

## 재조합 인간 상피세포 성장인자(DWP 401)의 일반약리작용

천선아 · 김상미 · 이은방<sup>‡</sup> · 임승욱\* · 유영효\* · 박명환\*

서울대학교 천연물과학연구소, \*대웅제약 중앙연구소

(Received June 7, 1995)

### General Pharmacology of DWP 401, a Recombinant Human Epidermal Growth Factor

Seon Ah Cheon, Sang Mee Kim, Eun Bang Lee<sup>‡</sup>, Seung Wook Lim\*,  
Young Hyo Yu\* and Myung Hwan Park\*

Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea

\*R & D Center, Daewoong Pharmaceutical Co. Ltd., Sungnam, Kyunggi-Do, 462-120, Korea

**Abstract** — The recombinant human epidermal growth factor(DWP 401) was investigated on the pharmacological actions. DWP 401 had no effects on the hexobarbital-induced sleeping time, locomotor activity, rotarod test, body temperature, analgesic action and anticonvulsant action in mice. It also had no influences on the isolated tracheal muscle and ileum of guinea-pig, isolated uterus and fundus strip of rats. Slight hypotensive action with effect on respiration was revealed at a dose of 8 g/kg i.v. of DWP 401 in rabbits. DWP 401 exhibited a weak inhibitory action of glucose tolerance in normal rats, significantly lowered the blood glucose contents in adrenalectomized rats at a concentration of 160 g/kg, and produced a significant inhibitory effect on leucocyte migration in CMC-pouch of rats at a concentration of 32 g/rat. Furthermore, DWP 401 showed a significant decrease on gastric juice volume and acidity. However, DWP 401 had no intestinal propulsion rate and influence on urine excretion.

**Keywords** □ Pharmacological profile, rhEGF, DWP 401.

상피세포 성장인자(epidermal growth factor, EGF, DWP 401)는 1960년 Stanley Cohen<sup>1)</sup>에 의해 mouse submaxillary gland로 부터 신경성장인자(nerve growth factor)를 분리하던 중 carboxymethyl cellulose chromatography를 통해 얻은 한 분획이 신경성장 촉진 활성과는 다른 생물학적 활성을 보인다는 것으로 부터 발견되었으며 피부나 상피에 이 인자를 처리하였을 때 상피가 성장하는 직접적인 영향을 준다는 사실이 밝혀짐으로써 "상피의 성장을 촉진하는 인자"라는 의미로서 EGF라 명명되었다.

Human EGF(hEGF)는 53개 아미노산으로 구성된

nonglycosylated single polypeptide chain으로, Gregory와 Preston<sup>2)</sup>에 의해 그 일차구조가 밝혀졌다. 분자량은 약 6,200 dalton으로 6개의 cysteine residue는 각기 3개의 disulfide bond를 형성하고 있으며, 특히 이 3개의 disulfide bond는 hEGF의 생물학적 활성을 위해서 반드시 필요하다.

hEGF의 체내 합성장소는 아직 분명하게 밝혀져 있지 않으나 주로 Brunner's gland와 submandibular gland일 것으로 생각하고 있다. hEGF는 사람의 여러 체액과 조직에 다양하게 분포되어 있으며 특히 침, 젖샘 및 젖, 전립선액과 정액, 그리고 뇨에 상대적으로 높은 농도로 존재하지만 혈액부분에는 상대적으로 적은양이 분포해 있다.

EGF에 의해 일어나는 생리작용은 세포표면에 존재

<sup>‡</sup> 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

(전화) 02-740-8917 (팩스) 02-764-7497

하는 EGF 수용체를 통하여 신호가 전달되는 과정으로서 아직 정확히 기전이 밝혀지지 않았으며, 단지 EGF가 EGF 수용체의 extracellular domain에 결합하면 수용체의 dimerization이 일어나서 수용체의 intracellular domain이 서로를 인산화시키게 되며 이에 따라 tyrosine kinase 활성을 갖게 되고, 이러한 활성이 세포 내부의 몇 종류의 단백질을 인산화시켜서 활성화시키고, 일련의 과정을 통하여 DNA 합성능력 촉진 등 대사 및 생리변화를 일으켜서 세포의 성장 및 증식이 유발되는 것으로 알려져 있다.

EGF는 눈에 대하여 각막세포의 증식을 촉진하며 내피세포의 이동과 증식을 자극하여 각막의 상처를 회복시키는 작용을 한다.<sup>3)</sup> 또한 피부조직에 대하여 상피 및 진피의 세포증식을 촉진시켜 상처를 치료하는 작용을 한다.<sup>4)</sup> 위장관에 대해서는 위산의 분비를 억제하고 위궤양 유발물질에 의한 조직손상에 대해 위, 십이지장 점막을 보호하는 작용을 하며, 위장관 세포의 증식을 촉진하여 위장관의 궤양을 치료하는 작용이 있다.<sup>5)</sup> 또한 수유기 이전 신생 포유동물의 위장관 발육을 촉진, 성숙시키는 작용도 하는 것이 알려져 있으며,<sup>6)</sup> 그밖에 간세포의 재생 및 증식작용<sup>7)</sup> 등 생체내 각 조직에 대해 광범위한 작용을 하는 것이 보고되어 있다.

생체내에 두루 분포되어 있는 EGF와 EGF에 의해 성장이 촉진되는 각 조직의 상피세포의 민감성 그리고 빠른 속도로 재생작용을 수행하여야 하는 상피의 필요성 등을 고려하여 볼 때 EGF의 생물학적 작용은 EGF가 동물에서 재생작용에 주역할을 하는 것으로 생각되고 있다. 임상적용에서 주요한 것은 상처치료를 위한 효과로서, 안과 영역에서는 각막손상 및 각막이식 등에, 피부과 영역에서는 창상, 화상, 외과 수술시의 절개 부위치료 및 난치성 만성 피부궤양등의 치료에 그 효과가 인정되고 있다. 본 연구는 recombinant human EGF(rhEGF)에 대한 각종 전임상 시험의 일환으로서 정제된 rhEGF를 사용하여 일반약리 연구를 실시한 것이다.

## 실험방법

**실험재료 및 실험동물** - 실험재료인 rhEGF는 (주)대웅제약 중앙연구소에서 생산된 것을 사용하였다. 또 사용동물은 Sprague-Dawley계의 흰쥐, ddY계의 생쥐, Hartley계의 guinea-pig, New Zealand White

계 토끼를 사용하였고, 동물실은 온도 22~25°C로 조절되었고 명암은 12시간으로 자동조절시켰으며 삼양유지(주)의 사료를 급식하였고 물은 수도수를 자유롭게 섭취토록 하였다.

**시약 및 기구** - 시약은 Sigma Chem. Co.의 제품 혹은 1급품을 사용하였고, 대조약물은 대한약전품을 사용하였다. 사용한 기기로서, 체온측정계는 일본 Shibaura electronics Co.의 digital thermometer이며, 호흡 및 혈압측정은 Narco Biosystems의 physiograph(MK-IV)를 사용하였다. 또 pH meter는 Swiss의 metrohm(691) pH meter를 사용하였고, UV spectrometer는 Gilford Co.의 model S-2600을 이용하였다. 또 Ratarod 장치와 Activity cage는 Ugo Basile Co.의 제품을 사용하였다.

## 중추신경계 및 행동에 미치는 영향

**Hexobarbital 수면시간에 대한 작용** - 체중 20~25g의 수컷 생쥐 7마리를 1군으로 하여 hexobarbital-Na 50 mg/kg을 복강주사하여 정향반사가 상실되는 시간을 측정하였다. 검체는 hexobarbital투여 30분 전에 80 및 160 µg/kg을 피하주사하였으며 대조약물은 chlorpromazine을 사용하였다.

**Rotarod 시험** - Dunham 등<sup>8)</sup>의 방법원리에 따라서 실시하였다. 즉, 선택된 체중 22~27g의 수컷 생쥐 8마리를 1군으로 하여 검체 80 및 160 µg/kg을 피하주사하고 30분 후에 본 실험을 실시하여 1분 이내에 떨어지는 생쥐를 계수하였다. 대조 약물로는 chlorpromazine을 사용하였다.

**자발운동성 시험** - 바닥에 진류가 흐르는 철봉이 있어서 생쥐의 운동에 따라 활동횟수가 기록되는 activity cage를 이용하여 Nahorski<sup>9)</sup>의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 24~28g의 수컷 생쥐 8마리를 1군으로 하여 2마리씩 한 cage에 넣어 30분간 적응시킨 후, 검체 80 및 160 µg/kg을 피하주사하고 30분 후부터 30분 동안의 자발운동성을 측정하였다. 대조약물은 caffeine을 사용하였다.

## 정상체온에 미치는 영향

체중 24~28g의 수컷 생쥐의 직장체온을 digital 전자체온계로 측정된 후, 검체 80 및 160 µg/kg을 피하주사하고 일정시간 간격으로 체온을 측정하였다. 대조약물은 aminopyrine을 사용하여 실시하였고 1군 6마

리를 사용하였다.

### 진통작용

Whittle<sup>10)</sup>의 초산에 의한 writhing 증상 억제법에 준하여 실시하였다. 즉, 체중 24~28 g의 수컷 생쥐 8마리를 1군으로 하여 검체 80 및 160 µg/kg을 피하주사하고 30분 후에 0.7% 초산-생리식염액 0.1 ml/10g을 복강내에 주사한 다음, 10분 후부터 10분간의 writhing 증상의 발생 수를 측정하였다. 이때에 대조약물은 aminopyrine을 사용하였다.

### 항경련작용

**Strychnine 유발 치사에 대한 작용** - 22~26 g의 수컷 생쥐 7마리를 1군으로 하여 Araki 등<sup>11)</sup>의 방법에 따라 실시하였다. 즉, strychnine nitrate 1.5 mg/kg을 피하주사한 후 30분간의 강제성 경련에 의한 생쥐의 사망수를 계수하였다. 검체는 80 및 160 µg/kg을 경련 유발 30분 전에 피하주사하였으며 대조약물은 diallylbarbiturate를 사용하였다.

**Pentylentetrazole 유발 경련에 대한 작용** - 22~26 g의 수컷 생쥐 7마리를 1군으로 하여 Swinyard 등<sup>12)</sup>의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, pentylentetrazole 85 mg/kg을 피하주사하여 1시간 동안의 간대성 경련 유무를 관찰하였다. 검체는 80 및 160 µg/kg을 경련 유발 30분 전에 피하주사하였으며 대조약물은 diallylbarbiturate를 사용하였다.

### 이뇨작용

체중 200 g 내외의 수컷 흰쥐 8마리를 1군으로하여 Gilman<sup>13)</sup>의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 하룻밤 절식시킨 흰쥐에 몸무게의 2.5%에 해당하는 물을 경구투여하고, 3시간 후에 다시 몸무게의 5%에 해당하는 물을 경구투여하였다. 즉시, 검체 80 및 160 µg/kg을 피하주사하고 24시간 동안의 뇨를 채취하였다. 채취한 뇨는 여과하여 용적, pH, Na<sup>+</sup> 및 K<sup>+</sup> 농도 등을 측정하였다.

### 토끼의 혈압 및 호흡에 대한 작용

체중 2.0 kg 내외의 수컷 토끼에 urethane 2.0 g/kg을 피하주사하여 마취시킨 뒤, physiograph와 연결된 cannula를 경동맥에 삽입하여 경동맥압(mmHg) 및 맥박수(rate/min)를 측정하였다. 호흡심도(rate/min)는 bellow pneumograph를 흉부에 묶은 다음

physiograph에 연결하여 측정하였다. 검체는 귀정맥으로 주입하였다.

### 적출장기에 대한 작용

**흰쥐 적출자궁근에 대한 작용** - 체중 180 g 내외의 암컷 흰쥐에 β-estradiol-3-benzoate 0.5 mg을 면실유에 현탁하여 피하주사하고, 24시간 후에 자궁을 적출하여 표본을 만들어 사용하였다. 영양액은 Locke-Ringer액을 사용하였고 수욕의 온도는 33°C로 하였으며 영양액에의 주입가스는 carbogen을 사용하였다. Resting tension은 0.5 g으로 하였다.

**흰쥐 적출위절편에 대한 작용** - 체중 180 g 내외의 암컷 흰쥐를 24시간 절식시킨 뒤, Vane<sup>14)</sup>의 방법에 따라 위절편을 만들어 상기와 같은 조건하에서 실시하였다.

**Guinea-pig 적출회장에 대한 작용** - 24시간 절식시킨 체중 300 g 내외의 수컷 guinea-pig의 회장을 상부에 의해 적출하여 상기와 같은 조건에서 실시하였다.

**Guinea-pig 적출기관근에 대한 작용** - 체중 300 g 내외의 수컷 guinea-pig 기관근을 Takagi 등<sup>15)</sup>의 방법으로 연결하여 상기와 같은 조건하에서 실시하였다.

### 생쥐의 intestinal propulsion 에의 영향

체중 26~30 g의 수컷 생쥐 6마리를 1군으로 하여 검체 80 및 160 Mg/kg을 피하 투여한 30분 후에 지표로서 황산바리움 용액(17g/ml) 0.2 ml씩을 경구투여했다. 그 30분 후에 장관을 적출하여 유분부로부터 황산바리움의 이동거리를 전장관 길이의 백분율로써 나타냈다.

### 위액분비에 미치는 영향

체중 230 g 내외의 수컷 흰쥐 7마리를 1군으로하여 24시간 절식시킨 뒤, ether 마취하에서 Shay 등<sup>16)</sup>의 방법에 따라 유분부를 결찰하고, 4시간 후에 과량의 ether로 동물을 희생시켜 저류된 위액을 채취하였다. 채취한 위액은 3000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 위액분비량(ml), 산도(µEq/ml) 및 총산분비량(µEq/4 hrs)을 측정하였다. 산도 및 총산분비량은 phenolphthalein 지시약을 사용하여 0.05 N NaOH 수용액으로 적정하여 구하였다. 검체는 유분결찰 직후에 50 및 150 µg/kg을 피하주사하였으며 대조약물은 cimetidine을 사용하였다.

### 백혈구 유주 작용에 대한 영향

체중 200 g 내외의 수컷 흰쥐 8마리를 1군으로 하여

Ishikawa 등<sup>17)</sup>의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 흰쥐의 등 부위에 공기낭을 만든 24시간 후에 멸균된 2% CMC-생리식염액 5 ml를 공기낭 내에 주입한다. 이때 검체 16 및 32 µg을 전술한 CMC액에 현탁해서 주입하였다. 6시간 후 낭 속의 삼출액을 채취한 다음 일정량을 취해 hemocytometer로 백혈구를 계수하였다. 백혈구의 염색은 Türk액으로 하였으며 대조약물로는 aspirin을 사용하였다.

**부신적출 흰쥐의 혈당에 미치는 영향** - 부신적출한 수컷 흰쥐에 검체 160 µg/kg을 피하주사하고, 일정시간 간격으로 4시간까지 안정맥으로부터 혈액을 채취한 다음, 원심분리하여 혈청을 얻고 혈청의 glucose 함량을 측정하여 대조군과 비교하였다. 부신을 적출한 흰쥐는 적출 후 4일간 생리식염수를 공급하면서 안정화시키고 제 5일째에 실험을 실시하였다. 대조약물로는 insulin 2.5 IU/kg을 사용하였으며, 검체의 경우와 동일한 방법으로 투여하였다. Glucose의 정량은 glucose oxidase법<sup>18)</sup>에 의하였다.

#### 흰쥐의 내당작용 시험

검체의 내당작용은 Kulakowski 등<sup>19)</sup>의 방법에 준하여 측정하였다. 즉, 하룻밤 절식시킨 흰쥐에 검체 160

µg/kg을 피하주사하고 30분 후 glucose 50 mg/kg을 복강내 주사하였다. 그런 다음, 일정시간 간격으로 3시간까지 안정맥으로 채혈하여 혈청을 얻고, 혈청내의 glucose 함량을 glucose oxidase법<sup>18)</sup>으로 측정하여 saline 투여군과 비교하였다. 1군은 6마리로 하였으며, 대조약물은 insulin 5 IU/kg을 사용하여 검체와 동일한 방법으로 투여하였다.

#### 통계적 처리

실험결과와 통계는 Student의 t-test를 이용하였으며, 대조군과 비교하여 p<0.05 일때를 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

## 결 과

#### 중추신경계 및 행동에 미치는 영향

본 결과는 Table I에 나타낸 바와 같다. 즉, hexobarbital-Na의 수면시간에는 본 검체 80 및 160 µg/kg의 피하주사시에 아무런 영향을 미치지 아니하였고, 대조약물인 chlorpromazine 2 mg/kg 투여군에서는 유의성있는 수면시간의 증가를 나타내었다. 또한, rotarod 시험에 있어서도 검체 80 및 160 µg/kg의 피하

**Table I**— Effect of DWP 401 on several pharmacological profiles

Activity	Method	Drug	Dose (mg/kg, sc)	Response <sup>a)</sup>
1. CNS activity	(1) Hexobarbital-Na sieeping time test	DWP 401	0.08	-
			0.16	-
		Chlorpromazine	2	+
	(2) Rotarod test	DWP 401	0.08	-
			0.16	-
		Chlorpromazine	2	+
(3) Rectal temperature		DWP 401	0.08	-
			0.16	-
		Caffeine	10	+
		DWP 401	0.08	-
2. Hypothermic	(1)Rectal temperature		0.16	-
		Aminopyrine	70	+
		DWP 401	0.08	-
3. Analgesic	(1) Writhing test		0.16	-
		Aminopyrine	70	+
		DWP 401	0.08	-
4. Antiepileptic	(1) Strychnine mortality test	DWP 401	0.08	-
			0.16	-
		Diallylbarbiturate	60	+
	(2) Pentylenetetrazole induced convulsion test	DWP 401	0.08	-
			0.16	-
		Diallylbarbiturate	40	+
5. Diuretic	(1) Urine excretion test	DWP 401	0.08	-
			0.16	-

<sup>a)</sup> The significant difference at a level of p<0.05 is represented as positive result.



Fig. 1 — Effect of DWP 401 blood and respiration in rabbit.

주사시에 아무런 영향을 인정할 수 없었으며, chlorpromazine 2 mg/kg의 투여시에는 유의성있는 영향을 미쳤다. 자발운동성 시험에 있어서도 검체 80 및 160 µg/kg의 피하주사시에는 자발운동성에의 영향을 인정할 수 없었으나 caffeine 10 mg/kg의 투여시에는 유의성있는 운동성의 증가를 나타내었다. 또한, 정상체온에 미치는 영향에 대한 시험에서도 검체 80 및 160 µg/kg의 피하주사시에 정상체온에 아무런 영향을 미치지 아니하였으나 대조약물인 aminopyrine 70 mg/kg을 피하주사하였을 경우에는 saline 투여군에 비하여 유의성있는 체온의 하강을 나타내었다. 또 진통작용에 대해서도 검체 80 및 160 µg/kg의 투여시에 0.7% 초산의 복강내 투여에 의해 유발된 writhing syndrome을 억제시키지 못하였으므로 진통작용을 인정할 수 없었다. 그러나 aminopyrine 70 mg/kg의 투여시에는 그 증상이 유의성있게 억제되었다.

**항경련작용**

Table I에 표시한 바와 같이 항경련작용 시험에서 strychnine 유발 처사 및 pentylenetetrazole 유발 경련에 있어서 본 검체 80 및 160 µg/kg의 피하주사시에 아무런 영향을 인정할 수 없었으나 대조약물인 di-allylbarbiturate 투여시에는 사망과 경련 유발을 유의성있게 억제하였다.

**이노 작용**

Table I에 나타난 바와 같이, 검체 80 및 160 µg/kg을 피하주사하고 24시간 채뇨하였을 때 뇨량, pH, Na<sup>+</sup> 및 K<sup>+</sup> 농도에 변화를 주지 아니하였다.

**토끼의 혈압 및 호흡에 대한 작용**

본 실험결과는 Fig. 1에 표시하였다. 토끼의 정상혈압에 대하여 검체 2.7 µg/kg의 정맥내 주사는 아무런 영향이 없었으나 8 µg/kg의 투여시에는 6.4 mmHg 정도

의 일시적인 강하를 나타내었다. 그러나 acetylcholine 10 µg/kg과의 병행투여에서 acetylcholine의 강화효과를 촉진시키지는 않았다. Epinephrine 5 µg/kg의 투여시는 일시적인 상승을 나타내었고, acetylcholine 10 µg/kg의 투여는 일시적인 강하를 나타내었다. 또한 그림에서 나타내지는 아니하였으나 맥박수와 호흡수에서도 검체 8 µg/kg의 투여는 아무런 영향을 나타내지 아니하였다.

**적출장기에 대한 작용**

**흰쥐 적출자궁근에 대한 작용** - Estrogen을 전처치한 흰쥐의 자궁근은 검체 16×10<sup>-2</sup> µg/ml의 농도에서도 수축 혹은 이완작용이 없었으며, oxytocin 5×10<sup>-4</sup> IU/ml에 의한 수축에 대하여 검체 16×10<sup>-2</sup> µg/ml의 전처치는 길항작용을 나타내지 아니하였다. 그 결과는 Fig. 2에 나타내었다.

**흰쥐 적출위질편에 대한 작용** - 본 결과는 Fig. 3에 표시한 바와 같이 검체 16×10<sup>-2</sup> µg/ml의 용량에서도 직접적인 작용이 없었으며, acetylcholine 5×10<sup>-5</sup> µg/ml에 의한 수축에 대하여 검체 16×10<sup>-2</sup> µg/ml의 전처치가 아무런 길항을 나타내지 못하였다.

**Guinea-pig 적출회장에 대한 작용** - Guinea-pig 적출회장에 대하여 본 검체 8×10<sup>-2</sup> µg/ml 및 16×10<sup>-2</sup> µg/ml의 농도에서 아무런 직접적인 작용이 나타나지 아니하였고, 검체 16×10<sup>-2</sup> µg/ml 전처치는 histamine 1×10<sup>-5</sup> µg/ml에 의한 수축에 대하여 길항작용을 나타내지 않았다. 그 결과는 Fig. 4에 표시하였다.

**Guinea-pig 적출기관평활근에 대한 작용** - 본 실험의 결과를 Fig. 5에 표시하였다. 즉, 검체 8×10<sup>-2</sup> 및 16×10<sup>-2</sup> µg/ml의 농도에서 기관평활근에 아무런 영향이 없었으며, histamine 5×10<sup>-5</sup> µg/ml의 수축에 대하여 검체 16×10<sup>-2</sup> µg/ml의 전처치는 길항작용을 나타내지 않았다.

**생쥐의 intestinal propulsion에의 영향**

본 결과는 Table II에 표시하였다. 검체 80 µg/kg 투여군에서는 8.3%, 160 µg/kg 투여군에서는 16.7%의 intestinal propulsion의 증가율을 나타냈으나 유의적인 차이는 아니었다.

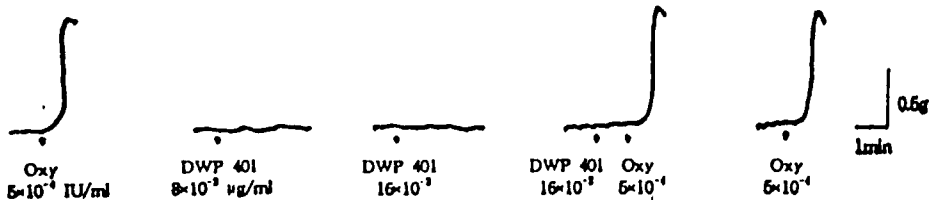
**Table II**— Effect of DWP 401 on intestinal propulsion in mice

	Dose (mg/kg)	No. of animals	Propulsion (%)	Increase (%)
Saline	-	6	44.8±4.2	-
DWP 401	0.08	6	48.5±4.3	8.3
	0.16	6	52.3±5.2	16.7

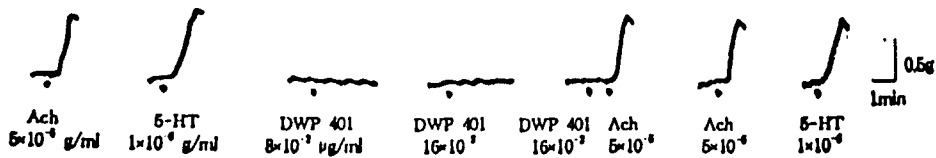
All data represent the mean ± S.E.M.  
Significantly different from the saline group (\* : p<0.01)

**위액분비에 미치는 영향**

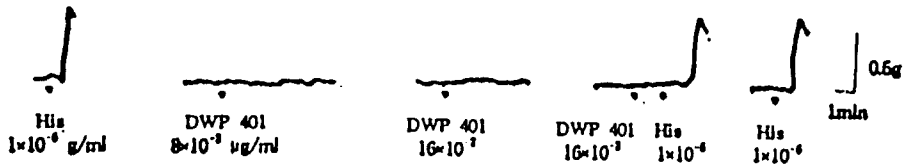
유문결찰에 의해 4시간 동안 저류된 위액에 대한 실



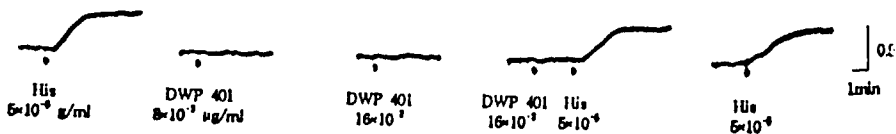
**Fig. 2**— Effect of DWP 401 on estrogenized rat uterus.



**Fig. 3**— Effect of DWP 401 on the rat fundus.



**Fig. 4**— Effect of DWP 401 on the guinea-pig ileum.



**Fig. 5**—Effect of DWP 401 on the guinea-pig trachea.

**Table III**— Effect of DWP 401 on the gastric secretion during 4 hrs in pylorus-ligated rats

Treatment	Dose (mg/kg, sc)	Volume (ml)	Acidity (Eq/ml)	Total acid output µ(Eq/4 hrs)
Saline	-	4.4±0.6	177.9±10.3	802.9±139.4
DWP 401	0.05	1.8±0.3*	101.7±12.8**	193.6± 49.7*
	0.15	1.5±0.4*	97.9±11.5**	167.0± 51.2*
Cimetidine	50	2.3±0.3*	118.1±14.9*	278.6± 53.8*

All data represent the mean±S.E.M.  
Significantly different from the saline group (\* : p<0.01, \*\* : p<0.001)

**Table IV** — Effect of DWP 401 on leucocyte migration in CMC-pouch of rats

Treatment	Dose (mg/rat, sc)	No. of animals	Exudate vol. (ml)	Leucocyte emigration		
				No./mm <sup>3</sup>	inhibition (%)	Total no. (1×10 <sup>7</sup> )
Saline	-	8	4.8±0.2	37930.8±2513.8	-	18.2±1.6
DWP 401	0.016	8	5.2±0.3	36722.0±2512.8	3.2	19.3±1.7
	0.032	8	5.5±0.2	31320.0±1165.1*	17.4	17.3±1.1
Aspirin	30	8	5.0±0.2	23969.8±2713.1**	36.8	11.9±1.1**

All data represent the mean ± S.E.M.

Significantly different from the saline group (\* : p<0.05, \*\* : p<0.01)

**Table V** — Effect of DWP 401 on blood glucose level of adrenalectomized rats

Treatment	Dose (sc)	No. of animals	Serum glucose (mg/dl, M ± S.E.)				
			20	40	60	120	240 min
Saline	-	6	104.5±2.2	105.3± 3.7	114.5± 7.1	104.5±3.5	114.9±5.8
DWP 401	160 µg/kg	6	85.4±1.7**	89.3±11.1	72.7±12.1*	65.1±9.8**	100.3±6.7
Insulin	2.5 IU/kg	6	69.7±5.4**	74.2± 5.3**	74.1± 4.9**	69.4±3.6**	91.2±4.4**

Adrenalectomy was performed by lumbodorsal approach under ether anesthesia. After operation, the rats received 0.9% NaCl as drinking fluid for days. The glucose levels were measured on the 5th day.

Significantly different from the saline group (\* : p<0.05, \*\* : p<0.01)

**Table VI** — Effect of DWP 401 on glucose tolerance in fasted rats

Treatment	Dose (sc)	No. of animals	Serum glucose (mg/dl, M ± S.E.)			
			30	60	120	180 min
Saline	-	6	116.6±1.9	120.6±2.9	87.5±3.5	117.5±2.6
DWP 401	160 µg/kg	6	109.4±3.1	117.9±3.5	86.8±4.8	106.9±3.3*
Insulin	5 IU/kg	6	33.9±2.0**	46.1±2.6**	45.3±2.6**	76.2±2.4**

Significantly different from the saline group (\* : p<0.05, \*\* : p<0.01)

험을 실시하였을때, 본 검체 50 및 150 µg/kg의 투여시 saline 투여군과 비교하였을때 위액의 분비량 및 산도가 유의성있게 억제되었으며 4시간 동안의 산분비량도 유의성있게 억제되었다. 한편 대조약물인 cimetidine 50 mg/kg 투여군에서는 위액분비량 및 산도를 유의적으로 감소시켰으며, 그 정도는 본 검체 150 µg/kg의 투여시보다도 현저히 약한 억제작용을 나타내었고 50 µg/kg의 투여시보다도 약하였다. 그 결과를 Table III에 표시하였다.

**백혈구 유주 작용에 대한 영향**

본 결과는 Table IV에 표시한 바와 같다. 즉, 검체 16 µg/rat를 주입한 경우에는 saline만을 주입하였을 때의 백혈구 수와 비교하여 차이를 인정할 수 없었다. 그러나 32 µg/rat를 주입했을 때는 mm<sup>3</sup>당 백혈구 수가 17.4%의 유의적인 억제율을 보였으나 삼출액 전체의 백혈구 수는 유의성을 인정할 만한 차이를 보이지 않았다. 한편, 대조약물인 aspirin 30 mg/rat를 투여한 군

에서는 mm<sup>3</sup>당 백혈구 수가 2.4 × 10<sup>4</sup>개로써 36.8%의 유의성 있는 억제율을 나타냈다.

**부신적출 흰쥐의 혈당에 미치는 영향**

이 검체 투여가 부신적출 흰쥐의 혈당에 미치는 효과를 측정된 결과를 Table V에 표시하였다. 대조군의 혈당은 약 100 mg/dl 이상의 농도이었고, insulin 2.5 IU/kg 피하주사군에서는 약 70 mg/dl 정도의 농도로서 대조군에 비하여 유의성있는 저하를 나타내었고 검체 160 µg/kg 투여군에서도 유의성있는 저하를 나타냈다.

**흰쥐의 내당작용 시험**

흰쥐에 포도당 500 mg/kg을 복강주사하여 혈당을 과부하시켰을 때에 insulin과 본 검체의 전처치시의 영향을 Table VI에 표시하였다. 즉, insulin 5 IU/kg 피하주사 시에는 대조군에 비하여 측정된 전 시간에 걸쳐서 1/3~1/2의 혈당 농도를 저하시켰는데, 이 검체는 투여 후 2시간까지는 영향이 없었으나 3시간 만에 약간

의 유의성 있는 혈당감소를 나타내었을 뿐이다.

### 고찰 및 결론

펩타이드로 구성된 성장인자는 많지만 그 중에서도 가장 많이 연구된 것이 EGF이다. 이 인자는 각종 세포에서 messenger RNA, DNA 및 단백질 합성을 촉진하고,<sup>20-21)</sup> *in vitro*에서 각질세포에서 분열을 자극하고 *in vivo*에서 상피세포의 재생을 촉진하는 등의 작용이 있는 것으로 알려져 있다.<sup>22-23)</sup> 또 EGF는 피부상처에서의 국소적용시에 치료를 촉진하는 등의 작용이 있는 것으로 보고되어 있다.<sup>24)</sup> 그러나 EGF의 일반약리작용에 관한 보고는 몇편 밖에 찾아볼 수 없었으므로 본 실험은 본 제제에 대한 일반약리에 관한 실험의 결과이다. 이 제제는 *in vivo* 실험을 실시하였을 때에 중추신경계에는 거의 작용이 없는 것으로 나타났다. 즉, 검체 80과 160 µg/kg을 생쥐에 피하주사하였을 때에 hexobarbital유발 수면시간의 연장이나 단축이 없었으며, 같은 양의 검체 투여는 생쥐에서의 rotarod 시험에서 아무런 영향이 없었고, 생쥐의 자발운동성 측정에서도 운동의 유의성있는 변화를 발견할 수 없었다. 또 정상체온에 영향이 없었고, 생쥐에서의 초산유발 writhing 증상의 유의성 있는 억제도 나타나지 아니하였으므로 진통작용을 인정할 수 없었다. Strychnine이나 pentylenetetrazole로 유발시킨 경련도 억제하지 아니하였다. 이 검체의 적출장기에 대한 실험에 있어서 사용한 농도에서 작용을 나타내지 아니하였다. 우선 estrogen처리 자궁근에서의 농도에 의한 수축율이 검체  $16 \times 10^{-2}$  µg/kg의 전처치가 아무런 영향을 나타내지 아니하였고, 또 흰쥐의 fundus 절편, guinea-pig 회장 및 기관에 대하여 아무런 작용을 나타내지 아니하였고, acetylcholine, 5-hydroxytryptamine 및 histamine에 대하여 길항작용이 없음을 알 수 있었다. 생쥐의 intestinal propulsion 시험에서 EGF의 투여용량이 propulsion의 증가 경향을 나타내었으나 유의성 있는 증가는 아니었다. 이 검체 50 µg/kg을 유문 결찰 흰쥐에 피하주사시에 위액분비량 및 산분비량은 cimetidine 보다 1000배 이상의 강한 억제작용이 있음을 알 수 있었다. Gregory<sup>25)</sup>는 EGF 10 µg/kg을 정맥내 주사시에 위액분비를 억제한다고 보고한 바 있다. EGF는 토끼의 적출집합세관에 0.1 µg/ml의 농도로 통과시에 Na<sup>+</sup> 재흡수를 50% 이상 억제한다고 되어있고<sup>26)</sup> EGF를 양의 정맥에 주사시에는 일시적인 Na<sup>+</sup> 및 K<sup>+</sup>의 배설이

증가되어 이노작용이 있다고 하였으나<sup>27)</sup> 본 실험 조건하에서는 이노작용이나 Na<sup>+</sup> 및 K<sup>+</sup>의 배설증가를 나타내지 아니하였다. 흰쥐에 부신을 적출하여 부신 피질호르몬의 영향으로 인한 역조절효과를 배제한 상태에서 본 검체 투여로 혈당강하작용을 나타낸 사실은 이 검체가 insulin 양 작용의 하나로 생각된다. 이러한 사실은 성장호르몬의 경우에서도 나타난다.<sup>28)</sup> 또한, 이 검체는 내당능의 저하효과 경향이 인정되었다.

이상의 실험결과로 보아 DWP 401은 160 µg/kg의 대량의 피하 용량에서 동물의 중추신경계에 대하여 나타나는 작용이 전연 인정되지 아니하였고, 진통 및 항경련작용이 없으며, 토끼에 정맥주사시 일과성의 혈압강하작용이 있을뿐이고, 적출 장관에의 직접작용이 없었으며, acetylcholine, histamine 및 5-hydroxytryptamine의 길항작용도 없었다. 다만, 위액 분비량의 감소와 백혈구 유주역제 경향이 있고, 이노작용은 인정할 수 없었으며, insulin 양작용약한 내당능이 인정되었다.

### 감사의 말씀

본 연구는 보건복지부 신약개발 과제의 연구비 지원으로 수행되었으며 이에 심심한 감사를 드립니다.

### 문헌

- 1) Cohen, S.: Purification of a nerve-growth promoting protein from the mouse salivary gland and its neuro-cytotoxic antiserum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **46**, 302 (1960).
- 2) Gregory, H. and Presto, B.M.: The primary structure of urogastrone. *Int. J. Peptide Protein Res.* **9**, 107 (1977).
- 3) Reim, M., Busse, S., Leber, M. and Schulz, C.: Effect of epidermal growth factor in severe experimental alkali burns. *Ophthalmic. res.* **20**, 327 (1988).
- 4) Franklin T. J., Gregory, H. and Morris, W. P.: Acceleration of wound healing by recombinant human urogastrone(epidermal growth factor). *J. Lab. Clin. Med.* **108**, 103 (1986).
- 5) Konturek, S. J., Dembinski, A., Warzecha, Z., Brzozowski, T. and Gregory, H.: Role of epidermal growth factor in healing of chronic gas-



- trooduodenal ulcers in rats. *Gastroenterol.* **94**, 1300 (1988).
- 6) Falconer, J.: Oral epidermal growth factor is trophic for the stomach in the neonatal rat. *Biol. Neonate* **52**, 347 (1987).
  - 7) Olsen, P. S., Boesby, S., Kirkegaard, P., Therkelsen, k., Almdal, T., Poulsen, S. S. and Nexø, E.: Influence of epidermal growth factor on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Hepatol.* **8**, 992 (1988).
  - 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 supersensitivity to apomorphine following cerebral dopaminergic denervation by 6-hydroxydopamine. *Psychopharmacol.* **42**, 159 (1959).
  - 10) Whittle, B. A.: The use of changes in capillary permeability in mice to distinguish between narcotic and non-narcotic analgesics. *Brit. J. Pharmacol.*, **22**, 246 (1964).
  - 11) Araki, Y. and Ueki, S.: Changes in sensitivity to convulsions in mice with olfactory bulb ablation. *Japan. 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. Exp. Therap.* **106**, 319 (1952).
  - 13) Gilman, A. and Goodman, L.: The secretory response of the posterior pituitary to the need for water conservation. *J. Physiol.* **90**, 113 (1937).
  - 14) Vane, J. R.: A sensitive method for the assay of 5-hydroxytryptamine. *Brit. J. Pharmacol.* **12**, 344 (1957).
  - 15) Takagi, K. and Takayanagi, I.: Chemico-pharmacological studies on antispasmodic action. XV 1) Non-specific antispasmodic action on tracheal muscle. *Chem. Pharm. Bull.* **6**, 716 (1958).
  - 16) Shay, H., Komarov, S. A., Fels, S. S. and Meranze, D.: A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. *Gastroenterol.* **4**, 43 (1945).
  - 17) Ishikawa, H. and Mori, Y.: The characteristic feature of glucocorticoids after local application with reference to leucocyte migration and protein exudation. *Eur. J. Pharmacol.* **7**, 201 (1969).
  - 18) Cawleat, L. P., Spear, F. E. and Kendall, R.: Ultramicrochemical analysis of blood glucose with glucose oxidase. *Am. J. Clin. Pathol.* **32**, 195 (1956).
  - 19) Kulakowski, E. C. and Maturo, H.: Hypoglycemic properties of taurine: not mediated by enhanced insulin release. *Biochem. Pharmacol.* **33**, 2835 (1984).
  - 20) Brightwell, J., Riddle, S. and Eiferman, R.: Biosynthetic human EGF accelerates healing of Neodecadron-treated primate corneas. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **26**, 105 (1985).
  - 21) Burstein, N.: Review: Growth factor effects on corneal wound healing. *J. Ocular Pharmacol.* **3**, 263 (1987).
  - 22) Brown, G. I., Curtsinger, I. and Brightwell, J. R.: Enhancement of wound healing by topical treatment with epidermal growth factor. *J. Exp. Med.* **163**, 1319 (1986).
  - 23) Nanney, J. B.: Epidermal growth factor-induced effects on wound healing. *Clin. Res.* **35**, 706A (1987).
  - 24) Brown, G. G., Nanney, L. B., Griffin, J., Cramer, A. B. and Yancey, J. M., *N. Engl. J. Med.* **321**, 76 (1989).
  - 25) Gregory, H.: Isolation and structure of urogastrone and its relationship to epidermal growth factor. *Nature(London)* **257**, 325 (1975).
  - 26) Vehaskari, V. M., Hering-smith, K. S., Moskowitz, D. W., Weiner, I. D. and Hamm, L. L.: Effect of epidermal growth factor on sodium transport in the cortical collecting tubule. *Am. J. Physiol.* **256**, F803 (1989).
  - 27) Scoggins, B. A., Butkus, A. J., Coghlan, P., Fei, D. T. W., McDougall, J. G., Niall, H. D., Walsh, J. R. and Wang, X., In *Endocrinology*, edit. by F. Labrie and L. Prouix, Amsterdam Elsevier p. 573 (1984).
  - 28) Lee, E. B., Shin, K. H., Kim, O. J., Yoon, K. Y., Cheon, S. A. and Chae, Y. J.: General pharmacology of recombinant human growth hormone without N-terminal methionine expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yakhak Hoeji* **36**, 17 (1992).