

유전자 재조합 Erythropoietin (LB-00014)의 일반약리작용

이은방* · 이향주 · 천선아 · 조성익 · 손지영
서울대학교 천연물과학연구소

General Pharmacology of Recombinant Erythropoietin (LB-00014)

Eun Bang LEE*, Hyang Joo LEE, Seon Ah CHEON, Sung Ig CHO and Jee Young SOHN
Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea

(Received March 14, 1996; accepted June 10, 1996)

Abstract—General pharmacological properties of LB-00014, an erythropoietin which was produced by recombinant DNA technique in Biotech Research Institute, LG Chemical Ltd. were examined. The administration of LB-00014 (60, 600, 6000 IU/kg, *iv*) in mice had no effect in general behavior and central nervous system, and no influences on normal body temperature, writhing syndromes induced by 0.7% acetic acid solution and chemoshock produced by strychnine and pentetrazole solution. LB-00014 (60, 600, 6000 IU/kg, *iv*) given to anesthetized rabbits showed no effect on blood pressure of carotid artery and respiration rates, and it did not influence the responses produced by injection of acetylcholine or epinephrine. The administration of LB-00014 (60, 600, 6000 IU/kg, *iv*) in rats had no effect on the plasma prothrombin time, activated partial thromboplastin time and hemolytic action. The platelet aggregation induced by collagen in human plasma was not influenced by LB-00014 (10, 100, 1000 IU/kg, *iv*). It showed no direct effect at 100 and 1000IU/ml in isolated stomach fundus and uterus of rats and ileum of guinea-pig, and it also had no inhibition of contraction produced by acetylcholine, oxytocin, serotonin and histamine in the above-mentioned preparations. It did not influence gastric secretion, pH and acid output at 6000 IU/kg, *iv* in rats, but showed a significant increase in intestinal propulsion of mice at 6000 IU/kg, *iv*. Its administration (60, 600, 6000 IU/kg, *iv*) caused no effect on urine and electrolyte excretion in rats. These results indicate that LB-00014 does not exert any of serious pharmacological effects.

Keywords □ LB-00014, recombinant erythropoietin, general pharmacology

LB-00014는 LG화학 바이오텍연구소에서 새로운 유전자 재조합 방법에 의하여 생산한 erythropoietin(EPO)이다. EPO는 신장과 태아의 간장에서 주로 생산되어 혈액으로 유입하며 골수에 작용하고, 후기 적아구계 전구세포의 분화, 증식을 촉진하며 적혈구 생산을 조절하는 내인성 호르몬이다(Jacobson 등, 1957; Koury 등, 1987; Adamson, 1988).

이 LB-00014를 신약으로 응용할 수 있는 한 단계로서 정맥투여에 의한 일반약리작용에 관하여 검토한 바, 그 결과를 보고한다.

실험방법

실험동물

생쥐는 ICR계 수컷, 흰쥐는 Sprague-Dawley계 수컷으로서 본 연구소에서 분만시킨 동물을 사용하였다. 토끼 및 기니피그는 각각 New Zealand White계 및 Hartley계로서 시중에서 구입하여 일주일이상 본 연구소 동물실에 적응시켜 사용하였다. 동물실(22-25°C) 내의 명암은 12시간 씩으로 자동조절시켰으며, 삼양유지(주)의 사료를 급식하였고, 물은 수도수를 자유롭게 섭취토록 하였다.

시험물질

EPO원액(LB-00014)은 4×10^4 IU/ml 로 제조되었으며, 4°C에서 냉장보관하여, 사용시에 주사용 용매(140mM 염화나트륨을 함유한 인산완충액, PH 7.2)로 희석하여 사용하였다.

시약 및 기구

Collagen은 Chrono-Log Co.의 제품을, 기타시약은 Sig-

*To whom correspondence should be addressed.

ma Chem. Co.의 제품을 사용하였으며, 대조약물은 대한약전품을 사용하였다. 정상인의 혈소판농축액은 서울대병원으로부터 구입하였다.

사용한 기기로서 rotarod 시험장치 및 activity cage는 Ugo Basile사의 제품이고, 체온측정기는 Shibaura Electronics Co.의 디지털 온도계이며, 혈압 및 적출장치에 대한 작용 관찰에는 Narco Biosystems 사의 physiograph(MK-IV)를 사용하였다. 원자흡광광도계는 Instrumentation Laboratory Co.의 제품이고, Platelet counter는 Same As Manufacturer의 PLT-4를, aggregometer는 Chrono-Log Co.의 것을 사용하였다. 또한, spectrophotometer는 Phillips의 PU 8625 UV/Vis이고, pH meter는 Metrohm사의 691 pH meter이며, 원심분리기는 Hanshin Medical Co.의 HC-16 Auto Series를 사용하였다. 또 뇨검사에는 영동제약의 BIOSCAN 022를 사용하였으며, 혈액응고시간 측정에는 Baxter Diagnostics Inc.의 kit를 사용하였다.

중추신경계 및 행동에 미치는 영향

일반행동에 미치는 영향

체중 25 g 정도의 생쥐에 검체 60, 600 및 6000 IU/kg을 정맥내 투여한 다음, 15분 후에 실험용 관찰 케이지에 넣어 관찰하였다. 대조군에는 주사용 용매만을 투여하였으며, 관찰방법은 주로 Irwin(1968)의 방법에 준하여 개변한 방법(Lee, 1975)으로 실시하였다.

Hexobarbital 수면시간에 대한 작용

체중 25 g 정도의 수컷 생쥐 8마리를 1군으로 하여 hexobarbital-Na 50 mg/kg을 복강주사하여 정향반사가 상실되는 시간을 측정하였다. 검체는 hexobarbital 투여 10분전에 60, 600 및 6000 IU/kg을 정맥주사하였으며, 대조약물은 chlorpromazine을 사용하였다.

Rotarod 시험

Dunham 등(1957)의 방법원리에 따라서 실시하였다. 즉, 회전봉에서 1분 이상 건디는 생쥐를 선별한 다음, 2회 반복 훈련을 실시하고, 30분 후에 본 실험을 실시하여 1분 이내에 회전봉에서 떨어지는 생쥐를 계수하였다. 검체는 본 실험 실시 10분전에 60, 600 및 6000 IU/kg을 정맥내 투여하였으며, 대조약물로는 chlorpromazine을 사용하였다.

자발운동성

바닥에 전류가 흐르는 철봉이 있어서 생쥐의 운동에 따라 활동횟수가 기록되는 activity cage를 이용하여 Nahorski 등(1975)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 25 g 내외의 수컷 생쥐 12마리를 1군으로 하여, 2마리씩 한 cage에 넣어 30분간 적응시킨 다음, 30분 후에 검체 60, 600 및 6000 IU/kg을 정맥주사하고, 30분 동안의 자발운동성을 측정하였다. 대조약물로는 caffeine을 사용하였다.

정상체온에 미치는 영향

수컷 생쥐의 직장체온을 디지털 전자체온계로 측정하

후, 검체를 정맥주사하고, 일정시간 간격으로 체온을 측정하였다. 대조약물은 aminopyrine을 사용하여 실시하였고 1군 7마리를 사용하였다.

진통작용

Whittle(1964)의 초산에 의한 writhing 증상 억제법에 준하여 실시하였다. 즉, 체중 28 g 정도의 수컷 생쥐 8마리를 1군으로 하여 검체 60, 600 및 6000 IU/kg을 정맥주사하고 10분 후에 0.7% 초산-생리식염액 0.1 ml/10 g씩을 복강내에 주사한 다음, 10분 후부터 10분간의 writhing 증상의 발생 수를 측정하였다. 이때에 대조약물은 aminopyrine을 사용하였다.

항경련작용

Strychnine 유발 경련에 대한 작용

수컷 생쥐 8마리를 1군으로 하여 Araki 등(1972)의 방법에 따라 실시하였다. 즉, strychnine nitrate 1.5 mg/kg을 피하주사한 후 30분간의 강직성 경련에 의한 생쥐의 사망수를 계수하였다. 검체는 60, 600 및 6000 IU/kg을 경련 유발 10분 전에 정맥주사하였다.

Pentylentetrazole 유발 경련에 대한 작용

수컷 생쥐 8마리를 1군으로 하여 Swinyard 등(1952)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, pentylentetrazole 85 mg/kg을 피하주사하여 1시간 동안의 간대성 경련 유무를 관찰하였다. 검체는 60, 600 및 6000 IU/kg을 경련 유발 10분 전에 정맥내 투여하였다.

호흡 및 혈압에 대한 작용

체중 2 kg 내외의 수컷 토끼에 urethane 2 g/kg을 피하주사하여 마취시킨 뒤, physiograph와 연결된 cannula를 경동맥에 삽입하여 경동맥압(mmHg) 및 맥박수(rate/min)를 측정하였다. Cannula 내에는 헤파린-생리식염액을 채워 혈액의 응고를 방지하였다. 호흡심도(rate/min)는 bellow pneumograph를 흉부에 묶은 다음 physiograph에 연결하여 측정하였다. 검체는 귀정맥으로 주입하였다.

적출장치에 대한 작용

흰쥐 적출자궁근에 대한 작용

체중 200 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 5% CO₂, 95% O₂를 사용하였다. Resting tension은 0.5 g으로 하였다.

흰쥐 적출위절편에 대한 작용

체중 180 g 내외의 수컷 흰쥐를 24시간 절식시킨 다음, Vane(1957)의 방법에 따라 위의 fundus절편을 만들어 상기와 같은 조건하에서 실시하였다.

기니피그 적출회장에 대한 작용

24시간 절식시킨 체중 300 g 내외의 수컷 guinea pig의

회장을 상법에 의해 적출하여 상기와 같은 조건에서 실시하였다.

위장에 대한 작용

생쥐의 장관 수송능에 미치는 영향

Takagi 등(1972)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 체중 25 g 내외의 수컷 생쥐 8마리를 1군으로 하여, 검체 60, 600 및 6000 IU/kg을 정맥주사한 10분 후에 지표로서 황산바리움 현탁액(1 g/ml) 0.2 ml씩을 경구투여했다. 그 30분 후에 장관을 적출하여 유문부로부터 황산바리움의 이동거리를 전체 소장 길이의 백분율로써 나타냈다. 대조약물로는 lidocaine을 사용하였다.

위액분비에 미치는 영향

체중 200 g 내외의 수컷 흰쥐 6마리를 1군으로 하여 24시간 절식시킨 뒤, ether 마취하에서 Shay 등(1954)의 방법에 따라 유문부를 결찰하고, 4시간 후에 과량의 ether로 동물을 희생시켜 저류된 위액을 채취하였다. 채취한 위액은 3000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 위액분비량(ml), 산도($\mu\text{Eq/ml}$) 및 총산분비량($\mu\text{Eq/4 hrs}$)을 측정하였다. 산도 및 총산분비량은 phenolphthalein 지시약을 사용하여 0.05N NaOH 수용액으로 적정하여 구하였다. 검체는 60, 600 및 6000 IU/kg을 유문결찰 후에 정맥내 투여하였으며, 대조약물로는 cimetidine을 사용하였다.

이뇨작용

체중 200 g 내외의 수컷 흰쥐 6마리를 1군으로 하여, Gilman 등(1937)의 방법을 약간 개변하여 실시하였다. 즉, 하룻밤 절식시킨 흰쥐에 몸무게의 2.5%에 해당하는 양의 생리식염수를 다시 3시간 후에 몸무게의 5%에 해당하는 양의 생리식염수를 경구투여하였다. 즉시, 검체 60, 600 및 6000 IU/kg을 정맥주사하고, 5시간 동안의 뇨를 채취하였다. 채취한 뇨는 여과하여 용적을 측정하고, kit를 사용하여 케톤, 글루코스, 단백, pH, 잠혈 등을 검사하고, 원자흡광도계를 사용하여 Na^+ 및 K^+ 의 농도를 측정하였다.

혈액계에 대한 작용

혈액응고계에 대한 작용

체중 140 g 내외의 수컷 흰쥐를 1군 7마리로 하여 검체를 정맥주사한 15분 후에 심장으로부터 채혈하였다. 즉시, 혈액 용적의 1/10에 해당하는 양의 4.18% sodium citrate를 넣어(최종농도 0.38%), 3000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈장을 분리했다.

PT(prothrombin time)를 측정하기 위하여 37°C에서 가온한 혈장 100 μl 와 thromboplastin 100 μl 를 섞어 응고되기까지의 시간을 측정하였다. APTT(activated partial thromboplastin time)의 측정은 37°C에서 가온한 activated cephaloplastin reagent 100 μl 에 혈장 100 μl 를 넣어 실온에서 3분간 활성화시킨 뒤, 미리 가온한 0.02M calcium chloride 100 μl 를 첨가한 후 응고되기까지의 시간을 측정하였

다.

혈소판의 응집능에 대한 작용

정상인의 혈소판농축액을 phosphate buffer(pH 7.4)로 1.8배정도 희석한 것을 platelet-rich plasma(PRP, 혈소판수 1,565,000 count/ μl)로 하여 사용하였다. 37°C에서 5분정도 가온한 PRP 500 μl 에 검체 5 μl 를 투여한 다음, 2분간 incubation하고 혈소판 응집 야기물질인 collagen을 5 μl 씩 첨가하여 나타나는 응집반응을 aggregometer로 측정하였다. Vehicle 투여시 나타나는 최대응집반응에 대한 억제율(%)로 검체의 작용을 나타내었다.

적혈구막 저항성에 대한 작용

Parpart 등(1947)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 150 g 정도의 수컷 흰쥐 6마리를 1군으로 하여, 검체를 정맥주사한 15분 후에 전혈 2.5 ml를 채혈하고 즉시, 10% sodium citrate 100 μl 를 넣어 응고를 방지하였다. 0.2-0.6%의 식염용액(pH 7.4) 5 ml에 전혈 20 μl 씩을 첨가하여 실온에서 45분간 방치한 후, 1.6-1.2%의 식염용액 5 ml씩을 넣어 삼투반응을 중지시켰다. 각 식염용액을 1500 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액의 흡광도를 540 nm에서 측정하였으며, 0.1%의 식염용액에 15분간 반응시킨 것을 100% 용혈 현상이 일어난 것(calibration solution)으로 하였고, 용혈반응(%)은 다음 식으로 계산하였다.

$$\text{Hemolysis (\%)} = \frac{D_{\text{exp}}}{D_{100\text{percent}}} \times 100$$

$D_{100\text{percent}}$: Calibration solution의 흡광도

D_{exp} : 각 농도 혈액-식염용액의 상등액의 흡광도

통계처리

모든 실험결과는 평균치와 표준오차를 사용하여 나타내었고, 각 군간의 비교는 Student's *t*-test 및 χ^2 -test를 사용하였으며, 대조군과 비교하여 p 값이 5% 미만일 때를 통계학적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

실험결과

중추신경계 및 행동에 미치는 영향

일반행동에 미치는 영향

본 검체 60, 600 및 6000 IU/kg을 생쥐의 정맥내에 투여하였는데, 6000 IU/kg의 고용량 투여시에도 행동 프로필, 신경 프로필 및 자율신경 프로필에서의 행동이나 증상에 이상을 찾아볼 수 없었다(Table 미표시).

Hexobarbital 수면시간에 대한 작용

본결과는 Table I에 표시한 바와 같다. 검체 60, 600 및 6000 IU/kg을 정맥내 투여시에 hexobarbital 유발 수면에 아무런 영향을 미치지 않았으며, 대조약물인 chlorpromazine 1 mg/kg 투여군에서는 유의성있는 수면시간의 증가를 나타

내었다.

Rotarod 시험

본 검체 60, 600 및 6000 IU/kg의 정맥내 투여시에 아무런 영향을 인정할 수 없었으며, chlorpromazine 1mg/kg을 정맥내 투여시에는 유의성있는 영향을 미쳤다. 그 결과는 Table II와 같다.

자발운동성

Table I. Effect of LB-00014 on hexobarbital sleeping time in mice

Treatment	Dose (IU/kg, iv)	No. of animals	Sleeping time (min, M.±S.E.)
Control	-	8	10.76±1.50
LB-00014	60	8	11.44±1.07
	600	8	10.19±1.24
	6000	8	9.77±1.26
Chlorpromazine	1(mg/kg)	8	28.38±2.03*

Significantly different from the control group (*p<0.001)

Table II. Effect of LB-00014 on rotatod test in mice

Treatment	Dose (IU/kg, iv)	No. of tested mice	No. of fallen mice
Control	-	8	0
LB-00014	60	8	0
	600	8	0
	6000	8	0
Chlorpromazine	1 (mg/kg)	8	7*

Significantly different from the control group (*p<0.01 in χ^2 -test)

Table III. Effect of LB-00014 on locomotor activity

Treatment	Dose (IU/kg, iv)	No. of animals	No. of movement (M.±S.E.)
Control	-	12	678.8±98.5
LB-00014	60	12	726.1±99.4
	600	12	743.3±91.1
	6000	12	621.0±67.3
	Caffeine	5 (mg/kg)	12

significantly different from the control group (*p<0.01)

Table IV. Effect of LB-00014 on body temperature in mice.

Treatment	Dose (IU/kg, iv)	No. of animals	Body temperature (°C, M.±S.E.)				
			0	10	60	90	120 (min)
Control	-	7	37.74±0.11	37.76±0.11	37.70±0.20	37.67±0.12	37.44±0.19
LB-00014	60	7	37.71±0.07	37.79±0.12	37.77±0.14	37.67±0.17	37.53±0.16
	600	7	37.70±0.12	37.81±0.10	37.79±0.22	37.61±0.20	37.54±0.28
	6000	7	37.74±0.19	37.84±0.26	37.73±0.22	37.47±0.23	37.21±0.17
	Aminopyrine	50 (mg/kg)	7	37.71±0.07	36.77±0.19*	34.47±0.55*	36.23±0.15*

Significantly different from the control group (*p<0.001)

Body temperature was determined at 0 (before), 10, 60, 90 and 120 mins after drug treatment.

검체 60, 600 및 6000 IU/kg을 정맥내 투여한 군의 자발운동성은 대조군에 비하여 유의성있는 차이를 나타내지 아니하였다. 반면에, caffeine 5 mg/kg의 정맥내 투여시에는 대조군에 비하여 55.8%의 운동성 증가를 보여 유의성있는 차이를 나타내었다. 그 결과는 Table III에 표시한 바와 같다.

정상체온에 미치는 영향

Table IV에 나타낸 바와 같이, 검체 투여시에 대조군에 비하여 정상체온에의 영향을 인정할 수 없었다. 반면 aminopyrine 50 mg/kg의 투여시에는 대조군에 비하여 유의성있는 체온의 하강을 나타내었으며, 투여후 2시간 만에 정상체온을 회복하였다.

진통작용

Aminopyrine을 정맥내 투여시에는 0.7% 초산의 복강내 투여에 의해 유발된 writhing syndrome을 현저하게 억제시켰으나, 검체 투여시에는 6000 IU/kg의 고용량 투여시에도 대조군과 비교하여 그 증상의 억제를 인정할 수 없었다. 그 결과는 Table V에 표시하였다.

항경련작용

Strychnine 유발경련에 대한 작용

이 결과는 Table VI에 나타내었으며, 본 검체 투여시에는 strychnine 유발 치사를 억제하지 못하였다.

Pentylentetrazole 유발경련에 대한 작용

본 검체는 pentylentetrazole로 유발시킨 경련에 대하여 억제작용을 인정할 수 없었다. 그 결과는 Table VII과 같다.

혈압 및 호흡에 대한 작용

Table V. Effect of LB-00014 on acetic acid-induced writhing syndrome in mice

Treatment	Dose (IU/kg, iv)	No. of animals	No. of writhing (M±S.E.)
Control	-	8	18.9±5.1
LB-00014	60	8	16.8±2.9
	600	8	22.5±4.3
	6000	8	17.9±5.2
Aminopyrine	50(mg/kg)	8	0.9±0.6*

Significantly different from the control group (*p<0.01)

Table VI. Effect of LB-00014 on strychnine-induced convulsion in mice

Treatment	Dose (IU/kg, iv)	No. of used mice	No. of died mice
Control	-	8	8
LB-00014	60	8	8
	600	8	8
	6000	8	8

Table VII. Effect of LB-00014 on pentetrazole-induced convulsion in mice

Treatment	Dose (IU/kg, iv)	No. of used mice	No. of convulsion mice
Control	-	8	8
LB-00014	60	8	8
	600	8	8
	6000	8	8

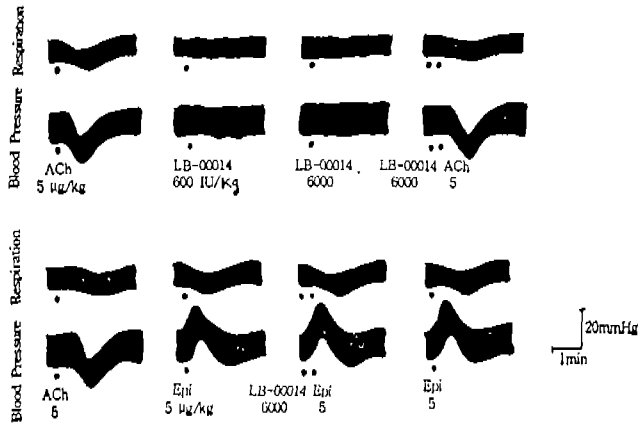


Fig. 1. Effect of LB-00014 on respiration and blood pressure in rabbit.

토끼의 혈압에 대한 영향을 Fig. 1에 표시하였다. Epinephrine 5µg/kg의 정맥내 투여시에 일시적인 상승을 나타내었고, acetylcholine 5 µg/kg의 투여는 일시적인 강하를 나타내었다. 정상혈압 및 호흡 심도에 대하여는 검체 600 IU/kg의 정맥내 주사시에 아무런 영향이 없었으며, 6000 IU/kg의 투여시에도 변화를 일으키지 아니하였다. 또, 맥박수의 영향도 인정되지 않았다(미표시). 또한, 검체의 전처치는 epinephrine에 의한 혈압의 상승이나 acetylcholine에 의한 혈압의 강하에 길항을 나타내지 않았다.

적출장기에 대한 작용

흰쥐 적출자궁근에 대한 작용

에스트로젠을 전처치한 흰쥐의 자궁근은 검체 1000 IU/ml의 농도에서도 수축 혹은 이완작용이 없었으며, oxytocin 1×10² IU/ml에 의한 수축에 대하여 검체 1000 IU/ml의 전처치도 길항작용을 나타내지 아니하였다. 그 결과는 Fig. 2에 나타내었다.

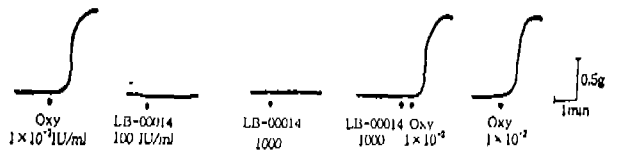


Fig. 2 Effect of LB-00014 on the rat uterus.

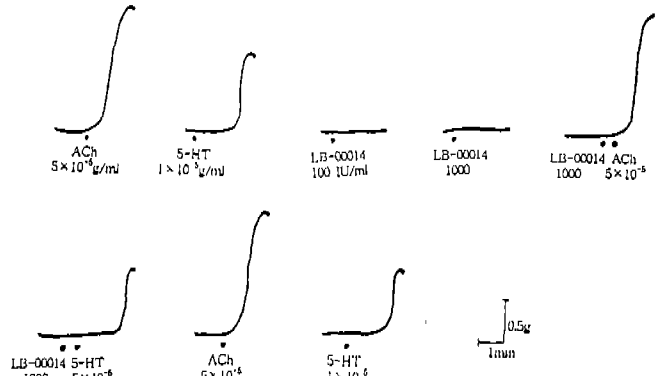


Fig. 3. Effect of LB-00014 on the rat fundus.

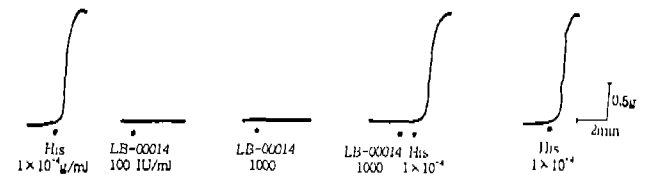


Fig. 4. Effect of LB-0014 on the guinea-pig ileum.

흰쥐 적출위절편에 대한 작용

본 결과는 Fig. 3에 표시한 바와 같이 검체 1000 IU/ml의 용량에서도 직접적인 작용이 없었으며, acetylcholine 5×10⁻⁵ g/ml와 serotonin 1×10⁻⁵ g/ml에 의한 수축에 대하여 검체 1000 IU/ml의 전처치도 아무런 길항을 나타내지 못하였다.

기니피그 적출회장에 대한 작용

기니피그 적출회장에 대하여 본 검체 100 및 1000 IU/ml의 농도에서 아무런 직접적인 작용이 나타나지 아니하였고, 검체 1000 IU/ml의 전처치는 histamine 1×10⁻⁴ g/ml에 의한 수축에 대하여 길항작용을 나타내지 않았다. 그 결과는 Fig. 4에 표시하였다.

위장에 대한 작용

생쥐의 장관 수송능에 미치는 영향

본 결과는 Table VIII에 표시하였다. 검체 60 및 600 IU/kg의 정맥주사시에는 장관 수송능에 별 영향을 미치지 아니하였으나, 6000 IU/kg 투여군에서는 26.8%의 증가로서 대조군에 비해 유의적인 차이를 보였다. 한편, lidocaine의 정맥내 투여시에는 29.9%의 억제율을 나타내었다.

위액분비에 미치는 영향

유문결찰에 의해 4시간 동안 저류된 위액에 대한 실험을 실시하였을 때, 본 검체 6000 IU/kg의 정맥내 투여시에도 대조군과 비교하였을 때, 위액분비량, pH 및 산도의 변화를 인정할 수 없었으며, 4시간 동안의 산분비량도 증가나 억제 의 경향을 나타내지 않았다. 그러나 cimetidine의 정맥내 투여시에는 위액분비량을 현저히 억제시켰고, pH 및 산도도 유의적으로 감소시켰다. 그 결과는 Table IX에 나타내었다.

이뇨작용

본 결과는 Table X에 나타낸 바와 같다. 대조군에서 5시

간 동안의 뇨배설량이 몸무게 100 g당 3.80 ml인 것에 비해, 검체 6000 IU/kg 투여군에서도 3.87 ml로 별 차이가 없었다. 또한, 대조군과 검체투여군 모두에서 케톤, 글루코스, 단백 및 잠혈 등이 검출되지 않았으며, pH도 대조군과 검체투여군이 별다른 차이를 보이지 않았다. 5시간 동안 배출된 sodium의 양은 대조군이 몸무게 100 g당 415.6 μ Eq인데 비하여, 검체 60, 600 및 6000 IU/kg 투여군에서는 366.8, 367.5 및 407.8 μ Eq로 별다른 영향을 미치지 않았으며, potassium은 대조군에서 161.2 μ Eq가 배출된데 반해, 검체투여군에서는 134.8, 119.1 및 120.8 μ Eq로 약간 감소하는 듯이 보였으나, 유의적인 것은 아니었다.

혈액계에 대한 작용

혈액응고계에 대한 작용

Table XI 및 XII에 나타낸 바와 같이, 내인성 및 외인성 혈액응고계에 대한 검체의 영향을 정맥내 투여 15분 후에 검사했지만, 검체 60, 600 및 6000 IU/kg은 PT 및 APTT에 전혀 영향을 주지 않았다.

혈소판의 응집능에 대한 작용

이 결과는 Table XIII에 나타내었다. 정상인의 혈액으로

Table VIII. Effect of LB-00014 on intestinal propulsion in mice

Treatment	Dose (IU/kg, iv)	No. of animals	Propulsion (% M.±S.E.)	Increase (%)
Control	-	8	54.8±1.7	-
LB-00014	60	8	54.4±4.3	-0.7
	600	8	60.8±3.5	10.9
	6000	8	69.5±3.5*	26.8
	Lidocaine	30 (mg/kg)	8	38.4±2.3**

Significantly different from the control group (*p<0.01, **p<0.001)

Table IX. Effect of LB-00014 on gastric secretion in rats.

Treatment	Dose (IU/kg, iv)	No. of animals	Volume (ml)	pH	Acidity (μ Eq/ml)	Total acid output (μ Eq/4hrs)
Control	-	6	4.92±0.98	2.33±0.15	110.83±9.10	562.38±139.80
LB-00014	60	6	5.37±0.71	2.29±0.22	115.42±4.05	626.25±91.66
	600	6	5.43±0.77	2.31±0.20	122.50±5.59	654.08±80.30
	6000	6	5.25±0.37	2.22±0.07	105.83±8.21	561.17±65.37
	Cimetidine	30 (mg/kg)	6	1.82±0.50*	3.83±0.42**	83.00±9.70*

Immediately after pylorus ligation, drug was given iv and autopsy was performed 4hrs later.

All data represent the mean±S.E.M.

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

Table X. Effect of LB-00014 on urine excretion in rats for 5 hours.

Treatment	Dose (IU/kg, iv)	LB-00014			
		Control	60	600	6000
No. of animals		6	6	6	6
Volume (ml/100 g, M±S.E.)		3.80±0.25	3.67±0.41	3.43±0.25	3.87±0.32
Ketones	-	6	6	6	6
	±	0	0	0	0
Glucose	-	6	6	6	6
	+	0	0	0	0
Protein	-	6	6	6	6
	+	0	0	0	0
pH	6	5	6	5	5
	7	1	0	1	1
Blood	-	6	6	6	6
	+	0	0	0	0
Na ⁺ (μ Eq/5hrs/100 g, M±S.E.)		415.6±21.9	366.8±38.1	367.5±32.3	407.8±38.5
K ⁺ (μ Eq/5hrs/100 g, M±S.E.)		161.2±32.5	134.8±18.3	119.1±16.8	120.8±15.8

부터 얻은 혈소판의 collagen 응집능에 대하여 검체 10, 100 및 1000 IU/ml의 처치는 아무런 영향을 주지 않았다.

적혈구막 저항성에 대한 작용

Table XIV에 나타낸 바와 같이, 적혈구를 저장액에 넣어 삼투압에 의한 용혈반응을 관찰하였지만, 검체 60, 600 및 6000 IU/kg의 정맥내 투여시 대조군과 유사한 용혈반응을 나타내어 아무런 영향이 인정되지 않았다.

고찰 및 결론

적혈구 생성과 후기 적아구계 전구세포의 증식을 촉진하는 작용을 가진 LB-00014를 정맥내 투여하였을 때의 일반 약리작용에 관하여 검토하였다. *in vivo* 실험의 경우에는 임

Table XI. Effect of LB-00014 on prothrombin time in rats.

Treatment	Dose (IU/kg, iv)	No. of animals	PT (sec, M.±S.E.)
Control	-	7	23.3±1.5
LB-00014	60	7	23.9±1.2
	600	7	24.6±0.6
	6000	7	24.7±1.2

Table XII. Effect of LB-00014 on activated partial thromboplastin time in rats

Treatment	Dose (IU/kg, iv)	No. of animals	APTT (sec, M.±S.E.)
Control	-	7	67.1±4.1
LB-00014	60	7	62.7±5.3
	600	7	65.3±3.0
	6000	7	63.1±3.3

Table XIII. Effect of LB-00014 on platelet aggregation induced by collagen in plasma of human.

Treatment	Concentration (IU/ml)	Inhibition (%), M.±S.E.)
LB-00014	10	1.22±1.14
	100	1.07±1.29
	1000	1.22±1.23

Table XIV. Effect of LB-00014 on erythrocyte fragility in rats.

Treatment	Dose (IU/kg, iv)	No. of animals	Control				LB-00014			
			-	60	600	6000	60	600	6000	
Hemolysis (%)	0.20% NaCl-PO ₄	6	97.72±0.99	97.50±1.11	96.78±1.40	97.80±0.62				
	0.30% NaCl-PO ₄	6	94.87±1.96	96.48±1.01	92.08±2.58	94.47±1.27				
	0.35% NaCl-PO ₄	6	84.65±3.03	83.63±2.55	86.95±4.06	85.07±3.17				
	0.40% NaCl-PO ₄	6	79.28±4.22	79.65±3.21	81.45±4.88	77.93±3.03				
	0.45% NaCl-PO ₄	6	38.35±10.39	31.18±3.48	31.57±7.01	29.75±5.59				
	0.50% NaCl-PO ₄	6	8.82±2.41	10.88±2.59	8.10±1.81	7.13±1.41				
	0.60% NaCl-PO ₄	6	2.90±0.93	3.40±1.51	3.27±0.99	1.98±0.77				

All data represent the mean ± S.E.M.

상용량의 약 100배에 해당하는 6000 IU/kg을 최고용량으로 하였고 *in vitro* 실험에서는 1000 IU/kg을 최고용량으로 적용하였다.

본 검체를 생쥐에 정맥내 투여하였을 때, 중추성이나 자율신경증상 등의 일반행동에는 별다른 영향이 인정되지 않았다. 또한, hexobarbital에 의한 수면시간의 연장이나 단축이 없었으며, rotarod 시험 및 자발운동성 측정에서도 운동의 유의성있는 변화가 관찰되지 않았으므로 중추신경계에 대하여 아무런 작용이 없음을 알 수 있었다. 정상체온에의 영향도 인정되지 않았으며, 초산유발 writhing 증상도 억제시키지 못하였다. 이 검체는 또한 strychnine이나 pentylenetetrazole로 유발시킨 경련에 대해서도 억제작용을 나타내지 아니하였으므로 항경련작용도 인정할 수 없었다. 소화기계에 대하여는 barium sulfate를 지표로 한 장관수송능에 대한 실험에서 용량의존적으로 수송능이 약간 증가하는 경향을 보였으며, 위액분비에 대한 실험에서는 4시간 동안의 위액분비량, pH 및 산도에 전혀 영향을 미치지 아니하였다.

마취시킨 토끼에 본 검체의 정맥내 적용시에 호흡수, 심박수 및 혈압에 아무런 영향을 미치지 않았으며, acetylcholine의 일시적 강하나 epinephrine의 일시적 상승에 대한 길항작용도 인정되지 않았으므로 호흡순환기계에 영향을 주지 않는 것을 확인하였다.

또, 이 검체의 적출평활근에 미치는 영향에 대해서도, 흰쥐의 자궁근, 위절편 및 기니피그 회장에서 직접적인 수축이나 이완의 작용을 나타내지 않았으며, 이 검체의 전처치가 oxytocin, acetylcholine, serotonin 및 histamine에 의한 수축을 전혀 길항하지 못하였다.

한편, 이 검체를 생리식염수를 경구투여한 흰쥐에 정맥 주사하였을 때, 노배설량 및 sodium과 potassium의 배설량에서도 유의성있는 변화가 관찰되지 않았고, 케톤, 글루코스, 단백 및 잠혈등도 나타나지 않았으며 pH에도 이상이 없었다. 또한, 흰쥐에 본 검체의 정맥내 적용시 PT 및 APTT의 증가나 감소 등의 유의적인 영향을 보이지 않았으며, 정상인의 혈소판 기능에 대하여도 collagen의 응집야기

에 검체의 직접적인 작용이 인정되지 않았으며, 삼투압의 변화에 따른 적혈구막의 저항성에 대해서도 검체는 아무런 영향을 미치지 않은 것으로, 본 검체는 혈액계에 대하여 직접적인 영향이 없음을 알 수 있었다.

이상의 결과로 보아 LB-00014는 중추신경계에의 작용, 진통 및 항경련작용, 평활근 말단에서의 작용과 혈압, 호흡, 이뇨작용 및 혈액응고계 및 적혈구에 대한 작용 등의 일반약리작용에 대하여 실험한 결과, 비교적 대량 투여시에도 크게 영향이 인정되지 않았다. 이것으로 LB-00014는 안전성이 큰 물질로 사료되는 바이다.

참고문헌

- Adamson, J. W. (1988). Erythropoietin, *in vitro* and *in vivo* studies of the regulation of erythropoiesis. *Schweiz. Med. Wschr.* **118**, 1501-1506.
- Araki, Y. and Ueki, S. (1972). Changes in sensitivity to convulsion in mice with olfactory bulb ablation. *Jap. J. Pharmacol.* **22**, 447-456.
- 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.
- Gilman, A. and Goodman, L. (1937). The secretory response of the posterior pituitary to the need for water conservation. *J. Physiol.* **90**, 113-124.
- Irwin, S. (1968). Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic quantitative procedure for assessing the behavioural physiologic state of the mouse. *Psychopharmacologia* **12**, 222-257.
- Jacobson, L. O., Goldwasser, E., Fried, W. and Plzak, L. (1957). Role of the kidney in erythropoiesis. *Nature (London)* **179**, 633-634.
- Koury, M. J., Bondurant, M. C. and Atkinson, J. B. (1987). Erythropoietin control of terminal erythroid differentiation, maintenance of cell viability, production of hemoglobin, and development of the erythrocyte membrane. *Blood cells* **13**, 217-226.
- Lee, E. B. (1975). Pharmacological approach of crude drugs. *Yakhak Hoeji* **19**, 53-59.
- Nahorski, S. R. (1975). Behavioural supersensitivity to apomorphine following cerebral dopaminergic denervation by 6-hydroxydopamine. *Psychopharmacologia.* **42**, 159-162.
- Parpart, A. K., Lorenz, P. B., Parpart, E. R., Gregg, J. R. and Chase, A. H. (1947). The osmotic resistance (fragility) of human red cells. *J. Clin. Invest.* **26**, 636-640.
- Shay, H., Sun, D. C. and Gruenstein, M. (1954). A quantitative method for measuring spontaneous gastric secretion in the rat. *Gastroenterol.* **26**, 906-913.
- Swinyard, E. A., Brow, W. C. and Goodman, L. S. (1952). Comparative assays of antiepileptic drugs in mice and rats. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.* **106**, 319-330.
- Takagi, K. and Lee, E. B. (1972). Pharmacological studies on *Platycodon grandiflorum* A. DC. III: Activities of crude platycodon on respiratory and circulatory systems and its other pharmacological activities. *Yakugaku Zasshi* **92**, 969-973.
- Vane, J. R. (1957). A sensitive method for the assay of 5-hydroxytryptamine. *Brit. J. Pharmacol.* **12**, 344-349.
- Whittle, B. A. (1964). The use of changes in capillary permeability in mice to distinguish between narcotic and non-narcotic analgesics. *Brit. J. Pharmacol.* **22**, 246-253.