

## 배양 Caco-2 세포 단층막 실험계에서 트랜스페린과 옥시다아제효소 복합체의 세포막투과

김동출<sup>†</sup> · 김지혜

충남대학교 약학대학  
(1999년 6월 1일 접수)

### Transport of Transferrin-Horseradish Peroxidase Conjugate Through Cultured Caco-2 Cell Monolayer

Dong-Chool Kim<sup>†</sup> and Jie-Hae Kim

College of Pharmacy, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea

(Received June 1, 1999 )

**ABSTRACT**—Transport study of horseradish peroxidase and transferrin-horseradish peroxidase conjugate was performed using an *in vitro* Caco-2 cell cultured monolayer grown on a polycarbonate membrane of Transwell<sup>®</sup>. Horseradish peroxidase was not transported across Caco-2 cell monolayer. Transferrin-horseradish peroxidase conjugate was transported through Caco-2 cell monolayer. The apparent membrane permeability coefficient ( $P_{app}$ ) of transferrin horseradish peroxidase conjugate was  $6.54 \times 10^{-7}$  cm/sec. The  $P_{app}$  value of transferrin-horseradish peroxidase conjugate across Caco-2 cell monolayer was increased to  $11.9 \times 10^{-7}$  cm/sec in the presence of 50  $\mu$ g/ml brefeldin-A. These results suggest the transferrin receptor mediated transcytosis of transferrin-horseradish peroxidase conjugate across Caco-2 cell monolayer.

**Keywords** – Caco-2 cell, Transport, Transferrin, Receptor mediated transcytosis

최근의 생물공학의 발달에 힘입어 단백질 또는 펩티드성 생리활성 물질들이 인간의 질병의 치료를 위해 속속 개발되어 상용화 되고 있다. 이런 추세는 21세기에 들어서면서 더욱 가속화될 것으로 생각된다. 종래의 저분자 약물과는 달리 단백질/펩티드성 생리활성 물질들은 그 분자량이 크고, 또 소장관내에서 흡수시에 단백분해 효소 및 펩티다아제 등에 의해 분해되므로 지금까지 이들의 투여방법은 주로 정맥주사 또는 피하주사에 의한 것이었다. 그러나 이런 투여방법의 제약은 이들 단백질/펩티드성 생리활성 물질의 의약품으로서의 적용범위 및 개발가능 범위를 크게 위축시키는 요인으로 작용하여 왔다. 따라서 이들 단백질/펩티드성 생리활성 물질들의 경구투여 방법에 관한 연구가 최근 활발히 진행되고 있다.<sup>1-3)</sup>

본 연구에서는 단백질의 소장관 상피세포막 투과를 연구하기 위해 Caco-2 세포 단층막 실험계를 이용하였다.<sup>4)</sup> Caco-2 세포 단층막 실험계는 세포막 투과 실험의 *in vitro* 모델로 많이 선택되고 있는데 이는 Caco-2 세포가 형태적으로나 기능적으로 사람의 소장관 상피세포와 유사성을 보이

기 때문이다.<sup>4)</sup> Caco-2 세포는 사람의 colorectal carcinoma에서 유래된 세포주로서 Transwell<sup>®</sup>의 polycarbonate membrane상에서 배양될 때 극성(polarity)을 나타내는 단층 세포막을 형성하게 되며, polycarbonate membrane과 Caco-2 세포가 접한 부분의 Caco-2 세포막은 혈관측 세포막 (basolateral side membrane), polycarbonate membrane과 Caco-2 세포가 접하지 않은 쪽의 Caco-2 세포막은 장관측 세포막 (apical side membrane)의 특징을 띠게 된다.<sup>4)</sup> 따라서 이 모델 실험계는 약물의 소장관으로부터 혈액으로의 흡수 및 혈액으로부터 소장관으로의 분비와 같은 막투과를 연구하는데 있어서 매우 유용한 *in vitro* 모델 실험계이다.<sup>5-9)</sup>

단백질/펩티드성 약물의 경구투여 개발 연구 중에서 널리 시도되고 있는 것 중의 하나는 receptor-mediated endocytosis (RME) 경로를 이용하는 것이다. RME는 내피세포와 상피세포 같은 세포 장벽을 통하여 단백질이나 펩티드를 수송하는 경로로 이용이 된다.<sup>10)</sup> RME과정에 의해 Caco-2 세포 단층막을 통과하는 것들로 cholera toxin<sup>11)</sup> 및 staphylococcal superantigen toxin<sup>12)</sup> 등이 보고되어 있으며, Madin-Darby Canine kidney 세포 단층막을 transferrin이 RME과정에 의해 투과한다는 보고도 있다.<sup>13)</sup> 한편 배양 Caco-2 세포 단층막 위의 transferrin receptor (TfR)의 분포는 사람의

<sup>†</sup>본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

Tel : 042)821-5936, E-mail : dongch@hanbat.chungnam.ac.kr

gastrointestinal(GI) tract와 매우 유사하다는 보고가 있으며,<sup>14)</sup> 따라서 소장관 상피세포에서의 transferrin receptor mediated 약물 수송의 연구에 적합한 *in vitro* 모델로 사용될 수 있다. 이미 보고된 바에 따르면 brefeldin-A (BFA) 는 basolateral transferrin receptor의 수를 감소시키고 동시에 apical transferrin receptor의 수를 증가시킨다고 알려져 있다.<sup>15)</sup> 본 연구에서는 transferrin receptor의 RME-pathway를 단백질 약물의 수송에 이용할 수 있는지를 조사하기 위해서 분자량 약 44,000의 horseradish peroxidase (HRP)를 모델 약물로 선정하여 HRP와 transferrin의 conjugate를 제조하였다. 이어서 transferrin-HRP conjugate가 transferrin receptor에 의해 수송되는가를 Caco-2세포 단층막 실험계를 이용하여 관찰하였으며, brefeldin-A가 transferrin receptor mediated transcytosis에 미치는 영향에 대해서도 살펴보았다.

## 실험방법

### 시약 및 기기

Transferrin, horseradish peroxidase, rat tail collagen type-I, sephacryl S-200HR, sodium borohydride, ethylene glycol, sodium m-periodate, fetal bovine serum, l-glutamine, 0.25% trypsin-EDTA solution, penicillin streptomycin solution, brefeldin-A (BFA), minimum essential medium eagle (NEAA), Dulbeccos modified eagle's medium, Dulbeccos phosphate buffered saline (DPBS), bovine serum albumin, 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)는 Sigma Co. (MO, USA)에서, 2,4-dinitrofluorobenzene은 Junsei Chem. Co. Ltd. (Japan)에서, 250 ml tissue culture flask, 500 ml media filtration unit, serological pipets, pasteur pipets 등은 Sigma Co. (MO, USA)에서, Transwell<sup>®</sup>은 Corning Costar Co. (MA, USA)에서, Caco-2 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, USA)에서 구입하여 사용하였고, 증류수는 Milli-Q (Millipore Co., USA)에 18 m $\Omega$ -cm로 통과시킨 것을 사용하였으며 기타 시약은 모두 특급의 것을 구입하여 사용하였다. 세포배양기, clean bench는 VWR (USA)로부터 구입하여 사용하였으며, 분석기기로는 Molecular Device사 (USA)의 microplate reader를 사용하였다.

### Caco-2 세포 단층막의 배양

이미 보고되어 있는 바와 같은 방법으로 Caco-2 세포를 배양하여 단층막을 제조하였다.<sup>16)</sup> 간단히 설명하면, ATCC로부터 구입한 Caco-2 세포를 37°C의 수욕에 넣어 녹인 후 세포를 culture flask에 옮겨 100×g에서 2분간 원심 분리한

후 상청액을 흡입 제거했다. 세포분획에 배양액 10 ml (modified Dulbeccos eagle's media로서 10% fetal bovine serum, penicillin-streptomycin을 함유한)를 천천히 가한 후 culture flask에 옮겨 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하면서 이틀에 한 번씩 flask의 배양액을 흡입 제거한 뒤 새로운 배양액을 25 ml씩 가해주었으며 4~5일에 한 번씩 계대 배양하였다. Flask내의 세포가 confluent한 상태로 자라나면 막투과실험을 위해 Caco-2 세포를 Transwell<sup>®</sup>에 seeding하였다. Seeding과정은 다음과 같다. 우선 10 mg의 rat tail collagen type-I을 100 ml의 0.1M acetic acid solution에 녹여 0.1 mg/ml의 collagen용액을 준비하였다. Transwell<sup>®</sup>에 seeding하기 3일 전에, 미리 준비하여 둔 collagen용액을 각 well당 0.3 ml씩 가하여 UV light 하에서 1일간 방치하면서 각 well의 polycarbonate membrane을 collagen으로 coating 하였다. 다음에 collagen coating한 각 well에 아래와 같은 방법으로 Caco-2세포를 seeding하였다. Culture flask중의 complete media를 제거한 뒤 10 ml의 DPBS를 가하고 2분 방치한 후, DPBS를 제거하고 trypsin-EDTA용액 3 ml를 가한 뒤 곧 흡입제거하고 CO<sub>2</sub> incubator 안에서 5분가량 방치한다. 10 ml의 배양액을 이용하여 flask 내면에 부착된 세포를 씻어내고, 세포의 밀도를 1×10<sup>6</sup> cell/ml 정도로 현탁시킨 후 Transwell의 각 well의 polycarbonate membrane위에 1.5 ml씩 가하여 seeding하였다. Transwell의 아래쪽에도 2.5 ml의 배양액을 가하여 배양한다. seeding후 최초의 5일간은 이틀에 한번씩 배양액을 교환해 주었으며, 그 다음부터는 매일마다 배양액을 교환해 주면서 배양하였다. Seeding으로부터 3주 이상 키운 것을 막 투과실험에 사용하였다.

### Transferrin-horseradish peroxidase conjugate 의 제조

5 mg의 horseradish peroxidase (HRP)를 2 ml의 0.3M NaHCO<sub>3</sub> buffer (pH 8.1)에 녹인 후 100  $\mu$ l의 1% 2,4-dinitrofluorobenzene을 가해 실온에서 한시간 반응 시켰다. 이 반응액에 1 ml의 0.04M sodium m-periodate를 가하고 30분간 실온에서 반응 시킨 후 0.16M의 ethylene glycol을 1 ml 가하고 실온에서 1시간 방치하였다. 위의 반응액을 1L×3의 pH 7.0, 0.05M NaHCO<sub>3</sub> 완충액으로 molecular weight cut-off가 12000-14000범위의 투석막을 이용하여 4°C에서 overnight로 투석하였다. 이 반응액에 5 mg의 transferrin (Tf)를 가하여 2시간 동안 실온에서 방치한 후, 5 mg의 sodium borohydride를 가하고 4°C에서 3시간동안 방치하였다. 위 반응액을 Centricon<sup>®</sup>-10을 이용해 4°C에서 1000×g로 20분간 원심분리하고 pH 7.2, 0.05M 인산완충액을

이용하여 4°C에서 overnight로 투석하였다. Sephacryl S-200HR 컬럼에 위 반응액을 가한 후 (pH 7.2, 0.05M 인산 완충액 이용) 컬럼으로부터의 유출액을 수집하여 각각의 분획에 대해 BIO-RAD사의 단백질 농도 측정용 시약을 사용하여 단백질 농도를 측정하여 피이크 분획을 수집하여 transferrin-horseradish peroxidase conjugate (Tf-HRP conjugate)로서 이후의 실험에 사용하였다.

**Transferrin-horseradish peroxidase conjugate의 정량**

pH 4.5, 0.04M citrate 완충액 50 ml에 125 mg의 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)를 가하고 10 µl의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 가하여 시약 A를 조제하였다. 또한 HRP 또는 Tf-HRP conjugate의 농도 범위가 1 ng~100 ng이 되도록 milli-Q water로 계열 희석하여 샘플을 조제한 후 각각의 샘플을 n=3으로 하여 microplate의 각 well에 100 µl씩 가하였다. 그 다음 각 well에 A시약을 100 µl씩 가한 후 3분 뒤에 405 nm에서 microplate reader (Molecular Device, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

**Transferrin-horseradish peroxidase conjugate의 Caco-2 세포 단층막에서의 투과 실험**

Diagram 1에는 Transwell®의 polycarbonate membrane 상에서 배양된 Caco-2 세포 단층막을 모식적으로 나타내었다. Polycarbonate membrane 위에 Caco-2세포를 seeding한 후 약 20일간 배양하면, polycarbonate membrane상에 Caco-2세포의 단층 세포막이 그림과 같이 형성된다. 이때, Caco-2 세포막의 상부는 소장관 세포의 장관측 (apical, AP) 특징을 띠게 되고, polycarbonate membrane에 접한 쪽은 소장관 세포의 혈관측 (basolateral, BL)특징을 갖게 된다.<sup>4)</sup> 따라서 약물의 소장관으로부터 혈액으로의 흡수를 연구하려면, 약물을 AP쪽에 넣어주고 BL쪽에서 샘플을 채취하여 약

물을 정량하면 된다. 본 실험에서는 diagram 1에서 보인 것과 같은 Transwell®에서 20~28일간 배양한 Caco-2 세포 단층막을 사용하였다. 투과실험 전에 1% NEAA와 1% glutamine을 함유한 serum free 배양액 (B액)을 AP측에 1.5 ml, BL측에 2.5ml씩 가하여 흡입 제거하였다. 내인성 transferrin을 고갈시키기 위해 bovine serum albumin의 농도가 2 mg/ml이 되도록 가한 B액을 AP측에 1.5 ml, BL측에 2.5 ml씩 가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 1시간 동안 방치하였다. B액으로 AP측과 BL측을 각각 1회 세척한 후, BL측에는 2.5 ml의 B액을 가하고, AP측에는 투과를 관찰하고자 하는 약물 (HRP 또는 Tf-HRP conjugate)을 함유한 B액을 1.5 ml씩 가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 방치하면서 샘플링 시간 (1, 2, 4, 6시간)마다 BL측에서 20 µl씩 시료를 채취하여 시료 중의 HRP활성을 앞에서 설명한 것과 같이 peroxidase의 활성으로부터 정량하였다. AP측에 가하는 샘플의 조제는 다음과 같다. HRP의 막투과실험의 경우에 B액 중의 HRP농도가 1.5 µg/ml가 되도록 하였으며, Tf-HRP conjugate의 막투과 실험의 경우에 B액 중의 Tf-HRP conjugate의 농도가 1.5 µg/ml가 되도록 하였다. 단 BFA존재 하에서의 실험의 경우에는 B액 중의 BFA농도가 50 µg/ml가 되도록 하였다.

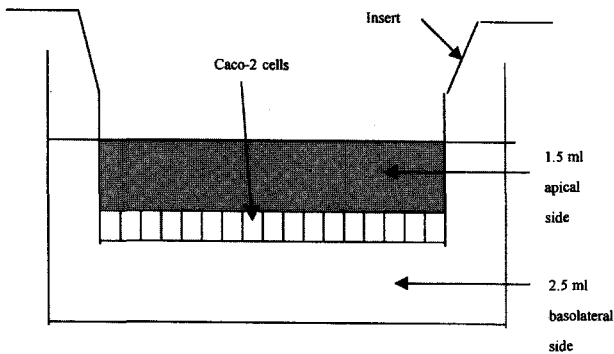
**결과 및 고찰**

**Tf-HRP conjugate 의 제조**

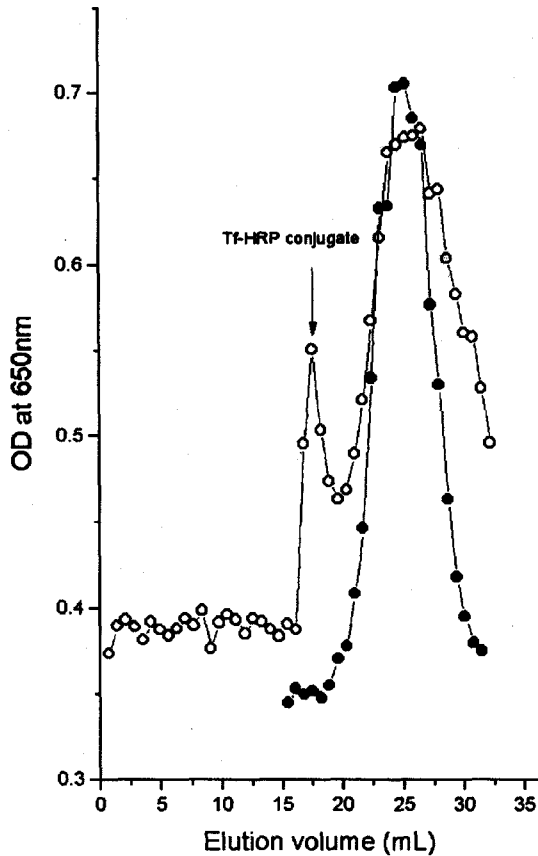
전술한 실험 방법에 따라서 제조한 Tf-HRP conjugate의 반응액을 sephacryl S-200HR column에 통과 시켜 분리한 결과를 Figure 1에 정리하였다. Tf-HRP conjugate는 16~18 ml의 elution volume에서 용출되었으며 HRP는 20~30 ml의 elution volume에서 용출되었다 (Figure 1). Figure 1의 16~18 ml의 elution volume을 합쳐서 얻어진 분획을 Tf-HRP conjugate로 이후의 실험에 사용하였으며, 이 분획의 단백질 농도는 0.628 mg/ml이었다.

**HRP와 Tf-HRP conjugate의 효소활성 비교**

위에서 제조한 Tf-HRP conjugate의 효소활성을 HRP와 비교하기 위해 HRP 및 Tf-HRP conjugate의 peroxidase활성을 앞에서 설명한 방법으로 측정하였다. HRP 및 Tf-HRP conjugate를 milli-Q water로 계열 희석하여 각각의 농도 범위가 1 ng/ml~100 ng/ml로 하였다. Peroxidase활성의 측정 결과를 Figure 2에 보였다. Tf-HRP conjugate의 효소활성이 HRP효소활성과 비교하여 거의 동일한 것이 관찰되었다. 즉, HRP와 Tf와의 conjugation에 의해 HRP의 효소활성이



**Diagram 1**-Schematic representation of Caco-2 cell monolayer grown on polycarbonate membrane of Transwell®.

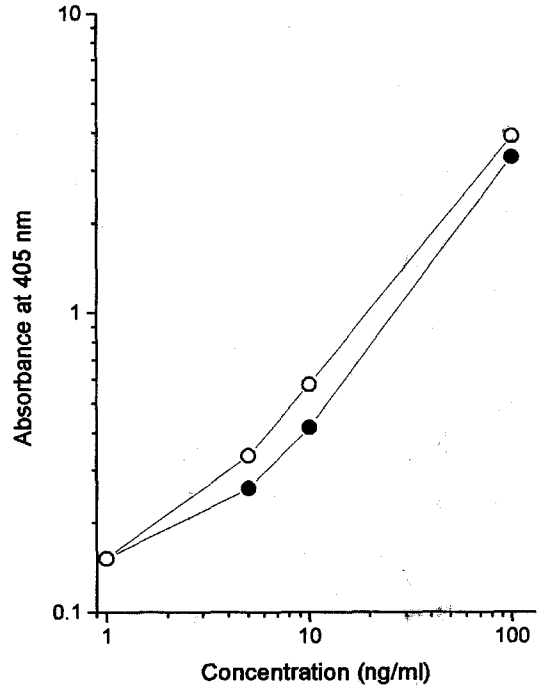


**Figure 1**—Elution profile of Tf-HRP conjugate by sephacryl S-200HR column. Following an overnight dialysis of the reaction mixture of Tf-HRP conjugate using Spectro/Por dialysis membrane (molecular weight cut off, 12000~14000), the reaction mixture was applied onto the column and eluted using PBS (pH 7.2, 50 mM). For a comparison, HRP alone was loaded onto the column and eluted using PBS. Each fraction from the column was collected into a tube and the protein concentration in each fraction was determined using BIO-RAD protein assay kit. Key: ○ ; reaction mixture of Tf-HRP conjugate, Tf and HRP, ● ; HRP only.

저하되지 않았음이 관찰되었다.

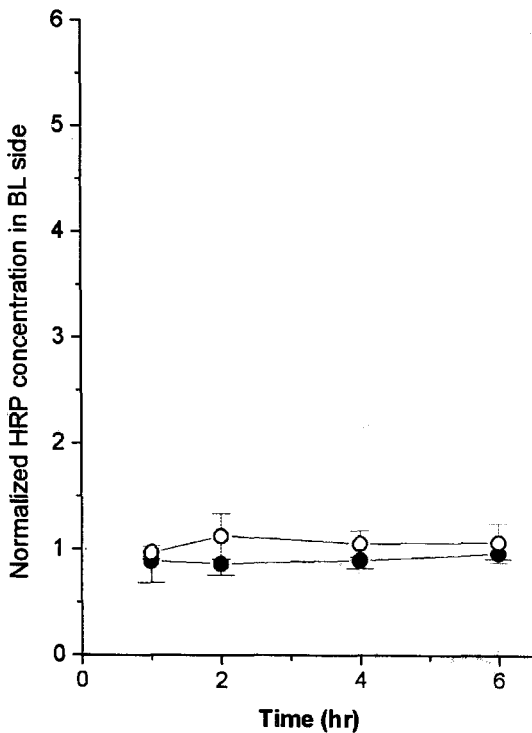
**Caco-2 세포 단층막에서의 HRP 및 Tf-HRP conjugate의 막투과 실험**

실험 과정에서 설명한 방법에 따라 Caco-2 세포 단층막의 AP측에 BFA의 존재 및 비존재하에 HRP 또는 Tf-HRP의 최종농도가 1.5 μg/ml가 되도록 가하고 37°C에서 배양하면서 각 샘플링 시간마다의 BL측으로부터 채취한 샘플 중의 HRP활성을 측정하였다. 투과실험 개시 60분 경과후의 BL측의 HRP의 농도를 기준으로 하여, 각 시간에서의 HRP농도(C<sub>t</sub>)를 60분에 측정된 HRP의 농도(C<sub>60</sub>)로 나눈 비율(C<sub>t</sub>/C<sub>60</sub>)의 형태로 규격화하였다. BFA의 존재 및 비존재하에서 HRP의 Caco-2 세포 단층막 투과의 경시적 변화를 나타낸 것이 Figure 3이다. HRP는 막투과 실험 중 (6시간 동안) Caco-2

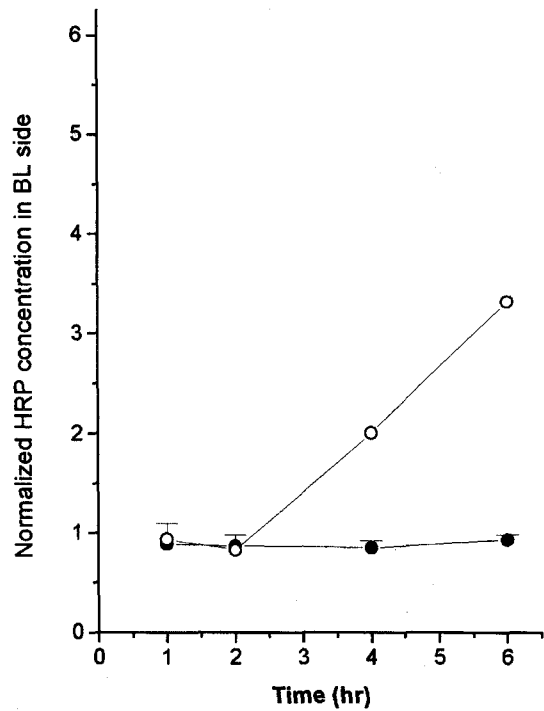


**Figure 2**—A representative calibration curve of HRP and Tf-HRP conjugate. The enzymatic activity of peroxidase was determined using chromogenic substrate ABTS as described in the method. Key: ○ ; free HRP, ● ; Tf · HRP conjugate.

세포 단층막을 전혀 통과할 수 없는 것이 관찰되었다. 이 결과는 HRP의 분자량이 약 44,000이므로 Caco-2 세포 단층막의 tight junction을 통한 paracellular pathway에 의해 통과할 수 없을 뿐 아니라, Caco-2 세포 단층막 상에 HRP의 receptor도 존재하지 않으므로 HRP는 receptor mediated transcytosis와 같은 기전에 의한 Caco-2 세포 단층막의 통과도 없음을 나타낸다. 즉 실험기간 동안 (6시간) Caco-2 세포 단층막이 HRP의 투과를 허용하지 않을 정도로 막투과에 대해 저항성을 유지하고 있음을 나타낸다. 그리고 이 저항성은 BFA의 존재유무에 영향을 받지 않는 것이 관찰되었다 (Figure 3). 한편, HRP 및 Tf-HRP conjugate의 Caco-2 세포 단층막 투과의 경시적 변화를 보인 것이 Figure 4이다. Tf-HRP conjugate는 약 2시간 후부터 basolateral side에 출현하고 있는 것이 관찰되고 있는데 이는 단독으로는 Caco-2 세포 단층막을 통과할 수 없었던 HRP가 Tf과 포합체를 만들어 줌으로써 Caco-2 세포 단층막을 통과할 수 있게 된 것을 의미하며, 이는 Caco-2 세포 단층막 상에 존재하는 transferrin receptor에 의해 매개된 transcytosis과정에 의한 세포막 투과라고 생각된다. 또 Tf-HRP conjugate가 apical side로부터 basolateral side로 투과되어 나오는데 약 2시간의 lag time이 관찰되었는데 이는 Tf-HRP conjugate가 Caco-2 세포의 apical side의 세포표면에서 transferrin receptor와의



**Figure 3**—Time profile of the normalized concentration of HRP in the basolateral side of the Caco-2 cell monolayer. Following the addition of HRP (final concentration, 1.5 µg/ml) to the AP side of the Caco-2 cell monolayer, the basolateral samples were taken from the bottom side of the Transwell® at designated time points and analyzed for the determination of HRP concentration. Each point represents mean±standard deviation from three experiments. Key: ○; free HRP in the absence of BFA, ●; free HRP in the presence of BFA.



**Figure 4**—Time profile of the normalized concentration of HRP and Tf-HRP conjugate in the basolateral side of the Caco-2 cell monolayer. Following the addition of Tf-HRP conjugate or HRP (final concentration of each compound, 1.5 µg/ml) to the AP side of the Caco-2 cell monolayer, the basolateral samples were taken from the bottom side of the Transwell at designated time points and analyzed for the determination of HRP concentration. Each point represents mean from three experiments. Key: ○; Tf-HRP conjugate, ●; HRP.

결합, 내재화(endocytosis), 그리고 반대편 세포막을 통한 방출(exocytosis) 등의 여러 과정을 거쳐 Caco-2 세포 단층막을 통과하므로 이러한 각각의 과정에 시간이 소요되기 때문인 것으로 생각된다. 실제로 transcytosis 등의 기전에 의해 단층세포막을 통과하는 단백질의 경우에는 이런 lag time이 존재하는 것이 관찰되고 있다.<sup>18)</sup>

Tf-HRP conjugate의 Caco-2 단층세포막 투과에 대한 BFA의 영향을 나타낸 것이 Figure-5 이다. Brefeldin-A 존재 하에서 Tf-HRP conjugate의 Caco-2 세포 단층막 투과가 더욱 증가한 것은 Tf-HRP conjugate가 transferrin receptor를 이용해 Caco-2 단층세포막을 통과하는 것을 간접적으로 시사하고 있다. 왜냐하면 brefeldin-A는 transferrin receptor의 transcytosis를 촉진하는 것으로 알려져 있기 때문이다.<sup>18)</sup>

**Caco-2세포 단층막을 통한 HRP 및 Tf-HRP conjugate의 막투과계수의 산출**

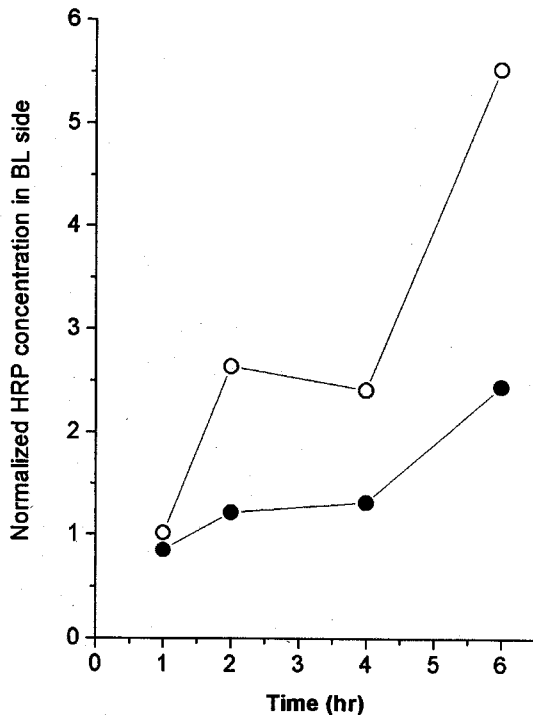
이상의 막투과 실험으로부터 HRP 및 Tf-HRP conjugate

의 막투과계수 (apparent membrane permeability,  $P_{app}$ )를 다음 식에 의해 산출하였다.<sup>16)</sup>

$$P_{app} = \frac{V \cdot dC}{A \cdot C_0 \cdot dt}$$

- dC/dt : Caco-2 단층세포막을 통한 flux
- V : BL 측의 용적 (2.5 ml)
- A : Caco-2 세포 단층막의 면적 (4.7 cm<sup>2</sup>)
- C<sub>0</sub> : AP측에서의 약물의 초기 농도

위 식에 의해 계산한 HRP 및 Tf-HRP conjugate의 겉보기 막투과계수 ( $P_{app}$ )값을 Table I에 정리하였다. 이상 Table I의 결과로부터 분자량 44,000의 HRP를 분자량 약 40000의 transferrin에 conjugate시킨 화합물들은 분자량 약 84000 이상의 거대분자이다. Arturssen<sup>17)</sup> 등은 Caco-2 단층세포막을 이용한 실험계에서 여러 가지 종류의 의약품들의 막투과계수 ( $P_{app}$ )를 구하고 이들  $P_{app}$ 값들과 *in vivo* 경구투여시의 흡수율과의 상관관계를 조사하였다.  $P_{app}$ 값이  $1 \times 10^{-6}$  cm/sec 이상인 의약품들은 거의 완전한 경구 흡수율 (100%)을 보였



**Figure 5**—Time profile of the concentration of Tf-HRP conjugate in the basolateral side of the Caco-2 cell monolayer. Following the addition of Tf-HRP conjugate (final concentration, 1.5  $\mu\text{g/ml}$ ) to the AP side of the Caco-2 cell monolayer, the basolateral samples were taken from the bottom side of the Transwell<sup>®</sup> at designated time points and analyzed for the determination of HRP concentration. Each point represents mean from three experiments. The standard deviations were not shown for the clear comparison of the time course of Tf-HRP conjugate in BL side between in the absence and in the presence of BFA. Key: ○ ; Tf-HRP conjugate in the presence of BFA, ● ; Tf-HRP conjugate in the absence of BFA.

**Table I**—Membrane permeability coefficient of HRP and Tf-HRP conjugate across Caco-2 cell monolayer

Compounds	$P_{app} \times 10^7$ (cm/sec)
HRP without BFA	N.D.
HRP with BFA	N.D.
Tf-HRP without BFA	6.54 $\pm$ 6.49
Tf-HRP with BFA	11.9 $\pm$ 12.4

N.D.; not detected because the horseradish peroxidase activity in the basolateral side of Caco-2 cell monolayer was below detection limit (< 1 ng/ml).

Each value represents mean  $\pm$  standard deviation from three experiments.

으며,  $P_{app}$  값이  $0.1 \sim 1.0 \times 10^{-6}$  cm/sec 사이에 있는 의약품들은 1-100% 사이의 경구 흡수율을 보였다.  $P_{app}$  값이  $0.1 \times 10^{-6}$  cm/sec 이하인 의약품들은 1% 미만의 경구 흡수율을 보였다고 보고하고 있다. 따라서 단순히 생각해서 Tf-HRP conjugate들의  $P_{app}$  값이 모두  $0.6 \sim 1.2 \times 10^{-6}$  cm/sec의 범위에

있으므로 경구투여시 대단히 좋은 흡수율을 기대할 수 있다고 추측할 수 있을 것이다. 또한 Arturssen의 연구에서 조사 대상인 의약품들의 분자량이 모두 1,000이하인 것을 고려하면 분자량이 84,000 이상인 Tf-HRP conjugate의  $P_{app}$  값 (Table I)은 이들 conjugate가 단순한 수동확산에 의해 Ca co-2 세포 단층막을 통과하는 것으로는 설명할 수 없는 값이다. 또 HRP는 Caco-2 세포 단층막을 전혀 통과하지 못하는 것과 비교하여 (Figure 3), Tf-HRP conjugate는 Caco-2 세포 단층막을 매우 잘 투과하는 사실 (Figure 4 및 5)로부터, Tf-HRP conjugate는 Caco-2세포 단층막 상에 존재하는 transferrin receptor가 개재된 transferrin receptor mediated transport pathway에 의해 막을 통과하는 것으로 추측된다. 또 transferrin receptor의 receptor mediated endocytosis에 영향을 주는 것으로 알려진 BFA의 존재하에서 Tf-HRP conjugate의 Caco-2 단층세포막 투과성이 더욱 증가한 결과가 관찰된 것은 Tf-HRP conjugate가 Caco-2 단층세포막상의 transferrin receptor에 의해 세포막을 투과하고 있음을 간접적으로 지지하는 것이라고 생각된다.

## 결론

*In vitro*의 Caco-2 세포 단층막 실험계에서 Tf-HRP conjugate의 세포막 투과가 transferrin receptor에 의한 receptor mediated transcytosis에 의해 일어난다는 사실이 시사되었다.

## 감사의 말씀

이 연구는 98년 보건복지부의 지원에 의해 수행된 것으로 깊이 감사드리며, 연구수행에 지도와 격려를 아끼지 않으신 충남대학교 약학대학의 지 웅길교수님께 감사드립니다.

## 문헌

- 1) P.S. Burton, R.A. Conradi, F.H. Ho Norman, A.R. Hilgers and R.T. Borchardt, How structural features influence the bio-membrane permeability of peptides, *J. Pharm. Sci.*, **85**, 1336-1340 (1996).
- 2) N. Hussain, P.U. Jani and A.T. Florence, Enhanced oral uptake of tomato lectin-conjugated nanoparticles in the rat, *Pharm. Res.*, **14**, 613-618 (1997).
- 3) T. Ogihara, I. Tamai, H. Takanaga, Y. Sai and A. Tsuji, Stereoselective and carrier mediated transport of monocarboxylic acids across Caco-2 cells, *Pharm. Res.*, **13**, 1828-1832 (1996).
- 4) I.J. Hidalgo, T.J. Raub and R.T. Borchardt, Characterization of

- the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability, *Gastroenterology*, **96**, 736-749 (1989).
- 5) J.N. Cogburn, M.G. Donovan and C.S. Schasteen. A model of human small intestinal absorptive cells. 1. Transport barrier, *Pharm. Res.*, **8**, 210-216 (1991).
  - 6) J. Karlsson and P. Artursson, A method for the determination of cellular permeability coefficients and aqueous boundary layer thickness in monolayers of intestinal epithelial (Caco-2) cells grown in permeable filter chambers, *Int. J. Pharm.*, **71**, 55-64 (1991).
  - 7) J.E. Polli and M.J. Ginski, Human drug absorption kinetics and comparison to Caco-2 monolayer permeabilities, *Pharm. Res.*, **15**, 47-52 (1998).
  - 8) E.W. Taylor, J.A. Gibbons and R.A. Braechman, Intestinal absorption screening of mixtures from combinatorial libraries in the Caco-2 model, *Pharm. Res.*, **14**, 572-577 (1997).
  - 9) G.T. Knipp, D.G.V. Velde, T.J. Siahaan and R.T. Borchardt, The effect of  $\alpha$ -turn structure on the passive diffusion of peptide across Caco-2 cell monolayers, *Pharm. Res.*, **14**, 1332-1340 (1997).
  - 10) W.C. Shen and H. Ekrami, Means to enhance penetration: Enhancement of polypeptide and protein absorption by macromolecular carriers via endocytosis and transcytosis, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **8**, 93-113 (1992).
  - 11) W.I. Lencer, C. Delp, M. R. Neutra and J. L. Madara, Mechanism of cholera toxin action on a polarized human intestinal epithelial cell line: Role of vesicular traffic, *J. Cell Biol.*, **117**, 1197-1209 (1992).
  - 12) A.R.A. Hamad, P. Marrack and J.W. Kappler, Transcytosis of staphylococcal superantigen toxins, *J. Exp. Med.*, **185**, 1447-1454 (1997).
  - 13) J. Wan, M.E. Taub, D. Shah and W.C. Shen. Brefeldin-A enhances receptor-mediated transcytosis of transferrin in filter-grown madin-darby canine kidney cells, *J. Biol. Chem.*, **267**, 13446-13450 (1992).
  - 14) D. Banerjee, P. Flanagan, J. Cluett and L. Valberg. Transferrin receptors in the human gastrointestinal tract, *Gastroenterol.*, **91**, 861-869 (1986).
  - 15) J. Lippincott-Schwartz, L. Yuan, C. Tipper, M. Amherdt, L. Orci and R. Klausner, Brefeldin A's effects on endosomes, lysosomes, and the TGN suggest a general mechanism for regulating organelle structure and membrane traffic, *Cell*, **67**, 601-616 (1991).
  - 16) D.C. Kim, P.S. Burton and R.T. Borchardt, A correlation between the permeability characteristics of a series of peptides using an in vitro cell culture model (Caco-2) and an *in situ* perfused rat ileum model of the intestinal mucosa, *Pharm. Res.*, **10**, 1710-1714 (1993).
  - 17) P. Artursson and J. Karlsson, Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **175**, 880-885 (1991).
  - 18) J. Wan, M. Taub, D. Shah, and W.-C. Shen. Brefeldin-A enhances receptor mediated transcytosis of transferrin in filter grown Madin-Darby Canine Kidney cells, *J. Biol. Chem.*, **267**, 13446-13450 (1992).