

정상 및 손상된 흰쥐 피부에 국소 적용된 ¹²⁵I-rhEGF의 체내 이행

이정욱 · 정석재 · 이민화 · 심창구*

서울대학교 약학대학

(Received August 22, 1997)

Body Distribution of ¹²⁵I-rhEGF Across Normal and Damaged Rat Skins

Jeong-Uk Lee, Suk-Jae Chung, Min-Hwa Lee and Chang-Koo Shim*

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul, 151-742, Korea

Abstract—Distribution of radioactivity in the skin tissues, subcutaneous tissues, blood and body organs was examined following topical application of ¹²⁵I-rhEGF (0.4 μCi), in the form of a Pluronic F-127 gel, on the normal and damaged (burned and stripped) skins of SD male rats. The radioactivity in the skin tissues and subcutaneous tissues was 3-5 times higher for the damaged skins than for the normal skin. But pretreatment of the skin with rhEGF (1 μg) twice at 24 hr dose intervals affected the distribution of the radioactivity yielding the order of burned skin > stripped skin = normal skin. The decrease for the stripped skin by the pretreatment might be related either to the pathophysiological change of the skin or to the down regulation of the EGF receptor. Liver showed the highest radioactivity in amount following single and multiple administration of the drug to the normal and damaged skins. But, in concentration, the kidney and stomach showed higher value than the liver which is consistent with that kidney is a major eliminating organ of EGF and that EGF exerts its pharmacological effect specifically for the stomach.

Keywords □ Epidermal growth factor (EGF), single dose, multiple dose, burned skin, stripped skin, radioactivity, organ distribution.

인간 상피세포 성장인자(human epidermal growth factor, hEGF)는 cytokine류의 하나이며 53개의 아미노산 잔기로 이루어진 펩타이드 약물로 *in vitro*에서 세포의 성장을 촉진하고 유전자를 활성화시킨다. 그 결과 *in vivo*에서 상피 상처를 치유하고 위산 분비를 억제하며 안구의 각막 또는 뼈 부위의 치유를 촉진하는 효과를 나타낸다.¹⁾ 따라서 EGF는 상피 조직의 치유를 목적으로 하는 국소 적용 제제나 위산 분비 억제를 목적으로 하는 전신 투여 제제 양쪽으로 개발될 가능성이 있다. 그럼에도 불구하고 EGF의 체내동태에 대한 연구는 보고

된 것이 비교적 적으며 특히 피부 국소 적용 후의 체내동태에 대하여는 전혀 보고가 없는 실정이다. 비록 EGF가 내인성 물질로서, 약리 효과를 보기 위한 실험들에서 우려할 만한 부작용을 나타내지는 않았으나 설치류의 등부위 피부에서 EGF에 의한 과다증식, 각질화 및 모발 성장의 억제와 같은 증상이 나타난다는 보고²⁾가 있었다. 그러므로 피부 손상이나 각막 손상과 같은 국소질환에 EGF를 장기간에 걸쳐 적용하고자 할 경우 그 잠재적 부작용을 회피하기 위하여 국소 투여된 EGF의 전신흡수 정도를 파악해 둘 필요가 있다.

따라서 이 연구에서는 유전자 재조합 기법으로 생산된 사람 EGF (rhEGF)를 예상 적용 질환인 화상 및 창상 피부에 국소 적용하였을 때 rhEGF의 체내 조직

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-880-7873 (팩스) 02-885-8429

이행성을 검토하였다. 이를 위하여 흰쥐의 등 피부에 유발한 화상 및 창상에 ^{125}I 로 표지된 rhEGF (^{125}I -rhEGF)를 국소에 적용한 후, 체내 각 조직으로의 방사활성의 이행을 검토하였다. 또한 약물을 여러 번 적용하는 것이 약물의 조직 분포에 어떠한 영향을 미치는가 알아보기 위하여, 미리 rhEGF를 24 시간 간격으로 2회 적용한 피부에 24시간 후 ^{125}I -rhEGF를 적용한 후 피부 조직내 방사활성의 분포와 체내 이행을 검토하였다.

실험방법

시약 - rhEGF(대웅제약, DWP401)로는 대장균에서 생성되어 정제된 유전자 재조합 물질로서 순도는 100%(HPLC), 또는 98.15%이상(size exclusion FPLC)인 것을 사용하였다. 이 약물의 체내동태⁷⁾는 일본 Wakunaga 제약의 것과 약간의 차이를 보였으나 모두 용량 의존성을 보였고⁸⁻⁹⁾ 조직 분포 특성⁸⁾은 rat EGF¹⁰⁾와 비슷하였다. 따라서 이 약물은 기존에 발표된 문헌중의 EGF와 유사한 체내 동태를 나타내는 물질임을 확인하였다. ^{125}I -rhEGF(0.2~0.4 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$, 대웅제약)는 순도 98%이상의 rhEGF에 N-chlorobenzene sulfonamide의 sodium salt (Pierce, 미국)를 이용하여 iodination법으로 ^{125}I 표지한 후 Sephadex G-25컬럼으로 정제한 것으로, gel filtration시의 순도 96%이상, 15% TCA 침전법상 순도 95%이상인 것을 사용하였다. 기타 시약으로는 Pluronic F-127 (BASF Co., 독일)과 주사용 증류수 (중외제약) 등을 사용하였다.

피부 손상 모델 - 실험 동물로는 Sprague-Dawley계 랫트의 수컷(300±30 μg)을 사용하였다. 랫트를 에틸로 마취한 뒤, 등부위의 털을 animal clipper (Model 900, Daito Electric Mfg Co., 일본)와 면도기를 사용하여 제거하였다. 그 후 화상피부 모델은 섭씨 200°의 열조절기(아립전자, 서울)로 10초간 화상(2° 화상)을 일으켜 만들었고, 창상피부 모델은 스텐레스제 스크래퍼(NT scraper, NT Inc., 일본)로 부분창상을 일으켜 만들었다. 정상피부 모델로는 털을 제거하는 것 이외에는 아무런 처치도 하지 않은 피부를 사용하였다.

피부적용을 위한 제제의 조제 - ^{125}I -rhEGF의 25% Pluronic F-127 용액(2 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$) 200 μl 를 우레탄 foam tape(한국 3M)를 써서 만든 직경 1.4 cm의 원형

틀(표면적 154 mm^2)에 붓고 37°C에서 30초간 두어 겔화 시켰다. 기계로서 Pluronic F-127을 선택한 것은 이 기계중에서 hEGF의 안정성이 좋고, 37°C에서 2시간에 80%이상의 EGF가 용출되며⁷⁾ 또 25% Pluronic F-127 용액은 저온에서는 액체 상태이나 37°C 정도에서는 겔화되어 일종의 패취제와 같은 성상을 띠게 되므로 피부에 적용하기 용이하기 때문이었다.

1회 투여 실험 - 상기한 ^{125}I -rhEGF 제제를 우레탄 테이프 틀제로 각 모델 피부에 붙이고 수술 테이프(한국 3M)로 고정시켜 투여하였다. 약물 투여 0.5, 1, 2, 5 및 8시간 경과후 에틸 마취하에 복대 동맥에서 채혈하여(21G needle) 실험 치사시킨 후 약물을 투여한 피부 조직, 피하조직, 간, 신장, 비장 및 위를 적출하였다. 적출한 조직 및 장기는 상수에 씻고 여지를 이용하여 물기를 제거한 뒤, 감마 카운터(Cobra Auto-Gamma, PACKARD^R, Canberra Co., 미국)로 조직중의 방사활성을 측정하였다.

다회 투여 실험 - 약물을 여러 번 투여하였을 때 피부 조직에 약물의 축적이 나타나는지 여부를 보기 위하여 비표지 rhEGF 제제를 24시간 간격으로 2회 피부에 적용한 뒤 다시 24시간 뒤에 ^{125}I -rhEGF를 피부에 국소 적용한 후 경시적으로 피부 조직 및 체내 장기중의 방사활성의 변화를 추적하였다. 즉 rhEGF의 25% Pluronic F-127 용액(rhEGF의 농도=5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 200 μl (rhEGF로서 1 μg)로 만든 패취형 겔 제제를 24시간 간격으로 2회 적용한 뒤 다시 24시간 뒤에 ^{125}I -rhEGF의 25% Pluronic F-127 용액(2 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 200 μl (rhEGF로서 1 μg , radioactivity로서 0.4 μCi)를 투여하였다. 적용 후 0.5, 1, 2, 5 및 8시간에 1회 투여 실험시와 같은 방법으로 피부 및 각 장기를 적출하여 각 시료 조직중의 방사활성을 측정하였다.

이 실험에서 rhEGF를 3회 투여한 것은 개방 창상 및 화상에 상처 부위당 10 g 씩의 rhEGF를 24시간 간격으로 3회 국소 적용하였을 때 유의성있는 치유 효과가 있었다는 보고들^{3, 8-10)}을 참고로 한 것이었다.

피부상태의 현미경 관찰 - 1회 또는 다회 약물투여가 피부 상태에 미치는 영향을 조사하기 위하여 약물을 투여한 일정 시간 뒤 피부 부위를 적출하여 바로 10% PBS buffered 포르말린으로 고정한 뒤 파라핀 포매하였다가 6 μm 의 두께로 절편을 만들었다. 각 조직 절편을 Mayer's hematoxylin과 eosin으로 염색한 다음 전자 현미경으로 관찰하였다.

실험결과 및 고찰

1회 투여 후 피부조직 및 피하조직 중 약물 농도 - 정상 및 손상(화상 및 창상) 피부에 ¹²⁵I-rhEGF를 1회 적용한 후 약물 적용 부위의 피부 조직과 피하 조직 중의 방사활성(cpm/g)-시간 추이는 Fig. 1(A)와 같았다. 피부조직에 있어서는 손상된 피부에 투여하였을 때가 정상 피부에 투여하였을 때 보다 약 3~5배 높은 방사활성 농도를 보였다(윗그림). 그러나 피하조직에 있어서는 일반적으로 화상피부에 투여하였을 때가 가장 높은 값을 보였고 다음으로 창상피부, 정상피부의 순이었다. 정상피부에 투여한 후의 피하조직중 방사활성 농도 추이는 피부조직중 방사활성의 5% 미만이었으며, 피부조직중 농도추이보다는 오히려 혈액중 농도추이(데이터 미표시)를 반영하고 있었다. 이는 피부에 적용한 ¹²⁵I-rhEGF가 피부 조직에 분포된 혈관을 통해 혈액중에

이행된 후 소량의 방사활성이 근접 피부 조직으로 이동된 때문으로 추정된다. 이는 생체 내에 투여된 Na¹³¹I의 약 25%가 피부에 축적되었다는 보고¹¹⁾와도 일치한다.

다회 투여 후 피부조직 및 피하조직 중 약물 농도

(Fig. 1) - 약물을 여러 번 투여하였을 때 피부 조직 및 피하조직 중 방사활성의 추이는 Fig. 1(B)와 같다. 1회 투여시에 비하여 화상 및 정상 피부모델에서는 현저히 높은 피부조직(윗 그림) 및 피하조직(아랫 그림)중 방사활성 농도를 나타냈으나 창상 피부모델에서는 오히려 낮은 농도를 나타냈다. 이는 EGF 수용체의 노출이 가장 컸던 창상군에서 down-regulation이 현저하게 일어나 hEGF의 세포내 uptake가 감소하였기 때문이거나, 다회 투여에 의해 단순히 피부 조직의 조직학적 상태가 달라졌기 때문일 가능성이 있다. 실제로 화상 피부에서는 다회 투여후 피부 조직에 삼출액이 생겼으나 창상 피부에서는 삼출액이 보이지 않았다. 또 피부의 손상 여부에 따라 수화의 정도가 달라 약물의 이행에 영향을 미칠 수 있는 가능성도 배제할 수 없었다.

rhEGF 투여에 의한 피부조직의 병리학적 변화(Fig. 2)

- 정상피부, 화상피부 및 창상피부에 rhEGF를 1회(왼쪽 칼럼) 또는 다회투여(오른쪽 칼럼)하였을 때의 조직 병리학적 관찰 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 정상피부(Fig. 2-a)에 대해서는 1회투여(왼쪽)와 다회투여(바른쪽)간에 차이가 보이지 않았다. 화상피부(Fig. 2-b)에 대해서는 다회투여시(바른쪽) 파괴되었던 상피 및 진피 구조가 소실된 후 일부 상피 세포가 재생되기 시작하였다. 창상피부(Fig. 2-c)에 대해서는 다회 투여시(바른쪽) 1회 투여시(왼쪽)와 비교할 때 상피하에 염증 세포의 침윤은 아직도 존재하나 상피 분화도 좋고 상처의 회복 양상이 보였다. 이에 따라 손상피부에 rhEGF를 다회 투여시의 방사활성 농도추이가 1회 투여시와 달라졌을 가능성이 시사되었다.

1회 투여 후 장기중 방사활성량 및 농도 추이(Fig. 3)

- 1회 투여시 혈중 방사활성량은 화상과 창상에 의해 증가하였으며 특히 창상군에서는 1시간에 최고 값을 나타내었다(데이터 미표시). 1회 투여시 각 장기중의 방사활성 이행량을 Fig. 3(왼쪽 칼럼)에 보였다. 이행량은 모든 피부 모델에서 혈액을 제외한 모든 장기(신장, 위, 비장, 간)중 간에서 가장 많이 간 클리어런스가 EGF의 전신 클리어런스의 80%를 차지한다는 보고¹²⁾와 일치하였다. 그러나 각 장기중 방사활성의 농도(Fig. 3, 바른쪽 칼럼)로 검토하면 간 조직중 농도가 신

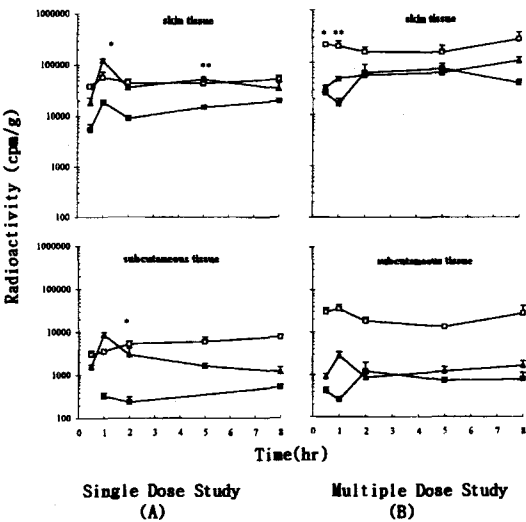


Fig. 1 - Concentration of radioactivity (cpm/g tissue, mean SE of three determinations) of skin (upper low) and subcutaneous tissue (lower low) after single (left A column) and multiple (right B column) topical application of ¹²⁵I-rhEGF preparation. Applied skin area: 154 mm². Applied dose: (A) 200 μl of ¹²⁵I-rhEGF preparation (0.4 μCi/200 μl in 25% Pluronic F-127), (B) 200 μl of rhEGF solution (1 μg/200 μl) was pretreated every 24 hr for two days and 200 μl of ¹²⁵I-rhEGF solution (0.4 μCi/200 μl in 25% Pluronic F-127) was applied after 24 hr. ■, □ and ▲: represent normal, burned and stripped skins, respectively. * p<0.01, ** p<0.05 different from the normal skin.

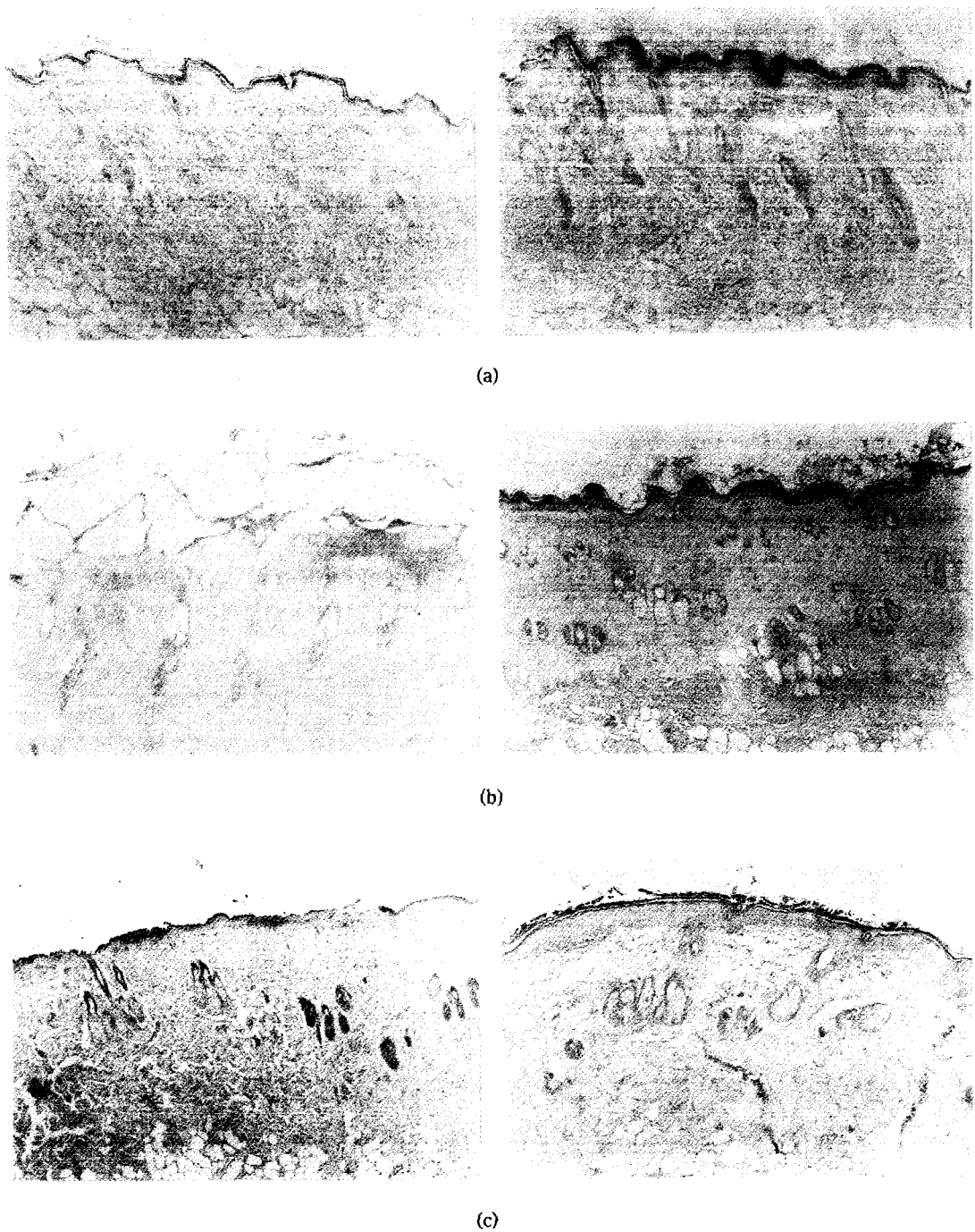


Fig. 2—Vertical section views of normal (a), burned (b) and stripped (c) skins following single (left column) and multiple (right column) dose studies. Skin tissues were embedded in paraffin and were cut into $6\ \mu\text{m}$ sections followed by staining with Mayer's hematoxylin and eosin, and photographed at the magnification of $\times 63$.

장이나 위장 중 농도보다 오히려 낮았다. 신장으로의 방사활성 이행량은 간보다 적었으나 방사활성 농도는 높아 EGF의 결합기 조직중 분포 용적이 간에서 보다 신장에서 더 높은 값을 보인다고 하는 보고¹³⁾와 일치하였다. 위장은 EGF가 특이적 약리 작용을 나타낸다고 알려져 있는 장기인데 이 조직에서의 방사활성 이행량은 신장과 비슷하였으나 조직 중량당 방사활성 농도는 관찰된 조직중 가장 높았다. 비장은 방사활성 이행량, 조직중 농도 모두 가장 낮은 값을 보였다. 특기할만한 사실은 창상피부에 약물을 적용하였을 때 모든 장기에서 1시간에 방사활성이 현저히 증가하였다가 2시간째에 급격히 감소하는 현상이었다. 이러한 현상은 표피가 제거되어 약물과 조직 세포와의 접촉이 가장 용이한 창상군에서는, 세포 표면에 있는 EGF 수용체의 down-regulation이 일어나 세포내에서 소실되는 속도가 느려지기 때문에 조직중 농도가 최고치를 보였다가, 약물

에 계속하여 노출되어 수용체 수가 늘어남에 따라 약물이 소실되는 속도도 다시 회복되어 조직중 농도가 감소하는 것이 아닌가 추론할 수 있었다. 그러나 역시 조직중 방사활성만으로 rhEGF의 분포를 추론할 수는 없으므로 앞으로 이에 대한 연구를 더 진행시켜야 할 것으로 생각되었다. 한편 화상피부모델에서는 화상을 입은 표피가 어느 정도 약물에 대한 장벽으로 작용하는지, 또 화상에 의해 증가하는 것으로 보고된 단백 분해 효소가 약물 투과의 장벽으로 작용하는지 알 수 없었으므로 이에 대한 검토도 필요할 것으로 생각되었다.

다회 투여 후 장기중 방사활성 농도 추이(Fig. 4) - 다회 투여시의 혈중 방사활성량은 피부에서와 마찬가지로 정상군에 비해 화상군에서 증가, 창상군에서는 감소의 경향을 보였다. 각 장기 중의 방사활성 이행량 및 농도는 1회투여시와 동일한 장기 순위를 보였다. 그러나 1회투여시에는 대체로 창상>화상>정상피부의 순인데 반하여 다회투여시에는 화상>창상>정상피부의 순을 보였다.

1회 및 다회투여 후 방사활성의 체내흡수 - 1회투여시 8시간 동안의 흡수량(투여한 방사활성으로부터 회

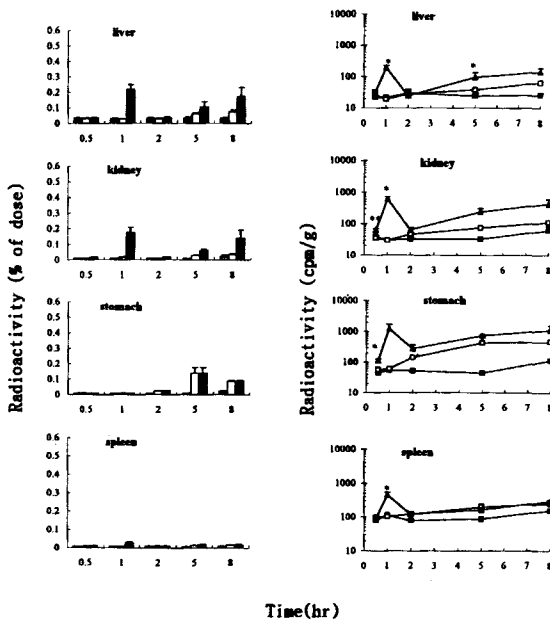


Fig. 3— Body distribution of radioactivity to major organ tissues expressed as percentage to dose (left column) and concentration (right column) after single topical application of ¹²⁵I-rhEGF preparation to various skin models. Each point represents mean S.E of three determinations. ■, □ and ▨ in the left column represent normal, burned, and stripped skins, respectively, and ■, □ and ▲ in the right column represent normal, burned, and stripped skins, respectively. * p<0.01, ** p<0.05 different from the control (normal) skin.

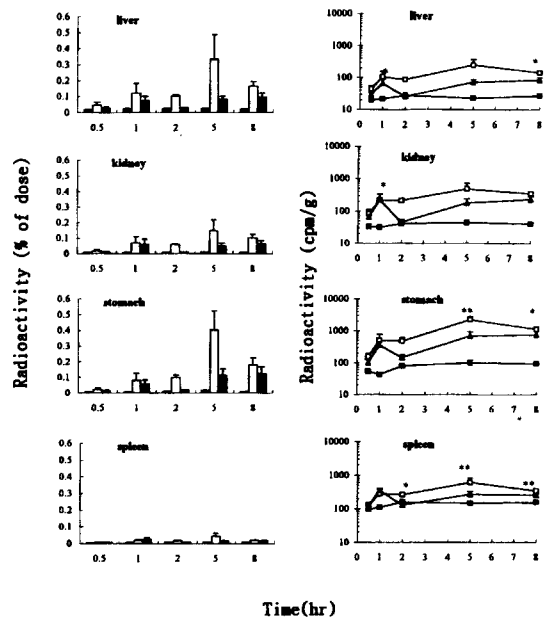


Fig. 4— Body distribution of radioactivity to major organ tissues expressed as percentage to dose (left column) and concentration (right column) after multiple topical application of ¹²⁵I-rhEGF preparation to various skin models. For others, see the legends of Fig. 3.

수된 제제중 방사활성과 제제를 떼어낸 후 피부를 닦아 내어 회수한 방사활성을 (뺀 값)은 투여량의 30~40%로 대체로 창상피부>화상피부>정상피부의 순이었으나 피부 손상에 따른 유의적인 차이는 보이지 않았다. 다회투여시의 8시간 동안의 흡수량은 다소 많아져 투여량의 30~50%이었고 대체로 창상피부>화상피부>정상피부의 순이었다. Fig. 1, 3, 4에서의 유의적인 차이가 전신 흡수량에 반영되지 않은 것은 개체차와 같은 편차 때문으로 생각된다.

이상의 결과가 곧바로 intact EGF의 이행을 반영한다고는 생각할 수 없다. ^{125}I -rhEGF가 피부 내에서 대사되어 대사된 ^{125}I 가 intact EGF와 무관하게 검출되었을 가능성을 배제할 수 없기 때문이다. ^{125}I -rhTNF (recombinant human tumor necrosis factor)를 생체내에 투여하였을 때 간, 신장등의 주요 장기가 ^{125}I 의 저장고로 작용하였다는 보고⁶⁾가 이러한 생각을 뒷받침한다. 따라서 앞으로 피부 조직에 존재하는 방사활성 중 어느 정도가 intact EGF에 기인하는 것인지 확인하여야 할 것이다.

결 론

흰쥐의 피부에 손상(창상 및 화상)을 일으킨 후 ^{125}I -rhEGF를 1회 또는 다회투여한 후의 피부조직 및 피하조직, 체내장기들에의 방사활성의 이행을 비교하였다. 손상된 피부에 1회투여하였을 때가 정상피부에 1회투여하였을 때에 비하여 약 3~5배의 높은 피부조직 이행을 보였으며 창상피부와 화상피부간의 차이는 없었다. 즉 1회투여시 피부조직중 방사활성 농도는 창상 = 화상 > 정상피부의 순이었다. 그러나 다회투여시 피부조직중 방사활성농도는 1회투여시에 비하여 정상피부의 경우는 증가한데 반하여 창상피부에서는 오히려 감소하여 화상 > 창상 = 정상 피부의 순이었다. 피하조직에 있어서도 대체로 비슷한 경향이었다. 창상피부에 대하여 다회투여가 1회투여보다 낮은 피부조직 및 피하조직 중 농도를 보인 것은 약물의 다회투여에 의하여 창상피부조직의 병태생리학적 상태가 변화한 때문일 가능성이 있다. 피부상태 또는 투여방법에 관계없이 8시간까지 체내로 이행된 총 방사활성량은 투여량의 20~40%이었으나 혈액 및 각 조직으로 이행된 방사활성량은 투여량의 0.5% 미만이었다. 그러나, 각 장기중 방사활성 농도는 약물을 적용한 피부 조직 중의 방사활성 농도를 반

영하고 있었다. 앞으로 조직중 방사활성 중 intact EGF의 분율이 얼마나 되는지를 규명하여야 정확한 체내이행 기전을 이해할 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

이 실험은 보건복지부 연구비로 수행되었습니다. 실험에 도움을 주신 대응계약 중앙연구소 박명환 부소장님과 강진석 연구원께 감사드립니다.

문 헌

- 1) Banks, A. R., The role of growth factors in tissue repair II. In Clark, R. A. F. and Henson, P. M. (Ed.), *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*, Plenum Press, New York, pp. 253 (1988).
- 2) Fisher, D. A. and Lakshmanan, J., Metabolism and effects of epidermal growth factor and related growth factors in mammals., *Endocr. Rev.* **11**, 418 (1990).
- 3) Kiyohara, Y., Nishiguchi, K., Komada, F., Iwakawa, S., Hirai, M. and Okumura, K., Cytoprotective effects of epidermal growth factor (EGF) ointment containing nafamostat, a protease inhibitor, on tissue damage at burn sites in rats., *Biol. Pharm. Bull.* **16**, 1146 (1993).
- 4) Chung, J. Y., Koh, Y. W., Nam, K. H., Yoo, E. S., Park, S. K., Yu, Y. H., Park, M. H. and Shim, C. K., Pharmacokinetics of recombinant human epidermal growth factor (DWP401) in rats., *Yakhak Hoeji* **41**, 328 (1997).
- 5) Murakami, T., Kawakita, H., Kishimoto, M., Higashi, Y., Amagase, H., Hayashi, T., Nojima, N., Fuwa, T. and Yata, N., Intravenous and subcutaneous pharmacokinetics and rectal bioavailability of human epidermal growth factor in the presence of absorption promoter in the rats., *Int. J. Pharm.* **46**, 9 (1988).
- 6) Jørgensen, P. E., Poulsen, S. S. and Nex, S. E., Distribution of intravenous administered EGF in the rat., *Regul. Pept.* **23**, 161 (1988).
- 7) Dibiasse, M. D. G., "Topical formulation of epidermal growth factor for wound healing", Ph.

- D. Thesis, University of Rhode Island, U. S. A. (1991)
- 8) Okumura, K., Kiyohara, Y., Komada, F., Iwakawa, S., Hirai, M. and Fuwa, T., Improvement in wound healing by EGF ointment I. Effect of nafamostat, gabexate or gelatin on stabilization and efficacy of EGF., *Pharm. Res.* **7**, 1289 (1990).
 - 9) Kiyohara, Y., Komada, F., Iwakawa, S., Hirai, M., Fuwa, T. and Okumura, K., Improvement in wound healing by EGF ointment II. Effect of protease inhibitor, nafamostat on stabilization and efficacy of EGF in burn., *J. Pharmacobio-Dyn.* **14**, 47 (1991).
 - 10) Kiyohara, Y., Komada, F., Iwakawa, S., Fuwa, T. and Okumura, K., Systemic effects of EGF ointment containing protease inhibitor or gelatin in rats with burns or open wounds., *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 73 (1993).
 - 11) Ferraiolo, B. L. and Mohler, M. A., Goals and analytical methodologies for protein disposition studies. In Ferraiolo, B. L., Mohler, M. A. and Gloff, C. A. (Ed.), *Protein pharmacokinetics and metabolism*, Plenum Press, New York. pp. 1-33 (1992).
 - 12) Kim, D. C., Sugiyama, Y., Fuwa, T., Sakamoto, S., Iga, T. and Hanano, M., Kinetic analysis of the elimination process of hEGF in rats., *Biochem. Pharmacol.* **38**, 241 (1989).
 - 13) Kim, D. C., Hanano, M., Sawada, Y., Iga, T. and Sugiyama, Y., Kinetic analysis of clearance of epidermal growth factor in isolated perfused rat kidney., *Am. J. Physiol.* **261**, F988-F997 (1991).