

중 22~24 g의 웅성 ICR 마우스를 군당 9마리씩 사용하여 EPO를 70, 700, 7000 U/kg 용량으로 정맥내로 투여하고 15분후에 charcoal meal(arabia gum 10%, charcoal 5%)을 각 마리당 0.1 ml씩 경구로 투여하고 15분후에 각 마우스를 희생시켜 소장을 적출하고 유분부에서 맹장입구까지의 길이에 대한 charcoal meal의 이동율을 측정하였다.

혈액응고계에 미치는 영향

혈액응고에 대한 작용 : 체중 26~28 g의 웅성 ICR mouse를 군당 7마리씩 사용하였다. EPO를 정맥내 투여한 후 15분에 ether 마취하에 심장채혈하고 1/10 용적의 3.8% sodium citrate를 가한 직후 원심분리하여 혈장을 준비하였다. Prothrombin time(PT)을 측정하기 위하여 37°C로 가온한 혈장 0.1 ml에 0.2 ml의 thromboplastin C(Baxter)를 첨가한 후 응고되기까지의 시간을 측정하였다. APTT(activated partial thromboplastin time)를 측정하기 위하여 0.1 ml의 혈장과 activated cephaloplastin reagent(Baxter) 0.1 ml를 혼합하고 0.02 M calcium chloride 시약을(일본국제시약) 첨가한 후 응고되기까지의 시간을 측정하였다.

혈소판 응집에 대한 작용 : 토끼의(약 3 kg, Japanese white) 이동맥으로부터 혈액을 채취한 후 1/10 용량의 3.8% sodium citrate를 첨가한 직후 원심분리하여(950 rpm, 10분) 상등액으로부터 platelet rich plasma(PRP)를 얻었다. 하층액은 다시 원심분리하여(2500 rpm, 5분) platelet poor plasma(PPP)를 준비하였다. PRP 200 μ l에 EPO 700 U/ml, 7000 U/ml 용액을 각각 20 μ l를 첨가한 후 37°C에서 3분간 incubation하고 혈소판응집 야기물질인 collagen(20 μ g/ml) 및 ADP(10 nM)를 각각 20 μ l씩 첨가하여 aggregometer(Chronolog, M400VS)에서 응집반응을 측정하였다. EPO의 작용은 vehicle 투여시 최대 응집반응에 대한 억제율 (%)로 나타내었다.

통계처리

모든 data는 mean \pm SD 로 표현하였으며 대조군과 처치군의 평균값 차이는 ANOVA 및 Dunnett's t-test로 검증하여 p<0.05인 경우 통계학적 유의성이 있는 것으로 판정하였다. 경련에 대한 작용의 경우는 발현동물수/시험동물수로 표현하였으며 통계학적인 유의성은 Fisher's

Table I. Effect of EPO on hexobarbital-induced sleeping time in ICR mice

Treatment	Dose (U/kg, iv)	No. of animals	Sleep-inducing Time (min)	Sleeping Time (min)
Vehicle	—	6	2.3 \pm 0.3	36.0 \pm 2.9
Erythropoietin	70	6	2.4 \pm 0.3	32.5 \pm 3.6
	700	6	2.7 \pm 0.8	31.2 \pm 4.6
	7000	6	2.6 \pm 0.4	27.1 \pm 1.7*

Hexobarbital : 70 mg/kg, ip

*Significantly different from vehicle-treated group(p<0.05)

exact test에 의하여 p<0.05 수준에서 검정하였다.

실험결과

일반증상 및 행동에 대한 영향

마우스 일반행동에 대한 작용 : 마우스에 EPO를 70, 700, 7000 U/kg 정맥내 투여한 후 24시간까지 모든 군에서 특이한 행동 및 증상의 변화를 관찰할 수 없었다. **중추신경계에 미치는 영향**

Hexobarbital 수면에 대한 작용 : EPO는 70, 700 U/kg 용량에서 hexobarbital에 의한 수면시간에 영향을 주지 않았으나 7000 U/kg에서 수면시간을 25% 단축시켰다. 수면유도시간의 경우 EPO에 의하여 영향을 받지 않았다 (Table I).

경련에 대한 작용 :

a. 경련 증강효과의 검색(Table II) : strychnine 및 pentetrazol의 경련유발 작용에 대하여 EPO를 70, 700, 7000 U/kg 정맥내 투여한 모든 군에서 경련 증강작용을 나타내지 않았다.

b. 항경련 작용의 검색(Table III, Table IV) : EPO는 70, 700, 7000 U/kg 정맥내 투여에서 vehicle을 투여한 대조군과 strychnine 및 pentetrazol에 의한 경련 유발 정도 및 사망에 차이가 없었다.

진통작용에 대한 작용 : EPO는 70, 700, 7000 U/kg 용량에서 acetic acid에 의한 writhing수에 영향을 주지 않았다(Table V).

체온에 대한 작용 : EPO를 정맥내 투여하고 4시간 동안 체온을 측정한 결과 700 U/kg 투여군에서 투여후

Table II. Convulsion augmenting activity of EPO in ICR mice

Treatment	Dose (U/kg, iv)	No. of animals showed convulsion /No. of animals used	
		Strychnine	Pentetrazol
Vehicle	—	0/5	3/5
Erythropoietin	70	0/5	4/5
	700	0/5	3/5
	7000	0/5	3/5

Strychnine : 0.8 mg/kg, ip, Pentetrazol : 65 mg/kg, ip

Table III. Effect of EPO on strychnine-induced convulsions and death in ICR mice

Treatment	Dose (U/kg, iv)	No. of Incidence	
		Convulsion	Death
Vehicle	—	5/5	5/5
Erythropoietin	70	5/5	5/5
	700	5/5	5/5
	7000	5/5	5/5

Strychnine : 2 mg/kg, ip

15분에 대조군과 비교하여 유의성 있게 감소하였으며, 7000 U/kg 투여군에서는 1시간과 4시간째에 각각 대조군과 비교하여 증가 또는 감소(정상 체온과 비교시에는 유의성이 없었음) 하였다(Table VI).

호흡 및 순환기계에 미치는 영향

EPO는 마취전에 70, 700, 7000 U/kg 용량의 단회 bolus 정맥투여에 의해 호흡수, 혈압, 심박수, 대퇴동맥 혈류량 및 심전도에 아무런 영향을 주지 않았다(Table VII, Fig. 1).

평활근에 미치는 영향

적출회장 : EPO는 70, 700 U/ml 농도에서 guinea pig 적출회장의 basal tension(data 생략) 및 histamine, acetylcholine에 의한 수축반응에 영향을 주지 않았다(Fig. 2).

수분 및 전해질 대사에 미치는 영향

노량 및 전해질 배설에 대한 작용 : EPO 700, 7000 U/kg 투여군에서 노량이 대조군과 비교하여 유의성있게 증가하였으나, 뇨중의 각 이온의 농도는 모든 군에서 차이가 없었다(data 생략). 배설된 이온의 총량은 Na⁺은 변화가 없었으나 K⁺ 및 Cl⁻은 증가되었다(Table VIII).

소화기계에 미치는 영향

마우스 장관수송능에 대한 작용 : Table IX에 나타낸 바와 같이 EPO를 7000 U/kg까지 투여해도 마우스의 장관수송능에 영향을 주지 않았다.

혈액응고계에 미치는 영향

혈액응고계에 미치는 영향 : Table X에 나타낸 바와 같이 prothrombin 시간의 경우 EPO 7000 U/kg에서 10% 감소되었으나 APTT는 EPO에 의하여 전혀 영향을 받지 않았다.

혈소판 응집에 미치는 영향 : EPO는 700 U/ml 까지의 농도에서도 collagen 및 ADP에 의한 혈소판 응집에 영향을 주지 않았다(Table XI).

Table IV. Effect of EPO on pentetrazol-induced convulsions and death in ICR mice

Treatment	Dose (U/kg, iv)	No. of Incidence	
		Convulsion	Death
Vehicle	-	5/5	5/5
Erythropoietin	70	5/5	4/5
	700	5/5	5/5
	7000	5/5	4/5

Pentetrazol : 100 mg/kg, ip

Table V. Effect of EPO on writhing syndrome induced by acetic acid in ICR mice

Treatment	Dose (U/kg, iv)	No. of writhing/10 min
Vehicle	-	28.4 ± 5.8
Erythropoietin	70	25.3 ± 3.9
	700	26.0 ± 6.0
	7000	28.4 ± 9.7

Table VI. Effect of EPO on rectal temperature in SD rats (n=8)

Time (min)	Body Temperature (°C, Mean ± SD)			
	Vehicle	Erythropoietin (U/kg, iv)		
		70	700	7000
0	37.3 ± 0.36	37.2 ± 0.42	37.2 ± 0.42	37.0 ± 0.46
15	37.6 ± 0.42	37.6 ± 0.28	37.1 ± 0.28*	37.8 ± 0.32
30	37.6 ± 0.42	37.3 ± 0.40	37.6 ± 0.14	37.8 ± 0.19
60	38.0 ± 0.15	38.1 ± 0.31	37.8 ± 0.28	38.4 ± 0.33*
120	38.1 ± 0.16	38.1 ± 0.25	37.8 ± 0.18	38.0 ± 0.38
240	38.2 ± 0.48	38.3 ± 0.35	37.9 ± 0.23	37.7 ± 0.25*

*Significantly different from vehicle-treated group(p<0.05)

Table VII. Respiratory and cardiovascular effects of EPO in anesthetized dogs (n=3)

Dose (U/kg, iv)		Before Administration	After Administration		
			5 min	15 min	30 min
70	MAP(mmHg)	127.5 ± 20.5	126.7 ± 27.5	126.7 ± 27.5	126.7 ± 25.0
	HR(beats/min)	211.5 ± 39.2	203.0 ± 46.4	203.3 ± 46.2	199.3 ± 49.3
	FBF(ml/min)	69.8 ± 11.7	69.0 ± 12.8	65.9 ± 15.1	69.0 ± 15.5
	RR(strokes/min)	20.3 ± 8.4	20.7 ± 8.1	20.0 ± 7.8	19.3 ± 8.4
700	MAP(mmHg)	125.0 ± 25.0	129.2 ± 25.5	125.2 ± 22.9	126.7 ± 20.2
	HR(beats/min)	197.2 ± 51.2	201.3 ± 58.2	196.3 ± 57.1	199.3 ± 54.7
	FBF(ml/min)	65.1 ± 12.3	65.1 ± 14.5	65.1 ± 12.3	68.2 ± 14.1
	RR(strokes/min)	20.0 ± 8.7	20.0 ± 7.9	19.7 ± 8.1	19.3 ± 8.5
7000	MAP(mmHg)	125.8 ± 19.1	119.2 ± 19.1	125.0 ± 24.1	125.8 ± 24.5
	HR(beats/min)	195.2 ± 58.2	193.2 ± 54.7	195.2 ± 58.2	195.2 ± 63.4
	FBF(ml/min)	69.0 ± 12.8	65.1 ± 16.1	65.1 ± 16.1	72.1 ± 15.2
	RR(strokes/min)	19.3 ± 8.5	19.7 ± 9.3	19.3 ± 9.5	19.5 ± 9.5

MAP: mean arterial pressure, HR: heart rate, FBF: femoral blood flow RR: respiratory rate

- Imai, N. *et al.*,(1988). Preclinical Report 1988. Chugai Pharmaceutical Co. Ltd.
- Irwin, S.(1968). Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. *Psychopharmacologia(Beri.)* **13**, 222-257.
- McLeod N.J.(1970). Pharmacological experiments on intact preparations. E & S. Livingstone, Edinburgh and London, 58-62.
- Ritchie, D.M. and Capetola, R.J.(1987). General pharmacological profile of recombinant, human-derived erythropoietin (r-HuEPO). Ortho Pharmaceutical Co., Raritan, N.J. 08869 (A 9890, Br-1431, September 16)
- Wiliams, P.D., Bennett, D.B. and Comereski, C.R.(1988). Animal model for evaluating the convulsive liability of β -lactam antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **32**(5), 758-760