

유전자 재조합 Human Growth Hormone의 성장촉진 효과에 관한 연구

정요찬¹ · 송동호² · 조명행^{1*} · 구본훈³ · 정광희³ · 김경연³ · 정경환³ · 이은경³ · 박두홍³

¹서울대학교 수의과대학, ²(주) 녹십자, ³목암생명공학연구소

Growth Effects of Recombinant Human Growth Hormone

Yo Chan JEONG¹, Dong Ho SONG², Myung Haing CHO^{1*}, Bon Heun KOO³,
Kwang Hoe CHUNG³, Kyeong Yeon KIM³, Kyung Hwan JUNG³,
Eun Kyung LEE³ and Doo Hong PARK³

¹College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea.

²Korea Green Cross Corp., Seochoku, Seoul 137-707, Korea.

³Mogam Biotechnology Research Institute, Yongingun, Kyunggido, Korea.

(Received September 7, 1995; accepted September 19, 1995)

Abstract-- The growth effects of newly developed recombinant human growth hormone (rHGH), were compared with those of Biotropine. For the effective evaluation, we examined the increasing rate of body weight and the thickness of tibial epiphysis as criteria of growth effects on hypophysectomised female rats treated with varying concentration of rHGH for 4 days. rHGH treated groups showed significant body weight gain which was less evident in Biotropine and vehicle treatment group. In tibial epiphyseal test, rHGH also showed clear effects compared to Biotropine and vehicle treatment group. Above findings indicate that newly developed rHGH has better effects of growth stimulation on female rats than Biotropine does.

Keywords □ recombinant human growth hormone (rHGH), hypophysectomy, body weight gain, tibial epiphyseal test

뇌하수체를 제거한 랫드에 성장호르몬을 투여하면 골단 형성이 촉진되고 체중이 증가한다는 것은 이미 잘 알려진 사실로서 성장호르몬은 뇌와 눈을 제외한 거의 모든 체내 조직장기의 세포 증식을 촉진시킴으로써 골 성장과 골격근 등의 균형 잡힌 성장을 촉진시킨다(Smith, 1930; Walker 등, 1950). 성장호르몬은 초기에는 뇌하수체 기능 부전성 왜소증(Hypopituitary dwarfs), 성장속도 지연(Growth retardation), 골연령 지연(Delayed bone growth), 혈중 Insulin-like Growth Factor-1 농도가 비정상적으로 낮은 경우 등으로 인하여 성장장애를 나타내는 어린이 등의 환자에게만 제한적으로 사용하였다. 그러나 정상 어린이 또는 다른 원인으로 인해 왜소한 어린이에서도 상당한 성장반응을 나타냄이(Van Vliet 등, 1983) 확인되어 현재는 정상어린이에서도 성장장애를

치료할 목적으로 많이 사용되고 있다. 과거에는 고도로 정제된 사람의 뇌하수체 성장호르몬(HGH)을 사용하였으나 치명적인 퇴행성 신경질환을 일으키는 Creutzfeldt-Jakob 바이러스가 오염될 수 있는 위험성 때문에 1985년 중반 이후로는 사용되지 않았으며, 현재는 유전자 재조합 기법으로 만들어진 제재를 주로 사용하고 있다. Martial 등(1979)에 의해 개발된 초기의 유전자 재조합 성장호르몬은 HGH의 N-terminal에 methionine이 첨가된 것으로서 강한 항원성으로 인해 장기간 반복 사용을 하지 못하는 단점이 있었으나 현재는 새로운 기법을 응용하여 methionine을 제거하여 줌으로써 HGH와 동일한 구조를 지녔으나 부작용을 감소시키고 효능을 한층 증진시킨 성장호르몬이 개발되어 이용되어지고 있다. 금번에 개발한 (주)녹십자의 유전자 재조합 성장호르몬 역시 이러한 류의 성장호르몬으로서 이의 효과를 평가하고자 본 연구를 수행하였다. 이의 효율적인 평가를 위하여 Gay의

*To whom correspondence should be addressed.

Transauricular hypophysectomy 방법(Gay, 1967)으로 뇌하수체를 제거한 hypophysectomised rat를 대상으로 (주)녹십자의 유전자 재조합 Human Growth Hormone (rHGH)과 대조물질인 미국 Bio Technology General Corp.의 바이오토프린(Biotropine)에 대하여 유럽약전(E. P.)에 기재된 시험법에 따라 체중 증가와 골단 두께를 성장지표로 이용하여 각각의 물질에 대해 성장촉진 효과를 검증하였다(European Pharmacopoeia, 1987; Bingham 등, 1985).

재료 및 방법

시험물질의 조제 및 투여

본 시험에 사용한 시험물질인 유전자 재조합 Human Growth Hormone(rHGH)은 (주)녹십자로부터 공급받았고 약물투여 48시간 전에 Biuret 방법으로 단백질을 정량하고(Layne, 1957), Radioreceptor assay 방법(Tsushima 등, 1980)을 WHO표준품을 대상으로 실시하여 역가를 확인하였으며, 대조물질로는 Biotropine (Bio Technology General Corp., U.S.A.)을 사용하였다. 각 투여물질은 50 mM sodium chloride가 첨가된 20 mM phosphate buffer(pH 8.0)를 vehicle로 이용하여 필요한 농도로 희석시켜 사용하였다. 실험동물 서울대학교 실험동물 사육실에서 3주령의 암컷 Sprague-Dawley 랫드를 분양 받아 7일간 실험실 환경에 적응시킨 후 시험에 사용하였다. 시험 전 과정에서의 사육실의 환경 조건은 온도 $20 \pm 1.5^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 환기회수 12~13회/시간, 조명시간 오전 7시~오후 7시, 조도 200~300 Lux이며, 실험동물은 순화기간 및 시험기간 중에 polycarbonate cage에 4마리씩 사육하였으며 개체식별법은 피모색소를 이용한 표시법과 사육상자별의 표시법을 이용하여 실험동물의 군 분리 및 개체식별을 하였다. 사료는 (주)삼양사의 고품사료를, 물은 수돗물을 자유 섭취시켰다. 시험군의 구성 및 약물투여 건강이상유무를 확인하여 체중편차가 15g 이하인 건강한 개체만을 선택하여 ether로 마취한 후 랫드의 왼쪽 auditory canal에서 hypodermic needle을 이용하여 뇌하수체를 제거하는 transauricular method(Giovanni와 Giovanni, 1964; Gay, 1967)를 이용 뇌하수체를 제거한 뒤 15일 경과 후 체중을 측정하여 체중변동이 10% 이하인 개체만을 선발하여 각 군당 8마리의 시험군으로 군 분리를 하였다. 시험군은 E.P. 규정상의 성장호르몬 성장 촉진효과 검정 방법 A와 방법 B의 각각에 대하여 대조물질과 시험물질을 고용량군(0.16 I.U./ml)과 저용량군(0.08 I.U./ml)의 4개의 시험군과 vehicle만을 투여한 부형제 대조군의 각 5개군으로 나누었다. 약물투여는 방법 A는 각각의 투여물질을 1일 1회(10:00 A.M.) 0.5 ml씩 피하주사법으로 경부후부에 4일간 투여하였으며 방법 B는 각각의 투여물질을 1일 2회(10:00 A.M., 05:00 P.M.) 0.5 ml씩 피하주사

법으로 경부후부에 4일간 투여하였다. 골단두께 측정 방법 A에 따라 4일간 약물투여를 한 후 최종 투여 후 24시간에 모든 실험동물에 대하여 체중을 측정하고 ether 흡입마취로 치사시킨 후 두개부를 열고 뇌를 제거한 후 뇌하수체 흔적을 조사하여 흔적이 남아있는 개체는 실험에서 제외시키고 나머지 개체는 양측의 경골을 분리한 후 골단에 붙은 근육 및 지지조직을 조심스럽게 제거하고 정중시상능(Middle sagittal plane)을 따라 골단 중앙부를 절개하여 Greenspan 등(1949)의 방법에 따라 silver nitrate로 염색한 후 ocular micrometer가 장착된 입체현미경으로 골단 두께를 측정하였다.

체중증가를 측정

방법 B에 따라 약물투여 직전에 체중을 측정한 후 4일간 약물투여를 실시하고 최종투여 16시간 후에 모든 실험동물에 대하여 체중을 측정하고 마지막 투여 24시간 후에 모든 동물을 ether 흡입마취로 치사시킨 후 뇌하수체 흔적을 조사하여 역시 흔적이 남아있는 개체는 통계학적 처리에서 제외시켰다.

자료의 통계학적 해석

약물 투여 전후의 체중증가를 비교는 짝비교 검정(Paired comparisons test)으로 유의성을 검증하였고 각 군간의 체중증가와 골단두께의 비교는 Anova와 Dunnett test를 이용하여 부형제 투여군에 대하여 시험물질 투여군과 대조물질 투여군을 비교하였으며, 시험물질 투여군과 대조물질 투여군간의 비교는 Student's t-test를 이용하였다.

결 과

골단두께 측정

각 시험군의 모든 개체에서 뇌하수체 흔적은 관찰되지 않았다. 시험물질 투여군에서는 저용량군과 고용량군 모두 높은 수준의 골단 두께의 증가를 보였으며 특히 고용량군에서는 부형제 투여군에 비해 유의성 있게 골단 두께가 증가하였다. 대조물질 고용량 투여군에서는 시험물질 저용량군과 비슷한 수준의 골단 두께의 증가를 나타냈으며 저용량군에서는 다른 시험군에 비하여 부형제 투여군과 큰 차이를 나타내지 않았다. 시험물질과 대조물질 투여군과의 비교에 있어서는 유의성은 인정되지 않으나 시험물질 투여군이 대조물질 투여군에 비하여 저용량군, 고용량군 공히 높은 수준의 골단 두께의 증가를 관찰할 수 있었다(Fig. 1, Fig. 2).

체중증가의 관찰

각 시험군의 모든 개체에서 뇌하수체 흔적은 관찰되지 않았다. 투여 전후의 체중증가를 비교에 있어서는 시험물질 투여군에서는 투여 전에 비해 투여 후의 체중증가가 저용량군, 고용량군 모두에서 고도의 유의성 있게 증가하였으나, 부형제 투여군과 대조물질 저용량군에서는 투여 전후의 큰 차이를 관찰할 수 없었고 대조물질

고용량군에서는 체중증가율이 증가하였으나 유의성은 인정되지 않았다. 체중증가율의 변화에 있어서는 시험물질 투여군에서는 저용량군, 고용량군 모두에서 부형제 투여군에 비하여 고도의 유의성 있는 증가를 보였고 대조물질 투여군에서는 유의성이 인정되지 않았다. 대조물질 투여군과 시험물질 투여군간의 비교에 있어서는 저용량군은 시험물질 투여군이 대조물질 투여군에 비해 유의성 있게 높은 체중증가를 보였으며, 특히 고용량군에서는 시험물질 투여군이 대조물질 투여군에 비해 고도의 유의성 있는 체중증가를 나타내었다(Table I).

고찰

이미 오래 전에 Smith에 의해 뇌하수체를 제거한 랫드에 성장호르몬을 투여하면 골단이 성장하고 대부분의 체내 조직장기의 세포를 증식시키고 이로 인해 골격근이 비대해지고 체중이 증가한다는 사실(Smith, 1930)이 알

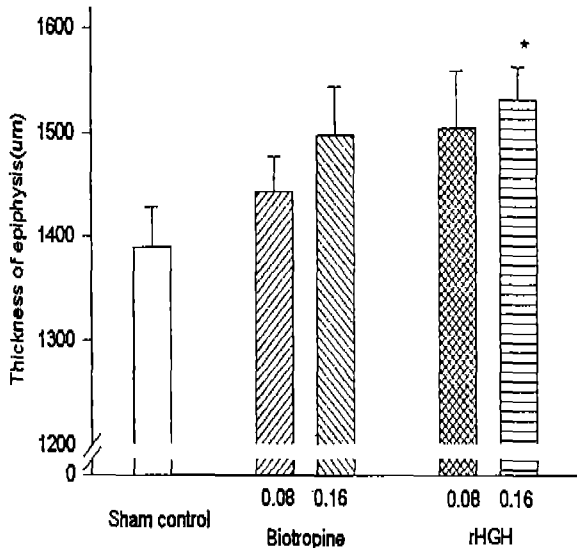


Fig. 1. Thickness of tibial epiphysis of female hypophysectomised rats after 4 days treatment. Each value represents the mean± S.D.(n=8). *Significantly different from sham control (p<0.05)

려졌고 이러한 사실을 기반으로 성장호르몬을 성장장애 치료 목적으로 많이 사용해왔다. 성장호르몬에 의한 골 성장 기전은 정확하게 확립되어 있지는 않지만 Daughday 등(1972)이 성장호르몬이 간장에서 somatomedin이라고 불리는 분자량 8000가량의 "Sulfation factor"의 체내 분비를 촉진시킴으로서 이 인자가 연골의 구성 성분인 sulfate를 연골로 들어가도록 자극하고 thymine이 DNA로 유입되는 것을 촉진시킴으로써 골 성장이 일어난다고 제안하였다. 또한 Isaksson 등(1982)과 Isgaard

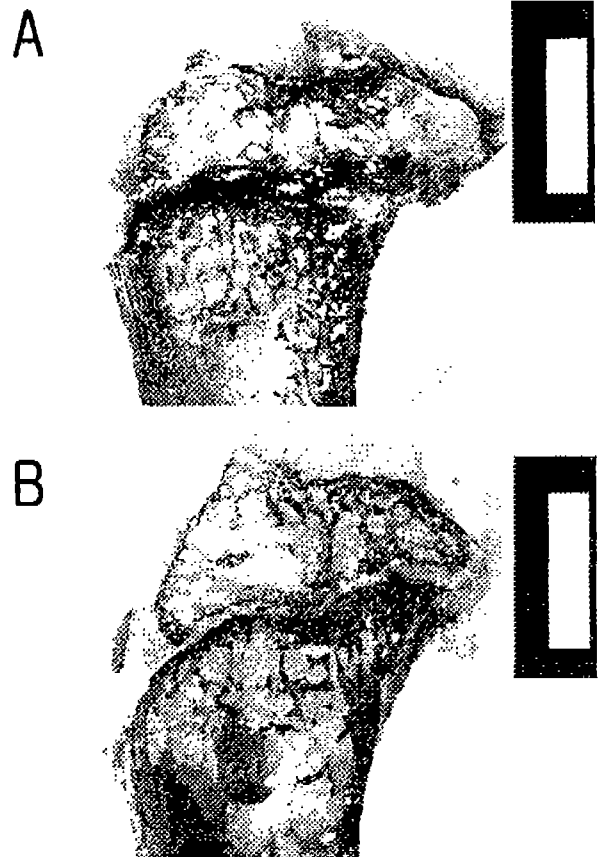


Fig. 2. Tibial epiphysis of female hypophysectomised rats after 4 days treatment (A: Sham control, B: 0.16 I.U./ml rHGH)

Table I. Increasing rate of body weight of hypophysectomised female rats

| Group | Dose (I.U./ml) | Body weight gain (%/day) | | |
|--------------|----------------|--------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| | | Before treatment (B) | After treatment (A) | A-B |
| Sham Control | 0 | 0.02± 0.13* | 0.15± 0.62 | 0.13± 0.61 |
| Biotropine | 0.08 | -0.03± 0.12 | 0.13± 0.83 | 0.16± 0.76 |
| | 0.16 | 0.13± 0.11 | 1.41± 0.72 | 1.28± 0.65 |
| rHGH | 0.08 | 0.13± 0.12 | 3.17± 0.79** ^{a,c} | 3.05± 0.69 ^{b,c} |
| | 0.16 | 0.01± 0.15 | 3.68± 0.44** ^{b,d} | 3.68± 0.38 ^{b,d} |

*Each value represents the mean± S.D.(n=8). **Very significantly different from before treatment (p<0.01) ^a Significantly different from sham control (p<0.05) ^b Very significantly different from sham control (p<0.01) ^c Significantly different from Biotropine treatment (p<0.05) ^d Very significantly different from Biotropine treatment(p<0.01)

등(1986)은 장골(Tibia)의 골단에 성장호르몬을 국소적으로 투여하여 실험한 결과를 통하여 성장호르몬이 직접적으로 골 성장에 관여한다고 주장하였으나, Schlechter 등(1986)은 이러한 성장호르몬의 직접작용은 장골에서의 국소적인 somatomedin의 생산에 의해 매개되는 것임을 확인하였다. 이러한 somatomedin은 간에서 주로 생성되는 Insulin-like Growth Factor(IGF) 1 및 2라는 polypeptide와 동일하다는 것이 후에 밝혀졌다(Froesch 등, 1985). 골격계 이외의 다른 장기나 조직에서의 성장은 조직 성장에 필요한 단백질을 증가시키고 아미노산이 조직세포내로 이동되는 과정과 단백질로 편입되는 과정을 촉진하며, 세포의 크기를 증가시키기보다는 세포의 수를 증가시키는 것으로 알려져 있다. 또한 insulin과 비슷한 작용을 나타내어 포도당의 근육내 섭취를 증가시키고 탄수화물을 당원상태로 축적시키는 등의 작용을 나타낸다. 이러한 성장호르몬의 복합적인 작용으로 체내 대부분의 장기 크기가 커지고 체중이 증가하게 되는 것으로 알려져 있다(Kuret과 Murad, 1991).

이러한 성장호르몬의 성장촉진 효과는 사람의 성장호르몬 및 유전자 재조합 성장호르몬에 대한 역가 평가 기준으로 이용되어 왔다. 초기에는 피하주사를 통한 10 일간의 체중증가를 평가기준으로 이용하였으나 최근에는 이보다 정확한 경골의 골단 및 골판 두께를 측정하여 성장지표로 이용하고 있다. 특히 Bangham 등(1985)은 뇌하수체제거 랫드에 4일간 피하주사하여 경골의 골판의 두께를 측정하여 Human Growth Hormone International Standard (HGH)에 대한 역가를 측정하였다.

본 실험에서는 유럽약전 시험법에 따라 (주)녹십자의 유전자 재조합 성장호르몬(rHGH)에 대한 성장촉진 효과를 검정하였다. 효과적인 비교를 위하여 부형제만을 동량 투여한 부형제 투여군과 Biotropine을 투여한 양성대조군을 설정하였다.

실험 결과 골단 두께의 증가에 있어서는 시험물질 투여군에서는 부형제 투여군에 비하여 높은 수준의 골단 두께의 증가를 볼 수 있었고 대조물질 투여군에서는 다소 증가하는 경향이 관찰되었으나 시험물질 투여군에 비해 미약한 수준이었고 특히 시험물질 고용량군에서는 부형제 투여군에 비해 유의성 있는 증가를 나타내었다. 이러한 양상은 체중증가를 관찰한 결과에서 더욱 두드러지게 나타났다. 먼저 약물 투여 전후의 체중증가를 비교에서는 대부분의 투여군에서 다소 증가하는 양상을 보였지만 시험물질 투여군에서 저용량군, 고용량군 모두에서 고도의 유의성 있는 체중증가를 나타냈으며, 체중증가의 변화를 관찰한 결과에서도 시험물질 투여군에서 대조물질 투여군에 비해 훨씬 높은 수준의 체중증가를 나타내었으며 부형제 투여군에 비해 유의성 및 고도의 유의성 있는 증가를 나타내었다. 체중증가의 변화를 대조물질 투여군과 시험물질 투여군간에 비교한 결과에서도 시험물질 투여군에서 유의성 또는 고도의

유의성 있는 증가를 관찰할 수 있었다. 이상의 사실을 종합한 결과 (주)녹십자의 rHGH는 뚜렷한 성장촉진 효과를 나타내며, 기존의 Biotropine보다 뛰어난 성장촉진 효과가 있는 물질로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구의 수행시 기술적 도움을 준 김기하, 이미영, 류신영 선생에게 심심한 사의를 표합니다.

참고문헌

- Bangham, D. R., Gaines Das, R. E. and Schulster, D. (1985). The international standard for human growth hormone for bioassay. *Mol. Cell. Endocrinology* **42**, 269-282.
- Brown P., Gadjusek D. C., Gibbs C. L. Jr. and Asher D. M. (1985). Potential epidemic of Creutzfeldt-Jakob disease from human growth hormone therapy. *N. Engl. J. Med.* **313**, 728-731.
- Council of Europe. (1987). Hormonum humanum incrementi ad injectabile. In *European pharmacopoeia* **556**. Maisonneuve S.A.
- Daughaday, W. H., Hall, K., Raben, M. S., Salmon, W. D., van Den Brande, J. L., van Wyk, J. J. (1972). Somatomedin: Proposed designation for sulfation factor. *Nature(London)*. **235**, 107.
- Froesch, E. R., Schmid, C., Schwander, J. and Zapf, J. (1985). Actions of insulin-like growth factors. *Annu. Rev. Physiol.* **47**, 443-467.
- Gay, V. L. A. (1967). Stereotaxic approach to transauricular hypophysectomy in the rat. *Endocrinology*, **81**, 1177-1179.
- Giovanni, F. and Giovanni, L. R. (1964). Transauricular hypophysectomy in rats and mice. *Endocrinology* **74**, 301-303.
- Greenspan, F. S., Li, C. H., Simpson, M. E. and Evans, H. M. (1949). Bioassay of hypophyseal growth hormone: the tibia test. *Endocrinology* **45**, 455-463.
- Isaksson, O. G. P., Jansson, J. O. and Gause, I. A. M. (1982). Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly. *Science* **216**, 1237-1239.
- Isgaard, J., Nilsson, A., Lindahl, A., Jansson, J. O. and Isaksson, O. G. P. (1986). Effects of local administration of GH and IGF-1 on longitudinal bone growth in rats. *Am. J. Physiol.* **250**, E367-E372.
- Kuret J. A. and Murad F. (1991). Adenohypophyseal hormone and related substances. In *The Pharmacological Basis of Therapeutics*(Gilman A. G, Rall T. W., Nies A. S. and Taylor. P. Ed.) pp. 1334-1360. Pergamon Press.
- Martial, J. A., Hallewell, R. A., Baxter, J. D. and Goodman, H. M. (1979). Human growth hormone: Complementary DNA cloning and expression in bacteria. *Science* **205**, 602-607.
- Schlechter, N. L., Russell, S. M., Spencer, E. M. and Nicoll, C. S. (1986). Evidence suggesting that the direct growth-promoting effect of growth hormone on cartilage *in vivo* is mediated by local production of somatomedin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **83**, 7932-7934.

- Smith, P. E. (1930). Hypophysectomy and replacement therapy. *Am. J. Anat.* **45**, 205-256.
- Tsushima, T., Sasaki, N., Imai, Y., Masuzaki, F. and Friesen, H. G. (1980). Characteristics of solubilized human-somatotropin-binding protein from the liver of pregnant rabbits. *Biochem. J.* **187**, 479-492.
- Van Vliet, G., Styne, D. M., Kaplan, S. L. and Grumbach, M. M. (1983). Growth hormone treatment for short stature. *N. Eng. J. Med.* **309**, 1016-1022.
- Walker, D. G., Simpson, M. E., Asling, C. W. and Evans, H. M. (1950). Growth and differentiation in the rat following hypophysectomy at 6 days of age. *Anat. Record.* **106**, 539-554.