

유전자 재조합 사람 erythropoietin, GC-rhEPO의 일반약리작용

한성규 · 김선돈 · 정원휘 · 이호성 · 김성남 · 백대현 · 허재욱¹ · 성연희² · 류판동*
서울대학교 수의과대학 약리학교실, ¹(주)녹십자 종합연구소, ²충북대학교 수의과대학 약리학교실

General Pharmacology of GC-rhEPO, a New Recombinant Human Erythropoietin

Seong Kyu HAN, Sun Don KIM, Wonee CHONG, Ho Sung LEE, Seong Nam KIM,
Dae Hyun BAEK, Jae Wook HUH¹, Yeon Hee SEONG² and Pan Dong RYU*

College of Veterinary Medicine, Seoul National University 103, Seodundong Kwonsungu, Suwon, 441-744

¹Central Research Institute, Korea Green Cross Corporation, 227-3 Kugal-ri,
Kiheung-eup, Yongin City, Kyunggi-do, 449-900

²College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, 48, Gaesindong,
Cheongju, Chungbuk, 361-763

(Received April 17, 2000; accepted June 3, 2000)

Abstract – To evaluate GC-rhEPO, human erythropoietin produced by recombinant DNA technique, its general pharmacological properties were investigated in experimental animals administering intravenously and *in vitro* test system. GC-rhEPO at doses of 70, 700 and 7,000 IU/kg body weight had no influence on general behavior, spontaneous motor activity, thiopental-induced sleeping time, writhing syndrome induced by acetic acid, strychnine-induced convulsions, charcoal meal propulsion in mice, and body temperature, gastric juice secretion, urine and electrolyte excretion in rats. In anesthetized rabbits, GC-rhEPO (70, 700 and 7,000 IU/kg, i.v.) did not alter respiratory rate, blood pressure, heart rate. In *in vitro* experiments, GC-rhEPO did not affect the contractions of the isolated ileum of guinea pigs and the muscle twitches of isolated neuromuscular junction of the rats. In addition, GC-rhEPO did not affect the blood coagulation time and ADP-induced platelet aggregation in plasma of rabbits. Taken together, these results indicate that GC-rhEPO does not induce any adverse effects in the experimental animals.

Keywords □ GC-rhEPO, general pharmacology, central and autonomic nervous system, gastrointestinal system, circulatory and respiratory system, urine, electrolyte, blood coagulation

Erythropoietin(EPO)은 적혈구의 생성을 촉진하는 호르몬으로 165개의 아미노산(18 kDa)과 당류를 포함하는 분자량 30 kDa의 당 단백질이다(Lai 등, 1986; Davis 등, 1987). EPO는 태아기에는 간장에서 생성 분비되나, 성장 후에는 신장에서 주로 생성 분비된다(Koury 등, 1988). EPO는 1906년에 그 존재 가능성이 처음 확인된 후, 1977년에 순수 분리되었으며(Miyake 등, 1977), 80년대에는 유전자가 규명되고 이어서 유전자조작법에 의하여 대량생산이 가능하게 되었다(Jacobs 등, 1985; Lin 등, 1985). 현재, EPO는 빈혈증상의 치료에 중요한 치료제의 하나로 특히 혈액 투석에 의존하는 말기 신부전 환자의 빈혈증 치료, AZT를 투여 받는 AIDS 환자의 빈혈증 치료, 자가수혈이나 항암제 투여로 인한 골수발육억제의 치료에特效약으로 권장되

고 있다(Fisher, 1997).

EPO의 임상적 중요성이 부각됨에 따라 이에 대한 연구도 활발히 진행되었으며, 이에 대한 총설(review)만 해도 수십 편에 이른다. 최근 수년에 알려진 몇 가지 새로운 사실로는 간장과 신장의 EPO 생성장소, ELISA를 이용한 EPO의 정량법, EPO의 약물동태 및 혈중농도의 일주기(Wide 등, 1988), EPO 생성과 관련된 신호전달인자들, EPO 수용체의 정제 및 유전자에 대한 규명 등이 있다(Fisher, 1997).

현재 전임상 및 위에 언급된 대부분의 적응증에서 EPO는 안전한 약물로 판명이 되었다(Sowade 등, 1998). 한가지 알려진 부작용은 말기 신부전증 환자에서 혈압을 증가시키거나, 고혈압을 악화시킬 수 있다는 점이다(Gill과 Anderson, 1993). 그러나, 이는 투여용량을 줄이거나, 혈압강하제의 병용으로 해결될 수 있으며, 말기 신부전증환자

*To whom correspondence should be addressed.

가 얻을 수 있는 치료효과를 감안하면 이는 큰 문제는 아닌 것으로 여겨지고 있다(Fisher, 1997; Sowade, 1998).

본 연구에서는 주식회사 녹십자에서 자체 개발한 유전자 재조합 사람 EPO(Green Cross recombinant human EPO, GC-rhEPO)에 대하여 조혈기능 외의 다른 기능 혹은 장기에 대한 부작용의 가능성을 조사하기 위하여 정상 마우스, 랫드, 토끼, 기니픽 및 그 조직에서 GC-rhEPO의 일반약리작용을 조사하였다.

재료 및 방법

시험약물 및 희석액

(주)녹십자에서 생산한 human recombinant erythropoietin (이하, GC-rhEPO)은 희석액과 같이 제공받아 사용하였다. EPO원액은 4°C에서 보관하며 사용직전 희석액에 적정농도로 희석하여 사용하였다. 희석액 조성은 20 mM NaH₂PO₄, NaCl 100 mM, human serum albumin 0.25%이고, 용매 투여 대조군의 경우에는 약물투여군과 같은 용량의 희석액만을 투여하였다.

대상동물

시험항목에 따라 마우스(ICR), 랫드(Sprague-Dawley), 기니픽, 혹은 토끼(New Zealand white)를 삼육실험동물연구소(오산)에서 구입하였고, 모든 동물은 최소 1주일 이상 순화기간을 거친 후에 실험에 이용하였다. 사육온도는 25 ± 2°C 내외로 유지하고, 습도는 65 ± 10%, 조명시간은 12 시간(07:00-19:00)의 밤낮 주기를 유지하였다. 사료와 물은 자유롭게 공급하였다.

투여용량

예상임상용량인 70 IU/kg을 참고하여, *in vivo* 시험에는 0, 70, 700, 7,000 IU/kg을 정맥투여하고, *in vitro* 실험에는 70, 700, 7,000 IU/L 농도로 적용하였다. 단 ADP를 이용한 혈소판 응집반응 실험에서는 70, 700 IU/ml 농도를 적용하였다.

일반행동에 미치는 영향

수컷 ICR 마우스(체중 30~35g)를 5마리씩 4군으로 나누고 각 군에 희석액, GC-rhEPO 70, 700, 7,000 IU/kg을 각각 정맥투여 후 15, 30분, 1, 2, 4시간 후에 나타나는 증상을 Irwin(1968) 관찰법에 준하여 일반행동을 관찰하였다.

중추신경계에 미치는 영향

자발운동에 미치는 영향

수컷 ICR 마우스(체중 30~35g)를 10마리씩 5군으로 나

누고 각 군에 희석액, GC-rhEPO 70, 700, 7,000 IU/kg을 각각 정맥투여 후 15, 30분, 1, 2, 4시간 후에 activity monitor(Benwick Electronics, Model AM 1051)를 이용하여 5분간 동물의 움직임을 수량화시켜 자발운동량을 결정하였다. 양성 대조약물로는 caffeine(5 mg/kg) 및 chlorpromazine(1 mg/kg)을 정맥주사하였다.

운동협조능(rota-rod test)에 대한 영향

수컷 ICR 마우스(체중 30~35 g)를 10마리씩 5군으로 나누고 Dunham 등(1957)에 의해 개발된 rota-rod법을 이용하여 운동협조능에 대한 영향을 조사하였다. 실험전날 동물을 rota-rod(10 rpm)에서 3분간 훈련시켰으며 3분 동안 떨어지지 않은 동물만 실험에 사용하였다. 각 군에 희석액, GC-rhEPO 70, 700, 7,000 IU/kg을 각각 정맥투여하고, 투여 후 15, 30분, 1, 2, 4시간에 rota-rod에서 2분내에 떨어지는 동물의 수를 측정하였다. 양성 대조약물로는 chlorpromazine(1 mg/kg)을 복강내로 투여하였다.

진통작용에 대한 영향

수컷 ICR 마우스(체중 30~35 g)를 10마리씩 5군으로 나누고 각 군에 희석액, GC-rhEPO 70, 700, 7,000 IU/kg을 각각 정맥투여하고 15분 후에 0.7% acetic acid를 마우스 체중 10 g당 0.1 ml씩 복강투여하고 10분 후부터 10분간 writhing syndrome의 수를 측정하였다. 양성 대조약물로는 acetaminophen(30 mg/kg)을 경구 투여하였다.

항경련 작용에 대한 영향

수컷 ICR 마우스(체중 30~35 g)를 10마리씩 5군으로 나누고 각 군에 희석액, GC-rhEPO 70, 700, 7,000 IU/kg을 각각 정맥투여하고 15분 후에 strychnine(1.5 mg/kg)을 복강투여하고 경련유발시간 및 사망시간을 조사하였다. 양성 대조약물로는 phenobarbital sodium(30 mg/kg)을 복강내로 투여하였다.

Thiopental sodium에 의한 수면시간에 미치는 영향

수컷 ICR 마우스(체중 30~35 g)를 10마리씩 5군으로 나누고 각 군에 희석액, GC-rhEPO 70, 700, 7,000 IU/kg을 각각 정맥투여하고 15분 후에 thiopental sodium 50 mg/kg을 복강투여하고 수면유도시간 및 지속시간을 측정하였다. 양성 대조약물로는 chlorpromazine(15 mg/kg)을 경구 투여하였다.

체온에 대한 영향

웅성 SD rat(체중 200~250 g)를 10마리씩 5군으로 나누고 각군에 희석액, GC-rhEPO 70, 700, 7,000 IU/kg을 각각 정맥투여하였다. 약물 투여 전, 약물 투여 후 15분, 30분, 1, 2, 4시간에 직장체온을 측정하였다. 양성 대조물질로는 aminopyrine(50 mg/kg)을 경구투여 하였다.

자율신경계에 미치는 영향

기니픽 적출회장에 대한 작용

가니픽(체중 250~300 g)을 경추탈골하여 희생시킨 후 약 15 mm의 회장절편을 얻어 95% O₂와 5% CO₂ 혼합가스로 포화된 Krebs's 용액에서 25 ml의 organ bath안에 현수하고 회석액, GC-rhEPO 70, 700, 7,000 IU/L를 누적적으로 전 처리한 후 histamine(10⁻⁸~3×10⁻⁶ M)에 대한 용량반응 관계를 조사하였다.

소화기계에 미치는 영향

장관수송능에 미치는 영향

20 시간 절식시킨 수컷 ICR 마우스(체중 30~35 g)을 10마리씩 4군으로 나누고 각군에 회석액, GC-rhEPO 70, 700, 7,000 IU/kg을 정맥투여하고 15분 후에 5% charcoal meal(10% arabia 고무 현탁액 함유)을 마리당 0.2 ml를 경구투여하고 20분 후에 치사시켜 위장관을 적출하고 유문부로 부터 charcoal meal의 이동거리를 측정하였다. 양성 대조군은 atropine sulfate(10 mg/kg)을 정맥내로 투여하였다. 소장의 수송능은 이동율을 구하여 비교하였는데 이동율은 다음과 같은 식에서 구하였다.

$$\text{이동율} = \frac{\text{charcoal meal의 장관내 이동거리}}{\text{유문부에서 회맹부까지의 거리}}$$

위액분비에 미치는 영향

24 시간 절식시킨 랫드(체중 200~250 g)를 1군당 5마리로 하여 Shay 등(1954)의 방법으로 유문부를 절찰하고 각군에 회석액 및 GC-rhEPO를 농도별로 정맥 투여하였다. 이후 8시간 후에 위액을 채취하여 위액부피, pH, 산도를 구하여 비교하였다. 산도는 pH가 8.3이 될 때까지 첨가된 NaOH의 양으로 결정하였다.

순환기에 미치는 영향

혈압 및 심박수에 미치는 영향

6 마리의 웅성토끼(체중 3 kg 내외)를 ketamine(50 mg/kg)-xylazine(1 mg/kg)으로 마취한 다음 경정맥과 경동맥에 카테타를 삽입하고 경동맥에 pressure transducer를 연결하였다. 회석액, GC-rhEPO 70, 700, 7,000 IU/kg을 누적적으로 정맥 주사하고 10초 후부터 1분간 맥박수와 혈압을 조사하였다. 혈압 및 심박수는 약물 투여전에 비하여 약물 투여 후 나타나는 변화량의 상대적인 값을 조사하였다. 대조약물로는 acetylcholine(1 µg/kg)과 epinephrine(1 µg/kg)을 정맥투여하였다.

호흡기계에 미치는 영향

호흡수에 미치는 영향

6마리의 웅성토끼(체중 3 kg 내외)를 ketamine(50 mg/kg)-xylazine(1 mg/kg)으로 마취한 후 경정맥에 카테타를 삽입하고 회석액, GC-rhEPO 70, 700, 7,000 IU/kg을 정

맥주사 하였다. 각각의 약물을 주입하기 전 1분간의 호흡수를 측정하고 약물 주입하고 10초 후부터 1분간 호흡수를 측정하여 이를 약물투여전 호흡수로 나누어 상대적인 값을 구하였다.

혈액응고계에 미치는 영향

혈액응고에 미치는 영향

수컷 ICR 마우스(체중 30~35 g)를 10마리씩 5군으로 나누고 각 군에 회석액, GC-rhEPO 70, 700, 7,000 IU/kg을 정맥투여하고 15분 후에 ether 마취하에 복대정맥에서 채혈하고 혈액의 1/10 용량의 3.8% sodium citrate를 가한 직후 3,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 혈장을 얻었다. Prothrombin time(PT)을 측정하기 위하여 37°C로 2분간 가온한 혈장 0.1 ml에 0.2 ml의 thromboplastin C (International reagents corporation, Japan)를 첨가한 후 응고되기까지의 시간을 측정하였다. Activated partial thromboplastin time(APTT)을 측정하기 위하여 혈장 0.1 ml에 thrombocheck APTT(International reagents corporation, Japan)를 첨가하고 37°C에서 2분간 가온하고 20 mM CaCl₂를 첨가한 후부터 응고되기까지의 시간을 측정하였다.

혈소판응집에 미치는 영향

웅성 토끼(체중 3~4 kg)의 이정맥에서 혈액을 채취한 후 혈액 1/10 용적의 3.8% sodium citrate를 처치하고, 1,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 platelet-rich plasma (PRP)를 분리하였다. 자동혈구계산기(Coulter STKS, Coulter CO. USA)를 이용하여 PRP의 혈소판 개수는 2~3×10⁵/µl로 조절하였다. PRP 450 µl에 회석액, GC-rhEPO 70, 700 IU/ml을 10 µl씩 가하고 3분후에 ADP (3×10⁻⁷~3×10⁻⁵ M) 50 ml를 가하여 ADP에 의한 농도 의존적인 혈소판 응집을 aggregometer(Platelet Aggregation Chromogenic Kinetics System, Helena Laboratories, USA)를 이용하여 측정하였다.

신경-근 표본에 미치는 영향

랫드를 경추탈골 후 회복하고 흉곽을 열어 좌측 phrenic nerve가 부착된 상태로 횡격막을 적출하고 Krebs's 용액이 든 장기수조에 현수하였다. Phrenic nerve를 0.2 Hz, 0.5 ms 동안 20 V로 자극하며 muscle twitch가 나타나면 그 상태로 30분간 안정화시켰다. 이후 회석액, GC-rhEPO 70, 700, 7,000 IU/kg을 누적적으로 적용하며 약물투여전과 투여 후 수축력의 변화를 조사하였다. 대조약물로는 succinylcholine (10⁻⁵, 10⁻⁴ M)을 적용하였다.

뇨량 및 전해질 배설에 미치는 영향

웅성 SD rat(체중 200~250 g)를 5 마리씩 5 군으로 나누어 약물투여 18 시간 전에 절식시키고 약물투여 2 시간전에 절수시켰다. 회석액, GC-rhEPO 70, 700, 7,000 IU/kg을 정맥투여하고 투여직후 2.5 ml/100 g의 생리식염

Table 1. Effects of GC-rhEPO on general behavior in mice

Treatment	Control															
	70				700				7,000							
Time (hour)	.25	.5	1	2	4	.25	.5	1	2	4	.25	.5	1	2	4	
1. Catalepsy	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
2. Tremor	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
3. Exophthalmos	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
4. Piloerection	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
5. Salivation	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
6. Lacrimination	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
7. Diarrhea	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
8. Skin coloration	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
9. Biting activity	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
10. Pinna reflex	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
11. Abdominal tone	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12. Tail elevation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13. Righting reflex	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14. Eye lids	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15. Death	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Each number represents the number of positive/the total number tested (1-10), the man scores of Irwin *et al.*, (1968) from 0 to 8 (11-14) and the number of animals (15).

수를 경구 투여한 후 대사 케이지에서 8시간동안 뇨를 채취하여 뇨량, creatinine, pH 및 배출되는 전해질(K⁺, Na⁺, Cl⁻)의 총량을 구하였다. 양성 대조 약물로는 acetazolamide(30 mg/kg)을 경구투여하였다.

통계처리

모든 실험결과는 mean±SEM으로 표현하였으며 대조군과 처치군의 평균값 차이는 경우에 따라 ANOVA test, Dunnett's test, student t-test로 검증하여 p<0.05인 경우 통계학적 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

일반행동에 미치는 영향

대조군 및 GC-rhEPO 70, 700, 7,000 IU/kg 투여군에서 투여후 4 시간까지 Irwin 등 (1968)의 방법에 의하여 일반행동을 관찰하였으나, 특이한 행동 및 증상이 관찰되지 않았다(Table I).

중추신경계에 미치는 영향

자발운동에 미치는 영향

대조군 및 GC-rhEPO 투여군에서 시간이 지남에 따라 전반적으로 자발 운동량의 감소가 관찰되었으나 대조군과 약물투여군과의 통계적으로 유의성은 관찰되지 않았다. Caffeine 투여군은 투여 후 15 분과 30 분, 1시간에 대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 운동량의 증가가 관찰되었고 2시간 및 4시간에서 회복되었다. Chlorpromazine 투여군에서는 여 후 15 분과 30 분, 1시간 및 2시간에서 대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 운동량의 감소가 4 시간에서 회복되었다(Table II).

운동협조능(rota-rod test)에 대한 영향

대조군과 GC-rhEPO 투여군에서 근육 운동협조성의 상실이 관찰되지 않았으나 양성 대조군인 chlorpromazine 투여군은 대조군 및 GC-rhEPO 투여군에 비하여 투여 후 1 시간까지 현저한 근육운동 협조성의 상실을 유발하였고 약

Table III. Effects of GC-rhEPO on motor function in mice

Treatment	No. of mice that fell down					
	Before	15 min	30 min	1 h	2 h	4 h
Control	0	0	1	1	0	1
GC-rhEPO (IU/kg)	70	0	0	1	0	0
	700	0	0	1	0	0
	7000	0	0	0	0	0
Chlorpromazine	1 (mg/kg)	0	8*	8*	6*	2

*p<0.05, compared to control (n=10).

Table IV. Effects of GC-rhEPO on writhing syndrome induced by acetic acid in mice

Treatment	No. of writhing syndrome	
Control	24.6 ± 1.65	
GC-rhEPO (IU/kg)	70	24.4 ± 2.00
	700	22.3 ± 2.19
	7000	24.2 ± 1.97
Acetaminophen	30 mg/kg	16.3 ± 1.86*

Each values represent the mean ± SEM.

*p<0.05, compared to control (n=10).

물투여 2시간 이후에는 회복되었다(Table III).

진통작용에 대한 영향

GC-rhEPO 투여군에서 acetic acid에 의해 유발된 writhing syndrome의 수는 대조군과 비교시 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 반면, 양성대조약물인 acetaminophen 투여군에서 writhing syndrome의 감소가 관찰되었다(Table IV).

항경련 작용에 대한 영향

GC-rhEPO 투여군에서 strychnine에 의한 경련유발시간 및 지속시간은 대조군과 비교시 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 반면, 양성대조약물인 phenobarbital sodium

Table II. Effects of GC-rhEPO on spontaneous motor activity in mice

Treatment	Activity (% of prevalue)					
	15 min	30 min	1 h	2 h	4 h	
Control	78.6 ± 15.4	41.8 ± 9.7	61.8 ± 16.4	60.0 ± 13.0	50.9 ± 12.9	
GC-rhEPO (IU/kg)	70	75.3 ± 14.5	52.9 ± 9.6	48.4 ± 7.80	42.9 ± 9.5	43.7 ± 5.9
	700	74.1 ± 10.6	40.7 ± 7.7	61.9 ± 10.7	40.9 ± 6.6	31.8 ± 7.1
	7000	71.0 ± 10.6	38.3 ± 8.3	40.9 ± 5.20	49.3 ± 10.5	30.4 ± 5.4
Caffeine	5 mg/kg	164.2 ± 25.3**	126.9 ± 16.5**	109.6 ± 14.0*	70.5 ± 13.9	70.9 ± 9.1
Chlorpromazine	1 mg/kg	1.61 ± 1.28**	0**	1.64 ± 0.95**	12.6 ± 7.10**	56.4 ± 3.10

Each values represent the mean ± SEM. *p<0.05, **p<0.01 compared to control (n=10).

Table V. Effects of GC-rhEPO on strychnine-induced convulsions and death time in mice

Treatment	Control	GC-rhEPO (IU/kg)			Phenobarbital (30 mg/kg)
		70	700	7000	
Induction time (sec)	48.4 ± 2.98	42.3 ± 2.08	46.7 ± 4.27	45.4 ± 3.23	66.8 ± 7.99*
Death time (sec)	62.2 ± 3.99	57.0 ± 2.80	61.5 ± 4.79	59.6 ± 3.99	90.9 ± 8.33*

Each values represent the mean ± SEM, *p<0.05, compared to control (n=10).

Table VI. Effects of GC-rhEPO on thiopental induced sleeping time 투

Treatment		Induction time (sec)	Duration (min)
Control		156 ± 16.4	88.8 ± 26.1
GC-rhEPO (IU/kg)	70	153 ± 15.9	75.3 ± 24.3
	700	168 ± 20.8	130 ± 24.7
	7000	135 ± 14.4	178 ± 50.7
Chlorpromazine	15 mg/kg	92.0 ± 4.78*	325 ± 0.48*

Each values represent the mean ± SEM (n=10).

*p<0.05, compared to control.

여군에서 경련유발시간 및 사망시간이 대조군에 비해 연장됨을 관찰할 수 있었다(Table V).

Thiopental sodium에 의한 수면시간에 미치는 영향

수면지속시간의 경우 대조군과 비교시 GC-rhEPO 투여군은 농도 의존적으로 증가되는 양상을 보였으나 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 양성대조군인 chlorpromazine을 투여한 경우 수면유도시간은 단축되었으며 수면지속시간은 증가됨을 관찰할 수 있었다(Table VI).

체온에 대한 영향

모든 군간 체온변화를 비교하기 위하여 one-way ANOVA test를 실시하고 유의한 F 값이 발견된 경우 유의수준 p<0.05로 Dunnett's t-test를 이용하여 비교하였다. 투여전의 체온과 비교 시 대조군 및 GC-rhEPO 투여군에서 통계적으로 유의한 체온의 변화를 관찰할 수 없었으나 양성 대조군인 aminopyrine 투여군의 경우 투여전에 비하여 투여 후 1 시간 및 2 시간에서 유의한 체온의 감소를 보였다(Table VII).

Table VII. Effects of GC-rhEPO on body temperature change in SD rats

Treatment	Control	GC-rhEPO (IU/kg)			Aminopyrine 50 mg/kg
		70	700	7000	
Before	38.4 ± 0.19	38.5 ± 0.19	38.2 ± 0.13	38.3 ± 0.10	38.6 ± 0.10
15 min	38.2 ± 0.18	38.5 ± 0.13	38.2 ± 0.15	38.3 ± 0.11	38.5 ± 0.08
30 min	38.4 ± 0.13	38.4 ± 0.10	38.2 ± 0.18	38.4 ± 0.07	38.5 ± 0.09
1 hour	38.7 ± 0.12	38.7 ± 0.13	38.5 ± 0.15	38.3 ± 0.12	38.2 ± 0.13*
2 hour	38.9 ± 0.08	39.1 ± 0.19	38.8 ± 0.23	38.3 ± 0.16	38.2 ± 0.17*
4 hour	38.7 ± 0.10	39.2 ± 0.18	38.7 ± 0.37	38.2 ± 0.23	38.1 ± 0.24

Each values represent the mean ± SEM. *p<0.05, compared to before (n=10).

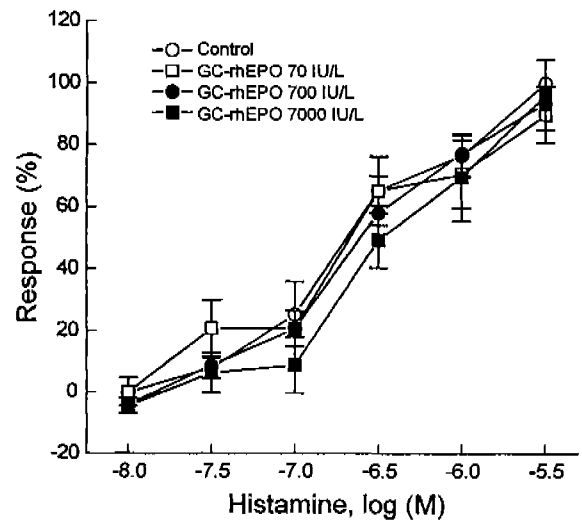


Fig 1. Concentration-response curves of histamine-induced contraction in the isolated ileum of guinea pig after GC-rhEPO pretreatment. Error bars indicate standard error of means. EC₅₀ was obtained by nonlinear curve fitting with sigmoidal Boltzman equation. Values of EC₅₀ are 1.9 × 10⁻⁷ M (Vehicle), 3.72 × 10⁻⁷ M (70 IU/L), 2.82 × 10⁻⁷ M (700 IU/L) and 4.79 × 10⁻⁷ M (7,000 IU/L).

자율신경계에 미치는 영향

기니픽 적출회장에 대한 작용

기니픽 적출회장에서 histamine에 의해 유발되는 수축반응의 EC₅₀은 대조군에서 1.9 × 10⁻⁷ M, GC-rhEPO 70, 700, 7,000 IU/L 투여군에서는 3.72 × 10⁻⁷ M, 2.82 × 10⁻⁷ M, 4.79 × 10⁻⁷ M으로 histamine 용량에 따른 회장 평활근의 수축정도는 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 1).

Table VIII. Effects of GC-rhEPO on the intestinal propulsion in mice

Treatment	Relative motility
Control	0.45 ± 0.052
GC-rhEPO (IU/kg)	
70	0.54 ± 0.037
700	0.63 ± 0.032
7000	0.47 ± 0.034
Atropine sulfate (10 mg/kg)	0.29 ± 0.07*

Each values represent mean ± SEM (n=10).

소화기계에 미치는 영향

장관수송능에 미치는 영향

대조군과 GC-rhEPO 투여군에서 소장 길이 대비 이동을 측정 한 결과, 대조군과 비교하여 GC-rhEPO 투여군의 장관수송능은 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. Atropine sulfate(10 mg/kg) 투여군에서는 대조군에 비하여 유의한 감소가 관찰되었다(Table VIII).

위액분비에 미치는 영향

Shay 등(1954)의 방법으로 위액을 채취하여 위액부피, pH, 산도를 구하여 비교한 결과 GC-rhEPO 투여군은 위액량, pH, 산도 등에서 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다(Table IX).

순환기계에 미치는 영향

혈압 및 심박수에 미치는 영향

Ketamine과 xylazine으로 마취한 토끼에서 acetylcholine, epinephrine, 회석액, GC-rhEPO 70, 700, 7,000 IU/kg을 주입하였을 때 대조군 및 GC-rhEPO 투여군에서는 혈압 및 심박수의 변화를 관찰할 수 없었으나 양성대조물인 acetylcholine이나 epinephrine에 의해서는 현저한 혈압의 변화가 관찰되었다(Fig. 2). 대조군과 GC-rhEPO 투여군에서 혈압의 변화는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았으나 양성 대조약물인 actylcholine의 경우 수축기 및 확장기 혈압모두 감소를 보였고 epinephrine의 경우 수축기 및 확장기 혈압에서 혈압의 증가를 보였다(Fig. 3). 심박수는 대조군에 비하여 GC-rhEPO 투여군에서 통계적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았으나 양성 대조약물인 epinephrine을 적용하였을 때 맥박수의 현저한 감소를 관찰할 수 있었다. 반면, acetylcholine 투여군에서는 맥박수의 감소가 관

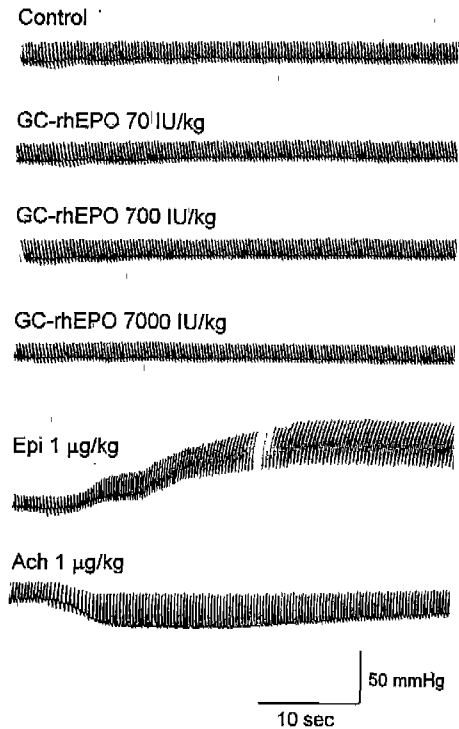


Fig 2. Representative traces showing the changes in blood pressure and heart rate after the intravenous treatment of acetylcholine (1 µg/kg), epinephrine (1 µg/kg) and GC-rhEPO in an anesthetized rabbit.

찰되었으나 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다 (Table X).

호흡기계에 미치는 영향

호흡수에 미치는 영향

Ketamine과 xylazine으로 마취한 토끼에서 GC-rhEPO를 투여한 후, 대조군과 GC-rhEPO 투여군에서 호흡수의 변화는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 11).

혈액응고계에 미치는 영향

혈액응고에 미치는 영향

GC-rhEPO를 투여한 마우스 혈장의 APTT(activated partial thromboplastin time)와 PT(prothrombin time)를 측정 한 결과, GC-rhEPO 투여군에서 APTT나 PT 모두 대

Table IX. Effects of GC-rhEPO on amount, pH and acidity of gastric juice

Treatment	Control	GC-rhEPO (IU/kg)		
		70	700	7000
Amount of gastric juice (ml/100g)	6.29 ± 0.533	7.37 ± 0.428	5.29 ± 0.892	6.46 ± 0.991
pH	1.90 ± 0.296	1.71 ± 0.169	1.49 ± 0.054	1.85 ± 0.185
Acidity (Eq/100g*h)	66.6 ± 12.90	81.3 ± 13.09	61.9 ± 9.13	68.1 ± 13.90

Each values represent mean ± SEM (n=7~10).

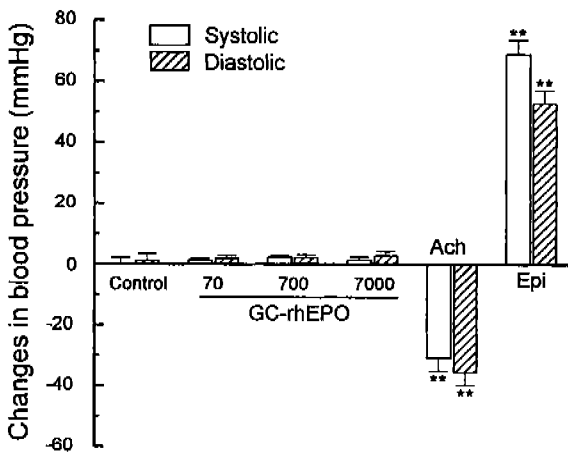


Fig 3. Effects of GC-rhEPO on blood pressure. Error bars indicate standard error of means of 5~8 experiments. ****p<0.01**

Table X. Effects of GC-rhEPO on pulse rate in rabbits

Treatment	Relative pulse rate
Control	0.99 ± 0.003
GC-rhEPO (IU/kg)	
70	1.00 ± 0.003
700	0.99 ± 0.008
7000	1.00 ± 0.004
Acetylcholine 1 µg/kg	0.92 ± 0.035
Epinephrine 1 µg/kg	0.85 ± 0.045*

Each values represent mean ± SEM (n=5~9).

Table XI. Effects of GC-rhEPO on respiration rate in rabbits

Treatment	Relative respiration rate
Control	1.02 ± 0.047
GC-rhEPO (IU/kg)	
70	1.05 ± 0.031
700	1.06 ± 0.053
7000	0.98 ± 0.022

Each values represent mean ± SEM (n=6).

조건과 비교시 통계적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았다 (Table XII).

혈소판 응집에 미치는 영향

GC-rhEPO를 투여한 토끼의 혈액으로부터 분리한 혈소판의 ADP 농도와 혈소판 응집반응의 정도는 회색액 및 GC-rhEPO에 의해 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 4). 여기서, 예상 임상 투여용량이 70 IU/kg을 감안할 때 70 IU/ml이나 700 IU/ml도 매우 높은 농도이기 때문에 7,000 IU/ml 용량은 실험에서 제외하였다.

신경-근 표본에 미치는 영향

GC-rhEPO에 의해 유발되는 muscle twitch의 정도는 대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다

Table XII. Effects of GC-rhEPO on the activated partial thromboplastin time and prothrombin time

Treatment	APTT (sec)	PT (sec)
Control	39.8 ± 3.95	11.2 ± 0.70
GC-rhEPO (IU/kg)		
70	45.2 ± 6.62	11.8 ± 0.42
700	41.7 ± 6.42	10.6 ± 0.44
7000	50.1 ± 2.95	10.4 ± 0.34

Each values represent mean ± SEM (n=6~10).

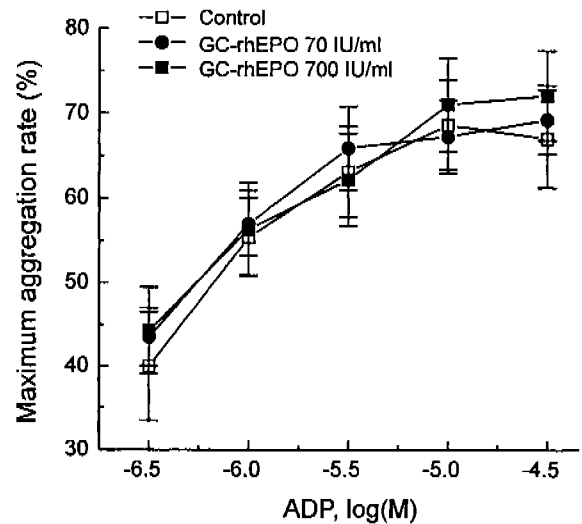


Fig 4. Concentration-response curves of adenosine diphosphate-induced aggregation in platelet-rich plasma of rabbit after pretreatment of vehicle, GC-rhEPO 70 IU/ml and 700 IU/ml. Error bars indicate standard error of means of 5 experiments.

Table XIII. Effects of GC-rhEPO on the neuromuscular response induced by electrical stimulation of phrenic nerve

Treatment	Muscle twitch (%)
Control	103 ± 2.91
GC-rhEPO (IU/L)	
70	99.9 ± 1.11
700	95.7 ± 3.00
7000	92.6 ± 3.96
Succinylcholine 10 ⁻⁵ M	40.8 ± 5.77**
10 ⁻⁴ M	1.50 ± 1.48**

Each values represent mean ± SEM (n=5).

나 양성대조약물인 succinylcholine 투여군에서는 농도 의존적으로 twitch의 크기가 감소되었다. 또한 succinylcholine에 의한 twitch감소는 시간이 지나면서 회복되었다(Table XIII).

노량 및 전해질 배설에 미치는 영향

GC-rhEPO 70, 700, 7,000 IU/kg을 정맥투여하고 8시간 후에 채취한 노량, 뇨중 creatinine량, pH 및 배출되는

Table XIV. Effects of GC-rhEPO on amount of secreted urine, pH, creatinine and total amounts per hour of urinary electrolytes (Na⁺, Cl⁻, K⁺)

Treatment	Control	GC-rhEPO (IU/kg)			Acetazolamide (30 mg/kg)	
		70	700	7000		
Amount of urine (ml/kg)	14.7 ± 2.10	18.8 ± 1.65	24.3 ± 5.11	13.4 ± 3.06	48.9 ± 3.57*	
Creatinine (mg/dl)	32.1 ± 1.53	36.3 ± 6.24	32.0 ± 8.29	45.0 ± 7.69	16.0 ± 2.02*	
pH	5.88 ± 0.10	5.75 ± 0.16	5.92 ± 0.31	6.27 ± 0.14	8.82 ± 0.03*	
Amounts of electrolyte secretion (Eq/kg*hour)	Na ⁺	343 ± 58.8	482 ± 25.3	7191 ± 37.7	435 ± 26.7	1345 ± 76.9*
	Cl ⁻	394 ± 39.2	534 ± 36.8	7691 ± 40.8	514 ± 36.5	701 ± 49.7
	K ⁺	191 ± 12.4	231 ± 36.9	190 ± 38.4	234 ± 25.7	630 ± 184.2*

Each values represent the Mean ± SEM, *p<0.05, compared to control (n=5).

전해질(K⁺, Na⁺, Cl⁻)의 총량은 대조군과 비교시 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 그러나, 양성대조군인 acetazolamide에 의해 뇨량 및 pH의 증가 및 creatinine 농도의 감소가 관찰되었다. GC-rhEPO 투여군에서 단위시간당 배출되는 전해질의 총량도 대조군과 비교시 유의한 차이를 보이지 않았으나, 양성대조약물인 acetazolamide 투여군에서 Na⁺ 및 K⁺의 배출증가가 관찰되었다(Table XIV).

고 찰

본 연구에서는 (주)녹십자에서 개발중인 적혈구조혈제 GC-rhEPO의 조혈작용이외의 특이한 약리작용 혹은 부작용의 가능성을 조사하기 위하여 마우스, 랫드, 토끼, 기니픽에 GC-rhEPO를 70, 700, 7,000 IU/kg을 정맥투여하고 일반행동, 중추신경계, 자율신경계, 소화기계, 순환기계, 호흡기계, 신경-근연접부, 뇨량 및 전해질에 미치는 영향을 조사하였다.

GC-rhEPO는 마우스의 일반행동, 자발운동량, 운동협조능, 진통작용, strychnine에 의해 유발되는 경련, 랫드의 체온등에 영향을 미치지 않았다. 마우스에서 thiopental 유도수면시간의 경우(Table VI), 고농도투여군(700 및 7,000 IU/kg)에서 대조군에서 보다 수면시간이 증가되는 경향을 보였으나, 통계적으로 유의성은 없었다. 이러한 결과를 종합해 볼 때 GC-rhEPO는 중추신경계의 기능에 유의성있는 영향은 미치지 않을 것으로 판단된다.

GC-rhEPO는 기니픽 적출회장의 histamine 유도 수축운동, 마우스 장관의 수송능 및 위액분비량에도 유의성있는 영향을 미치지 않았다. 따라서, GC-rhEPO는 자율신경계 및 소화기계의 정상적인 기능에 유의성있는 작용을 갖지 않을 것으로 여겨진다.

마취된 토끼에 GC-rhEPO를 정맥투여하며 측정된 혈압은 회석용매만을 투여한 대조군의 혈압변화와 다르지 않았으며, 심박수도 약물투여군과 대조군간의 유의성있는 차이가 보이지 않았다. GC-rhEPO를 투여받은 토끼의 혈액의 혈액응고시간(activated partial prothrombin time, prothrombin

time)과, ADP에 의한 혈소판응집반응에서도 회석액 투여대조군과 GC-rhEPO 투여군간의 유의성있는 차이가 관찰되지 않았다. 따라서 GC-rhEPO는 심맥관계 및 혈구응집에도 유의성있는 영향을 미치지 않을 것으로 판단된다.

신경-근 표본에서는 신경자극에 반응하여 acetylcholine을 매개로 한 정보전달이 일어나고 그 결과 골격근의 수축이 일어난다(Ganong, 1991). GC-rhEPO는 신경근 표본의 근육수축에도 유의성있는 영향을 미치지 않아, 신경-근연접부에 대한 특이적인 부작용은 없을 것으로 보인다.

신장기능에 대한 GC-rhEPO의 작용을 조사하기 위하여 뇨량 및 pH, 뇨중 creatinine과 3종의 전해질을 측정하였는데 이중 어느 조사항목에서도 대조군과 GC-rhEPO투여군간에 유의성있는 차이가 관찰되지 않았다. 다만, 전해질 가운데 Na⁺과 Cl⁻는 대조군보다 GC-rhEPO 투여군에서 높은 경향을 보였으나(Table XIV), 용량 의존성이나 통계학적인 유의성은 보이지 않았다. 김 등(1996)은 고용량의 EPO(7,000 IU/kg)를 투여한 랫드에서 뇨량이 증가됨을 보고하였으나, 본 연구에서는 그러한 현상이 관찰되지 않았다.

지금까지 알려진 EPO의 부작용으로는 말기 신부전환자의 혈압을 증가시킨다는 점이다(Eschbach과 Adamson, 1989; Abraham과 Macres, 1991; Korbet, 1993)). EPO에 의한 혈압 상승은 EPO가 신장동맥혈관을 수축시키거나(Heidenreich 등, 1994), 신장에서 angiotensin II의 유리 증가 및 Na⁺ 전류와 관련이 있을 것으로 알려졌다(Brier 등, 1993). 그러나, 본 연구에서 GC-rhEPO는 정상위의 혈압에는 영향을 미치지 않았고 뇨량이나 전해질의 배설량도 감소되지 않았다.

결론적으로 GC-rhEPO에 대한 이상의 일반약리 시험결과로부터 GC-rhEPO가 적혈구 조혈작용이외의 다른 특이적인 약리작용이나 혹은 부작용은 유발하지 않을 것으로 판단된다.

참고문헌

Abraham, P. A. and Macres M. G. (1991). Blood pressure in

- hemodialysis patients during amelioration anemia with erythropoietin. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2**, 927-936.
- Brier M. E., Bunke C. M., Lathon, P. V., and Arnoff G. R. (1993). Erythropoietin-induced antinatriuresis mediated by angiotensin II in perfused kidneys. *J. Am. Soc. Nephrol.* **3**, 1583-1590.
- Davis, J. M., Arakawa, T., Strckland, T. W. and Yphantis, D. A. (1987). Characterization of recombinant human erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cells. *Biochemistry*. **26**, 2633-2638.
- Dunham, N. W., Miya, T. S. and Edwards, C. D. (1957). Pharmacological activity of a series of basic esters mono- and dialkyl malonic acid. *J. Am. Pharm. Assoc.* **46**, 208-209.
- Eschbach, J. W. and Adamson, J. W. (1989). Guidelines for recombinant human erythropoietin (RHUEPO) in humans. *Cancer Surv.* **9**, 167-167.
- Fisher, J. W. (1997). Erythropoietin: Physiologic and pharmacologic aspects. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **216**, 358-369.
- Ganong, W. F. (1997). Neuromuscular transmission. *In Review of medical physiology 18th ed.* W. F. Ganong, Ed., pp. 107-110. Appleton & Lange, Stamford.
- Gill, M. L. and Anderson, J. L. (1993). Erythropoietin-induced hypertension without raising hematocrit. *Nephrol. Dial. Transplant.* **8**, 1264-1266.
- Heidenreich, S., Rahn, K. H., and Zidek, W. (1991). Direct vasopressor effect of recombinant human erythropoietin on renal resistant vessels. *Kidney Int.* **39**, 259-265.
- Irwin, S. (1968). Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. *Psychopharmacologia (Berl.)*. **13**, 222-257.
- Jacobs, K., Shoemaker, C., Rudersdorf, R., Neil, S. D., Kaufman, R. J., Muffson, A., Seehra, J., Jones, S. S., Hewick, R., Fritsch, E. F., Kawaita, M., Shimizu, T. and Miyake, T. (1985). Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature*. **313**, 806-810.
- Korbet, S. M. (1993). Anemia and erythropoietin in hemodialysis and continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Kidney Int.* **43(Suppl 40)**, 111-119.
- Koury, S. T., Bondurant, M. and Koury, M. J. (1988). Localization of erythropoietin synthesizing cells in urine kidneys by in situ hybridization. *Blood*. **71**, 524-527.
- Lai, P. H., Everett, R., Wang, F. F., Arakawa, T. and Goldwasser, E. (1986). Structural characterization of human erythropoietin. *J. Biol. Chem.* **261**, 3116-3121.
- Lin, F. K., Suggs, S., Lin, C. H., Browne, J. K., Smalling, R., Egrie, J. C., Chen, K. K., Fox, G. M., Martin, F. and Wasser, Z. (1985). Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 7850-7854.
- Miyake, T., Kung, C. K. H. and Goldwasser, E. (1977). Purification of human erythropoietin. *J. Biol. Chem.* **252**, 5558-5564.
- Shay, H., Sun, D. C. and Gruenstein M. (1954). A quantitative method for measuring spontaneous gastric secretion in the rat. *Gastroenterology*. **26**, 906-913.
- Sowade, B., Sowade, O., Mocks, J., Franke, W. and Warnke, H. (1998). The safety of treatment with recombinant human erythropoietin in clinical use: A review of controlled studies. *Int. J. Mol. Med.* **1**, 303-314.
- Wide, L., Bengtsson, C. and Birgegard, D. (1988). Circadian rhythm of erythropoietin in human serum. *Br. J. Hematol.* **72**, 85-90.
- 김동환, 안병옥, 손분호, 신명수, 이성희, 김원배, 양중익 (1996). Recombinant human erythropoietin (DA-3285)의 효력 및 일반약리작용. *응용약물학회지* **1**, 68-77.