약학회지 제35권 제2호 135~141(1991)
Yakhak Hoeji Vol. 35, No. 2

효모에서 발현된 유전자 재조합 인간 GM-CSF의 일반 약리작용

이은방 · 김운자
서울대학교 생약연구소
(Received March 2, 1991)

General Pharmacology of Recombinant Human Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor Expressed in *Saccharomyces cerevisiae*

Eun Bang Lee and Oon Ja Kim
Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea

Abstract—The general pharmacological tests with rhGM-CSF indicated that it had no influences on rotarod and locomotor activity tests, but shortened hexobarbital-sleeping time at the the large dose of 3 mg/kg s.c. in mice. It elicited no hypothermic, analgesic and antiepileptic action. No influences on blood pressure and respiration in rabbits were observed at the dose of 1 mg/kg, i.v. and it did neither affect the receptors of adrenaline, acetylcholine, serotonin, histamine, kinin and oxytocin, nor antagonize the actions of histamine, serotonin and oxytocin at its concentrations of 1×10^{-6}g/m*l*. However, this substance was demonstrated to stimulate the formation of leucocytes in rats.

Keywords□rhGM-CSF, general pharmacology, leucocyte formation.

인간의 혈구형성 자극인자(hematopoietic colony-stimulating factors, CSFs)는 혈구의 전구세포를 자극하여 혈구의 분화 및 증식을 촉진하는 물질로서 T세포, 섬유 아세포, 단구, 내피세포, B세포 등에서 생산하는 당단백질이다.[1]

CSFs는 크게 GM-CSF, G-CSF, M-CSF, multi-CSF (IL-3) 등 4가지 종류로 구분되는데 GM-CSF는 과립구 및 대식세포 형성을 자극하고, G-CSF는 과립구의 형성을, M-CSF는 대식세포의 형성을 촉진하며 multi-CSF는 과립구, 대식세포 및 erythroid, mega-karyotic, 호산구, 비만세포, stem cell 등에 광범위하게 증식 촉진효과를 나타낸다.[2] 특히 과립구-대식세포자극인자(granulocyte-macrophage CSF, GM-CSF)는 과립구와 대식세포의 colony 형성을 촉진하고,[3] 생체실험에서는 GM-CSF를 실험동물에 주입시 혈액중의 과립구, 단구, 임파구 등의 수가 급증하며,[4] 호중구와 대식세포의 기능이 활성화 되었다.[5,6] 또한 GM-CSF는 조혈기능 장애가 유발된 마우스에서 조혈기능 회복을 가속화 시켰다.[7]

이러한 일련의 연구 결과들을 통하여 GM-CSF가 임상적으로 화학요법이나 방사선 치료에 의한 면역체계 손상의 복구와 백혈구 수가 적은 환자의 치료 및 예방, 골수결핍증 환자의 치료 등에 유효할 가능성이 높다고 시사된다.

본 보고는 효모를 숙주로 하여 생성된 유전자 재조합 인간 GM-CSF의 일반 약리작용에 관한 것이다.

실험재료 및 방법

1. 시료

본 GM-CSF는 효모를 숙주로하여 생성된 유전자 재조합 인체 granulocyte-macrophage colony-stimu-

lating factor(rhGM-CSF)로서 (주)럭키에서 개발한 제품(LBD-005)이다. 본 제품은 동결시켜 vial에 밀봉된 상태로 제공받아서 −20℃ 이하에서 보관하였으며, 10 mM PBS 용액에 적당한 농도로 용해시켜 사용하였다.

2. 사용동물 및 사육조건

본 연구소 동물실(22～25℃)에서 분만하여 사육시킨 Sprague-Dawley계의 흰쥐, ddy계의 마우스, Hartley계의 guinea pig, New Zealand White계 가토를 사용하였고, 실험 중 실험실내의 명암은 12시간으로 자동조절시켰으며, 사료는 삼양유지(주)의 흰쥐 및 마우스용 또는 가토 사료를 급식하였으며, 물은 수도수를 자유롭게 섭취토록 하였다.

3. 시약 및 기구

사용한 시약으로서 epinephrine, acetylcholine, histamine 등은 Sigma Chem. Co.에서 구입하였고, oxytocin은 (주)유한양행, hexobarbital-Na은 hexobarbital(Tokyokasei Co.)로부터 합성하여 사용하였고, 기타 약물은 대한약전 제품 또는 일급시약을 사용하였다.

사용한 기기로서 rotarod 장치는 Dunham 등[8]의 방법에 따라 제작한 것이고, physiograph는 4 channel의 Narco Co. 제품(Model MK IV)을 사용하였고, 체온측정계는 일본 直方立石電氣(株)의 digital 전자체온계(Omron MC-III)를 사용하였고, activity cage는 Ugo Basile의 제품을 사용하였다.

4. 실험방법

(1) 중추신경계에 미치는 영향

Hexobarbital-Na 수면시간에 미치는 영향－본 시료를 대량, 즉 체중 22～25g의 수컷 마우스 피하에 주사하고, 20분 후에 hexobarbital-Na 70 mg/kg을 1 mg/kg과 3 mg/kg을 복강에 투여하고, 정향 반사가 상실되는 시간을 측정하였다. 대조약물은 chlorpromazine을 사용하였다.

Motor coordination에 미치는 영향－Dunham 등[8]의 rotarod법에 따라서 직경 4 cm의 회전봉이 1분에 12회 회전하도록 한 장치를 사용하였다. 선택된 체중 20～24g의 수컷 마우스 9마리를 1군으로 하여 시료 1 mg/kg과 3 mg/kg을 피하주사하고 20분 후에 본 실험을 실시하여 1분 이내에 떨어지는 마우스를 계수하였다. 대조약물로는 chlorpromazine을 사용하였다.

Locomotor activity에 미치는 영향－Locomotor activity는 Ugo-Basile사의 activity cage를 사용하여 측정하였는데, 이 cage의 바닥에 전기가 흐르는 bar가 있어서 마우스의 움직임에 따라 생기는 전기회로를 activity count로 환산해주는 원리로 측정되는 것이다. 두마리의 수컷 마우스를 activity cage에 넣어서 30분간 적응시킨 후, 본 시료를 1 mg/kg과 3 mg/kg을 각각 투여하고, 10분간씩 30분 동안의 locomotor activity를 측정하였다.[9] 대조약물은 caffeine을 사용하였다.

(2) 정상체온 하강작용－체중 100～120g의 수컷 흰쥐의 직장 체온을 digital 전자 체온 온도계로 측정한 후 약물을 1 mg/kg과 3 mg/kg을 주사하고, 일정시간 간격으로 체온을 측정하였다. 대조약물은 aminopyrine을 사용하여 실시하였다.

(3) 진통작용

Whittle의 초산에 의한 writhing 증상 억제법[10]에 준하여 실시하였다. 즉, 체중 20～25g의 수컷 마우스에 시료 1 mg/kg과 3 mg/kg을 피하주사하고, 30분 후에 0.7% 초산-생리식염액 0.1 ml/10g을 복강내에 주사한 다음, 10분 후부터 10분간 writhing 증상의 발생수를 측정하였다. 이 때에 대조약물은 aminopyrine을 사용하였다.

(4) 항경련 작용

Strychnine 유발치사에 대한 작용－체중 20～25g의 수컷 마우스에 시료 1 mg/kg과 3 mg/kg을 피하주사하고, 30분 후에 척수흥분제인 Strychnine nitrate 1.5 mg/kg을 피하주사하여, 30분 이내에 강직성 경련으로 사망하는 마우스 수를 기록하였다.[11] 대조약물은 diallylbarbiturate를 사용하였다.

Pentylenetetrazole 유발 경련에 대한 작용－수컷 마우스에 시료 1 mg/kg과 3 mg/kg을 각각 피하주사하고, 30분 후에 연수 흥분제인 Pentylenetetrazole 85 mg/kg을 피하주사한 다음 1시간 동안 간대성 경련 유발의 유무를 관찰하였다.[12] 대조약물은 diallylbarbiturate를 사용하였다.

(5) 가토의 호흡 및 혈압에 미치는 영향

체중 2 kg의 수컷 가토에 Urethane 2g/kg을 피하주사하여 마취시키고, 귀 정맥에 시료 0.3 mg/kg과 1 mg/kg을 주사하여 경동맥압(mmHg), 맥박수(rate/min), 호흡심도 및 호흡수(rate/min)를 측정하였다.

(6) 적출 장기에서의 작용

Table I—The effect of recombinant human GM-CSF on several pharmacological profiles

Activity	Method	Drug	Dose (mg/kg, s.c.)	Response[a]
1. CNS activity	(1) Rotarod test	GM-CSF	1	−
			3	−
		chlorpromazine	2	+
	(2) Locomotor activity test	GM-CSF	1	−
			3	−
		Caffeine	10	+
2. Hypothermic	(1) Rectal temperature	GM-CSF	1	−
			3	−
		Aminopyrine	10	+
3. Analgesic	(1) Writhing test	GM-CSF	1	−
			3	−
		Aminopyrine	50	+
4. Antiepileptic	(1) Strychnine mortality test	GM-CSF	1	−
			3	−
		Diallylbarbiturate	60	+
	(2) Pentylenetetrazole induced convulsion test	GM-CSF	1	−
			3	−
		Diallylbarbiturate	40	+

a) The significant difference at a level of $p<0.05$ is represented as positive result

Table II—The effect of GM-CSF on the hexobarbital sleeping time in mice

Group	Dose (mg/kg, s.c.)	No. of animals	Sleeping time (min, M± S.E.)
Control		7	20.1± 1.4
GM-CSF	1	7	21.7± 2.7
	3	7	13.3± 2.0*
Chlorpromazine	1	7	50.8± 8.5**

Significantly different from control group(*$p<0.05$, **$p<0.01$)

Guinea pig 적출회장에 대한 작용—24시간 절식시킨 체중 180g 내외의 수컷 guinea pig의 회장을 적출하여 상법에 의하여 실시하였다. 영양액을 Locke-Ringer액을 사용하였고, 수욕의 온도는 32℃로 하였으며 영양액에의 주입가스는 carbogen을 사용하였다.

흰쥐의 적출 fundus 절편에 대한 작용—체중 150g 내외의 암컷 흰쥐를 24시간 절식시킨 후 Vane 등의 방법[13]에 따라 위를 적출하여 fundus 절편을 만들어 표본을 사용하여 상기와 같은 조건에서 실시하였다.

Guinea pig 적출기관 평활근에 대한 작용—체중 180g 내외의 guinea pig 기관근을 Takagi 등의 방법[14]으로 연결하여 표본으로 사용하였고 상기와 같은 조건으로 실시하였다.

흰쥐의 적출 자궁에 대한 작용—체중 150g 내외의 암컷 흰쥐에 diethylstilbesterol 0.1 mg/kg을 면실유에 현탁하여 피하주사하고, 24시간 후에 자궁을 적출하여 표본을 만들고 상기와 같은 조건에서 상법에 따라 실시하였다.

(7) 혈중 백혈구수에 미치는 영향

체중 150~200g의 흰쥐에 본 시료 50 μg/kg과 150 μg/kg을 1일 2회씩 3일간 피하주사하였다. 피하주사하기 전과 주사한 뒤 24시간 및 72시간 후에 각각 흰쥐의 꼬리에서 채혈하여 EDTA 처리된 시험관에 넣고 혈중의 백혈구 수를 측정하여, 시료 주사로 인한 백혈구 수의 변화를 관찰하였다.[15]

실험결과

1. 중추신경계에 미치는 영향

본 결과는 Table I에 나타낸 바와 같다. 즉, rotarod 시험에 있어서 본 검체 GM-CSF 1 mg/kg과 3 mg/kg을 피하주사했을 때 아무런 영향을 미치지 아니하였고, 대조약물인 chlorpromazine 2 mg/kg 투여시에는 유의성 있는 영향을 미쳤다. 또한 locomotor activity에 대해서도 GM-CSF 1 mg/kg과 3 mg/kg 피하주사는 유의성 있는 영향을 미치지 못했고, 대조약물인 caffeine 10 mg/kg 투여는 마우스의 locomotor activity를 유의성 있게 증가시켰다. hexobarbital-Na의 수면시간에 대해서는 Table II에 나타낸 바와 같이 GM-CSF 3 mg/kg을 마우스에 투여시 수면시간을 유

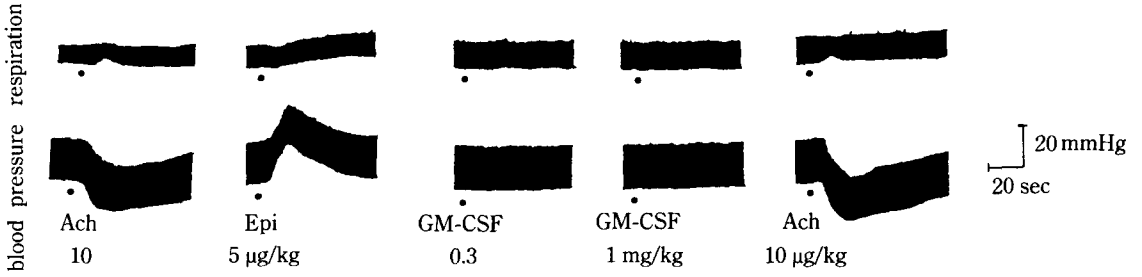

Fig. 1—The effect of GM-CSF on blood pressure and respiration in rabbit.

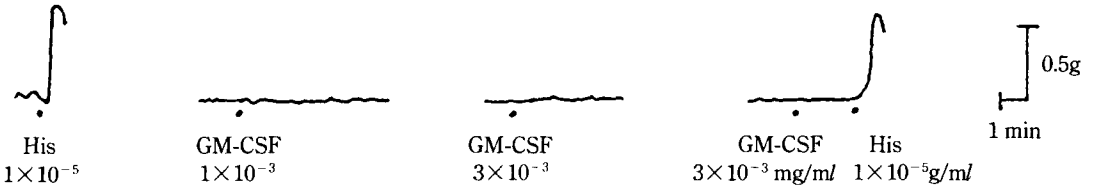

Fig. 2—The effect of GM-CSF on guinea pig ileum.

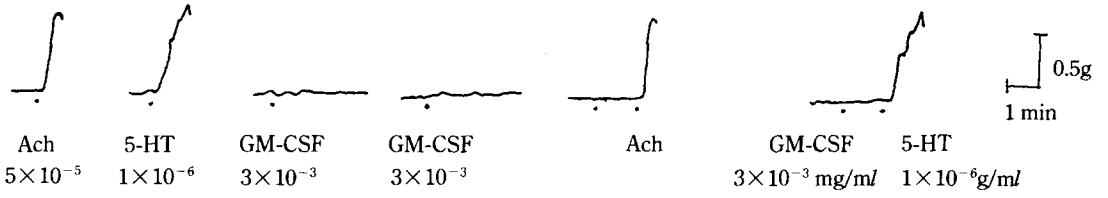

Fig. 3—The effect of GM-CSF on the rat fundus.

의성 있게 단축시켰다.

2. 장상체온 하강작용

Table I에 표시한 바와 같이 GM-CSF 1 mg/kg 및 3 mg/kg의 용량에서도 정상체온에 아무런 영향을 미치지 아니하였다. 반면 대조약물인 aminopyrine 70 mg/kg을 피하주사 하였을 경우에는 투여 후 0.5~3시간에 걸쳐서 대조군에 비하여 유의성 있게 하강을 나타내었다.

3. 진통작용 및 항경련 작용

Table I에 나타낸 바와 같이 GM-CSF 3 mg/kg 피하주사가 0.7% 초산의 복강내 투여에 의해 유발된 writhing syndrome을 억제시키지 못하였으므로 진통작용은 인정할 수 없었다. 대조약물인 aminopyrine 50 mg/kg 투여시에는 그 증상이 억제되었다. 또한 항경련 작용시험에서 strychnine 유발치사 및 pentylenetetrazole 유발경련에 있어서 GM-CSF 1 mg/kg과 3 mg/kg의 피하주사가 사망과 경련유발을 억제하지 못하였으므로 항경련작용을 인정할 수 없었다.

4. 가토의 호흡 및 혈압에 미치는 영향

본 실험결과를 Fig. 1에 표시하였다. 가토의 정상혈압에 대하여 GM-CSF 0.3 mg/kg과 1 mg/kg의 정맥내 주사는 아무런 영향이 없었다. Acetylcholine 10 μg/kg의 투여는 일시적인 강하를 나타내었고, epinephrine 5 μg/kg 투여시는 일시적인 상승을 나타내었다. 호흡에 있어서도 GM-CSF 1 mg/kg의 투여에도 별 영향이 없었다. 또한 그림에 나타내지 아니하였으나 맥박수와 호흡수에서도 GM-CSF 1 mg/kg의 투여는 아무런 영향을 나타내지 아니하였다.

5. 적출장기에서의 작용

Guinea pig 회장에 대한 작용—본 실험의 결과는 Fig. 2에 표시하였다. GM-CSF 1×10^{-3} 및 3×10^{-3} mg/ml의 농도에서 회장에 직접적인 작용이 없었으며, GM-CSF 3×10^{-3} mg/ml의 전처치는 histamine 1×10^{-5}g/ml에 의한 수축이 길항작용을 나타내지 못하였다.

흰쥐의 적출 fundus 절편에 대한 작용—본 결과는 Fig. 3에 표시한 바와 같이 GM-CSF 3×10 mg/ml의 농도에서도 직접적인 작용이 없었으며, acetylcholine

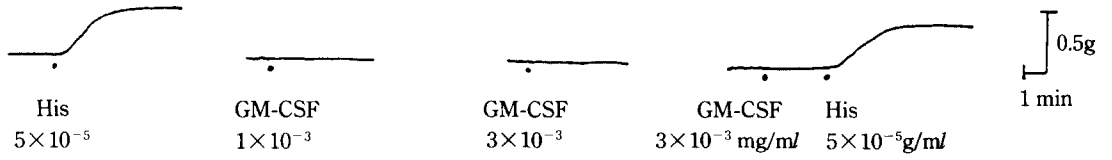

Fig. 4—The effect of GM-CSF on the guinea pig trachea.

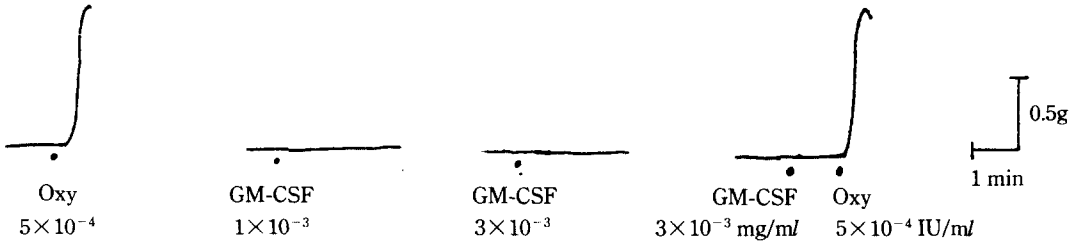

Fig. 5—The effect of GM-CSF on the estrogenized rat uterus.

5×10^{-5}g/ml 또는 serotonin 1×10^{-6}g/ml에 의한 수축에 대하여 GM-CSF 3×10^{-3} mg/ml의 전처치가 아무런 길항을 나타내지 못하였다.

Guinea pig 기관 평활근에 대한 작용—Fig. 4에 표시한 바와 같이 GM-CSF 1×10^{-3} mg/ml 및 3×10^{-3} mg/ml의 농도에서 기관 평활근을 아무런 영향이 없었으며, histamine 5×10^{-5}g/ml에 의한 수축을 길항하지 아니하였다.

흰쥐의 자궁근에 대한 작용—에스트로겐을 전처치한 흰쥐의 자궁근은 GM-CSF 3×10^{-3} mg/ml의 농도에서 수축 혹은 이완작용이 없었으며, oxytocin 5×10^{-4} IU/ml에 의한 수축에 대하여 GM-CSF 3×10^{-3} mg/ml의 전처치는 길항작용을 나타내지 아니하였다 (Fig. 5).

6. 혈중 백혈구 수에 미치는 영향

본 결과는 Table III에 표시한 바와 같다. 즉, GM-CSF 50 μg/kg을 1일 1회씩 3일간 피하주사 하였을 경우에 처치전의 백혈구 수와 비교하여 차이를 인정할 수 없었으나, 150 μg/kg을 피하주사한 72시간 후에는 처치전의 백혈구 수가 mm^3당 10.8×10^3개인데 비하여 50%의 증가를 나타내었다.

고찰 및 결론

본 시료, 즉, rhGM-CSF는 125개의 아미노산으로 구성되어 있고, 분자량이 15,500 정도이며, 두개의 sulfide 결합을 가진 glycosylated protein이다. 본 실험은 효모를 숙주로 하여 유전공학적으로 제조된 rh

Table III—The effect of recombinant human GM-CSF on the leucocyte level in peripheral blood of rats

Treatment	Dose (μg/kg, s.c.)	Time of blood sampling	Level of leucocytes	
			Number($\times10^3$/mm^3)	Increased precent
Control	—	Before injection	11.5± 1.5	0
		24 hrs after in injection	9.0± 0.9	−18.2
		72 hrs after in injection	13.0± 1.0	18.2
GM-CSF	50	Before injection	11.3± 1.1	0
		24 hrs after in injection	10.2± 1.3	−9.7
		72 hrs after in injection	12.6± 0.8	11.5
	150	Before injection	10.8± 1.2	0
		24 hrs after in injection	12.2± 1.3	13.0
		72 hrs after in injection	16.2± 1.2*	50.0

Rats were treated subcutaneously with GM-CSF twice a day for three days.
Significantly different from the levels before injection(*$p<0.01$)

GM-CSF에 대한 일반 약리작용에 관한 것이다.

이 실험에서 본 rhGM-CSF는 3 mg/kg 투여시에 중추신경계에 대한 실험, 즉 rotarod 및 자발운동성 시험에서 아무런 유의성 있는 작용이 인정되지 않았으나, hexobarbital-Na로 유발된 수면시간을 억제하였는 바 미약한 흥분성이 있음을 추정할 수 있다. 본 시료는 정상 체온하강 작용이 없었으며, writhing syndrome의 억제를 발현하지 못했으므로 진통작용을 인정할 수 없었고, strychnine 치사에 영향을 미치지 못하였고, pentylenetetrazole 유발경련에 대한 길항작용이 없었으므로 항경련 작용을 인정할 수 없었다.

본 rhGM-CSF는 1 mg/kg의 용량 정맥 투여시에 혈압, 심박수, 호흡의 심도 호흡수에 아무런 영향이 없었다. 또 적출한 기니아픽의 회장과 기관평활근, 흰쥐 위의 fundus 근과 자궁근에 대하여 본 시료 1 μg/ml의 고농도에서 아무런 작용을 나타내지 않았으므로 이 용량에서 adrenaline, acetycholine, histamine, serotonin, kinin 및 oxytocin 수용체에 대한 작용이 인정되지 않았고, acetylcholine, histamine, serotonin 및 oxytocin에 대한 평활근 수축작용을 길항하지 않았다. 그러나 본 rhGM-CSF는 정상 흰쥐에서 150 μg/kg을 피하로 투여시 백혈구 수의 현저한 증가를 나타냈다. 이 사실은 Mayer 등이 원숭이에 대하여 실험한 결과와 일치된다.[4]

결론적으로 이 rhGM-CSF는 자발성 운동에 영향이 없었으나, 3 mg/kg의 용량에서 hexobarbital 수면시간을 억제하였고, 체온하강작용, 진통작용, 진경작용이 없었으며, 각종 평활근 수용체에 직접적인 작용이 없었고, histamine, serotonin 및 oxytocin에 대한 길항작용이 인정되지 않았다. 또한 가토의 호흡과 혈압에 영향을 미치지 않았으나, 정상 흰쥐의 백혈구 형성을 촉진함을 확인하였다.

문 헌

1) Clark, S.C. and Kamen, R. : The human hematopoietic colony-stimulaing factors. *Science* **236**, 1129 (1987).

2) Metcalf, M. : The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Blood* **67**, 257(1986).

3) Lee, F., Yokota, T., Gemmel, L., Larson, N., Luh, J., Arai, K.I. and Rennick, D. : Isolation of cDNA for a human granulocyte-macrophage colony stimulating factor by functional expression in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 4360 (1985).

4) Mayer, P., Lam, C., Obenaus, H., Liehl, E. and Besemer, J. : Recombinant human GM-CSF induces leukocytosis and activates peripheral blood polymorphonuclear neutrophils in nonhuman primates. *Blood* **70**, 206(1987).

5) Fleischmann, J., Golde, D.W., Weisbart, R.H. and Gasson, J.C. : Granulocyte-macrophage colony stimulating factor enhances phagocytosis of bacteria by human neutrophils. *Blood*, **68**, 708(1986).

6) Morrissey, P.J., Bressler, L., Charrier, K. and Alpert, A. : Response of resident murine peritoneal macrophages to *in vivo* administration of granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *J. Immunol.* **140**, 1910(1988).

7) Tanikawa, S., Nakao, I., Tauneoka, K. and Nara, N. : Effects of recombinant granulocyte colony stimulating factor (rG-CSF) and recombinant granulocyte-macrophage colony stimulating factor (rGM-CSF) on acute radiation hematopoietic injury in mice. *Exp. Hematol.* **17**, 883(1989).

8) Dunham, N.W., Miya, T.S. and Edwards, C.D. : Pharmacological activity of a series of basic esters mono-and dialkyl malonic acid. *J. Am. Pharm. Assoc.* **46**, 208(1957).

9) Nahorski, S.R. : Behavioural sensitivity to apomorphine following cerebral dopaminergic denervation by 6-hydroxy dopamine. *Psychopharrmacologia* **42**, 159(1975).

10) Whittle, B.A. : The use of changes in capillary permeability in mice to distinguish between narcotic and nonnarcotic analgesics. *Brit. J. Pharmacol.* **22**, 246(1964).

11) Araki, Y. and Ueki, S. : Changes in sensitivity to convulsion in mice with olfactory bulb ablation. *Jap. J. Pharmacol.* **22**, 447(1972).

12) Swinyard, E.A., Brow, W.C. and Goodman, L.S. : Comparative assays of antiepileptic drugs in mice and rats. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.* **106**, 319 (1952).

13) Vane, J.R. : A sensitive method for the assay for 5-hydroxytryptamine. *Brit. J. Pharmacol.* **12**, 344 (1957).

14) 粕谷 豊 : 醫藥品研究法, 半義雄 等 編, 朝倉書店, 東京, p. 256(1968).

15) Mitruka, B.M. and Rawnsley, H.M. : *Clinical Biochem. and Hematol. Reference Values in normal exptl. animls and normal humans*, 2nd ed, Masson Publ. USA, Inc., N.Y., p. 36(1981).