

## 점막 추출액중 치로트로핀 유리호르몬의 효소적 분해 및 안정화

전인구\* · 신동원

동덕여자대학교 약학대학

(1997년 6월 5일 접수)

### Enzymatic Degradation and Stabilization of Thyrotropin Releasing Hormone in Various Rabbit Mucosa Extracts

In Koo Chun\* and Dong Won Shin

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

(Received June 5, 1997)

To evaluate the feasibility of mucosal delivery of thyrotropin releasing hormone (TRH) through various mucosae, enzymatic degradation and stabilization of TRH in the nasal, rectal and duodenal extracts of rabbits were studied. TRH in the extracts was assayed by HPLC and its degradation was found to follow apparent first-order kinetics. The residual concentrations of TRH in the mucosal extracts of nasal, rectal and duodenal segments after 24 hr of incubation were found to be 65.1( $\pm$ 1.1), 19.7( $\pm$ 2.7) and 0%, and in the serosal extracts, 65.6( $\pm$ 5.5), 75.2( $\pm$ 1.1) and 68.7( $\pm$ 1.4)%, respectively. This result suggests that there is a significant difference in the activity of TRH-degrading enzymes among the sites of administration. The inhibition of TRH degradation in the mucosa extracts was kinetically investigated using various additives such as thimerosal, benzalkonium chloride, disodium edetate, *o*-phenanthroline, dithiothreitol and dithioerythritol, and IC<sub>50</sub> values of inhibitors were calculated. The results obtained showed that thimerosal (0.5 mM) and benzalkonium chloride (0.141 mM) protected TRH from the enzymatic degradation in all the mucosa extracts more than 95% after 24 hr of incubation.

**Keywords**—Thyrotropin releasing hormone, Mucosa extracts, Enzymatic degradation, Enzyme inhibitor, Stabilization

치로트로핀 유리호르몬(L-pyroglutamyl-L-his-tidyl-L-proline amide, TRH)은 1969년에 확인된 분자량 362.42, pK<sub>a</sub> 6.2, pH 7.4에서의 유/수 분배계수 0.0376인 약염기성의 트리펩타이드이다.<sup>1)</sup> TRH는 치로트로핀의 합성과 뇌하수체 전엽으로부터의 분비를 조절하는 hypothalamic peptide로 여러 내분비계 및 중추 관련 생리활성이 있고 우울증, 속크 및 정신분열증을 포함하는 신경 및 신경심리학적 장애의 치료약물로서의 가능성이 제시되어 왔다.<sup>2-5)</sup> 그러나 이러한 효과는 정맥주사시 생물학적 반감기가 약 6~9분으로 매우 짧으며<sup>6-9)</sup> 조직내의 효소에 의해 신속히 분해가 일어나며 뇌로의 이행이 적다는 문제점이 있다.<sup>2,5,10)</sup>

TRH가 혈액과 체조직에서 급격히 불활성화되는 것

은 여러 종류의 효소에 의한 분해에 기인하는 것으로 알려져 있다. 이들 TRH의 주요 초기 분해 경로는 proline amide 잔기가 deamidation에 의해 TRH-OH를 생성하거나, N-말단의 pyroglutamyl 잔기가 제거되어 His-Pro-NH<sub>2</sub>를 생성하는 것이다.<sup>8,11,12)</sup> 전자는 prolyl endopeptidase에 의해서 분해되며<sup>12,13)</sup>, 후자는 선택성이 낮은 pyroglutamyl aminopeptidase, TRH-특이적인 pyroglutamyl aminopeptidase와 TRH 분해 혈청 효소에 의해 분해되는 것으로 밝혀져 있다.<sup>14-17)</sup> Brewster 등<sup>18)</sup>은 동물의 종과 체조직을 달리하여 TRH의 분해속도를 검토한 결과 분해속도는 동물의 종류와 종에 따라 크게 다르며 같은 동물에서도 조직에 따라 차이가 크다는 것을 보고하였다. 사람의 경우 조직에 따른 분해속도는 대체적으로 뇌>혈장>간>장의 순이었다.

\*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

이와 같이 TRH의 효소분해에 대한 저항성을 높이고자 합성 유사체와 prodrug류가 개발되기에 이르렀다. 피로리딘 ring의 두 번째 위치에 sulfur를 함유하는 MK-771<sup>19)</sup>은 CNS 기능상 TRH보다 200배의 효능을 지니고 있으며 혈장에서의 반감기가 46분으로 TRH (9분) 보다 안정하지만 사람에서의 경구 생체이용률이 2%로 매우 낮다.<sup>10)</sup> TRH의 디메틸인 pGlu-His-(3,3'-dimethyl)-Pro-NH<sub>2</sub><sup>20)</sup>, pyroglutamic acid 잔기를  $\gamma$ -butyrolactone- $\gamma$ -carboxyl로 변형시킨 DN-1417<sup>21-23)</sup>, N- $\alpha$ -[(S-4-oxo-2-azetidyl) carbonyl]-L-histidyl-L-prolinamide dihydrate의 구조를 지닌 YM-14673<sup>24)</sup> 등이 합성되어 TRH보다 강한 작용이 있음이 보고되어 왔다.

또한 TRH의 지용성을 증대시키고 분해효소에 대한 저항성을 높이고자 이의 prodrug류가 합성되었다. TRH의 히스티딘 잔기의 이미다졸기를 chloroformate류로 N-acylation을 행한 유도체들은 사람 혈장 중 효소에 대해 저항성이 있고 에스테라제에 의해 정량적으로 TRH를 생성하며, 분배계수가 TRH보다 현저히 증대하였다.<sup>25)</sup> TRH와 이의 prodrug인 N-isobutyloxycarbonyl-TRH는 사람 피부를 전혀 투과하지 않았지만 N-octyloxycarbonyl 유도체는 상당한 투과 플럭스를 보여 주어 경피수송 가능성이 제시되었다.<sup>26)</sup> 더욱 TRH의 낮은 경구 생체이용률의 증대를 위해 TRH와 이들 prodrug들에 대해 토끼 소장 호모지네이트에서의 분해와 소장 투과성을 검토한 결과 TRH는 반감기가 10분으로 소장 효소, 특히 prolyl endopeptidase 활성에 의해 급속히 분해되었으며 이의 특이적인 억제제인 바시트라신 함유시는 63분으로 지연되었으나 N-alkoxycarbonyl 기들이 도입된 prodrug류는 소장 호모지네이트 중에서 TRH보다 빠르게 분해되었으며 TRH는 물론 prodrug류도 donor solution에서의 신속한 분해로 공장, 회장 및 결장을 통한 투과는 일어나지 않았다.<sup>27)</sup> 또한 N-phthalidyl TRH<sup>28)</sup>는 TRH보다 지용성이 증대되고 사람 혈장 중에서는 반감기가 5.4 시간으로 TRH-특이적인 혈청 효소에 대해서는 저항성이 있었으나 토끼의 소장 호모지네이트에서의 반감기는 86분으로 비특이적인 pyroglutamyl aminopeptidase와 소장의 prolyl endopeptidase에 대한 보호효과는 나타나지 않았다. 또한 octyloxycarbonyl TRH는 사람 소장 상피(Caco-2) 세포를 투과하지 못하고 신속한 분해로 생성된 TRH가 세포간극로를 통하여 수송되는 것으로 제시되

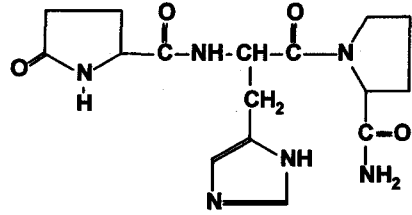


Chart 1—Structure of TRH

었으며 지용성의 증대는 투과에 그다지 기여하지 못하는 것으로 보고되었다.<sup>29)</sup> Toth 등<sup>30)</sup>은 TRH와 lipidic amino acid의 결합체가 Caco-2 cell의 호모지네이트에서 TRH를 유리하고 유리된 TRH는 분해되어 나온 lipidic amino acid의 효소억제작용에 의해 서서히 분해되는 것으로 보고하였다.<sup>30)</sup>

다른 한편 TRH의 분해효소의 특성을 검토하기 위해 효소억제제류가 검토되어 왔다. 혈청 중 분해효소에 대해 diisopropylfluorophosphate, 염화제이수은, 염화제이동, Cbz-Pro-Prolinal, 5-oxoprolinal, 에데트산나트륨, dithiothreitol 및 *o*-페난트롤린 등<sup>10,11,15,17,31)</sup>의 효과가 검토되었고, 소장 호모지네이트에서 바시트라신<sup>27)</sup>의 분해억제효과가 검토되었으나 점막 흡수부위인 비강이나 직장 점막에서의 효소적 분해 및 분해억제효과의 검토는 물론 효소억제제를 이용한 수송연구는 별로 보고된 바가 없다.

이상에서 기술한 바와 같이 TRH와 이의 유도체들이 소장에서 심한 효소적 분해를 받고 지용성의 증대에도 불구하고 생체 투과성이 매우 낮다. 따라서 비강, 직장 및 십이지장 등의 투여 점막부위에서 TRH의 분해 특성을 규명하고 안정화를 도모하는 한편 투과촉진제의 검토로 경점막 수송을 증대시키고자 하였다. 이 연구에서는 토끼의 비강, 직장 및 십이지장의 점막측 및 장막측 추출액 중 TRH (Chart 1)의 분해속도와 정도를 비교 검토하고 점막 부위에서 TRH의 분해억제제를 도모하고자 여러 효소억제제류의 영향을 검토하였다.

## 실험방법

### 실험동물 및 시약

체중 2.5~3.5kg의 건강한 New Zealand White (NZW)계 자성 토끼를 서울대 병원 동물사육실에서 구입하여 사용하였다.

재료 및 시약으로 TRH(초산염), Phe-Leu, 치메로살(TM), 염화벤잘코늄(BC), 에데트산나트륨(EDTA),

*o*-페난트롤린(PNT), dithioerythritol(DTE), phenyl-methylsulfonyl fluoride(PMSF) 및 토끼 알부민은 Sigma Chemical Co.의 것을 사용하였으며 dithiothreitol (DTT)은 Jassen Chemical Co.의 것을, bromphenol blue (BPB)는 Junsei Chemical Co.를 사용하였다. 이밖에 HPLC용 아세토니트릴은 Lab-Scan Ltd.의 것을 사용하였고 기타 시약은 시판 특급품을 썼다. 물은 정제수를 초순수제조장치 (UHQPS, Elgastat)를 통과시켜 18 MΩ 이상인 것을 사용하였다.

**기기 및 장치**

사용한 기기 및 장치로는 고속액체크로마토그래프 장치 (Series 410, Perkin-Elmer, U.S.A.), 흡광도 측정기(Lambda 4A, Perkin-Elmer, U.S.A.), 항온진탕 수욕장치(D-6072, Karl Kolb, Germany) 등을 사용하였고, 점막추출액의 제조에는 Valia-Chien permeation system (Biocrown Glass, USA)을 이용하였다.

**점막의 적출 및 추출액의 제조**

토끼의 귀정맥에 공기를 주입하여 치사시킨 후 십이지장 및 직장 점막조직을 절취한 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 한쪽 끝부터 조심스럽게 밀어올려 박리하였다. 적출 및 절제조작은 토끼를 치사시킨 후 30분 이내에 완료하였다. 신선하게 적출된 비강, 직장 및 십이지장 점막을 half-cell 사이에 점막측이 donor cell을 향하도록 하고 장막측이 receptor cell을 향하도록 각각 mounting하고 donor cell에는 pH 8.0, 7.2 및 7.4 생리 등장 인산염완충액을 각각 3.5 ml씩 넣고 receptor cell에는 pH 7.4 생리 등장 인산염완충액 3.5 ml씩을 넣어 채우고 37°C 항온을 유지하면서 8시간 동안 magnetic stir-head bar를 600 rpm으로 교반하여 추출하고 각 추출액을 15 ml 마개 달린 시험관에 모았다. 다시 위의 조작을 2회 반복하고 점막 및 추출부위별로 합하여 냉장고에 보존하고 최종 추출이 끝난 후 30분 이내에 사용하였다.

**점막추출액중 TRH의 효소적 분해**

TRH 1 mg을 830 μl의 생리식염수에 녹여 시료원액 (2.16×10<sup>-3</sup> M)을 제조하였다. 이 원액 100 μl를 점막추출액 800 μl에 넣고 완충액 100 μl를 넣어 섞고 80 rpm으로 흔들면서 37°C에서 incubation 하였다. 경시적으로 양측 셀로부터 100 μl씩을 취하여 Phe-Leu(6 g/ml)의 pH 2.2 인산염 완충액 400 μl (내부표

준액)에 넣고 vortexing하여 섞어 효소반응을 정지시켰다. 이 액 20 μl를 HPLC에 주입하여 아래의 정량법에 따라 TRH의 잔존량을 산출하였다.

**동일 단백질농도의 점막 추출액중 TRH의 효소적 분해**

TRH 원액(2.16×10<sup>-3</sup>M) 100 μl를 단백질농도를 30 μg/ml로 동일하게 조정한 비강, 직장 및 십이지장 점막 추출액 800 μl에 넣고 추출에 사용한 완충액 100 μl를 각각 넣어 섞고 80 rpm으로 흔들면서 37°C에서 incubation 하였다. 이하 위와 같게 조작하여 TRH의 잔존량을 측정하였다.

**점막추출액중 TRH의 초기농도가 분해속도에 영향**

TRH 원액(2.16×10<sup>-3</sup>M)을 비강, 직장 및 십이지장 점막추출액 800 μl에 넣고 점막의 추출에 사용한 각기의 완충액을 넣어 전체량을 1,000 μl로 하여 TRH의 농도가 30, 50, 100 및 200 μg/ml가 되도록 하였다. 이들을 80 rpm으로 흔들면서 37°C에서 incubation 하였다. 이하 위와 같게 조작하여 TRH의 잔존량을 측정하였다.

**점막추출액중 TRH의 효소분해억제실험**

**효소억제제 용액의 조성**—여러 억제제류를 생리식염수에 녹여 각기의 원액을 조제하고 점막 추출액중 이들 억제제의 농도가 EDTA, PNT, DTT 및 DTE는 1, 10, 100, 1,000, 5,000 및 10,000 μM, TM은 0.1, 1, 10, 100, 500, 1,000 및 5,000 μM, BC는 0.01, 0.1, 1, 14, 71, 141, 706, 1,412 μM이 되도록 하고 PMSF는 0.01, 0.1, 1, 10, 50, 100, 500 및 1,000 μM이 되도록 하였다.

**효소억제제류가 TRH의 분해에 미치는 영향**—시험 직전에 추출해 놓은 비강, 직장 및 십이지장 추출액 (37°C) 각 800 μl에 농도를 달리 하여 조제한 TM, BC, EDTA, PNT, DTT, DTE 및 PMSF 용액 100 μl를 각각 넣고 TRH 원액(2.16×10<sup>-3</sup>M) 100 μl를 넣은 다음 이 액을 37°C에서 80 rpm으로 흔들면서 incubation하였다. 24시간에 각각 100 μl를 취하여 내부표준액 400 μl에 넣고 vortexing하여 효소반응을 정지시켰다. 이 액 20 μl를 HPLC에 주입하여 TRH의 잔존량을 구하였다.

**점막추출액중 단백질함량 측정**

Schosinsky 등<sup>32)</sup>의 방법을 준용하여 추출액중 단백질량을 측정하였다. 비강, 직장 및 십이지장의 생리등장 인산염완충액 (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/ml의 농도로 희석시키고 이

액 500  $\mu$ 에 BPB 용액 2.0 ml를 넣어 섞고 파장 610 nm에서 공시험액을 대조로 표준액의 흡광도를 측정하여 각각 검량선을 작성하였다. 비강, 직장 및 십이지장의 점막층과 장막층 추출액 각 500  $\mu$ 에 BPB 용액 2.0 ml를 넣어 섞고 흡광도를 측정하고 검량선으로부터 추출액 중의 단백량을 정량하였다.

**HPLC법에 의한 TRH의 정량**

HPLC series 410 및 검출기 LC 90 UV spectrophotometric detector, 데이터 처리장치 Varian 4290 integrator을 사용하였다. 칼럼으로는 Resolve CN Guard Pak precolumn(Waters사)이 내장된 Nova-Pak CN HP Radial Pak column(100 $\times$ 8 mm)과 이동상으로 0.05M 인산염완충액(pH 8.0)을 사용하여 유속 1.0 ml/min 및 파장 214 nm의 조건에서 20  $\mu$ 를 주입하였다. TRH의 농도를 0~100  $\mu$ g/ml로 순차로 달리 하여 만든 표준액 100  $\mu$ 와 내부표준액 400  $\mu$ 를 섞어 주입하여 얻은 HPLC 크로마토그램으로부터 피크높이비를 구하여 검량선을 작성하고 이로부터 시료중의 TRH를 정량하였다.

**결과 및 고찰**

**점막 추출액중 단백질함량**

토끼의 비강, 직장 및 십이지장 점막을 적출하여 Valia-Chien permeation cell에 mounting하고 점막층과 장막층을 등장 인산염 완충액으로 8시간씩 3회 추출하여 얻은 추출액중 단백질의 함량을 BPB 색소법으로 정량하여 알부민의 양으로 산출하였다. 토끼 알부민의 농도를 0~500  $\mu$ g/ml로 변화시켜 얻은 검량선은 양호한 직선성( $y=8.68 \times 10^{-4}x + 1.51 \times 10^{-3}$  ( $r=0.9999$ ))을 보여 주었다. 이 검량선을 이용하여 점막층 추출액중 단백질함량은 Table I에서 보는 바와 같이 비강<직장<

**Table I** — Protein Concentrations in Various Rabbit Mucosa Extracts

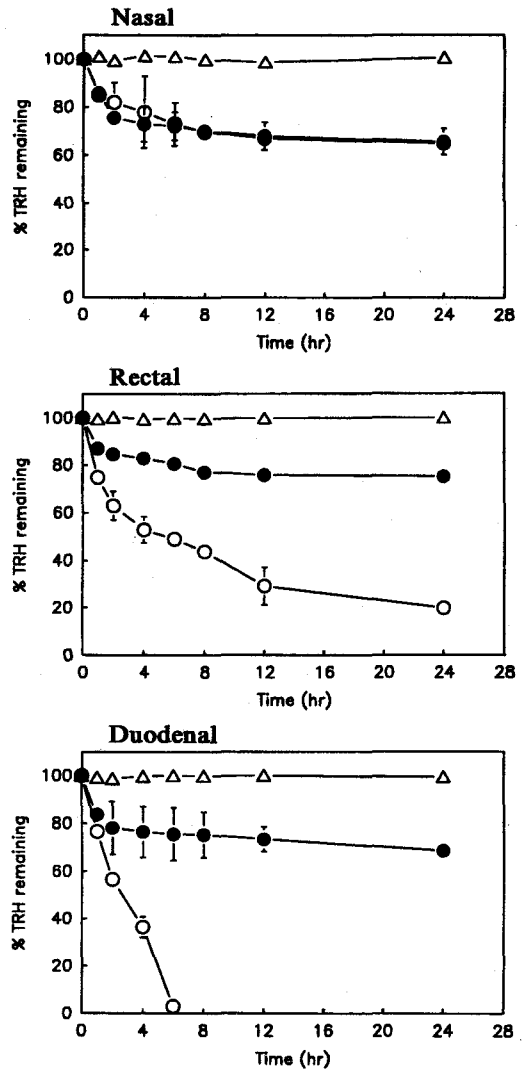
Mucosa	Extract	Protein concn. ( $\mu$ g/ml) <sup>a</sup>
Nasal	Mucosal	76.19 ( $\pm$ 0.01)
	Serosal	79.76 ( $\pm$ 0.02)
Rectal	Mucosal	133.33 ( $\pm$ 0.03)
	Serosal	92.06 ( $\pm$ 0.03)
Duodenal	Mucosal	203.57 ( $\pm$ 0.06)
	Serosal	74.21 ( $\pm$ 0.01)

<sup>a</sup> Expressed as the concentration of rabbit albumin. Data were expressed as the mean $\pm$ S.E. of the data from four rabbits.

십이지장의 순으로 높았으며, 장막층 추출액에서는 직장에서 다소 높았으나 비강과 십이지장 간에는 별다른 차이가 없었다.

**점막 추출액중 TRH의 분해**

비강, 직장 및 십이지장의 점막층 및 장막층 추출액 중에서 TRH의 경시적 분해정도를 잔존율로 표시하여 Figure 1에 나타내었다. 또 비강, 직장 및 십이지장의 추출에 사용한 완충액(각각 pH 8.0, 7.2 및 7.4)에서



**Figure 1**—Time-course degradation of TRH in the nasal rectal and duodenal extracts at 37°C. Each point represents the mean $\pm$ S.D. of three determinations. Key:  $\Delta$ , isotonic phosphate buffers (pH 8.0 for nasal, pH 7.2 for rectal, pH 7.4 for duodenal);  $\circ$ , Mucosal extracts;  $\bullet$ , Serosal extracts

의 TRH의 분해도 함께 나타내었다. 각기의 완충액에서는 pH에 관계없이 24시간까지 TRH의 분해가 별로 인정되지 않았으나 점막 추출액 중에서는 TRH가 비강<직장<십이지장의 순으로 심하게 분해되었다. 이러한 분해는 소장과 구강점막 부위에서 pyroglutamyl aminopeptidase 활성이 보여지지 않고 주로 prolyl endopeptidase에 의해 TRH가 TRH-OH로 분해되었다는 보고<sup>27,33)</sup>로 볼 때 비강이나 직장 부위에서도 주로 prolyl endopeptidase에 의해 분해되는 것으로 추정된다. 그리고 점막측 및 장막측 추출액간에는 비강점막의 경우는 비슷한 분해속도를 나타내었으나 직장 및 십이지장 점막의 경우는 점막측 추출액에서 급격히 분해되었으나 장막측 추출액에서는 완만한 분해거동을 보여 주었다. 이는 직장 및 십이지장의 점막측과 장막측간에 TRH 분해효소의 활성이 현저히 다를 것을 의미한다. 또한 경시적 잔존율을 가지고 1차식에 따라 구한 분해속도정수와 반감기를 Table II에 나타내었다. 비강, 직장 및 십이지장 점막 추출액중 TRH의 분해반감기는 각각 67.59(±9.23), 12.52(±0.99) 및 1.11(±0.02) hr이었다. 이로 볼 때 소장을 경유하는 경구투여 경로보다 비강이나 직장과 같은 비경구 점막투여경로가 TRH의 수송에 보다 유리함을 알 수 있다. 토끼의 공장, 회장 및 결장 혼합물의 호모지네이트 상정액과 구강점막을 마운팅한 donor 및 receptor cell 내에서의 분해 반감기가 각각 10 min<sup>27)</sup>, 20.4 및 2.3 hr<sup>33)</sup>이었다는 보고와 비교할 때 본 연구의 십이지장 추출액에서의 반감기가 67 min인 것은 조직부위 및 실험방법에 따른 분해효소의 농도차이로 생각되며 점막 추출액에서의 분해속도에 관한 정보는 투여 점막부위 간에 TRH의 분해정도의 상대적 크기와 안정화의 필요성에 관한 정보를 제공해 준다고 생각된다.

비강, 직장 및 십이지장 점막 추출액을 각각의 완충

액으로 단백농도를 동일 (30 µg/ml)하게 조정하여 TRH의 경시적 분해정도를 검토한 결과를 Figure 2에 나타내었다. 이에서 보는 바와 같이 여러 점막 추출액 중 TRH의 분해속도의 크기는 직장>비강>십이지장의 순이었으며, 비강과 십이지장에서는 점막측 및 장막측 추출액 간에 비슷한 분해속도를 보였으나 직장에서는 점막측 추출액에서 보다 신속히 분해되었다. 직장, 비강 및 십이지장의 점막측 추출액중 TRH의 분해반감

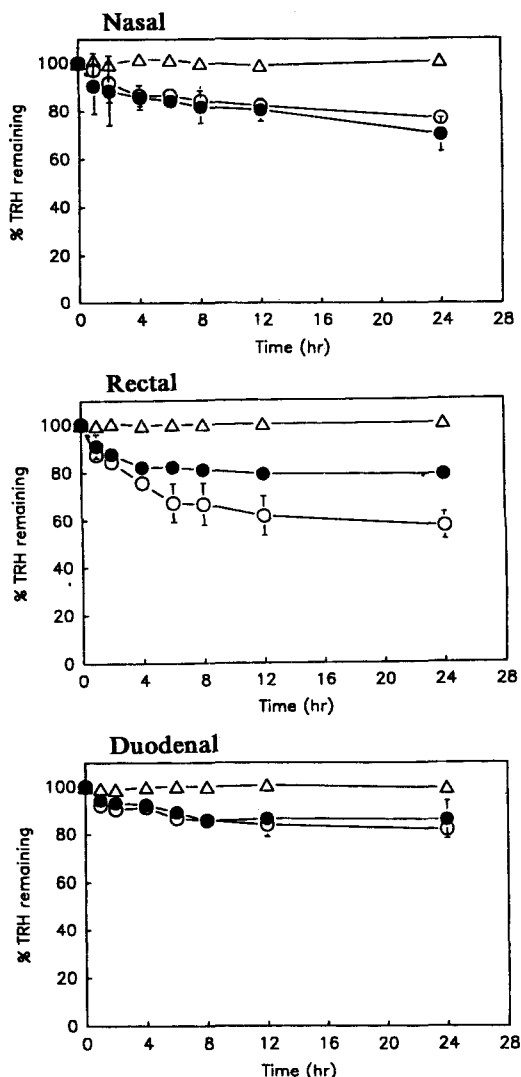


Figure 2—Time-course degradation of TRH in the nasal rectal and duodenal extracts containing same protein concentration (30 µg/ml) at 37°C. Each point represents the mean±S.D. of three determinations. Key: △, isotonic phosphate buffers (pH 8.0 for nasal, pH 7.2 for rectal, pH 7.4 for duodenal); ○, Mucosal extracts; ●, Serosal extracts

Table II—Apparent First-order Rate Constants (k) and Half-lives (t<sub>1/2</sub>) for the Degradation of TRH in the Extracts of Various Absorptive Mucosae

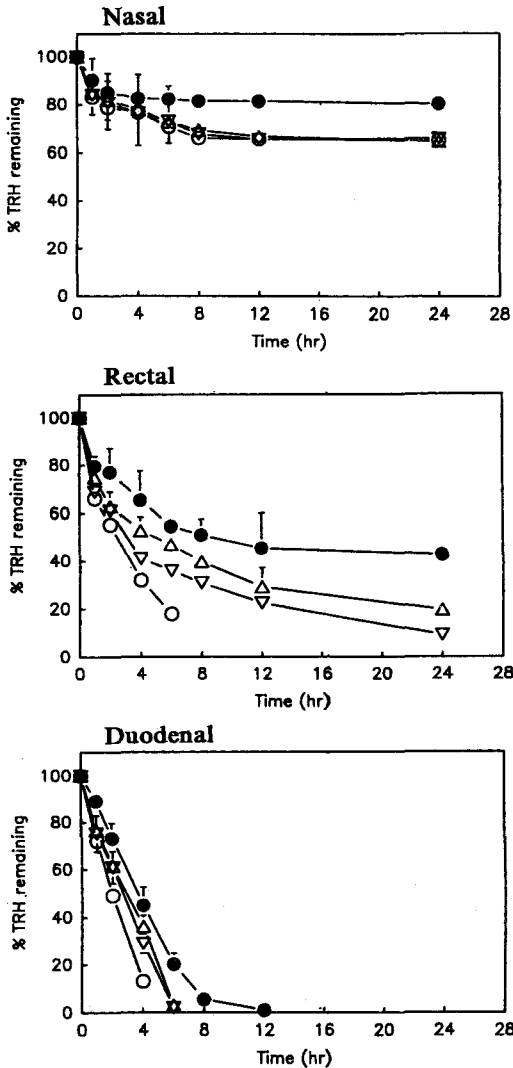
Mucosa	Extract	k (×10 <sup>3</sup> , hr <sup>-1</sup> )	t <sub>1/2</sub> (hr)
Nasal	Mucosal	10.86(±1.48)	67.59(± 9.23)
	Serosal	11.62(±2.27)	67.36(±13.15)
Rectal	Mucosal	56.43(±4.46)	12.52(± 0.99)
	Serosal	5.10(±0.61)	141.85(±16.92)
Duodenal	Mucosal	624.02(±9.07)	1.11(± 0.02)
	Serosal	6.76(±1.72)	127.03(±32.23)

Each value represents the mean±SEM of three determinations.

기는 각각 12.52, 83.80 및 154.33 hr로 산출되었다. 이러한 결과는 추출액중 단백질도가 같더라도 TRH 분해 효소의 활성이 점막의 종류와 부위에 따라 다름을 나타낸다.

**점막 추출액중 초기농도가 TRH의 분해에 미치는 영향**

비강, 직장 및 십이지장의 점막측 추출액중 TRH를 30-200 µg/ml로 변화시켜 TRH의 초기농도가 이의 경시적인 분해속도에 미치는 영향을 Figure 3에 나타



**Figure 3**—Effects of initial peptide concentrations on the degradation of TRH into the nasal, rectal and duodenal mucosal extracts at 37°C. Each point represents the mean±S.D. of three determinations. Key: ○, 30 µg/ml; ▽, 50 µg/ml; △, 100 µg/ml; ●, Serosal extracts

내었으며 Table III에는 각 점막 추출액중 TRH의 초기농도에 따른 1차 분해속도정수를 나타내었다. 초기 TRH의 농도에 대해 분해속도정수의 상용대수 값을 플로트한 결과 Figure 4에서 보는 바와 같이 30-200 µg/ml의 펩타이드 농도 범위에서 첨가농도의 증가에 따라 분해속도정수가 지속적으로 감소되었다. 이와 같이 기질의 농도가 높을수록 분해가 지연된 점은 TRH의 효소적 분해에 포화현상이 있음을 뒷받침한다.

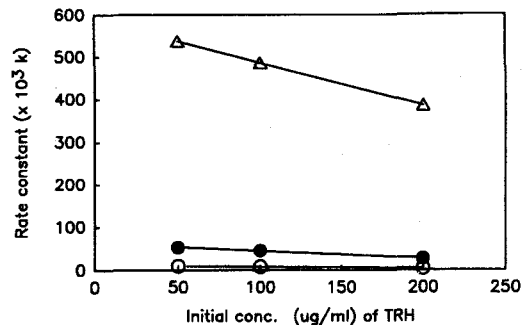
**수종의 효소억제제류 TRH의 효소분해 억제에 미치는 영향**

점막추출액 중에서 TRH가 비교적 빠른 속도로 분해되기 때문에 이의 경점막 수송을 도모하기 위해서는 투여부위인 점막부위 및 투과과정 중 효소적 분해로부

**Table III**—Effect of Initial Peptide Concentration on the Apparent First-order Rate Constants (*k*) and Half-lives (*t*<sub>1/2</sub>) for the Degradation of TRH in Various Absorptive Mucosal Extracts

Mucosa	Initial concn. (µg/ml)	<i>k</i> (×10 <sup>3</sup> , hr <sup>-1</sup> )	<i>t</i> <sub>1/2</sub> (hr)
Nasal	30	12.0(± 3.0)	61.6(± 8.9)
	50	9.8(± 1.2)	72.3(± 5.4)
	100	8.6(± 2.9)	89.7(±18.4)
	200	4.6(± 0.3)	144.6(± 3.5)
Rectal	30	274.1(±10.6)	2.5(± 0.1)
	50	52.9(± 2.7)	13.2(± 0.7)
	100	46.1(± 1.3)	15.1(± 0.4)
Duodenal	200	27.6(± 1.3)	25.5(± 1.3)
	30	926.9(±34.9)	0.75(± 0.5)
	50	536.6(± 2.7)	1.3(± 0.02)
	100	485.9(±13.3)	1.4(± 0.04)
	200	385.8(± 0.7)	1.8(± 0.01)

Each value represents the mean±SEM of three determinations.



**Figure 4**—Dependence of degradation rate constants on the initial peptide concentration in various mucosal extracts. Key: ○, Nasal extract; ●, Rectal extract; △, Duodenal extract

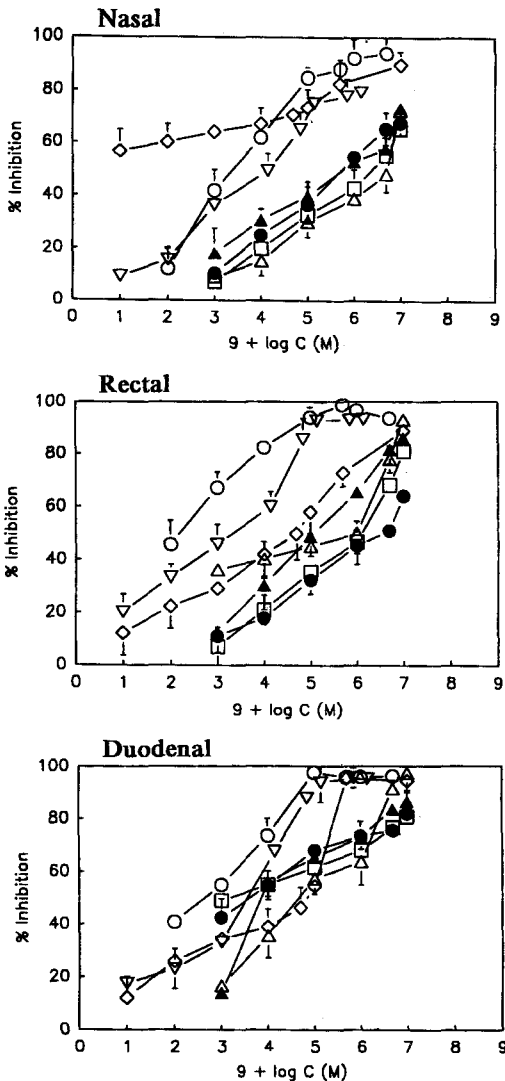
터 안정화시키는 일이 선결되어야 한다. Chun 등<sup>34,35)</sup>은 토끼의 수종 점막 추출액에서 펜타펩타이드인 메치오닌엔케팔린과 로이신엔케팔린 및 이들의 합성 유사체의 분해 억제에 TM, 아마스타틴 및 EDTA 등의 혼합 억제제가 유용함을 보고한 바 있다.

이 연구에서는 TM, BC, PNT, DTT, DTE, EDTA 및 PMSF를 사용하여 비강, 직장 및 십이지장의 점막층 및 장막층 추출액의 혼합액 중에서 TRH 분

해억제를 시도하였다. 그 결과를 Figure 5에 나타내었다. 비강, 직장 및 십이지장 점막 추출액 중에서 TRH의 분해 억제에는 각 점막에 따라 TM, BC 및 PMSF의 효소억제제가 효과적이었다. 억제제를 사용하지 않은 경우 비강의 점막층 추출액에서 24시간 후의 잔존율이 65.1%이었으나 점막층과 장막층 추출액의 혼합액에서 TM(0.5mM) 및 PMSF(1mM)의 첨가는 각각 93.4 및 92.8%의 잔존율을 나타내었다. 직장 추출액의 경우에도 효소억제제를 사용하지 않은 경우 19.7%만이 잔존하였으나 TM(0.5mM), BC(0.141mM), PMSF(1mM) 및 DTT(10mM)의 효소억제제를 첨가한 경우는 각각 99.1, 94.8, 92.1 및 90.3%의 잔존율을 보여 주었다. 십이지장 추출액에서는 24시간후 TRH가 거의 잔존하지 않았으나 TM(0.5mM), BC(0.141mM) 및 EDTA (10mM)를 첨가한 경우는 각각 96.9, 95.4 및 86.5%의 잔존율을 보여 주었다.

혈중 pyroglutamyl aminopeptidase에 대해 PMSF가 0.1mM 농도에서 억제효과를 전혀 나타내지 않은 것으로 보고되었으나<sup>17)</sup> 비강 점막에서는 매우 낮은 농도에서도 강력한 억제효과가 있는 것으로 나타났으며 직장과 십이지장 추출액에서도 다소의 억제효과가 있었다. 또한 EDTA와 PNT는 혈청에서 TRH를 분해하는 pyroglutamate aminopeptidase를 1.0mM 농도에서 완전히 억제하였다고 하였으나<sup>15,17)</sup> 점막 추출액에서는 점막의 종류에 따라 억제효과에 차이가 있었다 (Table IV). 한편 TM과 BC는 이 연구에서 처음 시도된 물질로 모든 점막 추출액에서 기존의 억제제류보다 TRH의 분해를 강력히 억제하여 새로운 효소 억제제로서의 가능성이 제시되었다. TM은 비강, 직장 및 질 점막 추출액에서 aminopeptidase류와 endopeptidase류를 강력히 억제하여 메치오닌엔케팔린<sup>34)</sup>과 로이신엔케팔린<sup>35)</sup>을 안정화시켰고, BC는 [D-알라<sup>2</sup>]-로이신엔케팔린아미드의 endopeptidase류에 의한 분해<sup>36)</sup>를 억제하는 것으로 보고되었다.<sup>35)</sup> 따라서 이들 억제제는 TRH가 소장이나 구강 점막에서 prolyl endopeptidase에 의해 분해됨을 고려할 때<sup>27,33)</sup> 이 효소활성을 억제하는 것으로 생각된다.

이들 점막 추출액중 TRH의 분해에 대한 첨가제들의 IC<sub>50</sub> 값을 구하여 정리한 결과가 Table IV이다. 비강점막의 점막층과 장막층의 추출액의 혼합액에서 PMSF, TM 및 BC의 IC<sub>50</sub>은 각각 0.00025, 2.69 및 3.73 μM이었으며, 직장점막에서의 DTT, DTE 및 PNT의 IC<sub>50</sub> 값은 139, 2,239 및 1,894 μM으로 TM



**Figure 5**—Effects of various additives on the inhibition of TRH degradation in the nasal, rectal and duodenal extracts after 24 hr-incubation at 37°C. Each point represents the mean±S.D. of three determinations.  
Key: ○, TM; ●, EDTA; △, PNT; ▲, DTT; □, DTE; ◇, PMSF; ▽, BC

**Table IV**—*IC<sub>50</sub> Values of Some Inhibitors for the Inhibition of TRH Degradation in Various Absorptive Rabbit Mucosa Extracts*

Inhibitors used	IC <sub>50</sub> values (μM)		
	Nasal	Rectal	Duodenal
TM	2.69(±0.37)	0.17(±0.17)	0.54(±0.38)
EDTA	531.0(±0.33)	9,830.2(±8.84)	3.35(±4.52)
PNT	4,496.3(±1.86)	1,894.4(±2.41)	21.07(±2.24)
DTT	739.3(±0.30)	139.1(±0.13)	3.82(±5.40)
DTE	392,960.2(±0.55)	2,239.4(±1.46)	4.36(±6.13)
BC	3.73(±0.25)	3.69(±3.29)	1.47(±1.97)
PMSF	0.00025(±0.0)	76.99(±9.60)	31.29(±3.99)

Each value represents the mean ± S.D. of three determinations.

의 0.17 μM에 비해 매우 높은 수치를 보였다. 또한 십이지장 추출액에서도 TM, EDTA 및 BC의 IC<sub>50</sub>이 각각 0.54, 3.35 및 1.47 μM이었다. 이상의 결과로 볼 때 모든 점막에서 TM과 BC가 TRH 분해효소활성을 충분히 억제할 수 있는 유용한 안정화제로 생각되며 이들은 경점막 투과연구에 응용될 수 있다고 생각된다.

## 결 론

생리활성 펩타이드인 치료트로핀유리호르몬(TRH)의 경점막 수송 가능성을 검토하고자 토끼의 비강, 직장 및 십이지장 점막 추출액 중에서 효소적 분해 거동을 속도론적으로 측정하는 한편 효소억제제류를 이용하여 TRH의 분해억제를 도모하였다. 그 결과 얻은 주된 결론은 다음과 같다.

1. 등장 인산염 원층액 중에서는 37°C에서 24시간 동안 TRH의 분해가 거의 없었으나 점막측 추출액에서는 비강<직장<십이지장 점막의 순서로 빠르게 분해되었다. 비강점막 추출액에서는 TRH의 분해가 점막측 및 장막측 추출액간에 별다른 차이가 없었으나 직장 및 십이지장의 장막측 추출액에서는 점막측 추출액에 비해 TRH의 분해가 지연되었다.

2. 비강, 직장 및 십이지장 점막 추출액에 수종의 억제제류를 가하여 TRH의 분해억제 정도를 검토한 결과 모든 점막 추출액에서 TM(0.5 mM)과 BC(0.141 mM)가 TRH의 분해억제에 효과적이었으며 새롭고 강력한 억제제로 제시되었다. 이들 억제제는 24시간 incubation 후에도 TRH를 90% 이상 잔존시켰다. 비강, 직장 및 십이지장 점막 추출액에서 TM의 IC<sub>50</sub> 값은 각각 2.69, 0.17 및 0.54 μM이었으며, BC의 IC<sub>50</sub> 값은 각각 3.73, 3.69 및 1.47 μM이었다.

## 문 헌

- 1) R.R. Burnette, and D. Marrero, Comparison between the iontophoretic and passive transport of thyrotropin releasing hormone across excised nude mouse skin, *J. Pharm. Sci.*, **75**, 738-743 (1986).
- 2) G. Metcalf, 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 (1982).
- 3) E.C. Griffiths, New applications in the clinic. *Nature*, **322**, 212-213 (1986).
- 4) A. Horita, M.A. Carino and H. Lai, Pharmacology of thyrotropin releasing hormone. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **26**, 311-332 (1986).
- 5) P.T. Loosen, TRH: behavioral and endocrine effects in man. *Progr. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiat.*, **12**, S87-S117 (1988).
- 6) R.M. Bassiri and R.D. Utiger, Metabolism and excretion of exogenous thyrotropin releasing hormone in humans. *J. Clin. Invest.*, **52**, 1616-1619 (1973).
- 7) J.E. Morley, T.J. Garvin, A.E. Pekary, R.D. Utiger, M.G. Nair, C.M. Baugh and J.M. Hershman, 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 (1979).
- 8) E. Iversen, Intra- and extravascular turnover of thyrotropin releasing hormone in normal man. *J. Endocrinol.*, **118**, 511-516 (1988).
- 9) J. Møss and H. Bundgaard, Kinetics and pattern of degradation of thyrotropin-releasing hormone (TRH) in human plasma. *Pharm. Res.*, **7**, 751-755 (1990).
- 10) M. Hichens, A comparison of thyrotropin-



- releasing hormone with analogs: Influence of disposition upon pharmacology, *Drug Metab. Rev.*, **14**, 77-98 (1983).
- 11) T.C. Friedman and S. Wilk, Delineation of a particulate thyrotropin-releasing hormone degrading enzyme in rat brain by the use of specific inhibitors of prolyl endopeptidase and pyroglutamyl peptide hydrolase. *J. Neurochem.*, **46**, 1231-1239 (1986).
  - 12) M. Safran, C.F. Wu and C.H. Emerson, Thyrotropin releasing hormone metabolism in visceral organ homogenates of the rat. *Endocrinology*, **110**, 2101-2106 (1982).
  - 13) S. Wilk, Minireview, prolyl endopeptidase. *Life Sci.*, **33**, 2149-2157 (1983).
  - 14) K. Bauer, K.J. Gr f, A. Faivre-Bauman, S. Beier, A. Tixier-Vidal and H. Kleinkauf, Inhibition of prolactin secretion by proline-diketopiperazine, *Nature*, **274**, 174-175 (1978).
  - 15) K. Bauer and P. Nowak, Characterization of a thyroliberin-degrading serum enzyme catalyzing the hydrolysis of thyroliberin at the pyroglutamyl-histidine bond. *Eur. J. Biochem.*, **99**, 239-246 (1979).
  - 16) K. Bauer, P. Nowak and H. Kleinkauf, Specificity of a serum peptide hydrolyzing thyroliberin at the pyroglutamyl-histidine bond. *Eur. J. Biochem.*, **118**, 173-176 (1981).
  - 17) W.L. Taylor and J.E. Dixon, Characterization of a pyroglutamate aminopeptidase from rat serum that degrades thyrotropin-releasing hormone. *J. Biol. Chem.*, **253**, 6934-6940 (1978).
  - 18) D. Brewster and K. Waltham, TRH degradation rates vary widely between different animal species. *Biochem. Pharmacol.*, **30**, 619-622 (1981).
  - 19) D.F. Veber, F.W. Holby, S.L. Varga, R.F. Hirschmann, R.F. Nutt, V.J. Lotti and C.C. Porter, The dissociation of hormonal and CNS effects in analogues of TRH. In: A. Lof-fet (Ed.), Proceeding of 14th European Peptide Symposium, Univ. of Brussels Press, Belgium, 453-461 (1976).
  - 20) B.A. Morgan, J.D. Bower, P.W. Dettmar, G. Metcalf and D.J. Schafer, Novel TRH analogues with increased neuropharmacological activity. In: E. Cros and J. Meienhofer(Eds.), Proceeding of the Sixth American Peptide Symposium, Perce Chem. Co., Rocford, II, 909-912 (1979).
  - 21) N. Fukuda, M. Miyamoto, S. Narumi, Y. Nagai, Y. Saji and Y. Nagawa,  $\gamma$ -Butyrolactone- $\gamma$ -carbinyl-histidyl-prolinamide citrate (DN-1417): a novel TRH analogue with potent effects on the central nervous system, *Life Sci.*, **28**, 861-869 (1981).
  - 22) N. Fukuda, O. Nishimura, M. Shikata, G. Hatanaka, M. Miyamoto, Y. Saji, R. Nakayama, M. Fujino and Y. Nagawa, Synthesis and pharmacology of TRH analogues to separate central nervous system action from endocrine activity. *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 1667-1672 (1980).
  - 23) K. Furukawa, T. Nomoto and T. Tonoue, Effects of thyrotropin releasing hormone (TRH) on the isolated small intestine and taenia coil of the guinea pig, *Europ. J. Pharmacol.*, **64**, 279-287 (1980).
  - 24) M. Okada, Effects of a new thyrotropin releasing hormone analogue, YM-14673, on the in vivo release of acetylcholine as measured by intracerebral dialysis in rats, *J. Neurochem.*, **56**, 1544-1547 (1991).
  - 25) H. Bundgaard and J. Møss, Prodrugs of peptides. 6. Bioreversible derivatives of thyrotropin-releasing hormone (TRH) with increased lipophilicity and resistance to cleavage by the TRH-specific serum enzyme, *Pharm. Res.*, **7**, 885-892 (1990).
  - 26) J. Møss and H. Bundgaard, Prodrugs of peptides. 7. Transdermal delivery of thyrotropin-releasing hormone (TRH) via prodrugs. *Int. J. Pharm.*, **66**, 39-45 (1990).
  - 27) J. Møss, A. Buur and H. Bundgaard, 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 (1990).
  - 28) J. Møss and H. Bundgaard, Prodrugs of peptides. 12. Bioreversible derivatization of thyrotropin-releasing hormone (TRH) by N-phthalidylolation of its imidazole moiety, *Int. J. Pharm.*, **74**, 67-75 (1991).
  - 29) S. Lundin, J. Møss, H. Bundgaard and P. Artursson, Absorption of thyrotropin-releasing hormone (TRH) and a TRH prodrug in a human intestinal cell line (Caco-2), *Int. J. Pharm.*, **76**, R1-R4 (1991).
  - 30) I. Toth, N. Flinn, A. Hillery, W.A. Gibbons and P. Artursson, Lipidic conjugates of luteinizing hormone releasing hormone (LHRH)<sup>+</sup> and thyrotropin releasing hormone (TRH)<sup>+</sup> that release and protect the native hormones in homogenates of human intestinal epithelial (Caco-2) cells, *Int. J. Pharm.*, **105**, 241-247 (1994).
  - 31) S. Wilk, Minireview: Neuropeptide-specific peptidases: Does brain contain a specific TRH-degrading enzyme?, *Life Sci.*, **39**, 1487-1492 (1986).

- 32) K.H. Schosinsky, M. Vargas, A.L. Esquivel and M.A. Chavarria, Simple spectrometric determination of urinary albumin by dye-binding with use of bromphenol blue, *Clin. Chem.*, **33**, 223-226 (1987).
- 33) M.E. Dowty, K.E. Knuth, B.K. Irons and J. R. Robinson, Transport of thyrotropin releasing hormone in rabbit buccal mucosa in vitro, *Pharm. Res.*, **9**, 1113-1122 (1992).
- 34) I.K. Chun and Y.W. Chien, Stabilization of methionine enkephalin in various rabbit mucosal extracts by enzyme inhibitors, *Int. J. Pharm.*, **121**, 217-231 (1995).
- 35) I.K. Chun, I.S. Park and J. Hyun, Inhibition of enzymatic degradation of leucine enkephalin and [D-ala<sup>2</sup>]-leucine enkephalinamide in various rabbit mucosal extracts by inhibitors, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **26**, 175-185 (1996).
- 36) I.K. Chun and I.S. Park, Enzymatic degradation of leucine enkephalin and [D-ala<sup>2</sup>]-leucine enkephalinamide in various rabbit mucosa extracts, *Yakhak Hoeji*, **38**, 530-543 (1994).