

## Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)의 방사선보호작용에 대한 실험적 연구

가톨릭대학교 의과대학 강남성모병원 치료방사선과, 가톨릭암센터

김 연 실 · 윤 세 철

**목 적 :** bFGF (basic fibroblast growth factor)는 섬유아세포(fibroblast)에서 분비하는 대표적인 성장인자로 섬유아세포 뿐 아니라 간질조직과 골수 및 다른 상피 근원세포의 성장에도 관여하며 방사선보호제 역할에 관한 연구가 시도되고 있다. 이 연구는 방사선보호제로서의 bFGF의 기능을 알아보고자 하였다.

**대상 및 방법 :** 간엽조직 기원(mesenchymal origin)인 마우스육종 180 종양세포를 생쥐 대퇴부 피하에 이식하고 bFGF를 투여한 후 전신방사선조사(6, 8, 10 Gy)하여 생쥐의 생존율을 조사하고 bFGF (3, 6  $\mu$ g/쥐)의 방사선보호효과를 관찰하였다. 동시에 이식한 마우스 180 고휘종양을 국소방사선조사한 후 bFGF가 종양성장에 미치는 영향을 알아보았다. 또한 bFGF에 의한 방사선보호효과의 기전을 이해 하고자 소장점막, 골수, 폐조직 및 이식종양조직에 대한 병리 조직학적 검사와 DNA terminal transferase nick-end labeling assay 방법으로 아포프토시스(apoptosis) 빈도를 측정하였다.

**결 과 :** 1) 방사선조사단독군에 비해 방사선조사와 6  $\mu$ g bFGF 투여병행군에서 생쥐의 골수치사를 감소시켜 생존율이 증가되었다( $p < 0.05$ ). 2) 방사선조사단독군에 비해 방사선조사와 6  $\mu$ g bFGF 투여병행군에서 공장 소낭선 길이 및 미세융모 길이가 유의 있게 증가되었다( $p < 0.05$ ). 소낭선세포의 아포프토시스 빈도는 방사선조사단독군에 비해 방사선조사와 bFGF 투여병행군에서 방사선조사후 8시간, 24시간에 감소하였으며 bFGF를 고용량 투여한 군에서 뚜렷하였다. 3) 골수조직에서는 방사선조사 후 7일, 14일째 세포 밀도가 방사선조사단독군에 비해 방사선조사와 6  $\mu$ g bFGF 투여병행군에서 증가하였으며 특히 거핵구(megakaryocyte) 계열의 증가가 뚜렷하였다. 4) 폐조직의 H-E 염색 조직소견에서 방사선단독군과 방사선조사와 bFGF 투여병행군 간의 차이는 없었다. 5) 골수 및 폐 조직에서 bFGF 투여에 따른 초기 아포프토시스 빈도의 차이는 없었다( $p > 0.05$ ). 6) 양성대조군과 bFGF단독투여군 비교시 bFGF투여에 의한 종양성장은 관찰되지 않았으며( $p > 0.05$ ) 방사선조사단독군과 방사선조사와 6  $\mu$ g bFGF 투여병행군에서도 종양성장곡선의 차이는 없었다( $p > 0.05$ ).

**결 론 :** 이상의 결과로 bFGF는 소장점막 및 골수세포에 방사선보호효과가 있었으며 그 기전은 조혈모세포 및 소장 낭선세포의 성장 및 재생을 촉진하고 초기에 방사선으로 유도된 아포프토시스를 감소시키기 때문인 것으로 생각된다.

**핵심용어 :** bFGF, 방사선보호효과, 아포프토시스

### 서 론

암 환자에 대한 방사선치료의 원칙은 정상조직에는 최소한의 손상을 주면서 악성종양세포만을 살상하는 것이다. 그러나 방사선감수성이 예민한 정상조직이 방사선조사 범위에 포함될 경우 방사선손상으로 인한 심각한 부작용을 초래하므로 방사선량을 제한해야하는 문제점이 있다. 따라서 정상세포를 보호하면서 부작용이 없고 종양치사효과에도 영향이 없는 방사선보호제(radioprotector)들에 대한 연구가 꾸준히 시

도되어 왔다.<sup>1)</sup>

지금까지 사용되어오던 방사선보호제들은 대부분 유리기 포획제(free radical scavenger)로서 방사선조사와 동시에 또는 수초이내에 투여되어야 하며 분할 방사선치료시 1회 투여로 그 효과를 기대 할 수 없고 방사선보호용량에서 부작용을 유발하여 임상적용이 어려웠다. 그러나 최근 연구되고 있는 사이토카인(cytokine) 방사선보호제들은 방사선조사 24시간 전에 투여해도 효과적이며 간혹 방사선조사 후에 투여해도 그 효과가 지속되는 것으로 알려져서 방사선보호제로서 임상응용 가능성은 오히려 높다고 생각된다. Basic fibroblast growth factor (bFGF)는 섬유아세포에서 분비하는 가장 중요한 사이토카인으로 섬유아세포의 성장에만 관여하는 것이 아니라 간엽기원(mesenchymal origin) 혹은 신경상피근원(neu-

이 논문은 2002년 5월 8일 접수하여 2002년 8월 9일 채택되었음.

책임저자: 김연실, 가톨릭의대 강남성모병원 치료방사선과

Tel: 02)590-1567, Fax: 02-3476-1365

E-mail: yeonkim7@catholic.ac.kr

roectodermal origin) 세포들의 성장에도 관여하며 특히 혈관 내피 세포에 친화력이 있는 혈관성장인자로서<sup>2)</sup> 시험관내(in vitro) 및 생체내(in vivo) 실험 결과 혈관내피세포와 골수세포의 방사선반응을 조절하는 효과가 있다고 알려져 왔다.<sup>3)</sup> bFGF의 방사선 보호효과는 방사선조사 후 유발된 혈관내피 세포들의 아포토시스를 억제하여 생긴다는 Langley 등<sup>4)</sup>의 보고가 있으나 bFGF가 다른 상피기원의 정상세포에 미치는 방사선보호효과는 아직 명확히 밝혀진 바 없다. bFGF가 방사선생물학적으로 주목을 받는 이유는 미세혈관에 대한 방사선손상이 모든 정상세포의 방사선손상 기전을 이해하는데 매우 중요하기 때문이다. bFGF는 혈관내피세포의 방사선손상을 보호함으로써 손상된 조직의 혈류를 증가시키며 세포의 재생에 필요한 국소조직내 환경을 개선하여 방사선 손상으로부터 재빠르게 복구하도록 한다. 즉 혈관에 대한 방사선 보호효과는 모든 세포의 방사선 반응성 및 감수성에 영향을 미친다고 할 수 있다. 반면에 bFGF는 종양 내 혈관에도 작용하여 종양성장을 항진시키고 신생혈관을 형성하여 전이를 촉진하는 등 유해한 효과를 유발할 수도 있다. 이 연구는 bFGF가 방사선으로 인한 정상조직 손상을 보호하면서 종양 세포의 성장을 증가시키지 않는 차별화된 보호효과가 있는지를 규명하여 방사선보호제로서 bFGF를 종양환자의 치료에 이용할 수 있는지 알아보려고 시도하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 재 료

#### 1) 실험동물

실험동물은 가톨릭의과대학 연구원 실험동물실에서 제공받은 생후 6~8주의 약 20 g 무게의 C3H 스킷 생쥐로 약 1주일 간의 적응 기간을 거친 후 건강한 생쥐만을 골라서 실험에 사용하였다. 실험군은 정상대조군(normal control group), 양성대조군(tumor control group), 방사선조사단독군(radiation alone

group), bFGF 단독투여군(bFGF alone group), 방사선조사와 bFGF 투여병행군(radiation and bFGF combination group)으로 각각 구분하였다. 마우스육종 180 종양세포를 이식하지 않고 방사선조사나 bFGF를 투여하지 않은 정상 생쥐를 정상 대조군으로, 종양세포이식 후 bFGF 투여나 방사선조사 없이 자연상태의 종양 성장을 관찰한 생쥐를 양성대조군으로 하였다. 방사선조사단독군은 종양세포이식 후에 bFGF를 투여하지 않고 방사선조사만을 시행한 군이며 bFGF 단독투여군은 종양세포이식 후에 bFGF만을 투여하고 방사선조사를 시행하지 않은 군이다. 방사선조사와 bFGF 투여병행군은 종양세포이식 후에 bFGF를 투여하고 방사선조사한 군이며 실험은 크게 생존률 및 종양성장관찰과 조직조건관찰로 나누어 진행하였다(Table 1, 2).

### 2. 방 법

#### 1) 마우스육종 180 종양세포 이식

실험에 사용된 종양세포는 가톨릭대학교 의과대학 미생물학 교실에서 마우스 복강을 이용하여 계대 배양한 마우스육종 180 세포를 사용하였다. 고형종양 발생에 필요한 세포수는 50% 고형종양 형성값(tumor solidification 50=TSD<sub>50</sub>)의 10배의 종양세포를 PBS에 희석하여 희석액 0.2 cc (2.5×10<sup>5</sup> cells)를 윤세철과 박용휘<sup>5)</sup>의 방법에 따라 생쥐 우측 대퇴부에 피하이식 하였다.

#### 2) bFGF 투여

Recombinant human bFGF (Intergen Co., New York, NY)를 전신방사선조사 24시간 전 및 4시간 전에 2회 꼬리 정맥에 주사하였다. 생존률 및 종양성장 관찰실험에서는 6 µg/mouse의 단일 용량을 사용하였고 조직조건 관찰실험에서는 3 µg/mouse, 6 µg/mouse 2군으로 구분하였다(Table 1, 2).

#### 3) 전신방사선조사

방사선조사는 6 MV 선형가속기(Digital Mevatron MX2, Siemens, Concord, U.S.A.)를 이용하여 종양이식 후 7일째 시행하였다. 전신방사선조사는 마취하지 않은 채 1회에 시행하였

Table 1. Grouping of Sarcoma-180 Tumor Cell Inoculated Mice for Survival and Tumor Growth

Group (number)*	Sarcoma-180	bFGF (6 µg/mouse)	TBI† (600, 800, 1000 cGy) Local RT† (3000 cGy)
Normal control (10)	× <sup>‡</sup>	×	×
Tumor control (10)	○ <sup>§</sup>	×	×
bFGF alone (10)	○	○	×
RT alone (50)	○	×	○: 600 (10), 800 (20), 1000 (20)
RT+bFGF (50)	○	○	○: 600 (10), 800 (20), 1000 (20)

\*Number of mice, †Total body irradiation, ‡Radiation therapy, §No, ¶Yes

Table 2. Grouping of Sarcoma-180 Tumor Cell Inoculated Mice for Histopathologic Analysis

Group (number)*	Sarcoma-180	bFGF (3 $\mu$ g or 6 $\mu$ g /mouse)	TBI† (800 cGy) Local RT‡ (3000 cGy)
Normal control (25)	× <sup>§</sup>	×	×
Tumor control (25)	○ <sup>  </sup>	×	×
bFGF alone (25)	○	○	×
RT alone (25)	○	×	○
RT+bFGF (50)	○	○: 3 $\mu$ g (25), 6 $\mu$ g (25)	○

\*Number of mice, †Total body irradiation, ‡Radiation therapy, § No, ||Yes

으며 방사선조사는 생존률 및 종양성장 관찰실험을 위해서는 600 cGy, 800 cGy, 1000 cGy군으로 세분하였으며 조직소견 관찰실험에서는 800 cGy 단일군으로 하였다(Table 1, 2).

4) 국소방사선조사

종양이식부위에 방사선조사는 전신방사선조사 6시간 후 생쥐의 움직임을 막기 위해 제작한 특수고정대에 고정된 뒤 마취없이 3,000 cGy를 1회에 종양부위에만 조사하였다. 1일 2회 방사선조사에 따른 손상 세포의 재생을 위해 전신방사선조사 후 6시간 시간 간격을 두었다

5) 생존률 관찰

방사선조사단독군과 방사선조사와 bFGF 투여병행군에서 전신방사선조사 후 생존한 생쥐의 수를 30일까지 관찰하여 생존률을 구하였다.

6) 종양크기의 계측 및 종양 성장곡선 작성

종양이식 직전의 우측 대퇴부 직경을 재고 종양이식 후 주 3회씩 종양의 최장 직경을 동일 관찰자에 의해 버니어(vernier)자로 측정하여 시간경과에 따른 종양성장곡선을 작성하였다.

7) 조직표본 제작 및 평가

조직표본 관찰을 위하여 Table 2의 실험군을 구성하여 각 군에서 5마리씩 전신방사선조사 후 8시간, 24 시간, 4일, 7일, 14일에 경추탈골로 희생시킨 후 개복하여 공장, 골수, 폐를 적출하고 종양이식 부위인 우대퇴부를 절제하여 조직블럭을 만들고 H-E 염색을 하였다.

(1) 조직관찰 및 공장 소낭선(crypt)수와 미세 융모(microvillus)길이 소낭선 길이 계측

각 실험군에서 방사선조사와 bFGF 투여에 따른 공장, 폐, 골수 및 종양세포의 조직학적 변화를 관찰하였다.

Withers와 Ekind<sup>9)</sup>의 microcolony 방법으로 소장점막의 환상 단면상 나타난 소낭선수를 200배 현미경에서 계측하였고 미세 융모 길이와 소낭선 길이는 전산화 영상분석장치를 이용하여 25배 현미경시야에서 관찰한 후 사진촬영을 하여 버니어(vernier)자로 계측하였다.

(2) 아포프토시스 빈도 계측

DNA terminal transferase nick-end labeling method (ApopTag<sup>®</sup> S7100 Peroxidase kit, Oncor Co., Gaithersburg, MD)를 이용하여 계측하였다. 요약하면 파라핀 조직블럭을 xylene, ethanol로 세척하여 파라핀을 제거하고 단백질분해효소로 반응시킨 후 3.0% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 quenching하고 Tdt enzyme (55  $\mu$ L/5 cm<sup>2</sup>)을 가하여 반응시켰다. Anti-digoxin peroxidase conjugate (65  $\mu$ L/5 cm<sup>2</sup>)를 가한 후 실온에서 반응시키고 peroxidase substrate (75  $\mu$ L/5 cm<sup>2</sup>)를 가하여 3~6분간 염색하였다. 0.5% methyl green으로 10분간 상온에서 대조염색한 후에 광학현미경하에서 각 실험군별 공장점막, 골수, 폐조직 및 마우스육종-180 종양세포의 아포프토시스 세포수를 계측하였다. 현미경 저배율 시야에서 염색이 뚜렷하고 아포프토시스가 가장 활발히 일어난 곳을 선택하여 공장점막 및 골수는 1,000배 시야에서, 폐조직은 200배 시야에서 총 1,000개의 세포중 아포프토시스가 일어난 세포수를 세어 아포프토시스 빈도를 결정하였다.

(3) 통계처리

종양크기 계측, 소낭선 수, 소낭선 길이, 미세융모 길이, 아포프토시스 빈도수 차이의 유의성은 이원분산분석법(2-way ANOVA)을 이용하였다. 유의한 결과에 대해서는 Scheffee's test와 Duncan test로 다중비교를 하였으며 유의수준은 5% 이하로 하였다.

결 과

1. 생존률

600, 800, 1,000 cGy 전신방사선조사군에서 6  $\mu$ g bFGF 투여 여부에 따른 생존률은 Fig. 1과 같다. 600 cGy 전신방사선조사군에서는 bFGF 투여 여부와 상관없이 전신방사선조사 후 30일까지 모든 쥐가 생존하였고 800 cGy 전신방사선조사군에서는 12일째 부터 사망하기 시작하여 25일까지 계속되

있으며 bFGF 투여군에서 의의 있는 생존률증가를 보여 방사선조사 후 30일째의 생존률이 bFGF 투여병행군 및 방사선조사단독군에서 각각 55%와 25%였다( $p < 0.05$ ). 1,000 cGy 전신방사선조사단독군에서는 방사선조사후 7~8일 사이에 75%가 사망하였으며 13일째 모두 사망하였다. 1,000 cGy 전신방사선조사와 bFGF 투여병행군에서도 7일째부터 사망하기 시작하여 16일째 모두 사망하였다. 6일 이전에 사망한 쥐는 없었으나 1,000 cGy 전신방사선조사단독군의 75%가 7~8일 사이에 사망하였기 때문에 이들 쥐의 사망원인은 위장관증후군으로 예측된다.

## 2. 종양성장

정상대조군, 양성대조군, 방사선조사단독군, bFGF 단독투여군, 방사선조사와 bFGF 투여병행군에서 국소적으로 3,000 cGy를 방사선조사한 후 계측한 우대퇴부 종양접종부위 최장직경의 변화는 Fig. 2와 같다. 모든 종양이식군에서 5~7일 사이에 계측 가능한 고품종양이 형성되어 자라기 시작하였다. 양성대조군과 bFGF 단독투여군에서는 종양이식 후 15~20일 부터 종양직경에 변화가 없이 플라토(plateau)를 보였으며 두 군간에 유의한 차이는 없었다( $p > 0.05$ ). 방사선조사단독군과 방사선조사와 bFGF 투여병행군에서는 15일 쯤부터 종양직경이 감소되기 시작하여 35~40일까지 감소되었으며 두 군간에 유의한 차이는 없었다( $p > 0.05$ ).

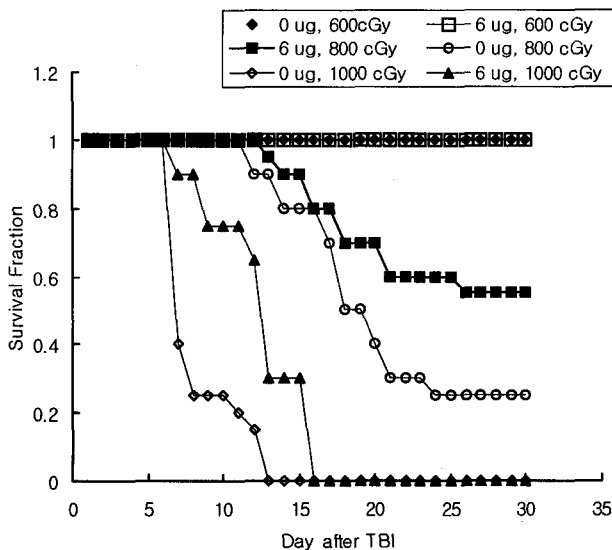


Fig. 1. Effect of 6  $\mu$ g bFGF on the survival of sarcoma 180 tumor bearing C3H mice which were received total body irradiation (TBI) of 3 dose levels (600, 800, 1,000 cGy). \* $p < 0.05$  compared with 800 cGy TBI alone.

## 3. 조직소견 및 아포프토시스 빈도

### 1) 공장

#### (1) 소낭선수와 미세융모질이 및 소낭선 깊이

정상대조군과 6  $\mu$ g bFGF 단독투여군에서의 환상단면당 소낭선수는  $191.8 \pm 18.9$ ,  $187.8 \pm 20.6$ 로 양군간에 차이가 없었으며 미세융모질이 와 소낭선 깊이도  $0.47 \pm 0.10$ ,  $0.47 \pm 0.10$  및  $1.70 \pm 0.17$ ,  $1.74 \pm 0.31$ 로 차이가 없었다( $p > 0.05$ ). 방사선조사단독군과 방사선조사와 bFGF 투여병행군에서 소낭선수는 유의한 차이가 없었으나( $p > 0.05$ ) 소낭선 깊이와 미세융모질이는 방사선단독군에 비해 방사선조사와 6  $\mu$ g bFGF 투여병행군에서 의의 있게 증가되었다( $p < 0.05$ ). 3  $\mu$ g bFGF 투여병행군에서도 소낭선 깊이와 융모질이는 방사선조사단독군에 비해 증가되어 있기는 하였으나 통계학적인 의의는 없었다( $p > 0.05$ ) (Table 3).

방사선단독군과 방사선조사와 bFGF 투여병행군 모두에서 전신방사선조사 후 24시간에 소낭선수, 융모질이, 소낭선 깊이가 최저치를 보였고 4일에는 증가된 소견을 보였고 이후 계속 증가하였으며 6  $\mu$ g bFGF 투여병행군에서 가장 뚜렷하였다(Table 3, Fig. 3).

#### (2) 소낭선세포의 아포프토시스

정상대조군과 bFGF 단독투여군에서 관찰되는 아포프토시스 수는 세포 1,000개당 각각  $8.9 \pm 3.9$ ,  $9.0 \pm 4.0$  ( $p > 0.05$ )이였

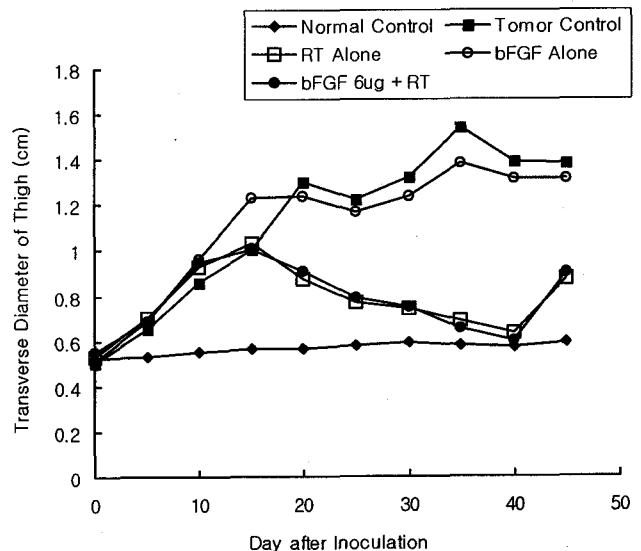


Fig. 2. Changes of transverse diameter of right thigh after sarcoma 180 inoculation in the groups of 6  $\mu$ g bFGF alone (—○—), combination of 6  $\mu$ g bFGF and 3,000 cGy local irradiation (RT) (—●—), tumor control (—■—) and local irradiation (RT) alone (—□—).

**Table 3. The Jejunal Crypt Count, Crypt Depth and Microvilli Length Following 800 cGy TBI with or without bFGF Combination**

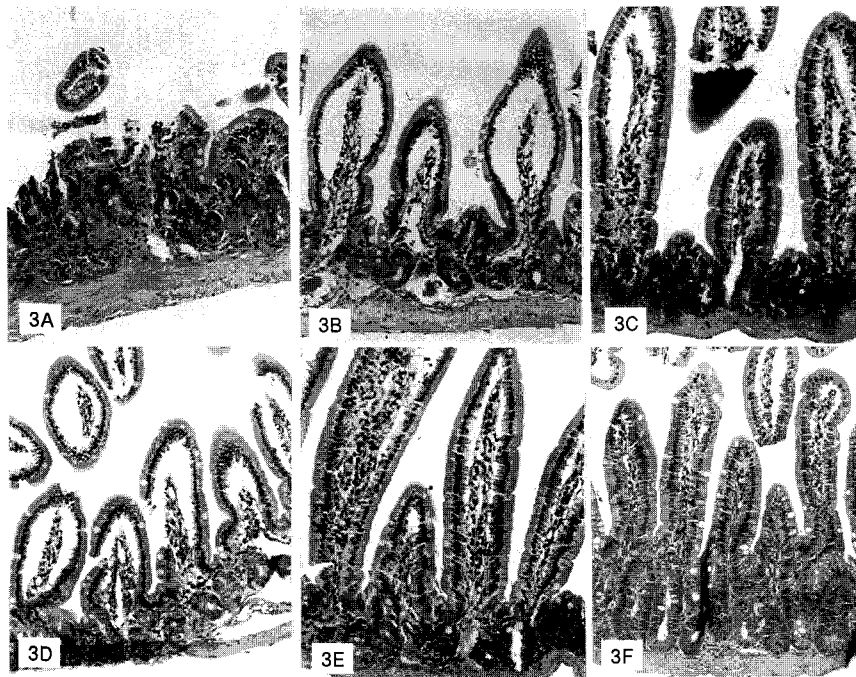
Time <sup>†</sup>	bFGF dose	0 $\mu$ g/mouse (n=25)	3 $\mu$ g/mouse (n=25)	6 $\mu$ g/mouse (n=25)
Crypt count	8H <sup>†</sup>	166.2±19.4	163.7±17.9	158.0±16.7
	24H	129.7±4.5	138.0±6.7	161.2±12.8
	4D <sup>§</sup>	145.7±2.9	154.5±8.2	161.2±6.2
	7D	173.5±24.9	175.0±20.8	176.0±6.3
	14D	178.7±6.9	180.0±6.2	180.2±6.1
Crypt depth	8H	0.31±0.10	0.29±0.11	0.33±0.15
	24H	0.25±0.11 <sup>*</sup>	0.30±0.11	0.40±0.11 <sup>*</sup>
	4D	0.46±0.10 <sup>*</sup>	0.54±0.14	0.66±0.16 <sup>*</sup>
	7D	0.51±0.10 <sup>*</sup>	0.53±0.11	0.65±0.13 <sup>*</sup>
	14D	0.51±0.11 <sup>*</sup>	0.51±0.11	0.67±0.16 <sup>*</sup>
Microvilli length	8H	1.78±0.24	1.68±0.11	1.80±0.29
	24H	0.55±0.13 <sup>*</sup>	1.04±0.11	1.47±0.32 <sup>*</sup>
	4D	1.07±0.17 <sup>*</sup>	1.29±0.15	1.76±0.13 <sup>*</sup>
	7D	1.38±0.13 <sup>*</sup>	1.45±0.19	1.71±0.11 <sup>*</sup>
	14D	1.67±0.13	1.67±0.11	1.69±0.16

\* P<0.05 compared with 800 cGy TBI alone  
<sup>†</sup>Time after 800 cGy TBI (total body irradiation)  
<sup>‡</sup>hour  
<sup>§</sup>day

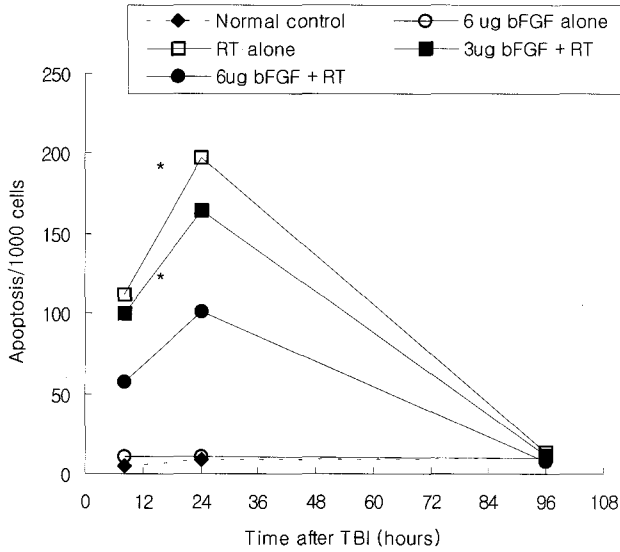
다. 방사선조사단독군에서 방사선조사후 8시간, 24시간 아포프토시스수가 111.6±34.8, 197.5±41.1로 급격히 증가하였고 4일에는 13.6±4.2로 감소하였고 7일, 14일째에는 8.0±5.1, 6.0±2.7로 정상으로 회복되었다. 방사선조사와 bFGF 투여병행군에서의 8시간, 24시간 아포프토시스수는 3  $\mu$ g bFGF군은 100.3±31, 164.5±28.4 였고 6  $\mu$ g bFGF군은 57.3±15.9, 101.3±18.6로 방사선조사단독군의 111.6±34.8, 197.5±41.1와 비교 시 양군 모두 의의 있게 낮았다(Fig. 4, 5).

2) 골수

(1) 정상대조군의 골수 세포밀도는 80~100%로 매우 높았다. 800 cGy의 전신방사선조사 후 세포밀도는 24시간부터 감소하기 시작하여 7일에 5~10%, 14일에 5%로 감소하였다. 800 cGy의 전신방사선조사와 bFGF 투여병용시 3  $\mu$ g bFGF 군과 6  $\mu$ g bFGF군 양군에서 골수세포밀도가 방사선조사 단독군에 비하여 높았으며 전신방사선조사 후 7일, 14일에 3  $\mu$ g bFGF군의 경우 5~10%, 50~60%였고, 6  $\mu$ g bFGF군의 경우 90~100%, 90~100%로 6  $\mu$ g bFGF군에서 세포밀도가 현저히 높았다. H-E염색 소견상 특히 bFGF에 의해 보호되는 세포는 거핵구(megakaryocyte) 계열이었다(Fig. 6).



**Fig. 3. Histopathologic change of jejunal mucosa (H-E, ×100).** Mouse jejunum showed near totally eroded villi and focal hemorrhage in lamina propria at 24 hours after 800 cGy TBI (3A) On the day 4 and 7 after TBI, villi were edematous and still shortened state but recovered normal architecture (3B, 3C). In bFGF and TBI combination group, villi were less shortened than those of TBI alone group at 24 hours (3D) and on the day 4 after TBI (3E). Regeneration of crypt is nearly complete on the day 7 (3F).



**Fig. 4.** The frequency of apoptosis of jejunal crypt cells is plotted as function of time after TBI (total body irradiation). The frequency of apoptosis was maximum at 8~24 hours after TBI and then fell to normal level in total body irradiated groups. \* $p < 0.05$  compared RT alone (□) with RT and bFGF combination group (6  $\mu$ g bFGF ● / 3  $\mu$ g bFGF ■)

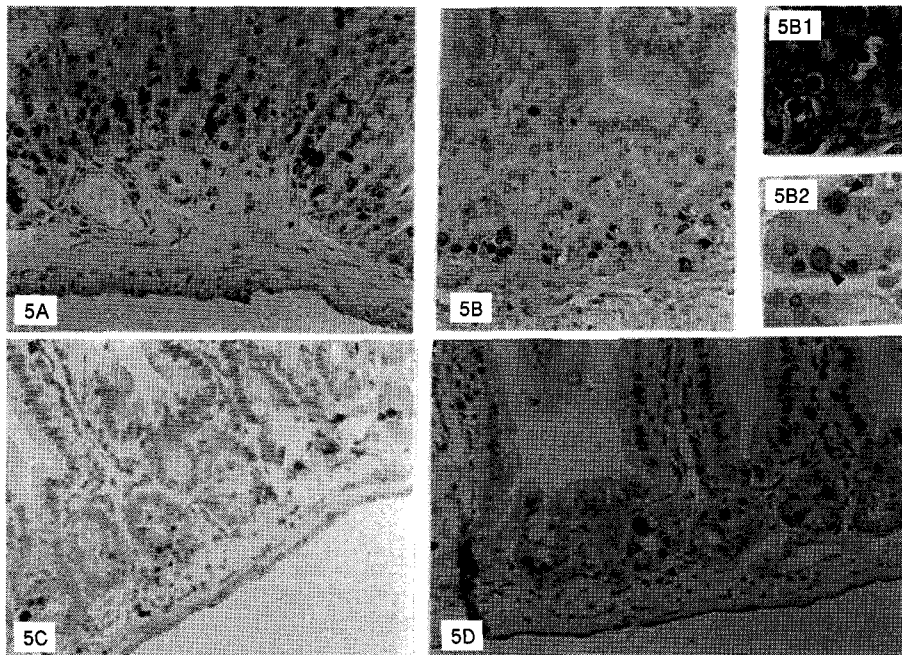
(2) 전신방사선조사 후 골수세포의 아포프토시스 빈도의 변화는 Fig. 6과 같다. 정상대조군과 bFGF단독투여군에서 아포프토시스수는  $44.0 \pm 7.4$ ,  $44.9 \pm 6.1$ 로 차이가 없었다( $P > 0.05$ ). 방사선조사단독군에서 24시간에 아포프토시스수가 증가하였고 4일 이후에는 감소하였고 방사선조사단독군과 방사선조사와 3  $\mu$ g 및 6  $\mu$ g bFGF투여병행군에서 아포프토시스수의 차이는 없었다(Fig. 7).

**3) 폐**

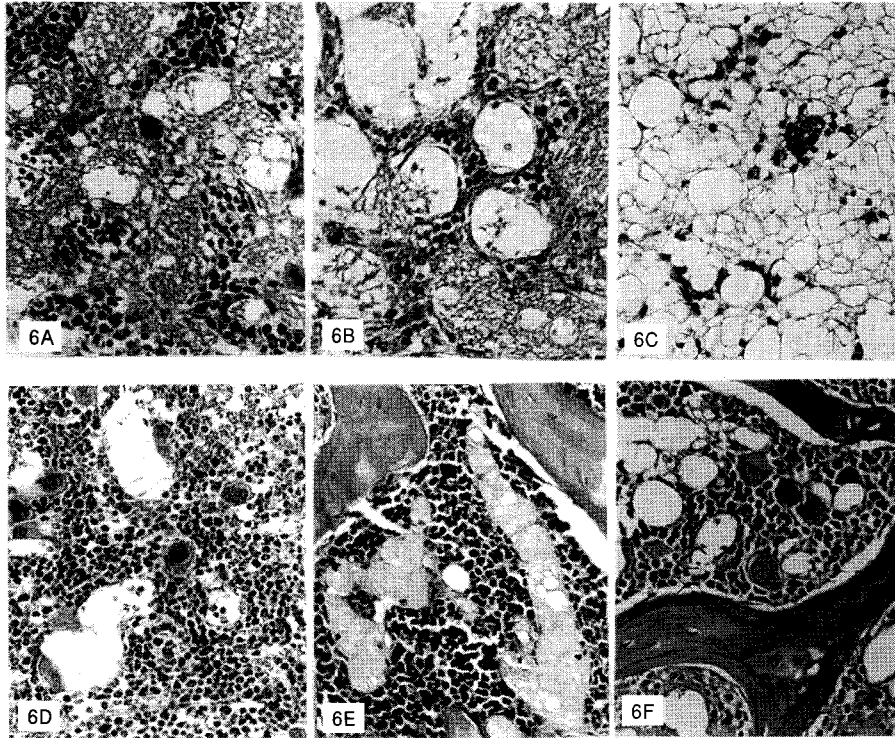
(1) 방사선조사단독군과 bFGF투여병용군에서 H-E 염색소견상 전신방사선조사후 8시간부터 혈관울혈, 간질부종 및 폐포벽의 비후, 염증세포의 침윤이 나타나기 시작하였고 4일째 가장 심했으며

7일 이후 현저히 감소하였고 이상의 조직학적 변화는 방사선조사단독군과 방사선조사와 bFGF 투여병행군에서 차이가 없었다(Fig. 8).

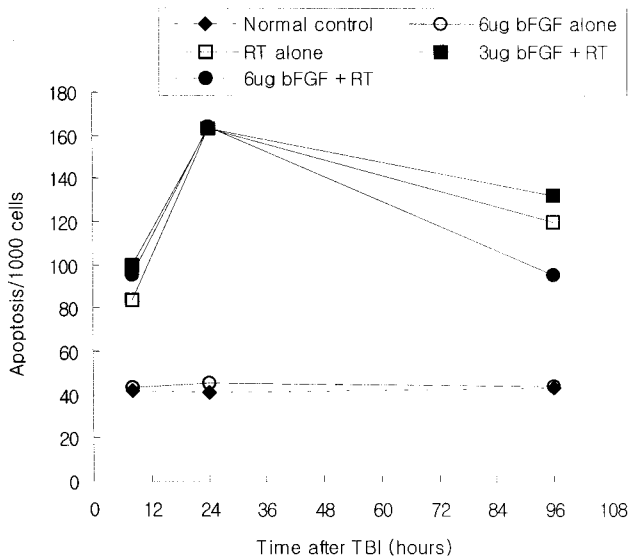
(2) 정상대조군과 bFGF단독투여군에서 아포프토시스수는  $1.9 \pm 0.9$ ,  $2.0 \pm 1.1$ 로 차이가 없었으며 발생 빈도가 낮았다. 방사선조사한 실험군에서도 8시간, 24시간에 아포프토시스수가 증가하다가 4일째부터 감소하여 정상수치를 보였으며 방사



**Fig. 5.** Identification of jejunal crypt cell undergoing early radiation induced apoptosis stained by DNA terminal transferase nick-end labeling method ( $\times 200$ ). In TBI alone group, there were diffuse apoptotic process involving jejunal crypt cell; 5A (8 hours after TBI)/5B (24 hours after TBI). In bFGF and TBI combination group exhibited reduced apoptotic change in 8 hours (5C) and 24 hours after TBI (5D). Arrow indicated fragmented nucleus of apoptotic cell (5B1). Note apoptotic nuclei stained brown-yellow color contrast with blue colored intact cell (5B2).



**Fig. 6.** The effect of bFGF on the bone marrow recovery (H-E, ×100). 6A-6C: Bone marrow on the day 1, 7 and 14 after 800 cGy TBI (total body irradiation). 6D-6F: Bone marrow from 6 μg bFGF and 800 cGy TBI combination group on the day 1, 7 and 14. In 6 μg bFGF treated group, bone marrow showed less hypocellularity than 800 cGy TBI alone group.



**Fig. 7.** The frequency of apoptosis of bone marrow stem cell is plotted as function of time after TBI (total body irradiation).

선단독군과 방사선조사와 bFGF 투여병행군에서 차이가 없었다(Fig. 8).

**4) 종양**

(1) 양성대조군과 bFGF단독투여군에서 H-E 염색상에 세포밀도, 세포이형성, 유사분열소견의 차이는 관찰되지 않았으며 마우스육종 180의 세포밀도는 높은 반면 신생혈관형성이 매우 빈약하고 간질조직이 풍부하지 않으므로 bFGF투여로 인한 신생혈관의 증가를 관찰할 수 없었다.

(2) 종양 중심부에는 흔히 조직괴사를 동반하였으며 아포프토시스는 종양 주변부에서 주로 관찰되었고 양성대조군과 bFGF투여군간의 차이는 없었다( $p > 0.05$ ). 방사선조사군에서도 종양내 아포프토시스는 양성대조군에 비해 증가하지 않았고 이는 bFGF를 병행하여도 변함이 없었다

**고안 및 결론**

암환자의 방사선치료시 방사선감수성이 예민한 정상조직이 방사선조사야에 포함된 경우 방사선손상으로 심각한 부작용을 초래하거나 종양이 잔류함에도 불구하고 방사선용량

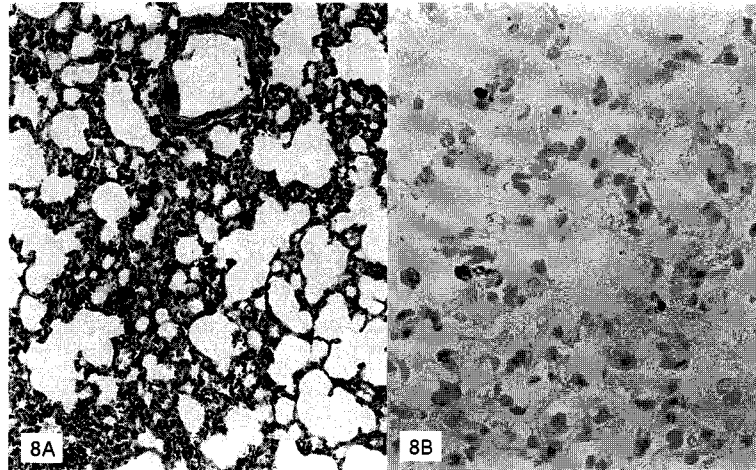


Fig. 8. Early radiation induced histopathologic changes in lung parenchyma obtained from 24 hours after 800 cGy total body irradiation. H-E staining ( $\times 100$ ) showed mild to intermediate interstitial edema and vascular congestion (8A). There were relatively scanty apoptotic cells identified by the DNA terminal transferase nick-end labeling method ( $\times 200$ ) (8B).

을 제한해야 하는 문제점이 있다. 따라서 정상세포를 보호하고 부작용이 없으면서 종양치사효과에도 영향이 없는 방사선보호제에 대한 연구가 계속되어왔다.<sup>1)</sup> 몇몇 성장인자 및 사이토카인(G-CSF, GM-CSF, IL-I, IL-II, SCF)들은 혈관내피세포, 조혈모세포, 소장점막의 소낭선 및 골 성장관에 대한 방사선반응 조절효과(radioreponse modifying effect)가 있는 것으로 알려져 있다.

bFGF는 섬유아세포에서 분비되는 혈관내피세포에 특히 친화력이 있는 성장인자로서<sup>2,3)</sup> 미세혈관에 대한 방사선손상을 보호함으로써 손상된 조직의 혈류를 증가시켜서 손상된 세포의 재생에 필요한 조직 내 환경을 개선하여 나아가 모든 조직의 방사선 손상을 복구하도록 한다. bFGF를 이용한 약물역동학적 실험결과에 의하면 혈관내로 주입된  $I^{125}$ -bFGF는 혈관밖으로 유출되지 않고 혈관내피세포에 부착되어 혈관의 방사선보호작용에 기여할 것으로 추측된다.<sup>7)</sup> bFGF의 작용기전은 아직 까지 자세히 증명되지는 않았지만 방사선 조사 후 수 시간 이내에 주로 Go-G1기 세포에 선택적으로 보호효과가 있는 것으로 밝혀졌다.<sup>4)</sup> 즉 bFGF는 방사선에 의한 세포의 유사핵분열사(mitotic death) 보다는 세포분열간기(interphase)의 아포프토시스에 관여한다고 생각되며 Fuks와 Alfieri<sup>8)</sup>의 마우스 생체실험에서도 bFGF투여로 폐혈관 내피세포의 아포프토시스가 감소되었다. 방사선에 의해서 아포프토시스가 일어날 수 있는 조직세포로는 흉선, 림프구, 조혈세포, 고환, 위장관, 신장, 신경조직 등이 알려져 있다.<sup>9)</sup> 이와 같은 연구 결과들을 연관 지어 볼 때 방사선에 의해서 유발

되는 세포분열간기의 아포프토시스는 종양뿐 아니라 정상세포손상을 이해하는데 매우 중요하며 아포프토시스의 분자생물학적 원리를 이해하여 방사선치료의 치료효율을 증가시키는데 기여할 수 있을 것이다. 이 실험에서도 bFGF의 방사선보호효과를 설명할 수 있는 기전으로 소장점막과 골수세포에서의 아포프토시스를 관찰하고자 하였다.

방사선보호효과가 있는 bFGF의 적정용량 및 투여방법에 대해 Ding<sup>10)</sup>은  $1 \mu\text{g}/\text{mouse}$ 에서는 방사선보호효과가 없었고 6 혹은  $12 \mu\text{g}/\text{mouse}$ 가 적정하였으며 유리기 포획제와는 달리 방사선치료 전, 후에 투여하여도 모두 효과적이라고 하였다. 반면에 Fuks와 Alfieri<sup>8)</sup>는 총  $1.6 \mu\text{g}/\text{mouse}$ 의 용량에서도 방사선에 의한 폐손상을 감소시켜  $LD_{50/180}$ 을 증가시킨다고 보고하였다. 이 연구에 의하면  $6 \mu\text{g}/\text{mouse}$  투여시  $3 \mu\text{g}/\text{mouse}$ 에 비해 800 cGy의 전신방사선조사에 대한 골수, 공장점막에 대한 보호효과가 현저하였다. 즉 아직까지 최저선량 한계가 명확히 규명되지는 않았지만  $6 \mu\text{g}/\text{mouse}$ 가 골수, 장점막등 재생력이 높은 조직 다시 말해 조기에 방사선에 반응하는 조직에 적정 용량이라고 생각된다.

방사선선량에 따른 bFGF의 보호효과에 관해 Ding<sup>10)</sup>은  $6 \sim 12 \mu\text{g}/\text{mouse}$ 의 용량으로는 900 cGy 이상의 전신방사선조사한 생쥐에서 모두 위장관증후군으로 사망하여 방사선보호효과를 관찰할 수 없었다고 한 반면 Okunieff<sup>11)</sup>은 동일한 용량의 bFGF를 사용한 실험에서 1,100 cGy 이상의 전신방사선조사시  $LD_{50/6}$ 이 1,250 cGy에서 1,350 cGy로 증가하여 상이한 결과를 보고하였다. 이 연구에서는 800 cGy의 전신방사선



조사후 30일째 생존률이 25%에서 55%로 증가되어 6  $\mu$ g의 bFGF가 전신방사선조사로 인한 골수치사를 효과적으로 감소시킬 수 있었다. 그러나 1,000 cGy조사군에서는 전신 방사선 조사단독군과 bFGF 투여군이 모두 치사함으로써 6  $\mu$ g의 bFGF가 위장관증후군을 유발하는 고선량 방사선 손상을 효과적으로 보호할 수 있는 지에 대해선 보다 정밀한 선량반응 연구가 필요하다고 생각한다.

bFGF에 의한 혈관의 방사선보호작용은 종양내의 혈관도 보호하여 방사선 저항성을 유발하고 신생혈관을 형성시켜서 종양성장을 촉진 할 수도 있다고 본다. 그러나 이제까지 정상세포와 종양세포에 대한 bFGF의 효과를 비교한 연구결과는 많지 않다. 종양세포는 높은 농도의 혈관성장인자를 분비하므로 이 실험에서 사용한 용량의 bFGF 투여로 종양에는 영향이 없었다<sup>10)</sup>는 보고가 있다. 또한 방사선보호작용이 있는 사이토카인의 하나인 IL-1을 이용한 생체실험에서 두 종류의 이식종양에 대한 성장 촉진효과는 없었다는 보고도 있다.<sup>12)</sup> 즉 bFGF가 종양세포에 미치는 영향은 앞으로 연구가 필요하다. bFGF가 마우스 육종 180 종양 성장을 촉진하지 않고 정상세포를 보호할 수 있다면 bFGF는 암환자의 방사선 치료시 정상조직과 암조직을 차별하여 보호하는 방사선 보호제이다. 그러나 이 실험에서는 전신방사선조사 전 2회에 한하여 총 6  $\mu$ g bFGF를 투여하였기 때문에 이 실험으로 종양조직에 미치는 효과를 단정하기에는 제한점이 있다. 또한 이 실험에 사용된 마우스육종 180은 간질조직이 희박하여 bFGF의 영향을 평가하기에 적절치 못했던 제한점도 있다. 향후 실험에서는 종양세포내 bFGF수용체 수준에 대한 연구와 더불어 고용량의 bFGF를 지속적으로 투여하여 bFGF가 종양의 성장 혹은 전이능에 미치는 효과를 관찰할 수 있을 것이다.

Fuks와 Alfieri<sup>8)</sup>는 흉부 방사선조사전후 투여한 1.6  $\mu$ g의 bFGF가 방사선 폐손상을 줄이고 치사율을 감소시켰으며 이는 방사선으로 유발된 폐혈관 내피 세포의 아포프토시스의 감소로 인한 것임을 보고하였다. 그러나 본 연구에서는 800 cGy 전신방사선조사 후 폐혈관 내피세포의 아포프토시스를 관찰하기 어려웠으며 방사선조사단독군과 방사선조사와 bFGF투여병행군에서 아포프토시스의 차이가 없었다. 이는 본 실험에 사용한 800 cGy가 방사선 폐손상을 관찰하기에 부적절한 선량임을 시사하며 방사선 폐손상의 주요원인은 혈관 내피세포의 아포프토시스 이외에 다른 기전도 관여하리라 생각된다.<sup>13)</sup>

몇몇 연구들<sup>14, 15)</sup>은 bFGF가 직접적으로 조혈모세포의 성장을 촉진할 뿐 아니라 골수의 간질세포에서 다른 성장인자들

을 분비하도록 조절하는 기능을 갖고 있다고 보고하였다. 저자들도 bFGF병행투여로 골수보호효과를 확인할 수 있었다. 방사선조사에 따른 조혈모세포의 아포프토시스는 공장 소낭선에서와 달리 방사선단독군과 bFGF 투여병행군에서 차이가 없었다. 반면 전신방사선조사 7일, 14일 째 감소되었던 골수 세포밀도가 현저하게 회복되었다. 이 실험의 결과로 볼 때 bFGF의 골수보호효과는 방사선에 의한 조혈모세포의 아포프토시스에 미치는 영향보다는 조혈모 세포의 성장촉진 혹은 방사선손상의 회복촉진에 의한 것으로 생각된다.

이 실험에서 bFGF투여병행군에서 소장보호효과를 관찰할 수 있었다. 소장점막의 경우 5~10 Gy의 전신방사선조사시 분열이 왕성한 소낭선 세포의 파괴는 방사선조사 후 24시간에 최고에 이르고 96시간 이내에 재생이 시작된다고 한다.<sup>16)</sup> 저자들의 실험에서도 같은 결과를 보여 4일 이후부터 소낭선 길이 및 용모 길이가 증가하기 시작해 소낭선 세포가 재생되기 시작하였고 6  $\mu$ g bFGF투여로 현저하게 소낭선세포의 재생이 항진되었다. 또한 bFGF투여로 소낭선세포의 아포프토시스가 감소하여 소장 보호효과를 설명할 수 있었다.

결론적으로 전신방사선조사 전 bFGF 투여로 골수세포와 소장 점막조직을 보호하여 생쥐의 생존률이 증가하였고 조직학적인 관찰 결과 방사선단독군에 비해 방사선손상의 정도가 감소하였다. 이러한 방사선보호효과의 기전으로 bFGF가 소장점막 소낭선세포의 아포프토시스의 감소 및 재생 분열능을 항진시키고 골수의 조혈모 세포의 재생 및 성장을 촉진시킨 결과로 생각된다. 또한 bFGF는 마우스 육종 180 종양 성장을 증가시키지는 않았다. bFGF가 정상세포와 종양세포에 차별효과가 있는 보호제임을 알아보기 위해서는 향후 좀더 적절한 종양세포를 사용한 광범위한 실험이 필요하다고 생각한다.

## 참 고 문 헌

1. Phillips TL. Sensitizer and protectors in clinical oncology. *Semin Oncol* 1981;8:65-82
2. Folkman J, Klagsbrun M. A family of angiogenic peptide. *Nature* 1987;239:671-672
3. Haimovitz-Friedman A, Balaban N, McLoughlin M. Protein Kinase C mediates basic fibroblast growth factor protection of endothelial cells against radiation induced apoptosis. *Cancer Res* 1994;54:2591-2597
4. Langley RE, Bump EA, Quartuccio SQ. Radiation induced apoptosis in microvascular endothelial cell. *Br J Cancer* 1997; 75:666-672
5. Yoon SC, Bahk YW. Effect of modified fractionated irradiation on the growth of sarcoma 180 solid tumor in mouse. *J*

Catholic Med College 1986;39:665-676

6. **Withers HR, Elkind MM.** Microcolony survival assay for cells of mouse intestinal mucosa. *Int J Radait Biol* 1970;17: 261-267.
7. **Fuks Z, Persaud RS, Alfriere A.** Basic fibroblast growth factor protects endothelial cells against radiation induced programmed cell death in vitro and in vivo. *Cancer Res* 1994;54: 2582-2590
8. **Fuks Z, Alfriere A.** Intravenous basic fibroblast growth factor protects the lung but not mediastinal organ against radiation induced apoptosis in vivo. *Cancer J Sci Am* 1995;1:62-72
9. **Allan DJ.** Radiation induced apoptosis: Its role in a MADCAT scheme of cytotoxicity mechanism. *Int J Radiat Biol* 1992;62:145-152
10. **Ding I, Huang K, Snyder ML et al.** Tumor growth and tumor radiosensitivity in mice given myeloprotective dose of fibroblastic growth factors. *J NCI* 1996;88:1399-1404
11. **Okunieff P, Mester M, Wang J et al.** In vivo radio-protective effect of angiogenic growth factors on the small bowel of C3H mice. *Radiat Res* 1998;150:204-211
12. **Dorie MJ, Bedarida G, Kallman RF.** Protection of IL-1 against lung toxicity caused by cyclophosphamide and irradiation. *Radiat Res* 1991;128:316-319.
13. **Adamson IYR, Bowen DH.** Endothelial injury and repair in radiation induced pulmonary fibrosis. *Am J Path* 1983;112: 224-230
14. **Brunner G, Nguyen H, Gabrielove J, Rifkin DB, Wilson EL.** Basic fibroblast growth factor expression in human bone marrow and peripheral blood cells. *Blood* 1993;81:631-638
15. **Avraham H, Banu N, Scadden DT, Abraham F, Groopman JE.** Modulation of megakaryocytopoiesis by human basic fibroblast growth factor. *Blood* 1994;83:2126-2132
16. **Stevens KR.** Stomach and small intestine. In: Cox JD, eds. *Moss's Radiation Oncology - Rationale, Technique, Results* 7th ed. St. Louis, Missouri : Mosby-Year Book, 1994:428-439

---

**Abstract**

---

**In vivo Radioprotective Effects of  
Basic Fibroblast Growth Factor in C3H Mice**

Yeon Shil Kim, M.D. and Sei Chul Yoon, M.D.

Department of Radiation Oncology, Kangnam St. Mary's Hospital  
Catholic Cancer Center, Catholic University of Korea, Seoul, Korea

**Purpose** : In order to understand in vivo radiation damage modifying effect of bFGF on jejunal mucosa, bone marrow and the effect of bFGF on the growth of transplanted mouse sarcoma 180 tumor in mice.

**Materials and Methods** : Mice were treated with 6  $\mu$ g of bFGF at 24 hours and 4 hours before exposing to 600 cGy, 800 cGy and 1,000 cGy total body irradiation (TBI), and then exposed to 3,000 cGy local radiation therapy on the tumor bearing thigh. Survival and tumor growth curve were plotted in radiation alone group and combined group of bFGF and irradiation (RT). Histologic examination was performed in another experimental group. Experimental groups consisted of normal control, tumor control, RT (radiation therapy) alone, 6  $\mu$ g bFGF alone, combined group of 3  $\mu$ g bFGF and irradiation (RT), combined group of 6  $\mu$ g bFGF and irradiation (RT). Histologic examination was performed with H-E staining in marrow, jejunal mucosa, lung and sarcoma 180 bearing tumor. Radiation induced apoptosis was determined in each group with the DNA terminal transferase nick-end labeling method (ApopTag<sup>®</sup> S7100-kit, Intergen Co.)

**Results** : The results were as follows 1) 6  $\mu$ g bFGF given before TBI significantly improved the survival of lethally irradiated mice. bFGF would protect against lethal bone marrow syndrome. 2) 6  $\mu$ g bFGF treated group showed a significant higher crypt depth and microvilli length than RT alone group ( $p < 0.05$ ). 3) The bone marrow of bFGF treated group showed less hypocellularity than radiation alone group on day 7 and 14 after TBI ( $p < 0.05$ ), and this protective effect was more evident in 6  $\mu$ g bFGF treated group than that of 3  $\mu$ g bFGF treated group. 4) bFGF protected against early radiation induced apoptosis in intestinal crypt cell but might have had no antiapoptotic effect in bone marrow stem cell and pulmonary endothelial cells. 5) There was no significant differences in tumor growth rate between tumor control and bFGF alone groups ( $p > 0.05$ ). 6) There were no significant differences in histopathologic findings of lung and mouse sarcoma 180 tumor between radiation alone group and bFGF treated group.

**Conclusions** : Our results suggest that bFGF protects small bowel and bone marrow from acute radiation damage without promoting the inoculated tumor growth in C3H mice. Improved recovery of early responding normal tissue and reduced number of radiation induced apoptosis may be possible mechanism of radioprotective effect of bFGF.

---

**Key Words** : bFGF (basic fibroblast growth factor), Radioprotective effect, Apoptosis