

## 헤어리스마우스 피부 국소에 적용된 $^{125}\text{I}$ -rhEGF의 피부흡수 및 체내 분포

이정욱 · 정석재 · 이민화 · 심창구<sup>#</sup>  
서울대학교 약학대학

(Received August 22, 1997)

### Dermal Absorption and Body Distribution of $^{125}\text{I}$ -rhEGF in Hairless Mice

Jeong-Uk Lee, Seok-Jae Chung, Min-Hwa Lee and Chang-Koo Shim<sup>#</sup>  
College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul, 151-742, Korea

**Abstract**—Distribution of rhEGF in the skin, plasma and several organ tissues following topical application of  $^{125}\text{I}$ -rhEGF (0.4  $\mu\text{Ci}$ ) solution in 25% Pluronic F-127 on 154 mm<sup>2</sup> of normal and damaged (burned and stripped) skins of hairless mice was examined. The radioactivity in the stripped skin tissues increased as a function of time, and was 10~20 times higher than that in the normal and burned skins. The fractions of intact drug in the skin tissues were 40~60% for the normal and burned skins, and 60~80% for the stripped skin. It indicates that the stratum corneum layer behaves as a barrier for the dermal penetration of the drug. The radioactivity in the plasma was much higher for the stripped skin than for the normal and burned skins. However, the concentration of intact drug in the stripped skin was comparable to those in the normal and burned skins indicating most severe degradation (or metabolism) of the drug in the stripped skin. As a result, the fraction of intact drug in the plasma was lowest for the stripped skin (<10%). Body organ distribution of the drug was much higher for the stripped skin. The concentration in the stomach, both in total radioactivity and intact drug, showed more than 10-times higher value than in the other organs (liver, kidney and spleen). The fraction of intact drug in each organ tissue was below 10~20%, and generally lowest for the stripped skin. The lowest fraction of the drug for the stripped skin could not be explained by the activity of the aminopeptidases in the skin since it was lower for the stripped skin than for the normal skin. Therefore, the fraction of intact drug appears to be determined by the balance between dermal uptake and systemic elimination of the drug, for example. The mechanism of dermal uptake of rhEGF was examined by topical applying 200  $\mu\text{l}$  of 25% Pluronic F-127 solution containing 0.4  $\mu\text{Ci}$  of  $^{125}\text{I}$ -rhEGF and 0.14  $\mu\text{Ci}$  of  $^{14}\text{C}$ -inulin (a marker of passive diffusion). The radioactivity of  $^{125}\text{I}$ -rhEGF at each sampling time point (0.5, 1, 2, 4 and 8 hr) was correlated ( $p < 0.05$ ) with the corresponding radioactivity of  $^{14}\text{C}$ -inulin. It appears to indicate the rhEGF may be uptaken into the skins mainly by the passive diffusion. This hypothesis was supported by the constant specific binding of EGF to the skin homogenates regardless of the skin models. Receptor mediated endocytosis (RME) appears to contribute negligibly, if any, to the overall uptake process.

**Keywords** □ Epidermal growth factor, burned skin, stripped skin, dermal uptake, organ distribution, intact drug, passive diffusion, receptor mediated endocytosis, specific binding, aminopeptidases, immunoprecipitin.

상피성장인자(이하 EGF라 칭함)는 1962년 Cohen  
이 수컷 마우스의 악하선에서 처음 분리한 물질

(mEGF)에서 유래한다. 1975년 Gregory는 이전에  
Gray가 사람의 오줌에서 발견한 urogastrone이  
mEGF와 구조적으로 유사함을 밝혔다. 그 후 이 uro-  
gastrone을 hEGF라 부르게 되었다.<sup>1)</sup> mEGF는  
60개, hEGF는 53개의 아미노산 잔기로 이루어진 펩타

<sup>#</sup> 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 02-880-7873 (팩스) 02-885-8429

이드 약물로 그 기원에 따라 아미노산의 배열에는 다소 차이가 있으나 삼차원 구조의 골격이나 생물학적 작용은 같다.<sup>2)</sup>

EGF는 뇨, 눈물 및 침과 같은 체액이나, 위장관, 신장, 뇌, 폐, 뼈 및 피부와 같은 부위에 분포하며, EGF 수용체와 결합하여 그 생물학적 작용을 나타내는 것으로 알려져 있다.<sup>3-5)</sup> EGF는 *in vitro*에서는 세포의 종류에 따라 다르기는 하나 세포를 성장시키고 유전자를 활성화하며, *in vivo*에서는 상피의 상처를 치유 (상피재생) 하고, 위산 분비를 억제하며, 안구의 각막이나 뼈 부위를 치유한다고 한다.<sup>1)</sup>

EGF를 *in vivo*에서 피부에 적용하였을 때의 상피 재생 효과를 요약해 보면 다음과 같다. 흰쥐의 피하에 EGF의 PVA 스폰지를 이식하면 EGF가 서서히 방출되어 7일째에 대조군에 비해 과립조직, DNA 및 단백질 함량등이 현저히 증가하였다.<sup>6)</sup> Calcium alginate beads에 EGF를 함유시킨 서방성 제형을 적용하면 상피의 neovascularization이 관찰되었으나 대조군(속방성 제제)에서는 효과가 없었다.<sup>7)</sup> 또 마우스의 창상에 EGF를 0.5 ng씩 1일 2회, 7~15일간 도포하였을 때 상처부위의 tear strength가 유의성있게 개선되었는데 특히 기체가 겔(Carbopol 940)일 때가 생리식염수인 경우보다 더 좋았다.<sup>8)</sup> 12명의 피부 이식 환자에게 sulfadiazine 크림에 EGF(10 µg/ml/2 cm<sup>2</sup>)를 섞어 1일 2회 도포하면 sulfadiazine 단독 투여시보다 치유율이 유의성있게 개선되었다.<sup>9)</sup> 화상 환자에게 피부를 이식하였을 때 donor site에 EGF 크림제를 도포하였더니 치유 시간이나 치유율이 개선되었다.<sup>10)</sup> 한편 흰쥐의 화상, 창상 및 허혈성 창상에 EGF를 단독으로 투여하였을 때는 손상된 피부의 치유 촉진 효과가 나타나지 않고 protease 저해제를 병용투여하였을 때에만 과립조직의 중량 및 hydroxyproline 함량등 상피 조직 회복의 지표가 개선되었다고 한다.<sup>11-15)</sup> 참고로 EGF를 피하 투여할 때 카프린산 나트륨, EDTA, 글리콜산 나트륨등의 흡수 촉진제와 병용 투여하였더니 EGF의 대사가 저해되어 EGF의 혈중농도가 증가하였다는 보고도 있었다.<sup>16)</sup>

이러한 약리 작용을 임상적으로 응용하기 위하여는 우선 약물의 체내 동태를 파악하여야 한다. 흰쥐에 EGF를 정맥 투여하였을 때, 투여 용량에 따라 50 µg/kg 이하에서는 반감기가 1.5분, 100 µg/kg 이상 투여시는 2상의 소실계를 나타내어 반감기가 상에서는 1~

4분, 상에서는 14~24분이라고 보고되어 있으며, 이 용량에서 용량의존성을 나타내었다.<sup>17)</sup> 돼지에 있어서는 rhEGF 10 µg/kg을 정맥 투여시 그 소실반감기는 약 2분으로 30분 정도에 다 소실되며, 피하 주사시는 12시간까지도 약물이 지속되었고<sup>18)</sup>, <sup>131</sup>I-EGF 3.4~4.7 MBq/kg을 정맥 투여시는 3상의 소실계를 나타내어 반감기가 α상에서는 0.4~0.7분, β상에서는 2.0~2.2분, γ상에서는 53.3~97.6분이었다.<sup>19)</sup> 마우스에서는 hEGF 0.1~1.0 mg/kg를 피하, 복강 및 근육주사하였을 때 반감기가 각각 40, 20 및 10분이었다.<sup>20)</sup>

그러나 피부에 국소적으로 적용한 EGF 체내 동태에 대하여는 보고된 것이 없다. 비록 EGF가 내인성 물질로서, 약리 효과를 보기 위한 실험들에서 우려할 만한 부작용을 나타내지는 않았으나 설치류의 등 부위 피부에서 EGF에 의한 과다증식, 각질화 및 모발성장억제와 같은 증상이 나타난다는 보고<sup>3)</sup>가 있었다. 그러므로 특히 피부나 각막 손상과 같은 질환에 장기간에 걸쳐 EGF를 적용하고자 할 경우 그 잠재적 부작용을 회피하기 위하여 국소적용된 EGF의 체내 이행을 파악할 필요가 있다.

따라서 이번 연구에서는 피부에 적용된 rhEGF의 피부 조직내로의 투과 및 소실 기전을 알아 보고자 하였다. 즉 화상 또는 창상(創傷)을 유발시킨 헤어리스 마우스의 피부에 <sup>125</sup>I로 표지된 rhEGF(<sup>125</sup>I-rhEGF)를 국소 적용한 후 경시적으로 피부 조직 및 체내로 방사능 또는 EGF가 이행하는 정도를 조사하였다. 또 EGF의 피부 투과 기구를 알아보기 위하여 이놀린의 피부 투과 실험을 하였으며, 피부 조직중에 있는 EGF 수용체가 피부 손상후 경과 시간에 따라 어떻게 변화하는지 알아보기 위하여 피부 조직 homogenate와 <sup>125</sup>I-rhEGF와의 specific binding을 검토하였다. 한편 화상을 입게 되면 피부 병소의 proteolytic activity가 증가한다는 보고<sup>11)</sup>가 있었으므로 피부 손상에 의해 여러 가지 peptidase의 함량이 어떻게 변화하는지도 조사하였다.

## 실험방법

**실험 재료 및 사용 기기** - 시약으로는 <sup>125</sup>I-rhEGF (대용제약; specific activity 0.2 µCi/µg), <sup>14</sup>C-inulin (NEN Products, Boston, MA, 미국; specific activity 0.0028 µCi/µg), Soluene-350 (Packard, A Canberra Co., Groningen, 네델란드), 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

(Yakuri Pure Chemicals Co., Osaka, 일본), LSC cocktail Formula-989 (NEN, Boston, MA, 미국), Immunoprecipitin (formalin-fixed Staph A cell: Gibco BRL, Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, 미국), anti rhEGF rabbit antiserum (Allelix Biopharmaceuticals Inc., 미국),  $\text{MgCl}_2$ , aprotinin, bovine serum albumin, Tris (이상 Sigma Chemical Co., 미국),  $^{125}\text{I}$ -rhEGF (Amersham, 영국; specific activity 800  $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$ ), rhEGF(대웅제약), 3,5-diaminobenzoic acid HCl (Aldrich Chemical Co., 미국), deoxyriboneucleic acid sod. salt (DNA highly polymerized from calf thymus: Sigma Chemical Co., 미국), sodium chloride (Shinyo Pure Chemical Co., 일본), sodium dihydrogen phosphate 및 sodium hydrogen phosphate (Junsei Chemical Co., 일본), leucine  $\beta$ -naphthylamide, arginine  $\beta$ -naphthylamide, alanine  $\beta$ -naphthylamide, p-dimethylaminobenzaldehyde, Folin & Ciocalteu's phenol reagent (이상 Sigma Chemical Co., 미국), Pluronic F-127 (BASF Co., 독일), 주사용증류수 (중외제약), 주사용에탄올 (안진제약) 등을 사용하였으며, 피부 스트립용 테이프로는 아세테이트 점착테이프 (Scotch Magic™ Tape, 한국 3M사)를 사용하였다. 재료로는 PVC sheet(신한무역), urethane foam tape(한국 3M사), 정맥용 카테터 (Vasculon 2, Viggo AB, Helsingborg, 스웨덴)를 사용하였다.

기기로는 thermocontroller (아립전자), microcentrifuge (Centronics, Microfuge 3600, U.S.A.), homogenizer (Ultra Turrax T25, IKA-Labor-technik, Janke & Kunkel GmbH, 독일), 감마 카운터 (Cobra Auto-Gamma, Canberra Co., 미국), liquid scintillation counter (Wallac system 1400 counter, An EG & G Co., Turku, 핀란드)를 사용하였다.

**손상 피부 모델** -  $25 \pm 4$  g의 헤어리스마우스(암컷)의 복부를 투여부위로 선택하였다. 복부 피부의 두께는 암수에서 거의 같은 것으로 알려져 있다.<sup>21)</sup> 손상 피부의 모델로 화상과 창상 모델을 택하였다. 화상 피부 모델은 헤어리스마우스에게 5 mg/ml 농도의 펜토바르비탈 나트륨 용액을 10 ml/kg 용량으로 복강 주사하여 마취시킨 후 사지를 고정시키고 수욕중에서 100°C로 가열한

원형(직경 1.4 cm)의 철제 인두를 5초간 복부에 눌러 화상을 유발시켰다. 창상 피부 모델은 화상 모델 준비 시와 마찬가지로 고정시킨 헤어리스마우스의 복부의 피부에 아세테이트 점착테이프를 이용하여 표피를 벗겨내어(20회 반복) 만들었다. 손상 피부 또는 정상피부(대조군)에 직경 1.4 cm의 원형 윤곽을 그어 약물 적용 부위를 표시하였다.

**약물의 투여 및 시료채취** - 손상을 입은 부위의 피부 및 대조 부위의 피부에 PVC sheet와 우레탄 foam tape를 이용하여 직경 1.4 cm의 원형으로 투여 부위를 설정하였다. 다음 25% Pluronic F-127로 조제한  $^{125}\text{I}$ -rhEGF(약 0.4  $\mu\text{Ci}$ ) 및  $^{14}\text{C}$ -inulin(약 0.14  $\mu\text{Ci}$ ) 함유 용액 200  $\mu\text{l}$ 씩을 PTFE 정맥 카테터를 끼운 주사기로 투여 부위에 발라 주었다. 여기에서  $^{14}\text{C}$ -inulin은 분자량 약 5400정도의 중성 고분자로 EGF와 분자량이 비슷하고 단순 확산에 의해서만 수송되는 물질로서 약물의 피부 투과 기전을 알아 보기 위하여 사용하였다. 또 기제로서 Pluronic F-127을 선택한 것은 이 기체중에서 hEGF의 안정성이 좋고, 37°C에서 2시간에 80%이상의 EGF가 용출되었다는 보고<sup>22)</sup>가 있기 때문이었다.

0.5, 1, 2, 4 및 8시간을 관찰 시간으로 정해두고, 각 군마다 4마리씩을 정해진 시간이 되면 물, 70% 에탄올, 물의 순서로 약물 적용 부위를 3회씩(총 9회) 닦아내고 그 부위의 피부를 벗겨 내었다. 벗겨낸 피부의 진피 부위에 있는 지방분 및 혈관은 조심스럽게 제거하였다. 그 다음 마우스를 개복하여 심장으로부터 약 0.2 ml씩의 혈액을 채취하고, 위, 간, 신장과 비장을 적출하였다. 적출 장기는 상수로 세척하고 흡수지로 물기를 제거하였다. 이중 피부는 절반으로 나누어 일부는 -70°C에서 얼려두고, 나머지는 무게를 단 후 바로 조직중 방사활성을 측정하였다. 혈액은 바로 원심분리하여 혈장을 분리하고, 나머지 장기들은 그대로 정량시까지 -70°C로 얼려두었다.

**시료중 방사활성 측정** - 피부, 혈액 및 각 장기중의  $^{125}\text{I}$ -방사활성을 측정하기 위해서는 각 시료의 무게를 잰 후 감마 카운터용 바이알에 넣고 감마 카운터로 측정하였다. 피부중  $^{14}\text{C}$ 의 방사활성을 측정하기 위하여는 피부 시료의 무게를 잰 후 LSC용 폴리에틸렌 바이알에 넣고 여기에 Soluene-350, 0.5 ml씩을 가하였다. 50°C의 오븐에서 하룻밤 방치하였다가 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  100  $\mu\text{l}$ 씩을 가한 뒤, 실온에서 6시간 이상 방치하였다. 그

후 바이알에 LSC cocktail (NEN Formula-989) 5 ml씩을 가하여 잘 흔들고, 실온에서 하룻밤 방치하였다가 liquid scintillation counter로 측정하였다.

**시료중 활성 약물 분율의 측정** - 각 시료중 활성 약물 분율은 Tyson등의 항원-항체 반응을 이용한 immunoprecipitin test<sup>23)</sup>를 변형하여 측정하였다. 즉, 조직의 종류에 따라 무게의 3~5배량의 pH 7.4 PBS를 가하고 호모게나이저를 이용하여 조제한 각 조직의 균질화액 약 200  $\mu$ l에 항체 100:1 희석액 100  $\mu$ l를 가하고 상온에서 1시간 동안 거품이 일지 않을 정도로 약하게 진탕하며 반응시켰다. 여기에 immunoprecipitin (formalin-fixed Staph A cell) 100  $\mu$ l를 가하고 다시 상온에서 30분 반응시킨 다음, 14,000 g에서 10분간 원심분리하였다. 항체는 대용 제약에서 제조한 rhEGF의 폴리클로날 항체를 사용하였으며, 침전과 상청중의 방사활성을 측정하고 이로부터 활성 약물의 분율을 계산하였다.

$$\text{활성약물의 분율(\%)} = \frac{\text{[침전중 방사활성 cpm]}}{\text{[침전중 방사활성 + 상청중 방사활성 cpm]}} \times 100$$

표준 <sup>125</sup>I-rhEGF의 회수율은 1 ng 이상에서 89.3~90.2%(평균 89.5%)였고, 항체를 가하지 않은 경우 6.4~5.6%(평균 6.0%)가 회수되었다.

**피부 조직의 병태 생리학적 변화 측정** - 피부의 손상은 시간이 경과함에 따라 회복된다. 이러한 회복은 약물의 투과에 영향을 미칠 가능성이 있다. 이를 검토하기 위하여 피부를 손상시킨지 1, 4, 8시간 후 피부중의 EGF 수용체 결합, DNA 함량, 단백 분해 효소 활성, 단백 함량을 측정하였다. 이를 위하여 다음과 같이 피부를 적출하여 호모지네이트 상청을 조제하였다. 헤어리스마우스의 복부에 화상과 창상을 일으킨 후, 약물을 적용하지 않은 상태로 각각 1, 4, 및 8시간 경과 후에 피부 조직을 적출하였다. 피부 조직의 호모지네이트는 Wynn등의 방법<sup>24)</sup>을 변형하여 만들었다. 즉, 적출한 조직을 드라이 아이스상에서 바로 얼린 뒤 -70°C로 보관하였다가 사용시 액체 질소로 냉동시켜 유발과 유봉을 이용하여 분쇄하였다. 여기에 각 조직 무게의 9배량에 달하는 pH 7.4 Tris-HCl 완충액(5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ g/ml aprotinin)을 가하고 호모게나이저를 이용하여 10% 호모지네이트를 얻은 후, 계속하여 4°C, 3000 g에서 5분간 원심분리하여 상청을 얻었다.

**EGF 수용체 결합 시험** - Yanai등의 방법<sup>25)</sup>을 수정하여 실시하였다. 즉, 상기 피부 조직 호모지네이트의 상청 200  $\mu$ l에 반응액 200  $\mu$ l를 가한 후 23 $\pm$ 1°C에서 60분간 배양하였다. 사용한 반응액은 특정결합분석을 위해서는 A액을, 비특정결합분석을 위해서는 B액을 사용하였다. A, B액의 처방은 다음과 같았다.

	A	B
Tris	0.05 M	0.05 M
MgCl <sub>2</sub>	5 mM	5 mM
Aprotinin	1 $\mu$ g/ml	1 $\mu$ g/ml
BSA*	0.1%	0.1%
rhEGF	-	360 ng
<sup>125</sup> I-rhEGF	50000 cpm**	50000 cpm

\* BSA : Bovine serum albumin.

\*\* <sup>125</sup>I-rhEGF 50000 cpm : rhEGF로서 0.017 ng 상당량.

반응액의 pH는 7.4로 하였으며, 이는 EGF와 수용체간의 결합에 있어서 적정 pH로 알려져 있다.<sup>26)</sup> 또 23 $\pm$ 1°C에서 60분간 배양한 것은 이 온도에서 60분 이내에 결합이 평형에 도달함이 보고<sup>24)</sup> 및 예비 실험에서 밝혀졌기 때문이다. 60분간 배양후 빙냉시킨 pH 7.4의 0.1% BSA 함유 PBS 1 ml를 가하여 반응을 종료시키고, 신속여과법으로 결합된 약물을 분리하였다. 신속여과시 사용한 필터는 유리섬유 필터(GF/F, Watman, England)였으며, 여과가 끝난 후 수초 이내에 필터를 빙냉시킨 pH 7.4의 0.1% BSA 함유 PBS 4 ml로 세척하고 필터상 잔류 방사능을 측정하여 결합된 약물의 분율을 구하였다. 수용체의 특정결합 %는 다음 식을 써서 계산하였다.

$$\text{Specific binding(\%)} = \frac{\text{[반응액 A액 첨가시 필터상 잔류 cpm]} - \text{[반응액 B액 첨가시 필터상 잔류 cpm]}}{\text{[가한 반응액 A 또는 B액중의 cpm=50000 cpm]}} \times 100$$

**DNA 함량 측정** - Erwin등의 방법<sup>27)</sup>을 사용하여 측정하였다. 각 호모지네이트의 상청(수용체 결합시험시 얻은 액) 100  $\mu$ l에 5% TCA 0.5 ml씩을 가하고 90°C에서 30분간 가열하여 혼재된 단백등을 침전시켰다. 이를 4°C로 식힌 다음 탁상용 원심분리기로 5분간 원심분리하였다. 상청을 100  $\mu$ l의 200 mg/ml 3,5-di-aminobenzoic acid HCl과 60°C에서 1시간 배양하여 발색시킨 다음 1N-HCl 2 ml를 가해 반응을 종료시키고 excitation 400 nm, emission 520 nm에서 형광

광도를 측정하였다. DNA로서 31.25~500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도 범위에서 직선성이 있었으며 이 검량선으로부터 각 homogenate의 상청중 DNA 함량을 산출하였다.

**단백 분해 효소 활성 분석** - 단백 분해 효소로는 점막중에서 단백질 의약품의 exoaminopeptidase로 작용하는 것으로 알려진 leucine aminopeptidase, arginine aminopeptidase<sup>28)</sup>와, 또 rhEGF의 피하투여시 enzyme barrier로 작용한다고 생각되었던 alanine aminopeptidase<sup>16)</sup>를 선택하였다. 이중 특히 leucine aminopeptidase (0.1 unit/ml)는 37°C, pH 7.3에서 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도의 rhEGF를 90% 이상 분해하는데 20분 정도 밖에 걸리지 않음이 보고되어 있다.<sup>16)</sup> 피부 손상시 조직중 단백 분해 효소는 다음과 같이 측정하였다. 각 효소의 함량은 Murakami등의 방법<sup>16)</sup>으로 측정하였으며, 정상 조직에서의 값을 100%로 하여 상대적 함량을 산출하였다. 대표적인 aminopeptidase인 leucine aminopeptidase에 대하여는 그 흡광도에 있어서 10~50 unit/ $\mu\text{l}$  범위에서 직선성이 있음을 확인하였다.

우선 각 효소의 기질로서 leucine  $\beta$ -naphthylamide, arginine  $\beta$ -naphthylamide, alanine  $\beta$ -naphthylamide의 0.2 mg/ml 0.05 M pH 7.4 PBS 완충액 용액 0.5 ml씩을 37°C에서 3분간 배양한 후 각 조직 호모지네이트의 상청(receptor binding assay시 얻은 액) 30  $\mu\text{l}$ 를 가하였다. 이 혼액을 37°C에서 15분간 인큐베이션하고 0.2N HCl 1 ml를 가하여 효소 반응을 종료시켰다. 여기에 4% *p*-dimethylaminobenzaldehyde의 EtOH 용액 1 ml를 가한 뒤 실온에서 20분 방치하여 발색시켜 450 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

$$\text{상 조직과 비교한 각 효소의 활성(\%)} = \frac{[\text{손상 피부 조직 상청의 Abs}_{450}]}{[\text{정상 피부 조직 상청의 Abs}_{450}]} \times 100$$

**단백 함량 측정** - 피부 손상시 조직중 단백 분해 효소 함량의 총 지표로서 조직중 단백 함량을 측정하였다. 정량 방법은 Lowry등의 방법 (Bollag and Edelstein, 1991)을 사용하였다. 조직 호모지네이트의 상청 100  $\mu\text{l}$ 에 물을 가하여 총용량이 1 ml가 되게 한 후 상온에서 20분 방치하였다. 여기에 folin & ciocalten's phenol reagent 0.5 ml씩을 가하고 빠르게 섞었다. 30분 방치후 750 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 이 방법은 BSA로서 50~700  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도 범위에서 직

선성을 나타내었으며 이 검량선으로부터 조직 호모지네이트의 상청 중 단백질 함량을 산출하였다.

## 실험결과 및 고찰

**EGF의 피부 투과** -  $^{125}\text{I}$ -rhEGF를 적용한 피부 중의 총 방사활성 농도 및 활성약물 농도의 경시 변화를 Fig. 1에 나타내었다. 정상 피부에서는 총 방사활성 및 활성 EGF의 투과가 매우 적었으며 1시간에서 최대치를 보인 뒤 오히려 감소하는 경향을 보였다. 화상 피부에 있어서도 정상 피부와 마찬가지로 경향을 보였으며 두

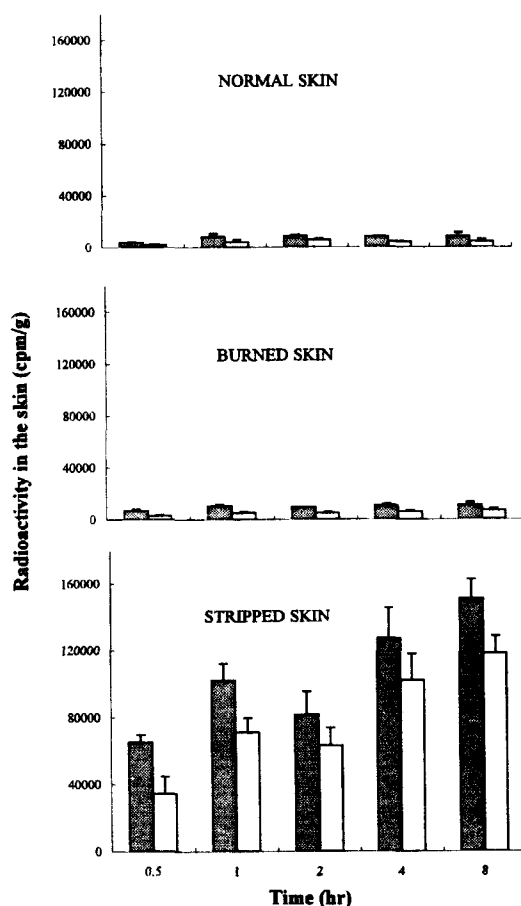


Fig. 1 — Skin absorption of radioactivity (cpm/g skin tissue, mean S.E., n=4) after topical application of  $^{125}\text{I}$ -rhEGF preparation on the normal, burned and stripped skins (applied area : 154 mm<sup>2</sup>) of hairless mice at  $^{125}\text{I}$ -rhEGF dose of 0.4  $\mu\text{Ci}$  (200  $\mu\text{l}$  as 25% Pluronic F-127 solution). ■ and □ represent total radioactivity and intact  $^{125}\text{I}$ -rhEGF originated radioactivity, respectively.

군 모두 시간대별로 유의성있는 차이를 보이지 않았다. 그러나 창상 피부에 있어서는 각 시간대 별로 정상 피부의 10~20배에 달하는 총 방사활성 및 활성 EGF의 투과가 관찰되었고 또 이 투과는 시간이 경과함에 따라 증가하는 경향을 보였다. 이는 정상과 화상 피부에서는 남아있는 각질층이 EGF의 투과 장벽으로 작용하나, 창상 피부에는 각질층이 없어 투과가 다른 군보다 비교적 쉽게 이루어지기 때문으로 생각된다. 한편 피부 조직중 총 방사활성에 대한 활성약물의 분율은 정상 및 화상군에서는 40~60% 이었으나 창상군에서는 60~80%로 다른 군보다 다소 높았다.

**EGF의 혈장 중 농도** - Fig. 2는 각 피부에 도포한 약물의 혈장중 방사활성 농도 및 활성약물 농도를 나타낸다. Fig. 1에서와 마찬가지로 창상 피부군이 가장 높

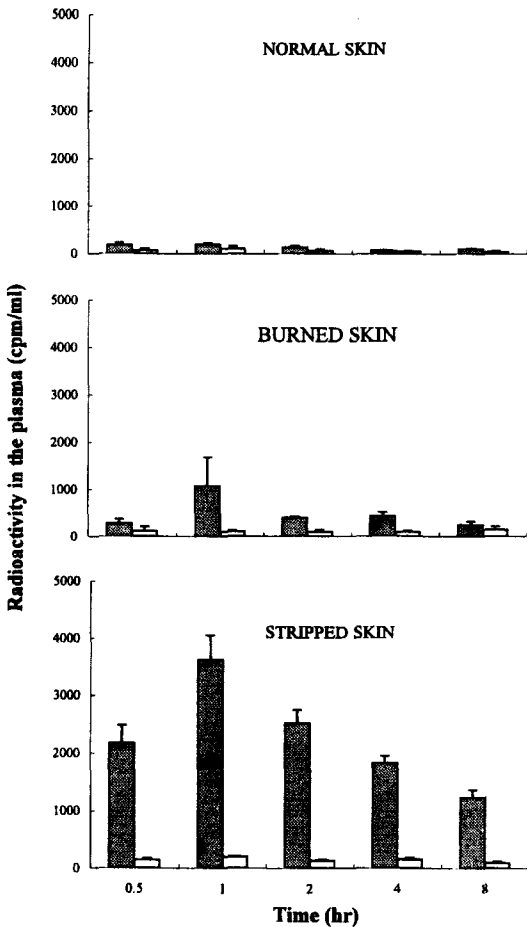


Fig. 2—Radioactivity in plasma after topical application of <sup>125</sup>I-rhEGF preparation. For others, see the legend of Fig. 1.

은 혈장 중 농도값을 나타냈으나, 피부 조직에서와는 달리 1시간에 최대 농도를 보였다. 또 모든 혈장 시료 중 총 방사활성 중 활성약물의 분율은 50% 미만으로 피부 모델간의 유의적인 차이는 없었다. 특히 창상피부군에서는 모든 시간대에서 그 분율이 평균 10% 미만으로 낮은 값을 나타내었다. 이는 창상피부에서는 다른 군의 피부 조직에서 보다 EGF가 대사되기 쉽기 때문으로 생각되었다. 진피 표면이나 표피의 기저층, 땀샘, 모세혈관과 같은 피부의 여러 부위에 여러가지 EGF 분해효소류(aminopeptidase)가 분포되어 있다고 하는 연구 결과<sup>28)</sup>는 이 추론을 지지하는 것으로 생각되었다.

**EGF의 장기 분포** - Fig. 3에 EGF를 각 피부에 국소 적용한 후 일정시간 후 위, 간, 신장 및 비장에 분포한 총 방사활성 및 활성약물의 농도를 보였다. 4 장기에서 모두 화상피부군은 정상피부군과 차이를 보이지 않았으나 창상피부군에서는 현저한 약물의 분포(총 방사활성 및 활성약물의 분포)가 관찰되었다. 특히 위장에서의 분포는 다른 장기의 10배 이상에 달하였는데 이는 피부조직 중 총 방사활성 농도의 10~20%에 이르는 값

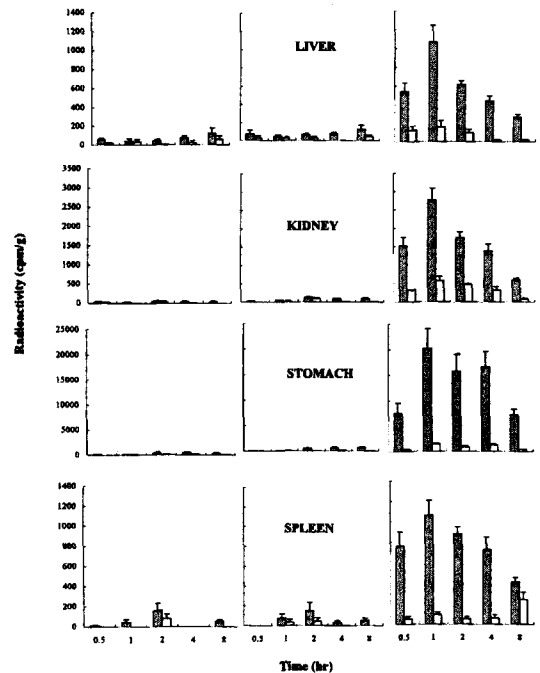


Fig. 3—Radioactivity in several organ tissues after topical application of <sup>125</sup>I-rhEGF preparation to the normal (left), burned (middle) and stripped skins (right column). For others, see legend of Fig. 1.

이었다. 그러나 이중 활성인 분율은 10% 미만으로 대부분의 약물이 대사된 채로 위장관에 도달함을 알 수 있었다. EGF의 주 소실 장기중 하나인 간중의 총 방사활성 농도는 혈액 중 총 방사활성 농도(마우스의 총 혈액량을 체중 20 g당 1.7 ml<sup>29)</sup>로 하여 환산한 값) 보다는 적었으나 신장중 총 방사활성 농도에 비하여 높았다. 조직중 총 방사활성 농도를 조직 중량당의 농도로 환산하였을 때 창상군에서는 오히려 신장중에서의 값이 간장중에서의 값보다 높게 나타났다. 비장중 총 방사활성 농도는 간중 농도와 비슷하였으나 총 방사활성 농도의 조직으로의 이행량은 관찰된 조직중 가장 적었다.

각 장기에 대해 활성 약물의 분율 면에서 고찰할 때 정상과 화상군은 분포한 방사활성이 적어 활성 분율이 검출되지 않은 경우도 많았으나 창상군에서는 대체로 20% 미만의 활성 분율을 나타내고 있었으며, 네 장기중 신장중의 활성 분율이 다른 장기에 비해 높은 경향을 보였다. 그러나 어느 경우이든 총 방사활성의 경시적 변동 추이는 피부보다는 혈장중에서의 변동 추이를 그대로 반영하여 모두 1시간에 최대 방사활성 농도를 나타내고 있었으며 피부중 농도에 비하면 1% 미만에 불과하였다.

이상으로부터 <sup>125</sup>I-rhEGF는 정상 및 화상 피부 모델에서는 피부 투과를 거의 하지 못하였고, 창상 피부 모델에서는 이에 비하여 훨씬 많은 양이 투과함을 알 수 있었는데, 이는 약물의 흡수에 각질층이 큰 장벽으로 작용함을 시사하는 것이다. 그러나 등전점 4.55인 EGF가 pH 6.0~7.5로 알려진 Pluronic 기체중에서 음전하를 띠고 있을 것이기 때문에 음전하를 띠고 있는 피부 표면<sup>30)</sup>에서 흡수에 저해를 받았을 가능성도 다소 있을 것이다. 특히 창상 피부 모델에서 투여 후 1시간을 기점으로 피부중 총 방사활성 농도는 증가하는데 비하여 혈액 및 조직에서의 농도는 감소하기 시작하였는데 이는 창상 조직에서는 일정 시간 경과후부터 피부 조직에서 전신 순환으로의 수송계가 포화되었기 때문일 가능성이 있다. 또 각 장기에 분포하는 활성 약물의 분율로부터 <sup>125</sup>I-rhEGF는 활성을 가진 채 체내로 이행하기 어려움을 알 수 있었다.

**EGF의 피부 조직중 투과 기전** - 일반적으로 물질의 막 투과는 단순확산이나 능동수송에 의해 일어난다.<sup>31)</sup> EGF도 단순확산이나 EGF 수용체에 의한 receptor mediated endocytosis (RME)에 의해 피부 조직을 투과할 것으로 기대되어 이에 대하여 검토하였다. 우선

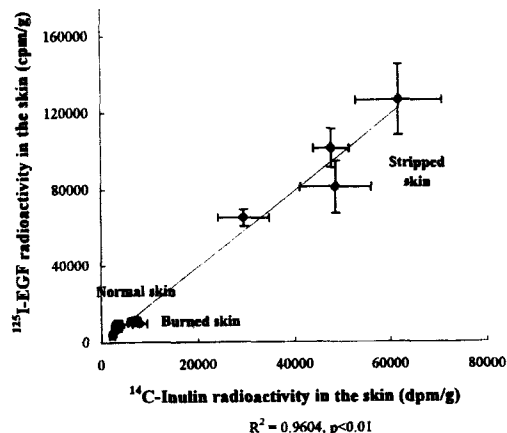


Fig. 4—Correlation between skin absorption of <sup>14</sup>C-inulin and <sup>125</sup>I-rhEGF after topical application of <sup>125</sup>I-rhEGF (0.4 μCi in 200 μl) containing <sup>14</sup>C-inulin (0.14 μCi). For others, see Fig. 1.

단순확산에 의해 약물이 수송되는지 알아보기 위하여 <sup>14</sup>C-inulin과 <sup>125</sup>I-rhEGF를 병용 투여한 후 각 방사활성의 피부 조직 이행을 검토하였다. Fig. 4는 <sup>14</sup>C-inulin의 피부 조직중 농도와 <sup>125</sup>I의 방사활성농도와를 플롯한 결과이다. 피부모델에 상관 없이 두 방사활성 농도간에 유의성(p<0.01)있는 비례관계가 관찰되었다. 이로부터 EGF는 피부모델(정상, 화상, 창상)에 관계없이 대부분 단순확산에 의해 피부중으로 투과되는 것으로 추정되었다.

다음으로 EGF의 RME에 관여하는 EGF 수용체가 피부의 손상 또는 손상후 경과 시간에 따라 어떻게 변화하는지 <sup>125</sup>I-rhEGF와 피부 조직 호모지네이트와의 특정결합을 검토함으로써 알아 보았다 (Fig. 5(A)). 그 결과, 피부모델간에 특정결합 % 차이는 없었다. 가장 높은 투과율을 보였던 창상군에서도 8시간째에 결합이 현저히 증가하기는 하였으나 경시적으로 유의성있는 변화를 보이지 않았다. 따라서 피부모델에 따라 약물의 피부 투과 정도에 차이를 보인 현상(Fig. 1 및 2)을 RME의 차이로 설명할 수 없었다. 그러나 문헌에 의하면 피부모델에 따라 EGF 수용체의 발현 상태가 경시적으로 달라진다고 한다. 예컨대 EGF-수용체는 화상을 입고 난 후 시간의 경과에 따라 발현 부위가 달라지며<sup>32)</sup>, *in vitro*상에서 46°C의 열에도 안정하다고 한다.<sup>33)</sup> 한편 마우스 꼬리 부위에 유발한 창상에서는 7일 동안 EGF-수용체의 함량이 초기에 급격히 증가하다가 후기에 감소한다.<sup>34)</sup> 또 건선과 같은 피부 질환에서는 EGF-수용체가 6시간 정

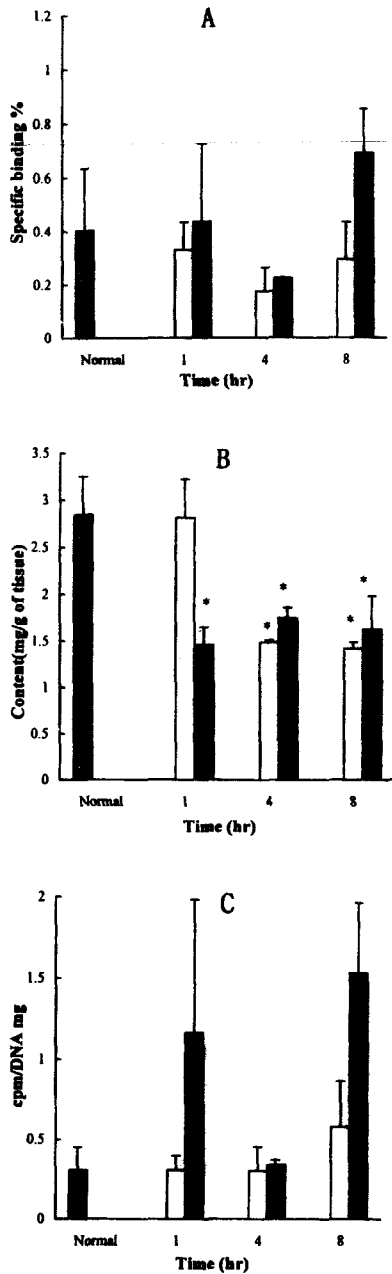


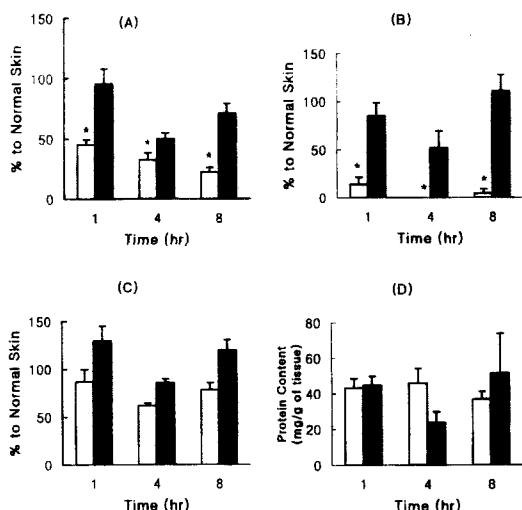
Fig. 5—Temporal changes in the specific binding of  $^{125}\text{I}$ -rhEGF with damaged skin homogenates (A), in the contents of DNA in damaged skin homogenates (B), and in the specific binding of  $^{125}\text{I}$ -rhEGF with damaged skin homogenates expressed per  $\mu\text{g}$  of DNA (C). All the values represent mean  $\pm$  SE of three or four determinations.  $\square$  and  $\blacksquare$  represent burned and stripped skin. \* significantly ( $p < 0.05$ ) different from the value for the normal skin.

도까지 증가하는 경향을 보였다.<sup>35)</sup> 이처럼 피부모델에 따라 EGF 수용체의 발현양상이 달라진다고 하는 보고들과 달리 본 실험에서는 피부모델간에 특정결합 %의 차이를 볼 수 없었는데, 이는 피부 조직 호모지네이트와  $^{125}\text{I}$ -rhEGF간의 결합이 심한 개체차를 보이며 그 값이 매우 낮기 때문이 아닌가 생각된다.

**EGF의 세포 분화 작용이 EGF의 투과에 미치는 영향** - EGF는 세포의 증식 또는 분화에 관여함이 알려져 있으므로 세포 분화의 지표로 볼 수 있는 DNA 함량이 피부 손상이나 손상후 경과 시간에 따라 변화하는지 알아 보았다. Fig. 5(B)에서 보인 바와 같이 DNA 함량은 피부 손상에 의해 감소되는 경향을 보였으며 특히 창상군에서는 세포 분화가 일어나는 것으로 알려진 상피세포의 기저층이 탈락되어 있으므로 전체적으로 정상군보다 유의성( $p < 0.05$ )있게 낮았으며, 화상군에서도 1시간을 기점으로 유의성있게 감소하였다. 이는 화상을 입은 후 가피가 탈락하는 현상을 반영하는 것이라고 생각되었다. DNA 함량당 피부 호모지네이트에 대한  $^{125}\text{I}$ -rhEGF의 결합률 (Fig. 5(C))은 정상피부군에 비하여 특히 창상피부군에서 대체로 증가하는 경향을 보였다. 그러나 유의성있는 차이는 아니었기 때문에 이 결과로부터 피부모델에 따른 피부투과의 차이를 세포분화의 차이로 설명할 수 없었다.

**손상 피부 조직중 단백 분해 효소가 활성 EGF 분율에 미치는 영향** - 피부 손상 종류에 따라 피부나 장기 조직중의 총 방사활성 중 intact한 약물 분율이 달라진 현상을 설명하기 위하여 단백질 의약품의 분해 효소 (aminopeptidase)의 활성이 손상 종류와 시기에 따라 어떻게 변화하는가 검토하였다. 최근 피부 조직의 대사계에 대하여 여러 가지 사실들이 밝혀지고 있으며, 단백 분해 효소, 특히 aminopeptidase류가 피부 조직 중에서 단백 분해에 중요한 역할을 하고 있다고 보고되었다.<sup>28, 36)</sup> 또한 화상을 입게 되면 피부 병소의 단백분해활성이 증가하며<sup>11)</sup>, 치유과정에 중요한 역할을 하는 acid proteinase가 토끼의 전층 창상에서 손상후 시간이 지남에 따라 3일까지 증가하였다고 하는 보고<sup>37)</sup>가 있었다. 한편 EGF는 체내에서 여러 가지 단백 분해 효소에 의하여 활성 또는 불활성 단백질이나 아미노산으로 분해됨이 알려져 있다.<sup>38)</sup> 따라서 피부 손상에 의하여 피부 조직내 단백 분해 효소 함량이 변화하는지 보기 위하여 각 피부 호모지네이트에서의 주요 aminopeptidase에 대한 함량 분석 실험을 하였다.





**Fig. 6**—Temporal change in the relative contents of leucine aminopeptidase (A), arginine aminopeptidase (B), alanine aminopeptidase (C) and protein (D) in the normal and damaged skin homogenates. For others, see Fig. 5.

그러나 그 결과 Fig. 6에서 보는 것처럼 손상피부에서의 단백 분해 효소 함량은 alanine aminopeptidase (Fig. 6-C)는 변화가 없었고 leucine aminopeptidase (Fig. 6-A)와 arginine aminopeptidase (Fig. 6-B)은 정상 피부군보다 유의성있는 감소를 보였다. 감소경향은 특히 화상의 경우 더 심하였다. 이는 특히 화상과 같은 손상에 의하여 피부 조직중 단백 분해 효소가 증가하였으리라 예측하였던 것과 상반되는 결과로서 화상을 유발하기 위하여 가한 고열에 의해 효소가 불활성화되었을 가능성이 시사된다. 그러나 창상 조직중 효소함량이 감소한 것은 단순히 세포수(여기서는 DNA 함량으로부터 추측)의 감소를 반영하는 것인지는 알 수 없었다. 따라서 이 실험계에서 손상 피부 조직중 일부 단백 분해 효소의 함량 변화는 피부 조직 및 다른 체내 장기로의 활성약물 분포에 크게 영향을 미치지 못하였으리라 생각되었다. 한편 총 단백 분해 효소 함량의 지표로서 각 피부 조직중 단백 함량(Fig. 6-D)을 측정하였을 때에도 피부 손상에 의하여, 또는 손상후 경과 시간에 따라 유의성있게 변화하지 않았다.

## 결 론

국소 피부에  $^{125}$ I-rhEGF를 적용한 후의 피부중 방사

활성은 창상군에서 가장 높은 분포를 보이며 경시적으로 증가하였던 반면, 화상군에서는 정상군과 마찬가지로 낮아 EGF의 피부 투과에 있어서 각질층이 투과장벽으로 작용함을 확인하였다. 피부중에서 방사활성 중 활성 약물의 분율은 정상 및 화상군에서는 40~60%, 창상군에서는 60~80%로 나타나 창상군의 활성 약물 분율이 더 높았다. 혈장중 방사활성은 피부 조직과 마찬가지로 창상군이 가장 높은 값을 나타내고 있었으며 투여 후 1시간을 기점으로 감소하였다. 그러나 방사활성 중 활성 약물의 분율은 정상과 화상군에서 약 50% 미만, 창상군에서는 10% 미만의 값을 나타내 세 군간 유의성 있는 차이가 없었다.

EGF의 피부 투과 기전을 검토하기 위하여 각 피부 모델에서 inulin의 투과와 비교한 결과 EGF의 피부중 농도는 inulin 농도에 비해하였다. 따라서 EGF의 피부 투과, 특히 창상 피부에서의 투과는 대체로 단순확산에 의해 이루어진다고 생각되었다. 한편 각 손상 모델에 있어서 EGF수용체와의 결합을 통한 RME가 EGF의 피부내 투과에 기여하는 정도를 측정하였다. 그 결과 EGF의 피부 투과는 창상 피부에서 가장 컸음에도 불구하고 수용체 결합은 정상, 화상, 창상피부 모델간에 유의성있는 차이를 보이지 않았다. 이는 inulin 투과 실험 결과 나타난 것처럼 EGF의 피부 투과는 RME 보다는 주로 단순 확산에 의해 일어나고 있음을 시사하는 것으로 생각된다. 그러나 창상 피부에서 DNA 함량당 결합 활성이 정상이나 화상 피부보다 3배 정도 높은 점(유의성은 없음)으로부터 창상시 RME 활성이 어느 정도 증가되었을 가능성이 시사되었다.

한편 위, 간, 신장 및 비장 중 방사활성 농도는 피부나 혈액에서와 마찬가지로 창상군이 가장 높은 값을 보였으며, 특히 위에서 다른 장기의 10배 이상 높았다. 그 다음으로는 신장 > 간장 > 비장의 순이었다. 각 조직중의 방사활성 중 활성인 분율은 대체로 20%미만이었으며 방사활성의 분포가 가장 컸던 위에서도 10% 미만으로 대부분의 약물이 대사된 채로 체내로 분포함을 알 수 있었다. 피부 손상 종류에 따라 피부나 장기 조직중의 총 방사활성 중 intact한 약물 분율이 달라진 현상을 설명하기 위하여 단백질 의약품의 분해 효소(aminopeptidase)의 활성이 손상 종류와 시기에 따라 어떻게 변화하는가 검토하였다. 그 결과 예상과는 달리 조직중 활성 약물의 분율이 가장 높았던 창상 피부에서 화상 피부보다 분해 효소 활성이 높았다. 즉, 창상 유발 4시간 후의 leucine

aminopeptidase의 활성만이 정상 피부보다 낮았을 뿐 창상 피부의 arginine aminopeptidase와 alanine aminopeptidase 활성은 정상 피부시와 차이가 없었다. 그러나 화상 피부에서는 alanine aminopeptidase 활성은 정상 피부와 차이가 없었으나 leucine amino-peptidase와 arginine aminopeptidase 활성은 정상시보다 현저히 낮았다. 즉 leucine aminopeptidase는 정상 피부의 1/2 이하, arginine aminopeptidase는 정상 피부의 1/5 이하로 매우 낮았다. 따라서 각 조직의 총 방사 활성 중 활성약물의 분율을 결정하는 것은 이러한 amino-peptidase의 활성이 아니라 다른 인자, 예컨대 EGF의 피부 투과 속도와 소실 속도의 밸런스 같은 인자 인 것으로 추정되었다.

### 감사의 말씀

실험에 도움을 주신 대응제약 중앙연구소 박명환 부 소장님과 정주영 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, 1988, pp. 253.
- 2) Campion, S. R. and Niyogi, S. K., Interaction of epidermal growth factor with its receptor., *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **49**, 353 (1994).
- 3) Fisher, D. A. and Lakshmanan, J., Metabolism and effects of epidermal growth factor and related growth factors in mammals., *Endocr. Rev.* **11**, 418 (1990).
- 4) Hayashi, T., Hashimoto, K. and Sakamoto, S., A sensitive enzyme immunoassay for human epidermal growth factor. Determination of hEGF in human serum and urine and pharmacokinetics in mouse., *J. Pharmacobio-Dyn.* **12**, 410 (1989).
- 5) Carpenter, G., Epidermal growth factor. Biology and receptor metabolism., *J. Cell Sci.* **S3**, 1 (1985).
- 6) Buckley, A., Davidson, J. M., Kamerath, C. D., Wolt, T. B. and Woodward, S. C., Sustained release of EGF accelerates wound repair., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 7340 (1985).
- 7) Downs, E. C., Robertson, N. E., Riss, T. L. and Plunkett, M. L., Calcium alginate beads as a slow-release system for delivering angiogenic molecules *in vivo* and *in vitro*., *J. Cell. Physiol.* **152**, 422 (1992).
- 8) Brown, G. L., Nanney, L. B., Griffen, J., Cramer, A. B., Yancey, J. M., Curtsinger, L. J., Holtzin, L., Schultz, G. S., Jurkiewicz, M. J. and Lynch, J. B., Enhancement of wound healing by topical treatment with epidermal growth factor., *N. Engl. J. Med.* **321**, 76 (1989).
- 9) Smith Jr., D. J., Thomson, P. D., Garner, W. L. and Rodriguez, J. L., Donor site repair., *Am. J. Surgery* **167**, 49S-51S (1994).
- 10) Celebi, N., Erden, N., Gonul, B. and Koz, M., Effect of Epidermal growth factor dosage forms on dermal wound strength in mice., *J. Pharm. Pharmacol.* **46**, 386 (1994).
- 11) 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).
- 12) 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).
- 13) 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).
- 14) 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).
- 15) Kiyohara, Y., Komada, F., Iwakawa, S. and Oku-

- mura, K., Improvement in wound healing by epidermal growth factor ointment., *Yakuzaijaku* **54**, 117 (1994).
- 16) Murakami, T., Misaki, M., Kojima, Y., Yamada, M., Yuki, M., Higashi, Y., Amagase, H., Fuwa, J. and Yata, N., Effect of absorption promoters on subcutaneous absorption of hEGF in rats., *J. Pharm. Sci.* **82**, 236 (1993).
- 17) 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).
- 18) Juhl, C. O., Vinter-Jensen, L., Jensen, L. S., Nexø, E., Djurhuus, J. C. and Dajani, E. Z., Systemic treatment with recombinant human epidermal growth factor accelerates healing of sclerotherapy-induced esophageal ulcers and prevents esophageal stricture formations in pigs., *Drug Dis. Sci.* **39**, 2671 (1994).
- 19) Vinter-Jensen, L., Frokiaer, J., Jorgensen, P. E., Marqvorsen, J., Rehling, M., Dajani, E. Z. and Nexø, E., Tissue distribution of <sup>131</sup>I-labelled epidermal growth factor in the pig visualized by dynamic scintigraphy., *J. Endocrinol.* **144**, 5 (1995).
- 20) Hayashi, T. and Sakamoto, S., Radioimmunoassay of human epidermal growth factor-hEGF levels in human body fluids., *J. Pharmacobio-Dyn.* **11**, 146 (1988).
- 21) Bronaugh, R. L., Determination of percutaneous absorption by *in vitro* techniques. In Bronaugh, R. L. and Maibach, H. I. (Ed.), *Percutaneous absorption drug*. Marcel Dekker, Inc., New York, 1989, pp. 221-238.
- 22) Dibiasse, M. D. G. (1991), "Topical formulation of epidermal growth factor for wound healing", Ph. D. Thesis, University of Rhode Island, U. S. A.
- 23) Tyson, L. M., Browne, C. A., Jenkin, G. and Thorburn, G. D., The fate and uptake of murine epidermal growth factor in the sheep., *J. Endocrinol.* **123**, 121 (1989).
- 24) Wynn, P. C., Maddocks, I. G., Moore, G. P. M., Panaretto, B. A., Djura, P., Ward, W. G., Fleck, E. and Chapman, R. E., Characterization and localization of receptors for epidermal growth factor in ovine skin., *J. Endocrinol.* **121**, 81 (1989).
- 25) Yanai, S., Sugiyama, Y., Kim, D. C., Sato, H., Fuwa, T., Iga, T. and Hanano, M., Binding of human epidermal growth factor to tissue homogenates of the rat., *Chem. Pharm. Bull.* **35**, 4891 (1987).
- 26) Newsted, J. L. and Giesy, J. P., Characterization of epidermal growth factor binding to hepatic plasma membranes of rainbow trout., *Scand. J. Gastroenterol.* **83**, 345 (1991).
- 27) Erwin, B., Stoscheck, C. M. and Florini, J. R., A rapid fluorometric method for the estimation of DNA in cultured cells., *Anal. Biochem.* **110**, 291 (1981).
- 28) Steinstrasser, I. and Merkle, H. P., Dermal metabolism of topically applied drugs. Pathways and models reconsidered., *Pharm. Acta Helv.* **70**, 3 (1995).
- 29) Davies, B. and Morris, T., Physiological parameters in laboratory animals and humans., *Pharm. Res.* **10**, 1093 (1993).
- 30) Hirvonen, J., Kontturi, K., Murtomaki, L., Paronen, P. and Urtti, A., Transdermal iontophoresis of sotalol and salicylate, the effect of skin charge and penetration enhancers., *J. Control. Rel.* **26**, 109 (1993).
- 31) Vander, A. J., Sherman, J. H. and Luciano, D. S., Movement of molecules across cell membranes. In *Human physiology*, McGraw-Hill Pub. Co., New York, pp. 107-137 (1990).
- 32) Wenczak, B. A., Lynch, J. B. and Nanney, L. B., Epidermal growth factor receptor distribution in burn wounds., *J. Clin. Invest.* **90**, 2392 (1992).
- 33) Liu, S. M. and Carpenter, G., Differential heat stress stability of epidermal growth factor receptor and erbB-2 receptor tyrosine kinase activities., *J. Cell. Physiol.* **157**, 237 (1993).
- 34) Stoscheck, C. M., Nanney, L. B. and King, Jr., L. E., Quantitative determination of EGF-R during epidermal wound healing., *J. Invest. Dermatol.* **99**, 645 (1992).

- 35) Nanney, L. B., Stoscheck, C. M., Magid, M. and King, Jr., L. E., Altered [<sup>125</sup>I]epidermal growth factor binding and receptor distribution in psoriasis., *J. Invest. Dermatol.* **86**, 260 (1986).
- 36) Zhou, X. H. and Li Wan Po, A., Comparison of enzymic activities of tissues lining portals of drug absorption, using the rat as a model., *Int. J. Pharm.* **62**, 259 (1990).
- 37) Kilic, N., Gonul, B., Aldemir, H. and Koz, M., Increases in acid proteinase and breaking strength during wound healing., *J. Fac. Pharm. Gazi*, **11**, 91 (1994).
- 38) Araki, F., Nakamura, H., Nojima, N., Tsukumo, K. and Sakamoto, S., Stability of rhEGF in various solutions., *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 404 (1989).