sup>)을 나타내고, 그 이후 조금씩 감소하는 경향을 보여주고 있다. ALI상태가 TEER값에 미치는 영향을 알아보기 위해 TEER값이 최대를 나타내는 4일째부터 ALI상태로 하여 TEER값을 측정하여 본 결과, ALI상태에서 TEER값이 약간 증가하는 경향을 보여주고 있다.

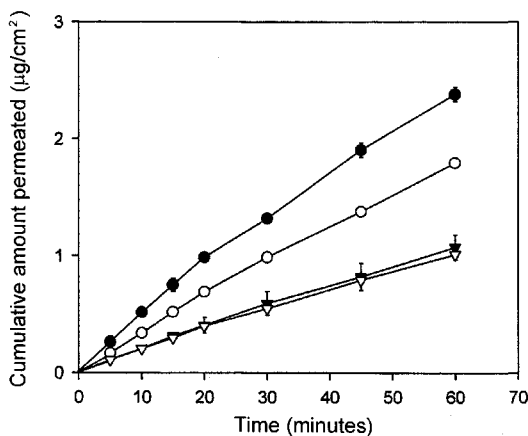
<sup>14</sup>C-mannitol의 투과 실험 Paracellular(intercellular) 경로만으로 이행하는 약물인 <sup>14</sup>C-mannitol을 이용한 투과 실험은 세포단층의 tight함을 확인할 수 있는 좋은 방법중의 하나이다.<sup>6,11</sup> ALI 상태를 만들기 바로 전(seeding 4일 후)에 투과 실험을 하고, ALI 상태를 만든 뒤 3일 및 6일 후(seeding 7일 및 10일 후)에 투과실험을 한 결과는 Figure 5와 같았다. 비강점막세포를 배양하지 않은 insert에 비해 일차배양을 4일간 한 경우 mannitol의 transport가 현저히 감소함을 보여주고 있다. 또한, ALI 상태를 만든 후 3일째 되는 날의 투과도는 ALI를 만들기 직전 보다 더욱 줄어드는 것으로부터



**Figure 5**—Effect of ALI on the <sup>14</sup>C-mannitol transport through the primary cultured human nasal cell monolayer on 3460 insert. ●, without cells (insert only); ○, before ALI (4 days after seeding); ▼, 3 days after ALI; ▽, 6 days after ALI. Each value is the mean ± SD of three determinations.

ALI가 세포단층을 좀 더 tight하게 만들었다는 것을 알 수 있었다. 그러나, ALI를 만든 6일 후에는 3일째와 유의성있는 차이를 나타내지 않는 것을 볼 수 있었다. 따라서, 비강점막세포를 3460 insert에 seeding한 후 4일째 되는 날 ALI 상태를 만들어 3일이 지난 후에 tight junction이 가장 잘 형성된다는 것을 알 수 있었다.

budesonide의 투과 실험 스테로이드계열의 약물인 budesonide를 모델로 하여, 일차배양한 비강점막상피세포의 단층막의 투과도를 관찰한 결과는 Figure 6과 같았다. <sup>14</sup>C-mannitol의 투과에서와 같이, ALI 상태를 만든 3일 후에 budesonide의 투과는 현저히 감소하였으며, 6일 후에는 3일



**Figure 6**—Effect of ALI on the budesonide (20 μg/mL) transport through the primary cultured human nasal cell monolayer on 3460 insert. ●, without cells (insert only); ○, before ALI (4 days after seeding); ▼, 3 days after ALI; ▽, 6 days after ALI. Each value is the mean ± SD of three determinations.

**Table I**—Apparent permeability coefficients ( $P_{app}$ ) of <sup>14</sup>C-mannitol and budesonide across the primary cultured human nasal epithelial cell monolayer

Days after ALI	$P_{app}$ (cm/s)	
	<sup>14</sup> C-Mannitol	Budesonide
0 day	$2.44 \times 10^{-5}$ ( $1.16 \times 10^{-6}$ )	$2.13 \times 10^{-5}$ ( $3.23 \times 10^{-8}$ )
3 day	$1.25 \times 10^{-5}$ ( $5.62 \times 10^{-7}$ )	$1.45 \times 10^{-5}$ ( $1.78 \times 10^{-6}$ )
6 day	$1.17 \times 10^{-5}$ ( $3.84 \times 10^{-7}$ )	$1.36 \times 10^{-5}$ ( $3.29 \times 10^{-7}$ )

Each value is the mean (± S.D.) of triplicate experiments. The air-liquid interface (ALI) state was maintained after 4 days of seeding on Transwell 3460.

째와 유의성 있는 차이가 없었다(Table I).

## 고 찰

사람의 비강점막상피세포를 Transwell의 insert 위에 단층막으로 일차배양하기 위한 최적의 조건을 찾기 위하여 insert의 직경, 재질, 및 pore size(0.4 μm와 3.0 μm)의 영향과 seeding하는 cell의 밀도 등의 영향을 관찰하였다. Insert의 직경은 TEER값에 별다른 영향을 미치지 못하였으며(data not shown), 또한 seeding density가 높은 경우( $4 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>)는 낮은 경우( $8 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>)보다 confluent layer를 2일 정도 빨리 형성하였을 뿐 permeability coefficient값과 TEER값에는 영향을 미치지 못하였다(data not shown). 그러나, Caco-2 cell의 배양에 많이 이용되는 polycarbonate 재질보다는 polyester 재질일 때 mannitol의 투과가 더욱 억제되었으며, pore size가 작을수록 비강점막세포의 배양에 적합한 것을 알 수 있었다(Figure 2와 3). 이는 세포가 insert의 표면에 부착하는 특성의 차이에 기인하는 것으로 생각되며 또한 pore size가 클수록 부착하는데 어려움이 있기 때문인 것으로 생각된다. 그러나, 비강점막세포의 부착을 촉진하기 위해서 문헌에 나와있는 방법으로 insert를 fibronectin/human collagen coating<sup>12)</sup>을 시도하였으나 본 실험에서는 유의성있는 차이점을 발견하지 못하였다(data not shown).

ALI상태는 apical 쪽이 공기와 접촉하고 있는 것이 *in vivo*의 상태와 유사하고 그것이 하나의 자극이 되어 배지로 채워져 있는 것에 비하여 세포의 성장과 분화를 촉진하는 것으로 알려져 있어서 점막상피세포의 일차배양에 적용되고 있는 방법이다.<sup>7-10)</sup> 본 실험에서도 apical 쪽의 배지를 제거하여 ALI 상태로 하였을 때, seeding 4일째에 최고값을 나타내었다가 감소하던 TEER값이 오히려 약간 증가하는 현상을 보였다(Figure 4). <sup>14</sup>C-mannitol을 통한 투과 실험에서도 ALI 상태를 만든 후 3일째 되는 날의 투과도는 ALI를 만들기

직전 보다 더욱 줄어드는 것을 관찰하였다(Figure 5),  $^{14}\text{C}$ -mannitol은 paracellular 경로만을 통하여 투과되는 것으로 알려져 있으므로<sup>6,11)</sup> 공기와의 접촉을 통한 자극으로 인해 분화가 더욱 촉진되어 세포단층의 tight junction이 더욱 견고해졌음을 알 수 있었다.<sup>8,10)</sup>

Budesonide는 호흡기 천식이나 비염의 치료에 사용되는 steroid 약물로서 비강점막에 spray하는 제제가 상품화되어 있다. 이러한 약물의 비강점막투여 전후에 점액질의 분비 변화를 *in vivo*상에서 관찰하는 실험계를 확립하는 것이 시급한 것으로 생각되며 이와 관련하여 약물이 점막상피세포를 투과하는 과정을 정량적으로 평가할 수 있는 가능성을 보여준 것이 본 연구의 커다란 의의라 할 수 있다. 그러나, 이상의 조건에서는 tight junction의 형성이 Caco-2 cell 만큼은 견고하지 않은 것으로 생각되며, 배지의 종류나  $\text{Ca}^{++}$ 의 농도 등을 조절하는 실험을 현재 진행중이다. 이러한 실험계가 완성되면 비강점막을 통한 각종 약물 및 펩타이드/프로틴 제제의 nasal delivery를 사람의 비강점막상피세포를 사용하여 *in vitro*상에서 간편하고 정량적으로 평가하는 것이 가능할 것으로 기대된다.

### 감사의 말씀

본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원(01-PJ1-PG3-21700-0005)에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

### 문헌

- 1) T. Kissel and U. Werner, Nasal delivery of peptides, *J. Control. Release.*, **53**, 195-203 (1998).
- 2) Y.W. Chien, *Transnasal systemic medications: fundamentals, development concepts and biomedical assessments*, Elsevier, Amsterdam, pp.1-99 (1985).
- 3) U. Werner and T. Kissel, Development of a human nasal cell culture model and its suitability for transport and metabolism studies under *in vivo* conditions, *Pharm. Res.*, **12**, 565-571 (1995).
- 4) M.C. Schmidt, H. Peter, S.R. Lang, G. Ditzinger and H.P. Merkle, *In vitro* cell models to study nasal mucosal permeability and metabolism, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **29**, 51-79 (1998).
- 5) H.J. Roh, E.K. Goh, S.G. Wang, K.M. Chon, J.H. Yoon and Y.S. Kim, Serially passaged normal human nasal epithelial cells : morphology and mucous secretory differentiation, *Korean J Rhinol.*, **6**, 107-112 (1999).
- 6) I. Behrens, P. Stenberg, P. Artursson and T. Kissel, Transport of lipophilic drug molecules in a new mucus-secreting cell culture model based on HT29-MTX cells, *Pharm. Res.*, **18**, 1138-1145 (2001).
- 7) N.R. Mathias, K.J. Kim, T.W. Robison and V.H.L. Lee, Development and characterization of rabbit tracheal epithelial cell monolayer models for drug transport studies, *Pharm. Res.*, **12**, 1499-1505 (1995).
- 8) T.W. Robison, R.J. Dorio and K.J. Kim, Formation of tight monolayers of guinea pig airway epithelial cells cultured in an air-interface: bioelectric properties, *BioTechniques*, **15**, 468-473 (1993).
- 9) J.J. Yang, H. Ueda, K.J. Kim and V.H.L. Lee, Meeting future challenges in topical ocular delivery: Development of an air-interfaced primary culture of rabbit conjunctival epithelial cells in a permeable support for drug transport studies, *J. Control. Release*, **65**, 1-11 (2000).
- 10) J.E. Chang, S.K. Basu and V.H.L. Lee, Air-interface condition promotes the formation of tight corneal epithelial cell layers for drug transport studies, *Pharm. Res.*, **17**, 670-676 (2000).
- 11) E. Duizer, W.H. Stenhuis, A.H. Penninks, P.J. van Bladeren and J.P. Groten, Characterization of (paracellular-)transport properties of IEC-18 and CACO-2, *J. Control. Release*, **41**, S6 (1996).
- 12) K.J. Elbert, U.F. Sch fers, K.J. Kim, V.H.L. Lee and C.M. Lehr, Monolayers of human alveolar epithelial cells in primary culture for pulmonary absorption and transport studies, *Pharm. Res.*, **16**, 601-608 (1999).