

## 재조합 표피성장인자가 방사선이 조사된 섬유아세포 증식에 미치는 영향

경상대학교 의과대학 방사선과학교실\*, 방사선종양학교실†, 울산대학교 의과대학 방사선종양학교실‡

김현숙\* · 강기문† · 이상욱† · 나재범\* · 채규영†

**목적:** 재조합 표피성장인자(rhEGF) 다양한 표피와 상피 세포의 증식을 자극하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 방사선이 조사된 섬유아세포의 증식에 rhEGF의 효과를 알아보려고 하였다.

**대상 및 방법:** 인간에서 기원한 섬유아세포를 초대배양(primary culture)한 세포를 이용하였다. 대용제약에서 유전자 재조합하여 대장균에서 발현하여 생산한 rhEGF를 제공 받아 사용하였다. 방사선 조사는 4 MV 선형가속기 (CLINAC 600C, Varian, Palo Alto, CA, USA)를 이용하여 분당 2 Gy 내외의 선량률로 균일하게 조사하였다. 조사된 방사선량은 8 Gy이었다. 생존세포수는 trypan blue 염색법을 이용하였고, rhEGF에 의한 세포주기의 변화를 관찰하기 위하여 유세포 분석법을 시행하였다.

**결과:** 4 Gy의 방사선을 조사한 후 7일째까지 생존 세포수를 trypan blue 염색법을 이용하여 측정한 결과 모든 rhEGF 농도(1.0 nM, 10 nM, 100 nM, 1,000 nM)에서 방사선 조사 단독군보다 생존세포 수가 많았다. 방사선을 조사하지 않은 섬유아세포에서 rhEGF를 10 nM처리한 후 FACS scan을 시행한 결과 세포주기 중에서 S기 비율이 증가하였다.

**결론:** 방사선이 조사된 섬유아세포에서 rhEGF를 투여하면 rhEGF를 투여하지 않은 섬유아세포에 비해서 세포증식이 가속됨을 확인할 수 있었다.

**핵심용어:** 재조합 표피성장인자, 방사선, 섬유아세포

### 서 론

표피성장인자(epidermal growth factor, EGF)는 1962년 Cohen이 최초로 생쥐의 악하선에서 발견하여 보고함으로써 세상에 알려졌으며 이후 1975년 사람의 요에서 발견되었다.<sup>1,2)</sup> EGF는 분자량이 6045 Da.이고 53개의 아미노산으로 구성된 단일 사슬 폴리펩타이드로 3개의 이중 결합을 가지고 있는 물질이며 상피조직의 증식과 각질화에 작용한다.<sup>3,4)</sup> 이후 EGF는 인체 내 다양한 조직에 존재하면서 조직을 구성하는 세포의 증식에 관여하는 것으로 알려져 있다.<sup>5~8)</sup> 특히 피부, 점막, 각막 등의 상피세포 재생에 관여하는 중요한 성장인자로 작용하며 또한 인체의 체액과 조직에 전반적으로 다양하게 분포되어 있는데, 외부로 분비되는 체액에 해당하는 침, 모유, 소변, 정액, 눈물 등에 특히 높은

농도로 존재하는 것으로 밝혀졌다.<sup>5,7~15)</sup>

방사선이 세포에 작용하는 기전은 DNA 이중나선구조의 손상에 의해 시작된다.<sup>16)</sup> 방사선이 인체에 조사되는 경우 방사선에 의한 손상은 크게 급성반응과 만성반응으로 분류되는데 급성반응을 나타내는 조직은 세포분열이 활발한 조직에서 주로 일어난다. 점막은 방사선에 의한 급성반응을 나타내는 대표적인 조직이다. 방사선에 의한 정상 조직세포의 손상은 점막염이나 피부염 형태로 나타난다. 점막손상은 초기에는 염증반응으로 나타나며 방사선에 의한 점막염의 회복에 있어서 정상 섬유아세포의 증식유무와 그 정도는 매우 중요한 지표라 할 수 있다. 방사선에 의한 점막염이나 피부염이 발생 시 회복되는 과정은 유사하며 이런 상처 회복에서 섬유아세포의 증식은 매우 중요한 역할을 하게 된다. 이에 본 연구에서는 방사선에 의해 손상 받은 섬유아세포의 증식에 미치는 EGF의 효과를 알아보려고 하였다.

이 논문은 2006년 8월 29일 접수하여 2006년 9월 11일 채택되었음.

책임저자: 채규영, 경상대학교병원 방사선종양학과

Tel: 055)750-8221, Fax: 055)750-8217

E-mail: cgyinj@dreamwiz.com

## 대상 및 방법

### 1. Recombinant human EGF (rhEGF)

대장균에서 유전자 재조합에 의해 합성된 rhEGF를 이용하였으며 모두 대응제약에서 공급 받은 것을 사용하였다.

### 2. 세포주와 세포배양

인간혈관조직 기원의 섬유모세포를 초대 배양하여 만든 세포주를 이용하였다. 실험에 이용된 정상 섬유모세포는 10회 이하로 계대 배양된 세포만을 선택하여 사용하였다. 세포주를 배양하기 위한 배지는 56°C에서 30분간 비활성화시킨 10% 우태아 혈청(fetal bovine serum; GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 배지(GIBCO BRL)를 배양액으로 사용하였다. 세포배양은 CO<sub>2</sub>의 농도를 5%로 유지하고 항온배양기의 온도를 37°C로 유지하였고, 배지는 주 2~3회 교환하였다. 광학현미경을 이용하여 세포형태를 150배 확대하여 관찰하였다. 실험에 이용된 세포는 10회 이내 계대 배양된 지수성장기 세포를 이용하였다.

### 3. 방사선조사

방사선 조사는 4 MV 에너지의 치료용 선형가속기(CLINAC 600C, Varian, Palo Alto, CA, USA)를 이용하여 분당 2 Gy 내외의 선량률로 균일하게 조사하였다. 방사선 조사량은 8 Gy이었다.

### 4. Trypan blue 염색법

실험에 필요한 재료는 1 mM PBS, hemocytometer, 0.4% trypan blue in PBS, micropipette, microscope, 12 well plate이었다. 간단한 실험방법은 아래와 같다.

1) Suspension cell을 카운트하여 1×10<sup>4</sup>씩 12 well plate에 분주하였다.

2) Drug 농도 0 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM을 4 group을 만들고 1×10<sup>4</sup> cell을 10개씩 seeding하였다.

3) 세포가 plate에 부착되면 다음날 방사선조사(8 Gy)를 시행하였다.

4) 방사선 조사 직전 rhEGF를 다음과 같은 0 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1,000 nM 농도로 처리한다. 방사선조사 후 1일째부터 hemocytometer를 이용하여 생존 세포수를 측정하였다.

5) 생존 분획을 구하기 위해서 처리된 plate wall에 trypsin EDTA을 처리하여 세포를 모으고 trypan blue 10 μl와 sus-

pension cell 10 μl을 mix하여 청결한 hemocytometer의 가장자리에 분주하였다.

6) Hemocytometer의 chamber 안의 10구획 안에 있는 세포 중 파랗게 염색되어있는 세포를 죽은 세포로 구분하고 염색되지 않는 세포를 살아있는 세포로 카운트하였다.

### 5. 유세포 분석

rhEGF에 의한 세포 주기의 변화 정도를 알아보기 위하여 유세포 분석을 이용하였다. 유세포분석기를 이용한 propidium iodide (PI) (Sigma Chemical Co.) 형광염색법을 시행하였다. 1×10<sup>6</sup>개/ml씩 분주한 각 세포를 무처리 세포와 일정 농도의 rhEGF를 4시간 처리한 세포를 70% ethanol 1 ml로 고정한 후 -20°C에 보관하다 일시에 분석하였다. 무처리 세포와 rhEGF로 처리한 세포를 600 g에서 원심분리하여 세포를 모았다. 최종 세포농도는 1×10<sup>6</sup> cells/ml가 되도록 완충액을 넣고 세포를 현탁시키고 50 μl를 취하여 negative control로 사용하고 나머지는 염색하였다. 실험목적에 따라 처리된 세포를 걷어 내어 15 ml conical tube에 넣고 cold phosphate buffered saline (PBS) 10 ml로 채운 후 1,000 rpm에서 5분간 원심분리한다. 원심분리 후 조심스럽게 상층액을 버리고 pellet를 잘 풀어주었다. 다시 cold PBS 3 ml로 채운 후 1,000 rpm에서 5분간 원심분리 후 조심스럽게 상층액을 버리고 pellet를 잘 풀어주었다. 이렇게 PBS로 2회 세척하고 암소에서 50 μg/ml propidium iodide (PI, Sigma Chemical Co.) 2 μl를 가하고 30분 후 완충액 400 μl를 가해 전체를 500 μl로 맞추어 유세포 분석기 FACscan (Becton

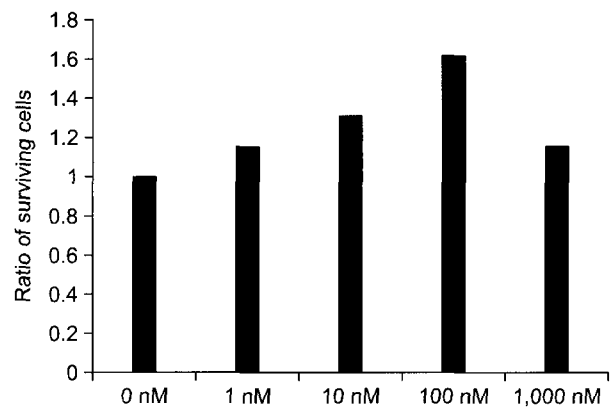


Fig. 1. MTT assay of fibroblast according to concentration of recombinant human epidermal growth factor (rhEGF). Fibroblast cultured various concentration of rhEGF (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1,000 nM). Culture media was replaced flash one after 24 hours. MTT assay was performed at 3 days later. RhEGF accelerated proliferation of fibroblast. Growth stimulation was maximum on the 100 nM of rhEGF.

Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)에서 dual color parameter protocol을 사용하여 분석하였다. 단 30분 이후에는 4°C 혹은 얼음에 보관하며 빛을 차단하였고, 3시간 이내 분석하였다.

6. 방법

방사선에 의해 손상 받은 섬유아세포의 증식에서 rhEGF의 효과를 알아보려고 하였다. 지수 성장기에 있는 정상 섬유아세포 1×10<sup>4</sup>를 12 well plate에 심고 4 Gy의 방사선을 조사하였다. 방사선조사 직후 rhEGF의 농도를 1.0 nM, 10 nM, 100 nM, 1,000 nM로 변경시키면서 24시간 처리 후 정상 배지로 교체하였다.

rhEGF가 섬유아세포의 세포주기에 미치는 영향을 알아보려고 하였다. 섬유아세포에 rhEGF 1.0 nM, 10 nM, 100 nM을 24시간 처리한 후 배지를 바꾸어 주었다.

방사선이 조사된 섬유아세포에서 rhEGF를 투여하면 생존 세포수 증가하는 기전이 방사선에 의한 세포손상억제나 회복 때문인지 아니면 단순히 생존세포의 증식이 가속된 이유인지를 알아보려고 하였다. 방사선 조사 후 rhEGF (10 nM)의 투여 시기를 시간차를 두며 tryphan blue 염색을 시행하였다.

결 과

섬유아세포에 rhEGF의 농도를 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1,000 nM로 변화시키면서 24시간 처리 후 배지를 갈아준 후 3일과 6일째 MTT assay를 시행한 결과 1 nM에서 100 nM까지는 농도가 올라갈수록 세포증식도 증가하였다. 대조군에 비해 세포수가 약 1.6배 증가하였다. 그러나 1,000 nM에서는 세포증식이 100 nM에 비해서 감소하였다. 섬유아세포의 증식은 rhEGF에 의해 가속됨을 확인하였다. 한편 rhEGF에 의한 세포증식 자극은 rhEGF의 농도에 따라 다른 양상을 나타내었다(Fig. 1). 방사선에 의해 손상 받은 섬유아세포의 증식에서 rhEGF의 효과를 알아보려고 하였다. 지수 성장기에 있는 정상 섬유아세포 1×10<sup>4</sup>를 12 well plate에 심고 8 Gy의 방사선을 조사하였다. 방사선조사 직후 rhEGF의 농도를 1.0 nM, 10 nM, 100 nM, 1,000 nM로 변경시키면서 24시간 처리 후 정상 배지로 교체하였다. 이후 날짜별로 typhan blue 염색법을 이용하여 생존 세포수를 측정하였다. rhEGF를 처리한 모든 농도에서 방사선 조사 단독군보다 rhEGF를 처리한 군에서 생존세포 수가 많았다. 이런 양상은 방사선 조사 후 7일까지 계속 유지되었다(Table

Table 1. Trypan Blue Assay for Normal Fibroblast after Irradiation (8 Gy)

Groups	2nd day	3rd day	4th day	5th day	6th day	7th day
RT alone	6,147	7,600	7,443	7,020	6,517	6,400
RT+EGF (1.6 nM)	7,384	9,368	9,208	8,144	7,772	8,328
RT+EGF (16 nM)	8,060	10,197	10,460	9,923	8,720	9,180
RT+EGF (160 nM)	8,833	10,837	11,210	10,517	9,710	9,403
RT+EGF (1,600 nM)	6,726	8,031	8,457	7,606	7,211	7,174

1×10<sup>4</sup> cell seeding

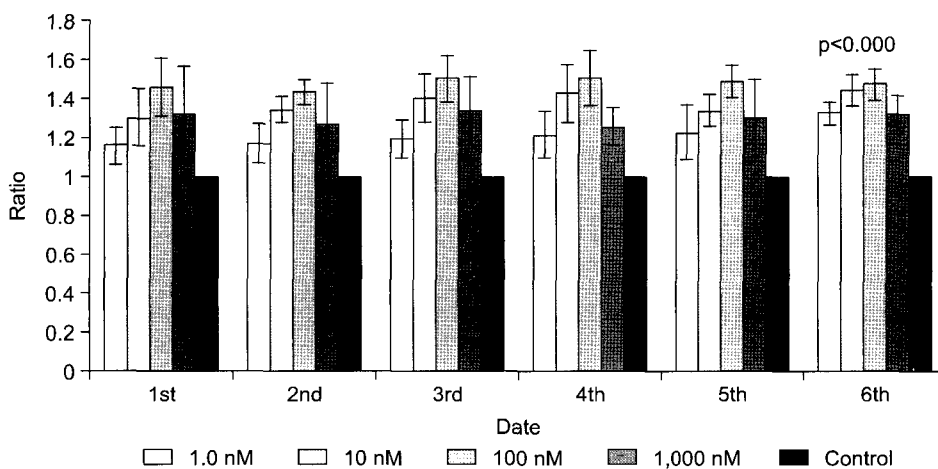
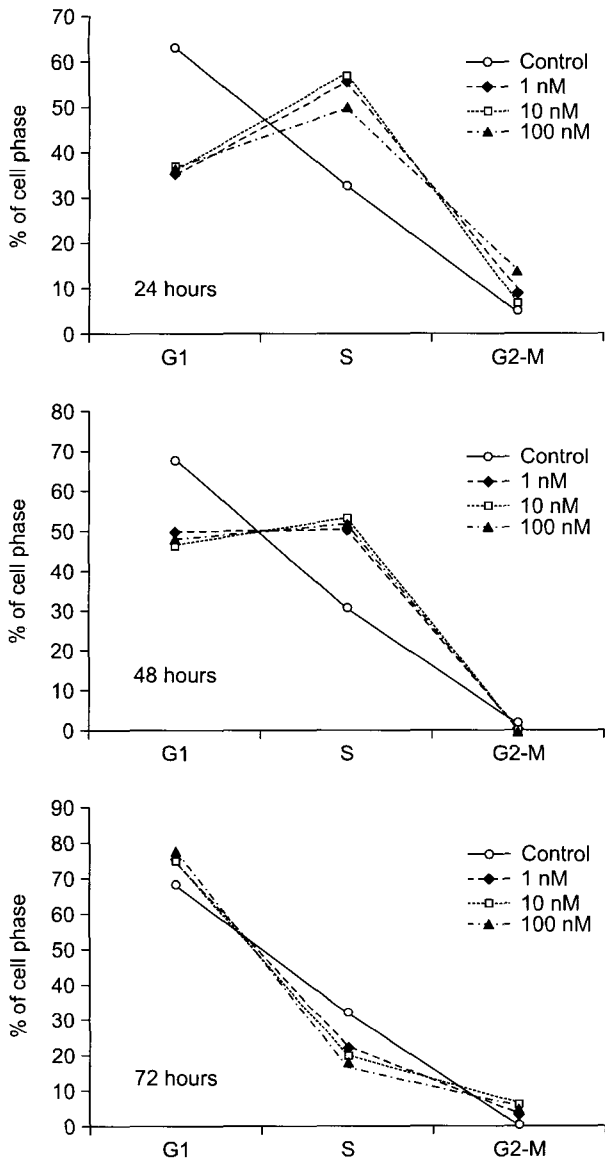
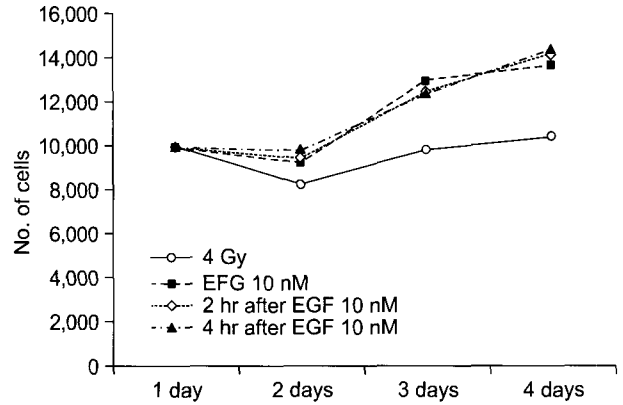


Fig. 2. Proliferation stimulation effect of rhEGF on the irradiated (8 Gy) fibroblast. Irradiated (8 Gy) fibroblast immediately treated with rhEGF (1.0 nM, 10 nM, 100 nM, 1,000 nM) for 24 hours and changed flash media. Survival fibroblast was counted by tryphan blue dye stain assay. Survival fibroblast was increased in rhEGF treated groups. Survival difference was maximum at 100 nM of rhEGF and maintained for seven days. Number of fibroblast was 1.5 times increased in 100 nM of rhEGF compared with control group.



**Fig. 3.** Cell cycle analysis of rhEGF treated fibroblast. Fibroblast cultured various concentration of rhEGF (1 nM, 10 nM, 100 nM) for 24 hours. Culture media was replaced fresh one after 24 hours. Fibroblast was stained with PI and FACS analysis was carried out at 24 hours, 48 hours, 72 hours. S phase fraction was increased in rhEGF treated group compared with control group. This finding was maintained 48 hours, however S phase fraction normalized 72 hours later.

1). 방사선조사만 시행 받은 군의 생존세포수를 1로 환산했을 때 rhEGF 처리군의 상대적 생존세포 비율을 확인한 결과 rhEGF의 농도가 1.0 nM에서 100 nM까지 증가할 때는 생존세포수가 증가하였고, 1,000 nM에서는 오히려 감소하였다(Fig. 2). 이런 양상은 방사선을 조사하지 않고 rhEGF만 처리한 앞의 결과와 비슷한 양상이었다. 본 연구 결과로부터 rhEGF가 방사선이 조사된 정상 섬유모세포의 생존



**Fig. 4.** Proliferation stimulation effect of rhEGF on the irradiated (8 Gy) fibroblast. Irradiated (8 Gy) fibroblast immediately, 2 hours later, and 4 hours later treated with rhEGF (10 nM) for 24 hours and changed fresh media. Survival fibroblast was counted by trypan blue dye stain assay. Number of survival fibroblasts were no difference according to timing rhEGF treated.

을 향상시킬 수 있었다.

섬유아세포에 rhEGF를 투여하면 세포증식이 가속됨을 앞의 결과에서 확인하였다. 이에 rhEGF가 섬유아세포의 세포주기에 미치는 영향을 알아보기 위해 PI 염색 후 FACS scan을 이용하여 세포주기를 분석한 결과 rhEGF를 투여한 경우 24시간에 S기 비율이 증가하였고 48시간에서 72시간으로 진행하면서 S기 비율이 대조군과 비슷한 양상으로 감소하였다. rhEGF의 농도에 따른 세포주기 변화의 양상의 차이는 관찰되지 않았다. 따라서 rhEGF를 섬유아세포에 투여하면 약 24시간 후에 세포 증식이 활발히 일어남을 알 수 있었다(Fig. 3).

방사선이 조사된 섬유아세포에서 rhEGF를 투여하면 생존 세포수 증가하는 기전이 방사선에 의한 세포손상억제나 회복 때문인지 아니면 단순히 생존세포의 증식이 가속된 이유인지를 확인하기 위해 방사선 조사 후 rhEGF (10 nM)의 투여 시기를 시간차를 두며 시행하였다. 방사선조사 직후 rhEGF를 투여하거나 아니면 2시간 후 또는 4시간 후 EGF를 투여하여도 생존세포의 수에는 변화가 없었다. 따라서 rhEGF의 효과는 방사선에 의한 세포손상 억제나 복구보다는 생존 세포의 증식으로 인한 것으로 생각되었다(Fig. 4).

### 고안 및 결론

본 연구는 방사선에 의한 점막염이나 피부염의 치유에서 핵심적 역할을 하는 섬유아세포에 대한 rhEGF의 성장

자극 효과를 알아보려고 고안한 실험이었다. Cohen에 의하면 10 nM의 EGF 농도에서 암세포는 성장이 억제되지만 섬유아세포는 성장자극이 일어난다고 알려져 있다.<sup>6)</sup> 본 실험에서는 섬유아세포가 EGF에 의해 세포증식에 자극을 받으며 EGF 농도에 따라 세포증식에 자극 받는 정도가 차이가 남을 알 수 있었다. EGF에 의한 세포 자극은 EGF 수용체와 EGF양에 따라 자극을 받을 수도 있고 오히려 성장억제가 일어날 수도 있다는 점이고, 암세포의 결과와 비슷함을 알 수 있었다. 모든 세포는 EGF 수용체의 자극에 대하여 과도한 자극이 일어나면 오히려 세포 분열이나 증식이 억제된다는 점을 보여 주고 있다. 본 연구에서는 10% 우태아 혈청을 배지에 첨가하여 주었는데 이런 조건에서 rhEGF 농도가 100 nM까지는 세포 증식을 가속시킴을 알 수 있었다. 하지만 세포증식에 자극을 받는 EGF의 농도는 배지의 혈청 농도나 첨가해주는 성장인자의 농도에 따라 다를 수 있다는 점이다.

EGF에 의한 섬유아세포의 세포증식 자극효과가 방사선이 조사된 환경에서도 같은 결과가 나오는지 알아보려고 하였다. 방사선이 조사된 섬유아세포의 증식에 대한 EGF의 효과는 방사선이 조사되지 않는 조건의 결과 매우 유사함을 알 수 있었다. 따라서 방사선이 조사된 임상조건에서도 EGF는 효과적으로 정상세포 분열을 자극할 수 있을 것으로 생각되었다.

EGF를 투여하고 24시간 후 세포주기 분석을 시행한 결과 비정상적으로 S기 비율이 증가되어 있었다. 그 이유는 EGF에 의해 자극 받은 섬유아세포는 세포 증식을 위해서 S기에서 DNA 복제가 활발히 일어나기 때문인 것으로 생각되었다. 하지만 EGF의 효과는 24시간 전후에서 최대이고 그 이후에는 S기 비율이 줄어들고 72시간이 되면 거의 EGF를 투여하지 않은 세포와 비슷한 양상으로 회복됨을 알 수 있어 섬유아세포의 증식을 위해서는 24시간 간격으로 EGF를 투여하는 것이 필요함을 알 수 있었다.

방사선이 조사된 섬유아세포에서 EGF에 의한 자극이 방사선 조사 시점과 비교하여 시간 차가 있을 때 어떤 차이가 있는지 알아보았다. 하지만 본 연구 결과에서는 EGF를 방사선 조사 직후에 투여한 경우와 2시간, 4시간 후에 투여한 경우에도 차이가 없음을 알 수 있었다. 따라서 EGF가 방사선에 의한 DNA 손상 복구에 영향을 주지 않음을 확인할 수 있었다. 그 이유는 방사선에 의한 DNA 손상의 복구는 2시간 내에 90% 정도 일어나기 때문이다.<sup>16)</sup> 하지만 본 실험에서 방사선조사 전에 EGF를 전처리한 경우의 실험을 하지 않아 향후 추가적이 실험이 더 진행되어야 될 것으로 생각되었다. 암세포에 방사선조사 시 EGF의 투여

시점에 따른 결과를 보면 방사선 조사 후 EGF를 투여한 경우 EGF가 방사선의 효과를 증진시켜 암세포의 사멸을 증진시키는 것으로 밝혀져 있다.

결론적으로 EGF는 섬유아세포의 증식에 효과적이며 방사선이 조사된 조건에서도 같은 결과임을 알 수 있었다. 이런 세포증식 효과는 EGF의 농도에 따라 다르게 나타나 섬유아세포의 증식을 최대화할 수 있는 농도가 존재함을 알 수 있었다. 방사선이 조사된 이후에도 섬유아세포의 증식을 기대하기 위해서는 일차적으로 생존한 섬유아세포가 있어야 됨을 알 수 있었고, EGF의 효과는 24시간 지속될 것으로 예측된다. 이런 실험의 결과를 동물실험이나 임상 실험에 적용하기 위해서는 일차적으로 방사선조사 후에도 생존세포가 남아있어야 하기 때문에 조기에 EGF를 투여해야 하고 EGF는 24시간 간격으로 투여하는 것이 적당할 것으로 생각되었다.

## 참 고 문 헌

1. Cohen S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal. *J Biol Chem* 1962;237:1555-1562
2. Cohen S, Carpenter G. Human epidermal growth factor: isolation and chemical and biological properties. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975;72:1317-1321
3. Savage CR, Inagami T, Cohen S. The primary structure of epidermal growth factor. *J Biol Chem* 1972;247:7612-7621
4. Taylor JM, Mitchell WM, Cohen S. Epidermal growth factor. Physical and chemical properties. *J Biol Chem* 1972;247:5928-5934
5. Weaver LT, Gonnella PA, Israel EJ, et al. Uptake and transport of epidermal growth factor by the small intestinal epithelium of the fetal rat. *Gastroenterology* 1990;98:828-837
6. Cohen S. The epidermal growth factor (EGF). *Cancer* 1983;51:1787-1791
7. Steidler NE, Reade PC. Histomorphological effects of epidermal growth factor on skin and oral mucosa in neonatal mice. *Arch Oral Biol* 1980;25:37-43
8. Waterfield MD. Epidermal growth factor and related molecules. *Lancet* 1989;1:1243-1246
9. Ino M, Ushiro K, Ino C, et al. Kinetics of epidermal growth factor in saliva. *Acta Otolaryngol Suppl* 1993;500:126-130
10. Thesleff I, Viinikka L, Saxen L, et al. The parotid gland is the main source of human salivary epidermal growth factor. *Life Sci* 1988;43:13-18
11. Epstein JB, Emerton S, Guglietta A, et al. Assessment of epidermal growth factor in oral secretions of patients receiving radiation therapy for cancer. *Oral Oncol* 1997;33:359-363
12. Carpenter G. Epidermal growth factor is a major growth-promoting agent in human milk. *Science* 1980;210:198-199

13. Heitz PU, Kasper M, van Noorden S, et al. Immunohistochemical localisation of urogastrone to human duodenal and submandibular glands. Gut 1978;19:408-413
14. Olsen PS, Poulsen SS, Therkelsen K, et al. Effect of sialoadenectomy and synthetic human urogastrone on healing of chronic gastric ulcers in rats. Gut 1986;27:1443-1449
15. Jung KI, Kim SH, Moon SY, et al. Effects of recombinant epidermal growth factor on experimental radiation-induced oral mucositis in rats. J Korean Soc Ther Radiol Oncol 2006;24:67-76
16. Hall E. Radiobiology for the radiologist. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000:67-90

---

**Abstract**

**Effects of Recombinant Human Epidermal Growth Factor on the Proliferation and Radiation Survival of Human Fibroblast Cell Lines *in Vitro***

Hyun Sook Kim, M.D.\*, Ki Mun Kang, M.D.<sup>†</sup>, Sang-wook Lee, M.D.<sup>†</sup>  
Jae Boem Na, M.D.\* and Gyu Young Chai, M.D.<sup>†</sup>

Departments of \*Radiology, <sup>†</sup>Radiation Oncology, Gyeongsang National University College of Medicine, Jinju, <sup>†</sup>Department of Radiation Oncology, University of Ulsan College of Medicine, Asan Medical Center, Seoul, Korea

**Purpose:** To explore the effect of recombinant human EGF on the proliferation and survival of human fibroblast cell lines following irradiation.

**Materials and Methods:** Fibroblast was originated human skin and primary cultured. The trypan blue stain assay and MTT assay were used to study the proliferative effects of EGF on human fibroblast cell lines *in vitro*. An incubation of fibroblasts with rhEGF for 24 hours immediately after irradiation was counted everyday. Cell cycle distributions were analyzed by FACS analysis.

**Results:** Number of fibroblast was significantly more increased rhEGF (1.0 nM, 10 nM, 100 nM, 1,000 nM) treated cell than control after 8 Gy irradiation. Most effective dose of rhEGF was at 160 nM. These survival differences were maintained at 1 week later. Proportion of S phase was significantly increased on rhEGF treated cells.

**Conclusion:** rhEGF cause increased fibroblast proliferation following irradiation. We expect that rhEGF was effective for radiation induced wound healing.

---

**Key Words:** Recombinant human epidermal growth factor, Radiation, Fibroblast cell