

아세트아미노펜 독성평가를 위한 μ CCA- μ GI 디바이스의 개발

장정윤[†] · Michael L. Shuler^{*}

식품의약품안전청, *코넬대학교

(2006년 7월 13일 접수 · 2006년 8월 9일 승인)

The Design and Fabrication of μ CCA- μ GI Device for Toxicity Evaluation of Acetaminophen

Jung Yun Chang[†] and Michael L. Shuler^{*}

Korea Food and Drug Administration, *Cornell University

(Received July 13, 2006 · Accepted August 9, 2006)

ABSTRACT – Deficiencies in the early ADMET (absorption, distribution, metabolism, elimination and toxicity) information on drug candidate extract a significant economic penalty on pharmaceutical firms. Microscale cell culture analogue-microscale gastrointestinal (μ CCA- μ GI) device using Caco 2, L2 and HEp G2/C3A cells, which mimic metabolic process after absorption occurring in humans was used to investigate the toxicity of the model chemical, acetaminophen (AAP). The toxicity of acetaminophen determined after induction of CYP 1A1/2 in Caco 2 cells was not significant. In a coculture system, although no significant reduction in viability of HEp G2/C3A and L2 cells was found, approximately 5 fold increase in the CYP 1A1/2 activity was observed. These results appear to be related to organ-organ interaction. The oral administration of a drug requires addition of the absorption process through small intestine to the current μ CCA device. Therefore, a perfusion coculture system was employed for the evaluation of the absorption across the small intestine and resulting toxicity in the liver and lung. This system give comprehensive and physiologic information on oral uptake and resulting toxicity as in the body. The current μ CCA device can be used to demonstrate the toxic effect due to organ to organ interaction after oral administration,

Key words – μ CCA (Cell culture analogue), Acetaminophen, CYP 1A1/2

신약후보물질이나 환경오염물질이 인체에 미치는 영향 평가에 대한 요구가 계속적으로 증가하고 있으나, 동물실험이나 조직세포의 단층배양을 이용한 평가는 시간과 비용이 많이 들며, 조직과 조직간의 영향을 알 수 없다는 단점을 가지고 있다. 또한, 단층세포로 배양한 *in vitro* 시스템의 경우 *in vivo*에서 일어나는 대사과정을 재현할 수 없다는 단점이 있다. 동물실험은 세포단층배양에 비해 독성이나 체내동태를 정확히 파악할 수 있다는 장점은 있으나 동물애호가들이 동물을 이용한 연구를 반대하고 있어, EU에서는 동물대체시험법의 개발을 적극적으로 유도하고 있다. 최근 동물실험의 대체방법으로 생리적 인자를 고려한 약력학적 모델을 기본으로 하여 혈류속도와 각 조직의 부피 등의 생리학적 정보를 세포배양에 접목시킴으로서 보다 인체 데이터와 인접한 결과들이 보고되고 있다.^{1,2)} 또한, 세포를 동시에 배양하여 서

로 시스템을 연결함으로써 흡수, 분포, 대사, 배설과정을 시뮬레이션할 수 있는 장점을 가지고 있다. 따라서 인체에서 일어나는 대사과정, 지방세포로의 약물의 흡수과정 등을 고려한 칩이 개발되었으며, 하나의 칩 위에서 세포를 동시배양한 시스템이 micro cell culture analogue(μ CCA) 디바이스이다. 이 μ CCA 디바이스는 간세포구획, 폐세포구획, 지방세포구획, 다른기관구획을 서로 사람의 혈액순환과 유사한 관류시스템(perfusion system)을 사용하여 연결한 것이다.

아세트아미노펜(N-acetyl-p-aminophenol)은 파라세타몰(paracetamol)로도 불리우며, 전세계적으로 해열진통제로 널리 사용되고 있다. 아세트아미노펜은 일반의약품으로 처방없이 사용되며, 일반적으로 치료용량에서는 부작용이 적은 것으로 알려져 있으나, 과용량 복용시 간독성을 일으키는 것으로 보고되어 있다.^{3,4)} 아세트아미노펜에 의한 간독성은 알코올의 남용이나 금식, 병용투여한 약물에 의하여 더 증가하는 것으로 알려져 있다. 치료용량에서 아세트아미노펜은 간에서 황산포합반응과 글루쿠론산포합반응이 일어나며, 단지 적은

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 02)380-1709, E-mail : changjy@kfda.go.kr

부분만이 CYP 2E1, 1A1/2와 3A4에 의해 독성물질인 N-acetyl-p-benzoquinoneimine을 생성하지만, 바로 글루타치온에 의해 해독된다.⁵⁾ 그러나 과용량을 복용하게 되면 황산포합을 일으키는 과정이 포화가 되고 글루타치온의 고갈이 일어나게 된다. 이 때 불충분한 해독과정이 일어나게 되면서 간조직의 괴사를 일으키게 된다. 그러나 지금까지 아세트아미노펜의 독성과 관련된 연구 보고는 독성기전에 주로 초점을 맞춘 것이어서 각 장기간의 상호작용에 의한 영향을 살펴본 연구는 없었다.⁶⁻⁸⁾

따라서 본 연구에서는 약물흡수와 각 장기간의 상호작용에 의한 영향을 알아보기 위해 소화관과 폐 및 간을 연결하는 μ CCA- μ GI 디바이스를 개발하고자 하였다.

실험 방법

시약

Caco 2세포(human colon adenocarcinoma epithelial cells), L2세포(rat lung Type II epithelial cells) 및 Hep G2/C3A세포(human hepatocarcinoma epithelial cells)를 ATCC(American Tissue Culture Collection)에서 분양받았다. Caco 2 세포는 10% FBS와 10 mM의 MEM non-essential amino acid가 첨가된 Dulbecco's modified minimum essential medium(DMEM)에서 배양하였으며, L2세포 및 Hep G2/C3A세포는 DMEM/F12(1:1)에 파이루베이트가 첨가된 세포배양배지에서 배양하였다. DMEM/F12을 포함한 모든 배지, 소혈청알부민(FBS), 페니실린, 스트렙토마이신, 파이루베이트와 생리식염인산염완충액은 Life Technologies사(Rockville, MD, USA)에서, 폴리라이신(Poly-D-lysine), 아세트아미노펜, 레조르핀, 에톡시레조르핀은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

Caco 2세포의 CYP 1A1/2활성의 측정

Caco 2세포를 웰당 $1 \times 10^3, 10^4, 10^5$ 개씩을 접종하고 Type 1 collagen이 코팅된 transwell의 apical side쪽에 DMEM 0.5 mL, basolateral쪽은 DMEM 1.5 mL를 넣어 24시간 배양하였다. 그리고, CYP 1A1/2의 활성을 증가시키기 위해 3-methylcholanthrene(3-MC) 0.5 μ M을 첨가하여 배양하였다. CYP 1A1/2의 활성은 ethoxyresorufin O-deethylase(EROD)에 의해 생성되는 레조르핀의 농도로 측정하였다.⁹⁾

HEpG2/C3A세포와 L2세포의 단층배양과 동시배양 시 세포의 증식능과 CYP 1A1/2 활성의 측정

HEpG2/C3A세포는 Type I collagen이 코팅된 transwell에 1×10^5 cells/cm²로, L2세포는 insert에 1×10^5 cells/cm²로 접종하고 각각 1.5 mL와 0.5 mL의 배지를 넣어 동시배양(coculture)하였다. μ CCA- μ GI에서의 아세트아미노펜의 독성을 평가하기 위해 Caco 2세포와 HEpG2/C3A세포, L2세포를 가지고 각 세포의 증식능과 효소활성을 실험하였다. 이때 랫트를 모델로 각 장기의 유지시간을 정하였으므로 랫트의 세포를 이용하여야 하나, Caco 2세포와 HEpG2/C3A가 가장 사람과 유사한 흡수능과 효소활성을 나타내는 것으로 보고되고 있어 사람과 랫트의 세포를 가지고 실험하였다.¹⁹⁾ HEp G2/C3A세포와 L2세포는 따로 well과 insert를 이용하여 단층배양하였으며, 배지의 양은 동시배양과 동일하게 사용하였다. 3-MC 처리후 각각의 세포를 단층배양한 것과 동시배양한 경우의 세포의 증식능(cell proliferation)과 CYP 1A1/2 활성을 측정하였다.⁹⁾ 세포의 증식능은 MTS((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt)와 electron coupling reagent인 phenazine methosulfate(PMS)를 사용하여 형성된 formazan의 흡광도를 Elisa reader를 이용하여 492 nm의 파

Table I-Physiological Parameters for a Pharmacokinetic Model

	Organ volume (mL) ^a (per 250 g rat weight)	Blood flow (mL/min) ^a	Blood flow (% of cardiac output) ^c	Residence time(sec) ^d
Blood flow of cardiac output		74.0		
Liver	19.6	13.8	18.6	85
Lung	2.1	74.0	100	2
Gut	11.3	9.8 ^b	13.2	69
Other tissue(brain, diaphragm, fat, kidney, muscle etc)	261.2	70.0	95.6	223

a. in B. Davies and T. Morris, *Pharm. Res.*, **10**, 1093-1095 (1993).

b. Portal vein flow is more important than gut itself blood flow as a connection with liver and GI.

c. Each blood flow/blood flow of cardiac output.

d. each organ volume/ each blood flow.

장에서 측정하는 MTS assay를 통해 측정하였다.²⁾

Caco 2세포에서 CYP 1A1/2 유도 후 아세트아미노펜에 의한 독성

Caco 2세포에서 3-MC에 의해 CYP 1A1/2의 활성이 증가된 후 Caco 2세포의 apical side 쪽에 3-MC와 아세트아미노펜(1-20 μ M)을 함유하는 새로운 배지를 가하고, basal side 쪽에는 3-MC를 함유하는 새로운 배지를 가하여 아세트아미노펜에 의한 독성을 Caco 2세포에서 살펴보고자 하였다. 따로 3-MC를 처리하지 않은 아세트아미노펜 투여군에서도 Caco 2세포에서의 독성을 평가하여 CYP 1A1/2 유도 후 나타난 아세트아미노펜의 독성과 비교하였다. 세포의 독성은 MTS assay로 측정하였다. 단백질 정량은 소혈청알부민을 표준물질로 하여 바이오레드 단백질 정량시약(Bio-rad, Munich, Germany)을 사용하여 측정하였다.

μ CCA 모델

랫트의 간은 19.6 mL, 폐는 2.1 mL 및 소화관은 11.3 mL 이므로 각 장기에서의 혈류속도로 각 장기의 부피를 나누어 유지시간을 구하였다.¹⁰⁾ 이렇게 얻어진 결과를 이용하여 폐 2초, 간 85초, 소화관 69초, 다른 기관 223초의 유지시간을 갖도록 디바이스를 디자인하였다. 이 때 소화관과 간을 연결 시킴으로서 각 장기간의 상호작용을 보고자 하였으므로 소화관에서의 혈류속도(7.5 mL/min)를 이용하지 않고 간문맥의 혈류속도(9.8 mL/min)를 이용하여 소화관의 유지시간을 계산하였다. 두개의 펌프중 peristaltic pump를 이용하여 폐와 간으로 이루어진 μ CCA 디바이스로 배지가 흐르게 하였으며, syringe pump는 폐와 간의 유속과 다른 μ GI tract을 위하여 장치하였다.

이 때 간문맥을 통해서 간으로 들어가는 배지의 양을 약 80%, 간동맥을 통하여 간으로 들어가는 배지의 양을 약 20%로 그 비율을 조절함으로써 생리학적 조건과 유사하게 하려고 디자인하였다.¹¹⁾

실리콘 μ CCA 제조

실리콘디바이스는 Cornell Nanofabrication Facility(CNF)에서 standard lithography-etching technique을 이용하여 제조하였다. μ CCA의 패턴은 CAD(Cadence; Fishkill, NY, USA)에서 작성하였으며, 데이터파일로 전환시킨 후에 pattern generator로 크롬이 코팅된 유리마스크에 노출시켜 μ CCA패턴을 제작하였다. 디바이스 제작 시 두개의 층이 필요하므로 100 μ m, 40 μ m을 위한 각각의 마스크를 제작하였다.

실리콘 웨이퍼(Silicone Quest; Santa clara, CA)는 실리콘

표면의 수분을 없애기 위하여 P20 primer (Shipley; Marlborough, MA)를 코팅하였으며, 4000 rpm에서 Shipley 1813 photoresist(Shipley)을 1.5 μ m두께로 회전코팅하였다. Pattern은 contact aligner(AB-M HTG 3HR Contact proximity aligner, San Jose, CA, USA)를 이용하여 웨이퍼에 자외선(405 nm wavelength)를 2.5초 동안 노출시켜 마스크의 패턴을 웨이퍼로 옮긴 후에 MIF 300 현상액으로 μ CCA패턴을 녹였다. 첫 번째 식각은 unix 770를 이용하여 2 μ m/min으로 40 μ m의 두께로 첫 번째 패턴대로 식각하였다. 식각된 부분 밖으로 남아 있는 photoresist는 60°C 30분동안 heated resist bath에서 제거하였다.

두 번째 층은 shipley 1075를 사용하여 3000 rpm에서 웨이퍼를 2번 회전코팅시켰다. 이 때 얇은 층을 형성하는 shipley 1827를 사용시 오랜 시간의 식각을 견디지 못하고 자외선에 노출되지 않은 부분도 식각이 되어 두꺼운 필름을 형성하는 shipley 1075를 사용하였다. 일반적으로 Shipley 1075는 20 μ m 정도의 두께를 형성하므로 더욱 긴 시간의 자외선노출이 필요하였다. Contact aligner를 사용하여 이미 식각된 실리콘웨이퍼를 원하는 모양을 얻도록 배열하였으며 405 nm에서 15초 동안 노출하였다. 현상한 이후에 웨이퍼는 100 μ m의 두께를 얻도록 unix 770으로 식각하였으며, 이것은 약 60분이 소요되었다. 마지막으로 남아 있는 photoresist를 60°C heated resist bath에서 제거하였으며 4개의 디바이스로 만들어진 μ CCA 디바이스는 웨이퍼용 전자칼을 이용하여 4개의 디바이스로 나누었다.

μ GI tract 디바이스

μ GI tract 디바이스에서의 위쪽 부분은 소화관 통과시간인 88분의 유지시간을 갖도록 하였으며, 아래쪽 부분은 유지시간 69초를 갖도록 하였다. 이 때 위쪽과 아래쪽 chamber의 높이를 같게 함으로서 양쪽 chamber의 압력차를 유사하게 하였다. 큰 압력차는 양쪽 chamber에서 소화관쪽과 혈관쪽에서 독립적으로 배지의 흐름이 일어나지 않게 하면서 압력차가 큰 chamber로만 흐르도록 하는 원인이 되기 때문이다. μ GI tract 디바이스는 polymethylmethacrylate(PMMA) 폴리머를 가지고 computer numerically controlled(CNC) machine (Bridgeport Series II:Bridgeport, CT, USA; equipped with a dynapath controller:Indianapolis, IN, USA)에 의해 제작되었다. CNC machine은 소화관에서의 유지시간을 위해 디자인된 디바이스에 정확한 수치를 부여하고 부드러운 표면을 갖도록 만들 수 있다는 장점을 가지고 있다. 아래쪽 chamber에 폴리카보네이트 멤브레인(3 μ m pore, 직경 12 mm)과 테프론 가스킷을 위한 계단형 원형 chamber를 갖도록 하였다.

마지막으로 배지의 입구와 출구를 위한 구멍을 만들었으며, 3개의 나사못을 이용하여 chamber가 서로 밀착되도록 하였다.

μCCA-μGI tract 디바이스

Plexiglas housing(3.8×5.4 cm²)은 실리콘 μCCA 디바이스의 표면을 덮기 위해 제작되었다. 윗부분은 plexiglas sheet (thickness: 3.2 mm)를 가지고 입구와 출구를 위한 구멍을 만들었으며, 아랫부분은 6.4 mm두께의 plexiglas를 가지고 2 mm두께의 실리콘 칩이 들어가도록 2.56×2.56 cm 정사각형 공간을 만들었다. 정사각형 공간에 제작된 웨이퍼를 놓고 기포가 생기지 않도록 주의하면서 위부분의 plexiglas를 덮고 나사못을 사용하여 양쪽의 덮개를 서로 밀착시켰다. μCCA와 μGI tract은 0.25 mm Pharmed tubing(205S: Watson-Marlow: Wilmington, MA, USA)으로 서로 연결이 되도록 하였으며, 이 때 튜브끝은 gel-loading tip을 이용하여 입구와 출구로 연결이 용이하도록 하였다.¹²⁾

결과 및 고찰

Caco 2세포의 CYP 1A1/2 활성

Figure 1은 Caco 2세포에서 CYP 효소활성을 측정하는 것으로 세포수에 비례하여 CYP 활성이 증가하는 양상을 보였다. 소화관과 간에는 아세트아미노펜을 대사시킬 수 있는 효소가 존재한다. CYP 1A1/2, 2E1 과 3A4가 아세트아미노펜의 독성물질인 N-acetyl-p-benzoquinoneimine을 생성하는데 주로 작용하는 효소로 보고되고 있는데 이 중 Caco 2세포에서 CYP 1A1/2 활성을 평가하고자 하였다.¹⁴⁻¹⁵⁾ 3-MC를

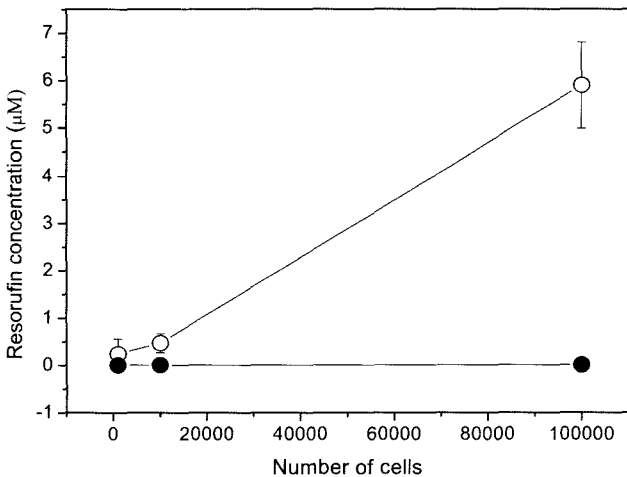


Figure 1—Resorufin concentration produced by the Caco 2 cells for 24 hrs in the presence (○) and absence (●) of 3-MC. 3-MC was added to media of the Caco 2 cells to activate CYP enzyme.

함유하는 배양배지를 사용하여 정상적인 장관내 세포의 CYP 1A1/2활성과 유사하도록 하였다.¹⁵⁾ 3-MC는 정상적인 소화관 상피세포에 존재하는 정도의 효소활성을 나타내기 위한 대표적인 유도물질로 non-induced Caco 2세포의 CYP 1A1/2의 활성을 증가시킨다.¹⁶⁾ CYP 1A1/2의 활성은 Caco 2세포와 10 μM 에톡시레조르핀의 배양에 의해 생성된 레조르핀의 농도로 측정하였다. 생성된 레조르핀의 농도는 530 nm excitation, 590 nm emission 필터에서 형광을 측정하였다. 이 때 레조르핀 0.01-100 μM의 농도 범위에서 양호한 직선성 (r=0.9926)이 나타났다. 3-MC를 함유하지 않는 Caco 2세포의 CYP 효소는 거의 발현되지 않았으나, 3-MC에 의한 CYP 1A1/2의 유도이후 Caco 2세포의 농도가 1×10⁵개일 때 CYP 효소의 활성은 약 5배 정도 증가하였으며, 이는 보고된 생리적인 CYP 1A1/2의 농도와 유사한 것을 알 수 있었다.¹⁶⁾

간세포와 폐세포의 단층배양과 동시배양 시의 세포의 증식능과 CYP 1A1/2 활성측정

Figure 2와 같이 간세포와 폐세포를 단독으로 배양하였을

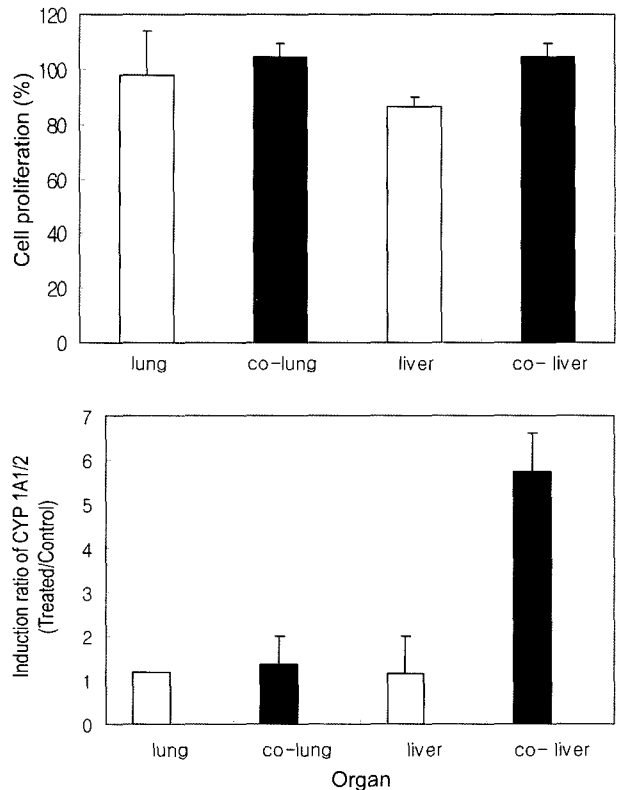


Figure 2—Changes in cell proliferation (top) and CYP 1A1 activity (bottom) of Hep G2/C3A and L2 cells induced by 2 μM of 3-MC for 24 hr. (□) single, (■) co-culture system, □ : HEpG2/C3A and L2 cells were incubated by itself with 3-MC and without 3-MC, ■ : HepG2/C3A was incubated with L2 cell with 3-MC and without 3-MC.

때에 비해 동시에 배양하였을 때 세포의 증식은 크게 증가하지 않았다. CYP 효소의 활성은 폐세포에서는 약간 증가하는 것으로 보이나 유의적인 차이를 나타내지는 않았다. 반면, 간세포의 경우 동시배양에 의해 CYP 1A1/2의 유도율이 약 6배 증가하는 것을 알 수 있었다. 동시배양에서 증가된 CYP 1A1/2 활성은 조직간(lung-liver)의 상관관계에 의한 것으로 사료된다. 이처럼 동시배양에서 증가된 CYP 활성은 인체내에서 독성물질의 향방을 결정하는데 중요한 인자 중의 하나가 될 수 있다. 왜냐하면 조직과 조직간의 상호작용은 외부자극물질에 대해 다양한 조직들이 서로 반응하는 복합적인 인체 시스템을 반영하기 때문이다.

CYP 1A1/2 유도 후 Caco 2세포에서의 아세트아미노펜에 의한 독성

Caco 2세포를 3-MC로 처리하여 CYP 1A1/2의 활성을 증가시켰다. 아세트아미노펜의 독성이 주로 간에서의 CYP 2E1에 의한 대사에 의해 나타나는 것으로 알려져 있으나, 소화관 흡수과정에서 생성되는 대사체에 의한 독성을 알아보고자 Caco 2세포에서 CYP 1A1/2에 의한 아세트아미노펜의 독성 여부를 측정하였다. 아세트아미노펜을 Caco 2세포에 가한 뒤 24시간 후에 세포독성을 측정하였다. 3-MC처리군과 미처리군 모두 20 mM 아세트아미노펜으로 24시간 처리한 후에도 IC_{50} 에는 도달하지 않았으며, 두 군간에 유의적인 차이를 보이지 않았다(Figure 3).

향후 μ CCA와 μ GI tract를 연결함으로써 간과 소화관의 상호작용이 폐에 미치는 영향, 소화관과 폐의 상호작용이 간에 미치는 영향을 알아볼 수 있을 것으로 기대된다.

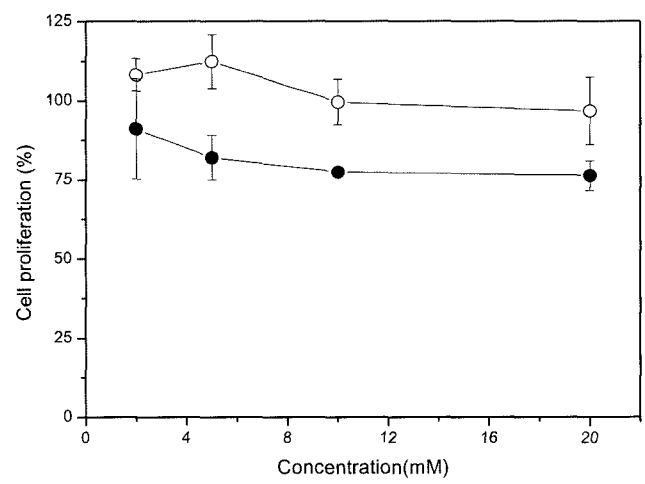


Figure 3—Proliferation activity of Caco 2 cells with (●) and without (○) after acetaminophen treatment for 24 hrs.

μ GI tract 모델의 디자인

위쪽 chamber와 아래쪽 chamber 사이에 Caco 2세포배양을 위하여 폴리카보네이트 멤브레인이 있으며, 테프론 가스킷은 멤브레인을 지지하는 역할을 한다. 위쪽 chamber의 입구를 통하여 들어가는 배지는 0.292 μ L/min으로 Caco 2세포로 들어가서 출구로 빠져 나오게 된다. 아래쪽 chamber로 들어가는 배지는 동일한 속도로 흐르게 되며 출구로 빠져 나온 배지는 μ CCA의 간세포구획에 위치한 입구로 들어가도록 디자인되었다(Figure 4).

μ CCA 모델의 디자인

간과 폐로 이루어진 μ CCA를 만들었으며, 모형도를 Figure

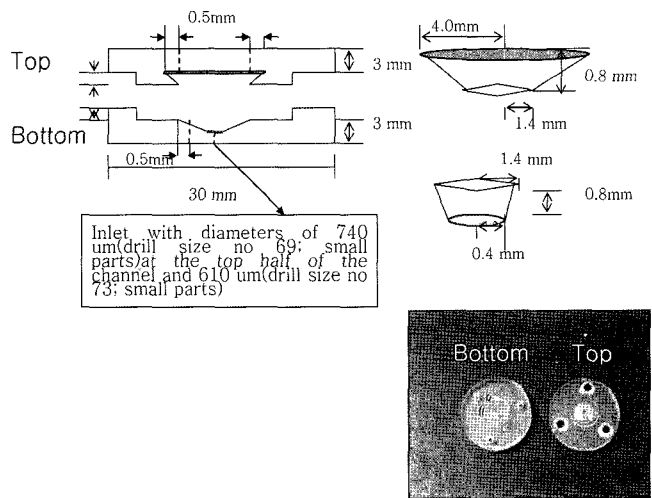


Figure 4—Schematic diagram of μ GI tract. The μ GI tract-device is made by the CNC machine using polymethylmethacrylate polymer. Top part (R of picture) and basal part (L of picture) are put together.

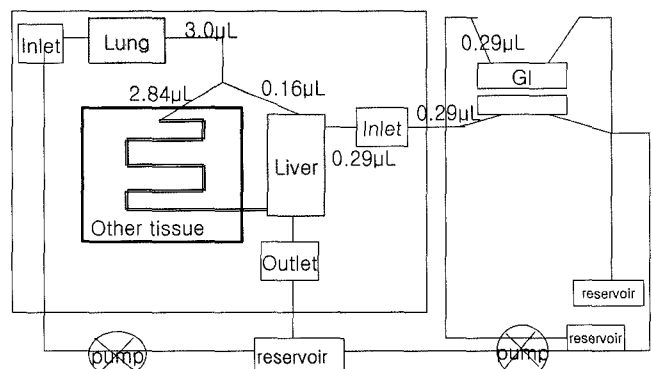


Figure 5—Schematic diagram of μ CCA and μ GI tract. The microfabricated device comprises two depths 40 μ m (depicted in grey) for the lung and liver chamber and 100 μ m (depicted in black line) for the other tissues. The dimension of the chamber are as follows (w×L): Lung (2×2 mm), Liver (3.5×4.6 mm), Other tissue (0.4×50.6 mm).

5에 나타내었다. 혈액대체물인 배지는 폐쪽의 입구를 통해 폐로 들어가서 간과 다른 조직으로 각각 5.4%[(13.8-9.8) mL/min]/[74 mL/min], 94.6%[100%-5.4%]비율로 흘러 들어가며, 위장관에서 간으로 들어오는 비율은 13.2%[9.8 mL/min]/[74 mL/min]다. 위장관을 통과 후 간으로 들어온 배지와 폐를 통해서 들어온 배지는 기타조직의 액이 합쳐져서 간 세포 chamber의 아래 쪽 출구로 빠져나오게 된다. 출구에서 빠져 나온 배지는 reservoir에서 가스교환을 한 후에 입구로 다시 순환하게 된다. 아래쪽 chamber는 폐와 간으로 들어가는 배지의 reservoir에서 위장관으로 들어온 배지와 혼합이 되며, 위쪽 chamber는 Caco 2세포의 영양공급과 가스공급을 위해 별도로 reservoir가 있다. 위쪽 chamber는 apical chamber로 소화관의 역할을 담당하며, 아래쪽 chamber는 basal chamber로 혈관의 역할을 하게 된다.

μ GI와 μ CCA는 Figure 6과 같이 연결하였다. μ CCA- μ GI의 연결은 향후 장관에서의 약물의 흡수과정을 거쳐 간에서 대사되는 약물의 독성을 평가할 때 단층배양에 비해 신약후보물질의 독성을 평가하는데 보다 더욱 적절한 정보를 얻을 수 있을 것이다.

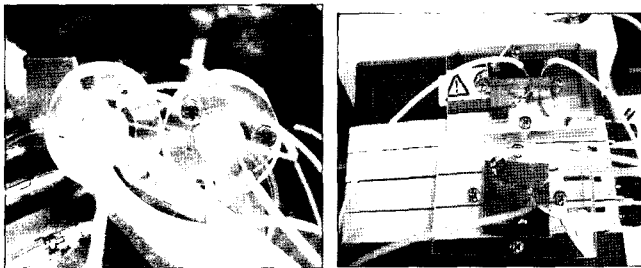
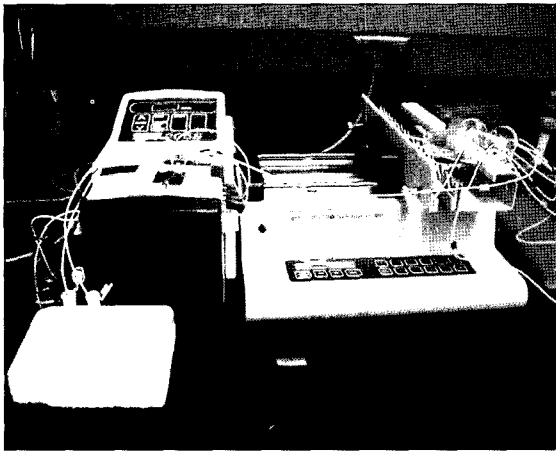


Figure 6—The fabricated μ CCA- μ GI system for the evaluation of the toxicity of acetaminophen. The recirculation loop is completed by a peristaltic pump and syringe pump in conjunction with 0.25 mm inside diameter Pharmed tubings.

감사의 말씀

이 논문은 한국학술진흥재단의 해외 Post-doc. 연수지원 (KRF, 2004-E00037)에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 1) L.M. Sweeny, M.L. Shuler, J.G. Babish and A. Ghanem, A cell culture analogue of rodent physiology: application to naphthalene toxicology, *Toxicol in Vitro.*, **59**, 307-316 (1995).
- 2) K. Viravaidya and M.L. Shuler, Incorporation of 3T3-L1 cells to mimic bioaccumulation in a microscale cell culture analogue device for toxicity studies, *Biotechnol. Prog.*, **20**, 590-597 (2004).
- 3) D.G. Davidson and W.N. Eastham, Acute liver necrosis following overdose of paracetamol, *Br. Med. J.*, **5512**, 497-499 (1966).
- 4) J.R. Mitchell, Acetaminophen toxicity, *N. Engl. J. Med.*, **31**, 1601-1602 (1988).
- 5) T. Ishida, M. Abe, K. Oguri and H. Yamada, Enhancement of acetaminophen cytotoxicity in selenium-binding protein-overexpressed COS-1 Cells, *Drug Metab. Pharmacokin.*, **19**, 290-296 (2004).
- 6) J.D. Gibson, N.R. Pumford, V.M. Samokyszyn and J.A. Hinson, Mechanism of acetaminophen-induced hepatotoxicity: covalent binding versus oxidative stress, *Chem. Res. Toxicol.*, **9**, 580-585 (1996).
- 7) J.A. Brent and B.H. Rumack, Role of free radicals in toxic hepatic injury. II Are free radicals the cause of toxin-induced liver injury? *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, **31**, 173-196 (1993).
- 8) J. Liu, Y. Liu, D. Hartley, C.D. Klaassen, S.E. Shehin-Johnson, A. Lucas and S.D. Cohen, Metallothionein-I/II knockout mice are sensitive to acetaminophen-induced hepatotoxicity, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **289**, 580-586 (1999).
- 9) S.H. Choi, M. Nishikawa, A. Sakoda and Y. Sakai, Feasibility of a simple double-layered coculture system incorporating metabolic processes of the intestine and liver tissue: application to the analysis of benzo[a]pyrene toxicity, *Toxicol. in Vitro.*, **18**, 393-402 (2004).
- 10) B. Davies and T. Morris, Physiological parameters in laboratory animals and humans, *Pharm. Res.*, **7**, 1093-1095 (1993).
- 11) R.D. Kanter, M. Monshouwer, A.L. Draaisa, M.H. De Jager, I.A.M. De Graaf, J.H. Proost, D.K.F. Meijer and G.M.M. Groothuis, Prediction of whole-body metabolic clearance of drugs through the combined use of slices from rat liver, lung, kidney, small intestine and colon, *Xenobio.*, **24**, 229-241 (2004).

- 12) A. Sin, K.C. Chin, M.F. Jamil, Y. Kostov, G. Rao and M.L. Shuler, The design and fabrication of three chamber microscale cell culture analogue devices with integrated dissolved oxygen sensors, *Biotechnol. Prog.*, **20**, 338-345 (2004).
- 13) P.T. Manyike, E.D. Kharasch, T.F. Kalthorn and J.T. Saltery, Contribution of CYP 2E1 and CYP 3A to acetaminophen reactive metabolite formation, *Clin. Pharm & Therapeu.*, **67**, 275-282 (2000).
- 14) S.D. Nelson, Mechanism of the formation and disposition of reactive metabolites that can cause acute liver injury, *Drug Met. Res.*, **27**, 147-177 (1995).
- 15) V. Carriere, J. Chambaz and M. Rousset, Intestinal response to xenobiotics, *Toxicol. in Vitro.*, **15**, 373-378 (2001).
- 16) D.W. Rosenberg and T. Leff, Regulation of cytochrome P450 in cultured human colonic cells, *Arch. Biochem. Biophys.*, **300**, 186-192 (1993)
- 17) J.M. Gearhart, G.W. Jepson, H.J. Clewell, M.E. Anderson and R.B. Conolly, Physiologically based pharmacokinetic and pharmacodynamic model for the inhibition of acetylcholinesterase by disodiumpropylfluorophosphate, *Toxicol. Applied Pharm.*, **106**, 295-310 (1990).
- 18) S. Rendic and F.J. Dicarolo, Human cytochrome P450 enzymes: A status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors, *Drug Metab. Rev.*, **29**, 413-80 (1997).
- 19) T. Prueksaritanout, L.M. Gorham, J.H. Hochman, L.O. Tran and K.P. Vyas, Comparative studies of drug-metabolizing enzymes in dog, monkey, and human small intestines and in Caco-2 cells, *Drug Metab. Dispos.*, **24**, 634-642 (1996).