

## Nitronе 계 항산화제 (PBN) 의 뇌에서 혈액으로의 배출과 뇌 수송 특성

이나영 · 강영숙<sup>#</sup>

숙명여자대학교 약학대학

(Received July 9, 2003; Revised August 1, 2003)

## Characterization of the Brain Transport and Brain-to-Blood Efflux of Nitronе Based Antioxidant, PBN

Na-Young Lee and Young-Sook Kang<sup>#</sup>

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

**Abstract** — We have investigated the transport characteristics of synthetic antioxidant and free radical scavenger,  $\alpha$ -phenyl-*n*-tert-butyl nitronе (PBN) at the blood-brain barrier (BBB) by *in vitro* uptake study in conditionally immortalized rat brain capillary endothelial cell line (TR-BBB). Also, the efflux of PBN from brain to blood is estimated using the brain efflux index (BEI) method. Choline is a charged organic cation, including nitrogen-methyl group and shows the carrier-mediated distribution to the brain. [<sup>3</sup>H]Choline uptake by TR-BBB cells was significantly inhibited by PBN with IC<sub>50</sub> of 1.2 mM, which appears to be due to similar structures between choline and PBN. And, PBN was microinjected into Par2 of the rat brain by BEI method, and was eliminated from the brain with an apparent elimination half-life of about 2 min. Also, [<sup>3</sup>H]choline efflux was significantly inhibited by PBN using BEI method. In conclusion, the efflux transport of PBN takes place across the BBB and PBN may be transported into the brain and eliminated from the brain by BBB choline transporter.

**Keywords** □ blood-brain barrier,  $\alpha$ -phenyl-*n*-tert-butyl nitronе, choline transporter, conditionally immortalized rat brain capillary endothelial cell line, efflux transport

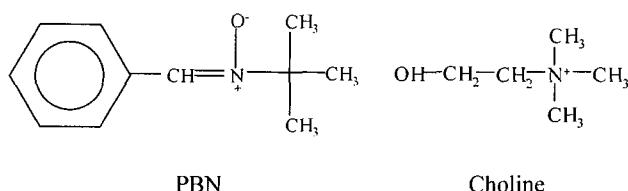


Fig. 1 – Structure of materials.

Nitronе 계 항산화제로 알려진  $\alpha$ -phenyl-*n*-tert-butyl nitronе (PBN, Fig. 1)은 free radical과 결합하여 상대적으로 안정한 부산물을 형성하는 radical scavenger로 작용한다.<sup>1)</sup> 실제로 PBN은 뇌손상을 입은 흰쥐의 기억장애를 억제하였고 조직손상을 감소 시켰으며,<sup>2)</sup> lipopolysaccharide(LPS)에 의해 유도된 세균성 뇌수막염 흰쥐 모델에서 nitric oxide(NO)를 유의성있게 감소시켜 신

경보호효과를 나타내었다.<sup>3)</sup> 또한 PBN은 노화 및 뇌졸중, 알츠하이머병 등과 같은 퇴행성 뇌질환에 대하여 강력한 약리학적 활성을 나타낸다고 보고되어 있다.<sup>4)</sup>

위와 같이 여러 가지 뇌질환에 대해 치료효과를 나타내는 PBN은 여러 다른 spin trapping 약물에 비해 상대적으로 높은 뇌중 약물농도를 나타낸다고 보고되었는데, nitronе 계열의 spin trapping 약물인 POBN( $\alpha$ -4-pyridyl-*n*-oxide-*n*-tert-butyl nitronе)과 PBN을 복강내로 투여하였을 때, PBN은 POBN에 비해 높은 농도로 뇌내에 축적되는 것을 알 수 있다.<sup>5)</sup> 또한 cerebral endothelial cell에서 uptake 실험을 실시하였을 때 PBN은 nicotine보다도 높은 뇌 투과 상수를 나타내었다.<sup>6)</sup> 그리고, 본 연구실에서 이미 보고한 논문에서 PBN이 정맥투여 후 2시간까지 높은 뇌 이행량을 나타내는 것을 알 수 있었다.<sup>7)</sup>

이와 같이 PBN은 뇌로 잘 이행되는 것이 알려져 있지만, 그 수송 특성에 대해서는 이제까지 보고된 바가 없다. Choline(Fig. 1)은 세포막의 구성성분이고 신경전달물질인 acetylcholine의 전구물질로써 유기양이온(organic cation)형 약물이다. 혈액-뇌 관문(blood-brain barrier, BBB)에는 높은 친화력을 가지면서 Na<sup>+</sup>

\*본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 02-710-9562 (팩스) 02-715-9498  
(E-mail) yskang@sookmyung.ac.kr

비의존성인 choline 수송체(choline transporter)가 존재하는 것이 보고되어 있다.<sup>8)</sup> 이러한 BBB의 choline 수송계를 통해서 choline과 구조 유사체이며 아민성 약물인 eperisone, scopolamine, thiamine, isoproterenol 등이 뇌로 수송된다는 것이 보고되었다.<sup>9)</sup> PBN 역시 nitrogen-methyl group을 가지고 있는 약물로서 choline과 유사한 구조를 가지고 있기 때문에 PBN이 BBB의 choline 수송계를 통해 뇌로 분포될 가능성을 예측해 볼 수 있다.

또한, 본 연구실에서 실험한 결과, PBN은 투여 초기에 매우 높은 뇌 투과량을 나타내었으나 약물투여 후 2시간에서는 뇌 투과량<sup>10)</sup>이 약 80배 이상 감소하는 것을 알 수 있었다.<sup>7)</sup> 이와 같이 PBN의 뇌 분포가 감소하는 것은 PBN이 빠르게 뇌로 분포된 후 다시 뇌에서 혈액으로 배출될 가능성을 시사하는 것으로 사료된다. 다만 아니라 microdialysis study로 실험하였을 때에도 이러한 '설과 동일하게 시간이 지날수록 PBN의 뇌 분포량이 감소된다'는 것이 보고되었다.<sup>5)</sup> 최근에 Kakee 등에 의해서 brain efflux index(BEI)법이 개발되었으며,<sup>10)</sup> BEI법을 사용하여 독성물질 및 대사-물질을 배출하는 유기 음이온 수송체(organic anion transporter) 및  $\gamma$ -aminobutyric acid(GABA)를 비롯한 여러 아미노산의 배출 수송계와 valproic acid와 같은 약물의 배출 수송계가 BBB에 존재하는 것이 밝혀지고 있다.<sup>11)</sup>

마지막 본 연구에서는 PBN의 뇌 수송 특성을 choline 수송계와 관련하여 *in vitro* BBB 모델인 조건적 불사화 흰쥐 뇌 모세혈관 세포주(conditionally immortalized rat brain capillary endothelial cell line, TR-BBB)<sup>12)</sup>를 통하여 알아보려 하였다. 또한 BEI법을 사용하여 PBN의 뇌에서 혈액으로의 배출을 *in vivo*<sup>10)</sup>에서 검토하고자 하였다. 이 때 뇌에 남아있는 PBN의 양은 high performance liquid chromatography(HPLC)법으로 정량하여 검토하였다.

## 실험 방법

### 실험동물

실험동물로는 Sprague-Dawley(SD)계 수컷 흰쥐를 쎈타코(주)에서 구입하여 일주일간 동물실에서 사육하여 8주령된 약 250~300g의 흰쥐를 사용하였다. 동물실험실 온도는 22~25°C, 습도는 50~60%, 조명시간은 12시간으로 자동조절이 되도록 하였다.

### 시약

*c*-Phenyl-*n*-tert-butyl nitrone(PBN)은 Aldrich Chemical Co.에서 구입하여 사용하였다. [<sup>3</sup>H]Choline chloride ([<sup>3</sup>H]choline, 86.0 Ci/mmol)과 [<sup>14</sup>C]inulin ([<sup>14</sup>C]inulin, 1.92 mCi/g)은 NEN Life Science(부경사(주))에서 구입하였다. 마취제로 사용한 염산 ketamine은 유한양행(주) 제품을, 균이완

제인 xylazine은 Sigma Co.에서 각각 구입하여 사용하였다. Acetonitrile은 HPLC용으로 덕산이화학(주)에서 구입하였고, choline, betaine은 Sigma Co.에서 구입하였다. 기타 dimethyl sulfoxide(DMSO), polyethylene glycol 200(PEG 200) 등의 시약은 일급 이상의 제품을 덕산이화학(주)에서 구입하여 사용하였다.

### 세포 배양

TR-BBB 세포주는 temperature-sensitive SV40 large T-antigen gene을 harboring한 transgenic rat에서 이미 보고된 논문의 방법<sup>12)</sup>으로 수립하였다. TR-BBB 세포는 33°C, 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 20 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2 mM L-glutamine, 15 ng/ml endothelial cell growth factor, 100 U/ml benzyl penicillin, 100 mg/ml streptomycin sulfate, 10% fetal bovine serum을 포함하는 dulbecco's modified eagle's medium(DMEM)에서 배양시켰다.

### TR-BBB 세포주에서 [<sup>3</sup>H]choline uptake study

24-Well plate(Becton Dickinson, Bedford, MA, U.S.A.)에 TR-BBB 세포를  $1.0 \times 10^5$  cells/well의 밀도로 깔아서 33°C에서 48시간 배양하였다. [<sup>3</sup>H]Choline의 uptake를 구하는 실험방법은 이미 보고된 논문<sup>12)</sup>을 참고하였다. 먼저 TR-BBB 세포를 37°C에서 ECF buffer(122 mM NaCl, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM D-glucose, 3 mM KCl, 1.4 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.4 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM HEPES, pH 7.4)로 3번 세척하였다. 1 μCi의 [<sup>3</sup>H]choline과 0.2 μCi의 [<sup>14</sup>C]inulin에 choline과 PBN을 각각 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 5, 10 mM<sup>o</sup> 되도록 조제한 ECF buffer 200 μl를 TR-BBB 세포에 적용하여 37°C에서 반응을 시작하였다. 5분간 반응시킨 후 적용했던 용액을 흡인 세제하고 4°C의 isotope-free ECF buffer 1 ml를 적용하여 반응을 멈췄다. 세포들을 1 N NaOH 750 μl로 녹이고 그 중 50 μl를 사용하여 DC protein assay kit에 적용하여 protein량을 정량하였고 나머지 500 μl를 취하여 scintillation cocktail인 Hionic-F 5 ml와 잘 혼합하여 방사활성을 측정하였다.

### Brain Efflux Index(BEI) Study<sup>10)</sup>

흰쥐에 ketamine(100 mg/kg)과 xylazine(2 mg/kg)을 근육주사하여 마취시키고 stereotaxic frame(Stoelting Co.)에 고정시킨 후 두개골을 노출시키고 bregma로부터 lateral로 5.5 mm, anterolaterally 0.2 mm의 위치에 dental drill(Eicom Co.)로 1.0 mm의 구멍을 만들어 놓았다. Injectate는 PBN 1 mg을 DMSO로 용해시키고 PEG 200과 ECF buffer로 잘 혼합하여 전체가 1 ml가 되도록 조제하였는데, 이 때 사용한 DMSO는 전체량의 1%가 되도록 하였다. 조제한 injectate 중 0.5 μl를 needle(100 μm i.d., 350 μm o.d., Natsume Co.)을 연결한 5 μl microsyringe(Hamilton

Co.)에 취하여 미리 만든 구멍을 통해 흰쥐의 Par2 영역에 2분간 적용하였다. Injectate를 순시에 주입하고 2, 5, 10분 후에 단두하여 동측의 뇌를 적출한 다음, 생리완충액(PB, 10 mM HEPES, 141 mM NaCl, 4 mM KCl, 2.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM D-glucose, pH 7.4) 500 μl를 넣고 균질화한 후 chloroform 3 ml를 넣어 5분간 추출하였다. 추출액 중 유기층만을 취하고 N<sub>2</sub> gas를 적용하여 유기용매를 완전히 날린 후 acetonitrile 200 μl에 녹여 pore size가 0.2 μm인 syringe filter(National Scientific Co.)를 사용하여 여과하고 그 중 100 μl를 HPLC에 적용하였다. 본 실험에서는 BBB를 통과하지 못하는 표준 물질로 inulin을 사용하는 대신 논문에 보고되어진 값을 근거로 하여<sup>10)</sup> 표준 물질의 뇌내 농도를 보정하여 계산하였다.

한편 BEI법을 사용하여 choline, PBN 및 betaine이 [<sup>3</sup>H]choline의 뇌 배출에 미치는 영향을 살펴보았다. 먼저 choline, PBN 및 betaine을 각각 50, 10, 100 mM의 농도로 함유하는 0.5 μl ECF buffer에 [<sup>3</sup>H]choline (80 nCi)과 [<sup>14</sup>C]inulin을 (4 nCi)를 녹여 injectate를 만들었다. 이들 injectate 0.5 μl를 위에서 언급한 방법과 동일하게 needle (100 μm i.d., 350 μm o.d.)을 연결한 5 μl microsyringe에 취하여 Par2 영역에 2분간 적용하였다. Injectate를 투여하고 40분 후에 단두하여 뇌를 꺼내고 위와 같은 방법으로 방사활성을 측정하였다.

#### Brain Efflux Index(BEI)의 산출<sup>10)</sup>

BEI(%)는 뇌에 주입한 약물의 양에 대해서 뇌에서부터 BBB를 통과하여 순환혈중으로 배출된 약물의 양의 상대적인 비율로 다음과 같이 정의하였다.

$$\text{BEI}(\%) = \frac{\text{effluxed drug at the BBB}}{\text{injected drug into the brain}} \times 100$$

뇌로부터 배출된 약물의 양은 주입한 약물의 양에서 뇌에 남아있는 약물의 양을 뺀 것과 같으며, BBB를 통과할 수 없는 표준물질을 약물과 동시에 뇌로 투여하여 뇌에 남아있는 약물의 양을 보정할 수 있도록 하였다. 그러므로 위의 수식은 다음과 같은 식으로 바꾸어 표현할 수 있다.

$$\text{BEI}(\%) = \left[ 1 - \left( \frac{\frac{\text{amount of test drug in the brain}}{\text{amount of reference in the brain}}}{\frac{\text{amount of test drug injected}}{\text{amount of reference injected}}} \right) \right] \times 100$$

그러므로 BEI법으로 실험한 후에 뇌에 남아있는 약물의 양 {100 - BEI(%)}을 구하는 식은 다음과 같다.

$$100 - \text{BEI}(\%) = \left( \frac{\frac{\text{amount of test drug in the brain}}{\text{amount of reference in the brain}}}{\frac{\text{amount of test drug injected}}{\text{amount of reference injected}}} \right) \times 100$$

겉보기 뇌배출 속도 상수(brain efflux rate constant, K<sub>eff</sub>)는 시간에 따른 {100 - BEI(%)}} 값으로 semilogarithmic plot을 그려서 얻을 수 있다.

#### HPLC 분석

HPLC 분석은 Shimadzu LC-10AS gradient liquid chromatographic system을 사용하여 실시하였고 UV detector를 사용하여 280 nm에서 chromatogram을 얻었다. Column은 C18 reverse phase column(CLCA-ODS 5 μm, 4 mm × 250 mm)을 사용하였다. HPLC 이동상은 A액과 B액을 각각 0.1% phosphoric acid in water, 0.1% phosphoric acid in acetonitrile로 구성하였는데, A액과 B액을 각각 4:6의 비율로 하여 flow rate는 1 ml/min의 속도로 적용하였다.

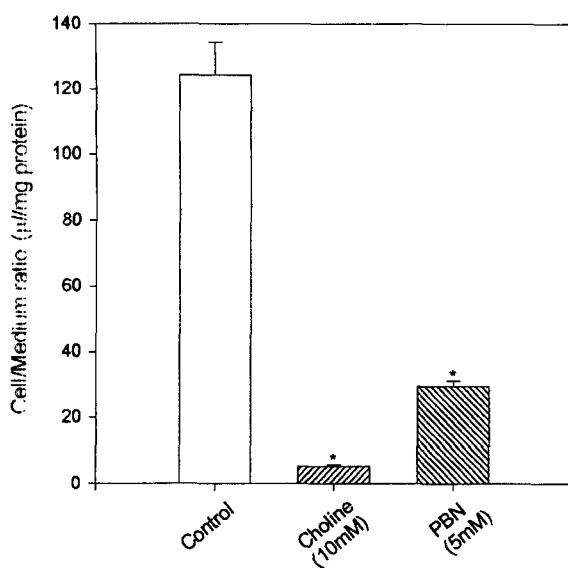
#### 통계 처리

모든 데이터는 각 실험 횟수에 대한 평균과 표준오차(mean ± S.E.M.)로 표시하였다. 두 그룹간 유의성은 student's t-test로 계산하고 p<0.05인 것을 통계적으로 유의하다고 간주하였다.

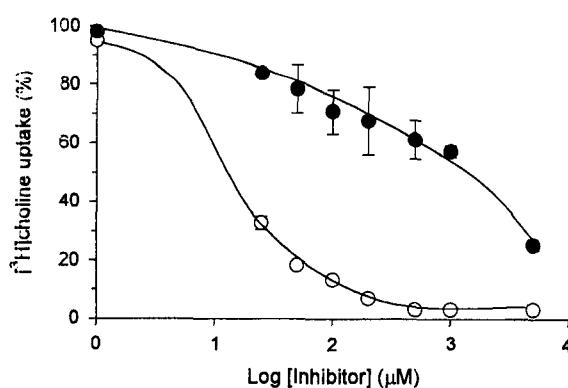
#### 실험결과 및 고찰

##### PBN의 뇌 수송 특성

PBN의 혈액-뇌 관문 수송 특성을 밝히기 위하여 본 연구에서는 *in vivo* 상태를 잘 반영하고 있는 BBB *in vitro* 모델인 TR-BBB 세포주<sup>12)</sup>를 사용하여 *in vitro*에서 구조 유사체인 [<sup>3</sup>H]choline uptake에 대한 PBN의 영향을 평가하였다. PBN의 뇌 수송 특성을 알아보기 위하여 세포에서 PBN의 uptake 실험을 실시하는 것이 이상적인 방법이지만 PBN의 방사성 동위원소 표식체가 시판되고 있지 않고, 염기성 약물은 amine 수송체를 통하여 BBB를 투과한다는 이전의 보고<sup>9)</sup>도 있어서 대신 구조 유사체인 [<sup>3</sup>H]choline을 선택하여 실험을 실시하였다. Choline은 nitrogen-methyl group을 가지는 PBN의 구조 유사체로써 BBB에 그 수송체가 존재하는 것이 보고되어 있다.<sup>8)</sup> 먼저 TR-BBB 세포에 5 mM PBN 또는 10 mM choline을 처리한 후 5분 동안의 [<sup>3</sup>H]choline의 세포내 uptake는 control과 비교하였을 때 두 그룹 모두에서 유의적으로 감소하는 것을 알 수 있었다(Fig. 2). 또한 TR-BBB 세포에서 [<sup>3</sup>H]choline uptake에 대한 choline과 PBN의 IC<sub>50</sub>은 각각 9.4 μM과 1.2 mM이었다(Fig. 3). 이전의 연구에서 brain uptake index(BUD)법으로 실험하였을 때 choline 수송체를 통해 뇌로 수송되는 약물로 알려진 eperisone은 IC<sub>50</sub> 값이 1.45 mM로 [<sup>3</sup>H]choline의 뇌 투과를 저해한다고 보고하였는데, 이는 PBN의 IC<sub>50</sub> 값과 유사한 수치이다.<sup>9)</sup> 또한 TR-BBB 세포에서 choline은 IC<sub>50</sub> 값이 9.4 μM로 [<sup>3</sup>H]choline의 세포내 uptake를 농도 의존적으로 저해하였다. 이러한 결과는 흰쥐 뇌

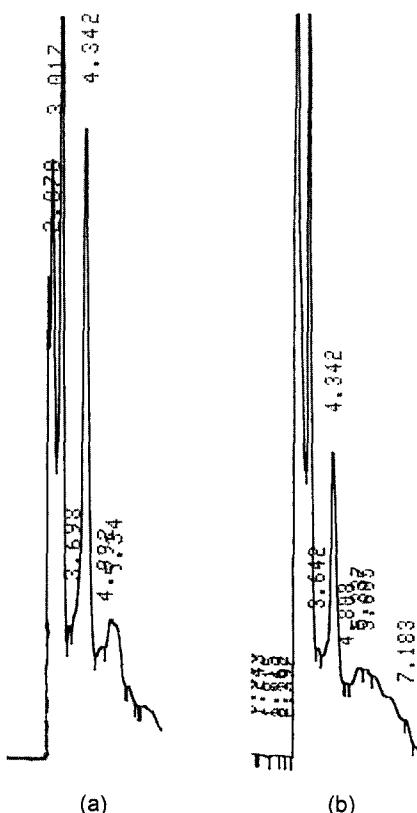


**Fig. 2** – Inhibitory effect of several compounds on  $[^3\text{H}]$ choline uptake in TR-BBB cells. The  $[^3\text{H}]$ choline uptake was measured at  $37^\circ\text{C}$  for 5 min in TR-BBB cells. The uptake was performed in the absence (control) and presence of each compound. Each data point represents the mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 3\sim 4$ ). \* $p < 0.0001$ , significantly different from control.



**Fig. 3** – Dose-response relationship for the inhibition of  $[^3\text{H}]$ choline uptake by unlabeled choline and PBN. Uptake of  $[^3\text{H}]$ choline (11.63 nM) was measured in TR-BBB cells with a 5 min incubation in the presence of increasing concentrations of choline and PBN. Results are given as percent of control uptake measured in the absence of inhibitors. ○, unlabeled choline; ●, PBN.

모세혈관 내피세포주(rat brain capillary endothelial cell line)인 REE4 세포에서 실험하였을 때 얻은 choline의  $IC_{50}$ 은  $12 \mu\text{M}^{13}$ 과 두~사한 값으로 TR-BBB에서의 choline의 수송이 carrier에 의해서 수송되고 있음이 잘 나타나고 있다. 이러한 결과들은 PBN이 EBB의 특수 수송계인 amine 수송계를 통해 뇌내로 수송될 가능성을 시사하고 있지만, 앞으로 PBN의 수송과 choline 수송 계와의 저해 특성 등에 대해서 약물학에서 더욱 상세한 연구가 진행되어야 할 것이다.



**Fig. 4** – HPLC chromatograms of PBN. Injectate (A), brain extract obtained at 2 min after microinjection by BEI method (B) of PBN. The peak of PBN was found at about 4.3 min.

#### PBN의 뇌에서 혈액으로의 배출

이미 보고한 연구에서 PBN의 뇌투과 고유상수는 경동맥 투여 후 15초에서 약  $240 \mu\text{l}/\text{min/g}$ 으로 높은 값을 나타내었지만, 정맥 투여 후 120분에서는 약  $3 \mu\text{l}/\text{min/g}$ 을 나타내어 투여 초기의 뇌 투과 고유상수에 비해 약 80배 정도 낮은 값을 나타내었다.<sup>7)</sup> 이는 PBN이 빠르게 뇌로 분포된 후 다시 혈중으로 배출되고 있는 가능성을 시사하는 것이다. 그러므로 본 연구에서는 PBN의 뇌에서 혈액으로의 배출을 BEI법을 사용하여 검토하였다. BEI법을 실시하여 얻은 PBN의 대표적인 chromatogram을 Fig. 4에 나타내었다. A, B는 각각 실험에 사용한 injectate의 peak, PBN을 뇌의 Par2 영역에 주입한 후 2분에서 적출한 뇌에서 얻은 peak이다. 두 chromatogram 모두에서 HPLC에 적용한 후 약 4.3분에서 PBN의 peak를 얻을 수 있었다. HPLC chromatogram의 결과를 바탕으로 뇌에서의 PBN의 표준 검량선을 작성한 결과 직선 상관 계수가  $r^2=0.936$ 인 회귀직선을 얻을 수 있었고 이 직선을 사용하여 적출한 뇌에서의 PBN의 농도를 정량하였다.

흰쥐의 뇌의 Par2 영역에 PBN을 microinjection한 후, 시간이 증가함에 따라 뇌에 남아있는 PBN의 양  $\{100 - BEI(\%)\}$ 의 변화

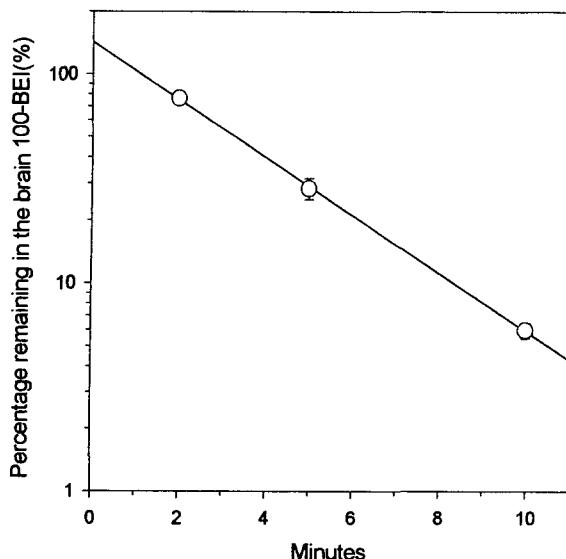


Fig. 5 – Time-course of PBN in the ipsilateral cerebrum after intracerebral microinjection. PBN was injected into Par2 region of rat brain. Rats were decapitated at 2, 5 and 10 min after microinjection. The slope of the line represents the elimination rate constant of a tracer amount of PBN, i.e.  $0.32 \text{ min}^{-1}$ , obtained using non-linear least squares regression analysis. PBN was eliminated from the brain with an apparent elimination half-life of 2.2 min. Each data point represents the mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 3$ ).

를 Fig. 5에 나타내었다. 그 결과 대부분의 PBN이 투여 후 10분 이내에 뇌로부터 소실되었고, 그 때의 PBN의  $K_{\text{eff}}$  값은  $0.32/\text{min}$ , 반감기는 2.2분으로 매우 빠른 속도로 소실되는 것을 알 수 있었다. 그러나 본 실험에서는 PBN의 steady-state에서의 뇌 분포 용적을 구하지 않았기 때문에 PBN의 뇌투과와 뇌 배출간의 정확한 차이를 비교할 수는 없었다. 또한 이와 같은 PBN의 빠른 소실은 PBN이 뇌에서 혈액으로 배출될 뿐만 아니라 뇌에서 대사됨을 통해 소실될 가능성도 배제할 수 없다. 여러 보고에서 PBN은 여러 종류의 radical과 빠르게 반응하여 안정한 화합물로 변화된다고 알려져 있는데, PBN이 간에서 hydroxyl radical과 결합하여 주로 4-hydroxyPBN로 대사된다는 보고가 있고,<sup>14)</sup> 허혈

상태의 뇌에서 PBN<sup>o</sup> hydroxyl radical과 결합하여 3,4-dihydrobenzoate 등으로 변화된다는 보고도 있다.<sup>15)</sup> 그러므로 PBN의 뇌 배출 기전에 대해서는 방사성 동위원소와 대사체 등을 사용하여 앞으로 더 상세한 연구가 수행되어야 할 것이다.

또한 PBN의 뇌에서 혈액으로의 배출 수송계와 choline의 배출 수송계와의 관계를 알아보기 위하여 *in vitro* 실험에서와 마찬가지로 PBN을 대신하여 [<sup>3</sup>H]choline의 뇌 배출을 BEI법을 사용하여 검토하였다. 본 연구실에서는 BBB를 통하여 choline의 뇌에서 혈액으로의 배출 수송계가 존재한다는 것을 실험으로 증명하여 보고 중에 있으므로 본 논문에서는 [<sup>3</sup>H]choline의 뇌 배출에 관한 상세한 특성은 나타내지 않았다. 실험 결과, PBN 및 choline, choline의 대사산물이면서 GABA 수송체의 저해제인 betaine을 [<sup>3</sup>H]choline과 동시에 뇌의 Par2 영역으로 투여하였다. 그 결과 뇌에 남아있는 [<sup>3</sup>H]choline의 양{100 - BEI(%)}은 control과 비교하였을 때 PBN, choline에서 각각 33%, 36% 증가하여  $p < 0.05$ 인 유의적인 증가를 나타내었는데, 이것은 [<sup>3</sup>H]choline의 뇌 배출이 PBN 등에 의해 억제되고 있음을 나타내고 있다(Table I). 이러한 결과는 PBN이 뇌에서 혈액으로 배출될 때에도 choline 수송계를 경유할 가능성을 시사하는 것이다. 그러나 betaine은 control과 유사한 100 - BEI(%)를 나타내어 [<sup>3</sup>H]choline의 뇌 배출을 억제시키지 못하였다. 이것은 choline의 배출 수송계와 betaine의 배출 수송계가 서로 관여하지 않으며, betaine이 혈중으로 배출될 때 choline 수송계를 경유하고 있지 않음을 나타내고 있는 것이다.

## 결 론

본 연구 결과, PBN은 TR-BBB 세포에서 구조 유사체인 choline의 수송을 유의적으로 저해하였으며 이와 같은 저해작용은 농도 의존적인 특이적인 저해 현상을 나타내었다. 또한 BBB를 통한 PBN의 뇌 배출은 뇌에서 혈액으로 아주 빠르게 배출되었으며, PBN의 뇌 투과와 뇌 배출 수송은 choline 수송계에 인식되어 수송될 가능성을 시사하였다.

Table I – Effect of several compounds on [<sup>3</sup>H]choline efflux from the rat brain

Compound	Concentration in the injectate (mM)	Concentration in the brain (mM)	100 - BEI(%)	% of control
Control	0	0	$62.5 \pm 5.3$	100
+ Choline	50	1.7	$84.7 \pm 1.1$	136**
+ PBN	10	0.33	$82.9 \pm 1.1$	133*
+ Betaine	100	3.3	$66.8 \pm 2.1$	107

[<sup>3</sup>H]Choline (80 nCi) and [<sup>14</sup>C]inulin (4 nCi) dissolved in 0.5  $\mu$ l ECF buffer were injected into Par2 region of the brain in the presence of several compounds.

The brain concentration was estimated from the injectate concentration divided by the dilution factor, i.e., 30.3, which was reported previously.<sup>10)</sup>

Data, determined at 40 min after intracerebral microinjection, are mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 3$ ).

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , significantly different from control.

## 감사의 말씀

저희들은 본 연구의 수행에 있어서 도움을 준 박지희와 이경운에게 깊은 감사를 드립니다.

## 문 헌

- 1) Kuech, K. T. and Mason, R. P. : *In vivo* spin trapping of xenobiotic free radical metabolites. *Arch. Biochem. Biophys.* **303**, 185 (1993).
- 2) Marklund, N., Lewander, T., Clausen, F. and Hillered, L. : Effects of the nitronе radical scavengers PBN and S-PBN on *in vivo* trapping of reactive oxygen species after traumatic brain injury in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **21**, 1259 (2001).
- 3) Endoh, H., Kato, N., Fujii, S., Suzuki, Y., Sato, S., Kayama, T., Kotake, Y. and Yoshimura, T. : Spin trapping agent, phenyl N-*tert*-butylnitronе, reduces nitric oxide production in the rat brain during experimental meningitis. *Free Radic. Res.* **35**, 583 (2001).
- 4) Floyd, R. A., Hensley, K., Forster, M. J., Kelleher-Anderson, J. A. and Wood, P. L. : Nitronеs as neuroprotectants and antiaging drugs. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **959**, 321 (2002).
- 5) Cheng, H. Y., Liu, T., Feuerstein, G. and Barone, F. C. : Distribution of spin-trapping compounds in rat blood and brain: *In vivo* microdialysis determination. *Free Radic. Biol. Med.* **14**, 243 (1993).
- 6) Dehouck, M. P., Cecchelli, R., Richard-Green, A., Renftel, M. and Lundquist, S. : *In vitro* blood-brain barrier permeability and cerebral endothelial cell uptake of the neuroprotective nitronе compound NXY-059 in normoxic, hypoxic and ischemic conditions. *Brain Res.* **955**, 229 (2002).
- 7) 나영, 강영숙 : 흰쥐에서 nitronе계 항산화제인  $\alpha$ -phenyl-*n*-

*tert*-butyl nitronе(PBN)의 뇌 투과성 및 체내동태. *약학회지* **46**, 124 (2002).

- 8) Lockman, P. R. and Allen, D. D. : The transport of choline. *Durg Dev. Ind. Pharm.* **28**, 749 (2002).
- 9) Kang, Y. S., Terasaki, T., Ohnishi, T. and Tsuji, A. : *In vivo* and *in vitro* evidence for a common carrier mediated transport of choline and basic drugs through the blood-brain barrier. *J. Pharmacobiodyn.* **13**, 353 (1990).
- 10) Kakee, A., Terasaki, T. and Sugiyama, Y. : Brain efflux index as a novel method of analyzing efflux transport at the blood-brain barrier. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **277**, 1550 (1996).
- 11) Hosoya, K., Ohtsuki, S. and Terasaki, T. : Recent advances in the brain-to-blood efflux transport across the blood-brain barrier. *Int. J. Pharm.* **248**, 15 (2002).
- 12) Hosoya, K. I., Takashima, T., Tetsuka, K., Nagura, T., Ohtsuki, S., Takanaga, H., Ueda, M., Yanai, N., Obinata, M. and Terasaki, T. : mRNA expression and transport characterization of conditionally immortalized rat brain capillary endothelial cell lines; a new *in vitro* BBB model for drug targeting. *J. Drug Target.* **8**, 357 (2000).
- 13) Friedrich, A., George, R. L., Bridges, C. C., Prasad, P. D. and Ganapathy, V. : Transport of choline and its relationship to the expression of the organic cation transporters in a rat brain microvessel endothelial cell line (RBE4). *Biochim. Biophys. Acta* **1512**, 299 (2001).
- 14) Reinke, L. A., Moore, D. R., Sang, H., Janzen, E. G. and Kotake, Y. : Aromatic hydroxylation in PBN spin trapping by hydroxyl radicals and cytochrome p-450. *Free Radic.. Biol. Med.* **28**, 345 (2002).
- 15) Gido, G., Cronberg, T. and Wieloch, T. : The effect of  $\alpha$ -phenyl-*tert*-butyl nitronе (PBN) on free radical formation in transient focal ischaemia measured by microdialysis and 3,4-dihydroxybenzoate formation. *Acta Physiol. Scand.* **168**, 277 (2000).