

Rat의 방사선 조사성 구내염에 대한 Recombinant Human Epidermal Growth Factor (rhEGF)의 효과

대웅제약 생명공학연구소 약리독성팀*, 단백질의약품†, 울산대학교 의과대학 서울아산병원 성형외과‡, 방사선종양학과§, 경상대학교 의과대학 방사선과학교실||

정권일* · 김선희† · 문수영§ · 김연화† · 홍준표† · 김현숙|| · 이상욱§

목적: 구내염은 두경부종양이 있는 암환자에게 방사선 및 항암제 치료 시술 시 매우 흔하게 발생하는 합병증이다. 본 연구는 Rat의 방사선성 구내염 모델에서 recombinant human epidermal growth factor (rhEGF)의 효과를 평가하고자 하였다.

대상 및 방법: 25 Gy의 방사선량으로 두부에 단회 조사한 Rat를 무작위로 7마리씩 무처치군, 부형제 처치군, rhEGF 15 또는 30 µg/day 구강 내 처치군으로 나누었으며, 방사선을 조사하지 않은 7마리의 Rat를 정상시험군으로 나누었다. rhEGF 시료 및 부형제는 1일 3회 Rat의 구강점막에 매일 도포하였다. Rat의 생존율, 체중변화 및 사료섭취량을 18일 동안 관찰하였으며, 방사선 조사 후 7일 및 18일째에 Rat의 구강점막을 조직학적으로 평가하였다.

결과: 실험종료 시점에서 rhEGF 15 또는 30 µg/day 구강 내 처치군이 모두 33%의 생존율을 보인 것에 비하여, 무처치군 및 부형제 처치군은 모두 0%의 생존율을 보였다. 체중변화에서도 rhEGF 처치군은 방사선 조사 후 2일부터 7일까지 부형제 처치군에 비하여 Rat의 평균체중이 통계적으로 더욱 무거웠다. 사료섭취율은 모든 시험군에서 방사선 조사 후 4일까지 감소하는 양상을 보이다가, rhEGF 15 또는 30 µg/day 구강 내 처치군에서 14일째에 뚜렷한 사료섭취율의 증가가 관찰되었다. 방사선 조사 후 7일째의 조직학적 분석 결과, rhEGF 15 또는 30 µg/day 구강 내 처치군의 Rat에서는 점막 표피층의 각질세포의 증창 및 변성만이 관찰되었던 것에 비하여, 무처치군 및 부형제 처치군에서는 심한 위막성 또는 궤양성 구내염이 관찰되었다.

결론: rhEGF (15 또는 30 µg/day 구강 내 처치군) 처치에서 방사선 조사로 유발시킨 Rat의 구내염 모델에서 유의성 있는 치유 효과를 확인하였으며, 본 시험결과로 rhEGF가 방사선에 의해 유발된 구내염을 치료할 수 있는 임상 제제로써의 가능성을 볼 수 있었다.

핵심용어: 구내염, 방사선, Epidermal growth factor, Rat 모델

서 론

방사선이 발견되어 암치료에 적용된 지 오랜 시간이 지났지만 방사선치료는 아직까지 매우 효과적인 주요 항암 치료법으로 자리하고 있다. 그러나 방사선 치료법의 끊임 없는 개선에도 불구하고, 방사선 치료에 따른 여러 합병증

들이 문제시되고 있는 실정이다. 특히 구내염(oral mucositis)은 두경부 암환자에게 방사선치료 시술 시 매우 흔하게 발생하며, 암환자를 매우 고통스럽게 만드는 원인이다.¹⁾ 구내염은 암환자의 예후를 나쁘게 할 뿐만 아니라, 방사선 치료의 중단 및 다른 병용 치료를 필요로 한다. 그리고 구내염은 백혈구감소증이 있는 중양 환자에게 환부를 통한 세균 감염을 용이하게 하여 패혈증으로 인한 사망 위험을 크게 한다.²⁾ 또한 경제적인 측면을 고려하였을 때, 통상 구내염이 심한 환자가 퇴원시까지 걸리는 시간이 길기 때문에, 그만큼 입원비용도 늘어나 경제적으로 손실을 주게 된다.

치료 효과가 좋은 새로운 항암제의 개발로 방사선치료와 항암치료를 동시에 시행하면 더 높은 생존율을 기대할

이 논문은 2006년 2월 9일 접수하여 2006년 3월 3일 채택되었음. 본 연구는 아산생명과학 연구소 과제 지원에 의해 이루어졌음 (2006-308).

책임저자: 이상욱, 서울아산병원 방사선종양학과
Tel: 02)3010-4435, Fax: 02)486-7258
Email: lsw@amc.seoul.kr

수 있지만 이런 치료 기법을 제한하는 주요 요인 중 하나가 구내염이다. 방사선과 함암제 병용치료에 의해 유발된 구내염에 대한 효과적인 치료법은 아직까지 없으며 대부분 대증요법이 치료의 주류를 이루고 있다.¹⁾

방사선 또는 함암제는 암세포 이외에도 구강점막상피세포 등과 같은 분화속도가 빠른 세포에 비특이적으로 독성을 나타내어 구내염을 유발한다. 하지만 구내염 발병 기전은 아직 명확하게 알려지지 않았으나 현재까지 알려진 바에 의하면, 혈관내피세포, 점막상피세포 및 결합조직의 변화, 그리고 구강 내의 미생물의 불균형 및 침 내 성장인자의 변화 등 복잡한 과정이 관여하는 것으로 보고있다.

Recombinant human epidermal growth factor (rhEGF)는 당뇨병성 족부궤양 같은 만성 상처에 대한 치유 효과가 이미 증명되어 방사선에 의해 유발되는 구내염의 치료에도 그 효과가 기대된다.³⁾ 최근 본 연구팀이 시행한 세포 증식 실험에서도 방사선 조사로 손상시킨 섬유아세포에 rhEGF 10 ng/ml부터 1,000 ng/ml까지 농도를 변화 시켰을 때 섬유아세포가 농도의존적으로 증식되어지는 결과를 보여 rhEGF의 구내염 치료제로서의 가능성을 볼 수가 있었다(unpublished). 방사선에 의한 구내염의 예방과 치료에 rhEGF의 효과가 증명된다면 두경부종양의 치료 성적 향상을 기대할 수 있다.

본 시험은 rhEGF가 방사선 구내염의 회복에 미치는 효과를 알아보기 위하여 임상에서 일반적으로 사용되는 방사선량보다 더 많은 양의 방사선을 고의적으로 Rat에게 조사하여 구내염을 발생시킨 후, rhEGF를 구강 내에 처치하여 rhEGF를 처치하지 않은 개체들과 생존율, 체중변화, 사료섭취율 및 조직학적 변화 등을 비교분석하여 내염에 대한 rhEGF의 효과를 평가하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 실험동물

동물 실험은 서울아산병원연구소의 Institutional Review Board에서 승인되었으며, 실험동물은 특정병원체 부재 SD 계 Rat 7주령 35마리(암수 각각 17, 18)(체중: 178±5 g)를 (주)오리엔트로부터 공급받아 서울아산병원연구소 실험동물사육실에서 온도 23±1°C, 상대습도 55±5%, 배기 10~18회/hr, 조명 12시간, 조도 150~300 lux의 사육환경에서 사육하였다. Rat용 고형사료와 음료는 자유롭게 섭취시키며, 1주일간 순화시킨 후 시험에 사용하였다.

2. 방사선 조사

방사선 조사 전 Rat를 ketamine (100 mg/kg)과 xylazine (10 mg/kg)를 혼합하여 근육 주사하여 마취시켰다. 4 MV 에너지의 치료용 선형가속기(CLINAC 600 C, Varian, Palo Alto, CA, USA)를 이용하여 분당 2 Gy의 선량률(dose rate)로 Rat의 두부에 균일하게 조사하였다. 이 때 점막에 충분한 선량이 투여되게 하기 위하여 1.5 cm bolus를 이용하였다. 방사선은 단회로 조사하였으며, Potten 등³⁾이 발표한 논문을 참고하여 Rat 한마리당 총 25 Gy의 방사선을 조사하였다.

3. 시험군의 구성 및 rhEGF의 투여

전체 Rat 35마리 중 방사선 조사한 Rat 28마리를 무작위로 7마리씩 4개의 시험군으로 구분하여 무치치군, 부형제 처치군, rhEGF 처치군(15 또는 30 µg/day 구강 내 처치군)으로 분류하였고, 방사선을 조사하지 않은 7마리를 정상시험군으로 분류하였다. rhEGF의 투여는 방사선 조사 후 다음날부터 18일 동안 하루 총 3회(오전 9시, 오후 1시, 그리고 오후 6시) 구강에 도포하였다. Rat의 구강에 rhEGF가 충분히 도포하기 위하여, 1회당 100 µl씩 EGF 총 300 µl를 매일 도포하였다. 사용된 rhEGF 시료는 ml당 50 µg 및 100 µg 농도의 액상제로 (주)대웅제약으로부터 공급받아 본 연구에 사용하였다.

4. 관찰 및 평가

실험기간 동안 실험 동물의 일반 증상 및 사망 동물을 관찰하였다. 일반 증상의 관찰항목으로는 식욕부진(anorexia), 탈모(hair loss) 및 예민성(sensitivity)을 관찰하여 기록하였다. 또한, 실험기간 동안 모든 실험 동물에 대하여 오전 9시의 체중 및 사료섭취량을 매일 측정하였다.

5. 육안 및 조직학적 관찰

방사선 조사 후 7일째에 구내염 유발과 정도를 시험군 간에 비교 평가하기 위하여 시험군당 1마리씩을 무작위로 선별하여 육안소견을 확인한 후 부검하였다. 혀와 구강점막 및 일반장기(간, 신장, 심장, 비장, 폐장, 소장, 대장)를 적출하였고, 10% 중성포르말린에 고정하여 조직표본 제작 후 haematoxylin & eosin (H&E) 염색을 시행하였다. 사망 동물 및 회복 동물에 대해서도 부검을 실시하여, 조직학적 변화를 분석하였다.

6. 통계학적 분석

모든 측정치는 평균±표준편차로 표시하였고 시험군 간의 비교는 ANOVA test를 시행하였다. 시험군 간의 통계학적 유의성은 student's t-test로 검정하였으며, $p < 0.05$ 이하를 통계적으로 유의한 것으로 판단하였다. 시험군의 생존 분석(survival analysis)은 Kaplan-Meier법을 이용하여 95% 신뢰구간에서 검정하였다.

결 과

1. 생존율

모든 시험군에서 방사선 조사 후 7일 동안 사망동물은 관찰되지 않았다. 무처치군에서 조직학적 검사를 위해 7일째에 부검한 Rat 1마리를 제외한 총 6마리 중 방사선 조사 8일째에 3마리가 사망하였고, 9일째에 남은 3마리가 사망하여 0% (0/6)의 생존율을 보였다. 부형제 처치군에서는 방사선 조사 8일째에 3마리, 9일째에 2마리 그리고 10일째에 남은 1마리가 사망하여 0% (0/6)의 생존율을 보였다. 이에 비해 rhEGF 15 $\mu\text{g}/\text{day}$ 구강 내 처치군에서는 방사선 조사 11일째에 2마리, 13일째에 1마리, 그리고 14일째에 1마리가 사망하였고, 실험종료 18일까지 더 이상 사망하는 개체가 발생하지 않아 33% (2/6)의 생존율을 보였다. rhEGF 30 $\mu\text{g}/\text{day}$ 구강 내 처치군에서는 방사선 조사 10일째에 3마리가 사망하였고, 11일째에 1마리가 추가적으로 사망한 것을 제외하고는 더 이상 사망동물이 관찰되지 않아 33% (2/6)의 생존율을 나타내었다. rhEGF 15 및 30 $\mu\text{g}/\text{day}$ 처치군은 무처치군 및 부형제 처치군에 비하여 각각 통계적으로 유의한 생존율을 보였다($p=0.0001$). 하지만, rhEGF 15 또는 30 $\mu\text{g}/\text{day}$ 구강 내 처치군은 서로 통계적인 유의성을 보이지 않았다(Table 1, Fig. 1).

2. 일반증상

방사선 조사를 받은 Rat에서 관찰되는 일반 증상은 식욕 부진이였다. 방사선 조사 4일째에 모든 시험군에서 Rat의 두부로부터 탈모가 관찰되기 시작하였으며, 무처치군, 부형제 처치군, rhEGF 15 또는 30 $\mu\text{g}/\text{day}$ 구강 내 처치군에서 각각 4마리, 2마리, 3마리 및 2마리가 탈모가 관찰되었다. 하지만 시험군 간의 뚜렷한 탈모 증상의 차이는 관찰할 수 없었다(Table 2). 방사선 조사 6일째에 모든 시험군의 Rat에서 물리적인 자극 및 소리에 대해 매우 예민한 반응을 보였으며, 무처치군 및 부형제 처치군의 Rat에서 사망 전

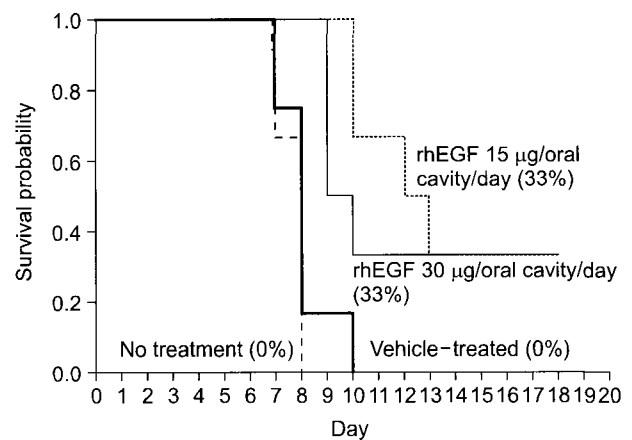


Fig. 1. Relationship between oral EGF and the survival probability of irradiated rats. Irradiated rats were subjected to no further treatment (Group 1) or were treated with vehicle (Group 2), 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ EGF (Group 3), or 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ EGF (Group 4). The survival probabilities of EGF-treated rats (Groups 3 and 4) differed significantly from that of untreated rats (Groups 1 and 2), as determined by the Kaplan-Meier log-rank test ($p=0.0001$). However, the survival probabilities of rats treated with 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ EGF (Group 3) or 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ EGF (Group 4) showed no significant difference.

Table 1. Survival of Rats

Groups	Survival rate (No. lived/No. dosed)	Number of death												
		Days post-irradiation (day)												
		1~5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16~18	
No irradiation	7/7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
No treatment	0/6	0	0	0*	3	3								
Vehicle control	0/6	0	0	0*	3	2	1							
rhEGF 15 $\mu\text{g}/\text{oral cavity}/\text{day}$	2/6	0	0	0*	0	0	0	2	0	1	1	0	0	
rhEGF 30 $\mu\text{g}/\text{oral cavity}/\text{day}$	2/6	0	0	0*	0	0	3	1	0	0	0	0	0	

*one rat was sacrificed for histopathological evaluation from each group at 7 days post-irradiation

까지 예민한 반응을 지속적으로 관찰할 수 있었다. 방사선 조사 14일째에 rhEGF 15 또는 30 µg/day 구강 내 처치군의 Rat에서는 예민 반응과 같은 이상 증상을 보이지 않았으며, 외양적으로 양호하였다(Table 2).

3. 체중

방사선 조사를 받은 모든 시험군에서 방사선 조사 후 3 일 동안은 체중이 점차 증가하다 4일부터는 급격하게 체중이 감소하였다(Fig. 2). rhEGF 15 µg/day 구강 내 처치군의 평균 체중은 부형제 처치군과 비교하였을 때, 방사선 조사

Table 2. Incidence of Clinical Signs of Irradiated-rats with or without EGF

Day	Sign observed	Group				
		No irradiation	No treatment	Vehicle-treated	rhEGF 15 µg/day	rhEGF 30 µg/day
0	Appears normal	7/7*	7/7	7/7	7/7	7/7
1	Appears normal	7/7	0/7	0/7	0/7	0/7
	Anorexia	0/7	7/7	7/7	7/7	7/7
4	Appears normal	7/7	0/7	0/7	0/7	0/7
	Anorexia	0/7	7/7	7/7	7/7	7/7
	Hair loss	0/7	4/7	2/7	3/7	2/7
5	Appears normal	7/7	0/7	0/7	0/7	0/7
	Anorexia	0/7	7/7	7/7	7/7	7/7
	Hair loss	0/7	7/7	7/7	7/7	7/7
6	Appears normal	7/7	0/7	0/7	0/7	0/7
	Anorexia	0/7	7/7	7/7	7/7	7/7
	Hair loss	0/7	7/7	7/7	7/7	7/7
	Sensitivity	0/7	4/7	5/7	0/7	2/7
7	Appears normal	7/7	0/7	0/7	0/7	0/7
	Anorexia	0/7	7/7	7/7	7/7	7/7
	Hair loss	0/7	7/7	7/7	7/7	7/7
	Sensitivity	0/7	7/7	7/7	4/7	7/7
14	Appears normal	7/7	-	-	2/2	2/2
	Anorexia	0/7	-	-	1/2	1/2
18	Appears normal	7/7	-	-	2/2	2/2
	Anorexia	0/7	-	-	1/2	1/2

*number of animals with the sign/number of animals examined

Table 3. The Changes in Body Weight of Rats in the Radiated Groups

Group	EGF (-)		EGF (+)	
	No treatment	Vehicle-treated	rhEGF 15 µg/day	rhEGF 30 µg/day
Day 1 (n=7)	182.0±5.9	181.8±7.5	186.2±3.1	184.7±6.7
Day 2 (n=7)	184.7±7.1	182.5±8.3	191.4±3.4*	189.3±6.3
Day 3 (n=7)	189.0±10.0	186.8±9.3	197.4±4.8*	193.0±6.8
Day 4 (n=7)	188.4±10.1	183.4±11.5	195.0±6.2*	188.5±7.1
Day 5 (n=7)	165.8±9.4	164.3±10.1	180.2±11.0*	178.4±6.1 [†]
Day 6 (n=7)	146.5±8.1	144.3±8.5	154.4±13.3 [†]	159.8±7.7 [†]
Day 7 (n=6)	133.0±5.0	131.5±7.5	148.2±16.8 [†]	151.9±8.2 [†]
Day 8	128.8±7.2 (n=3)	127.7±4.6 (n=3)	141.3±28.1 (n=6)	143.9±11.5 (n=6)

Each value represents mean±standard deviation. Values of un-treated group were not significantly different as compared to vehicle-treated group. *p<0.05, [†]p<0.01: significantly different as compared between rhEGF-treated group (15 µg/day) and vehicle-treated group, [‡]p<0.01: significantly different as compared between rhEGF-treated group (30 µg/day) and vehicle-treated group

후 2일, 3일, 4일 및 5일째에 각각 8.9 g, 10.6 g, 11.6 g 및 15.9 g 더 무거웠으며($p < 0.05$), 6일 및 7일째에는 10.1 g 및 16.7 g 더 무거웠다($p < 0.01$). rhEGF 30 $\mu\text{g/day}$ 구강 내 처치군의 평균 체중은 5일, 6일 및 7일째에 부형제 처치군에 비해 14.1 g, 15.5 g 및 20.4 g 더욱 무거웠다($p < 0.01$)(Table 3). 부형제 처치군과 무처리군간의 평균 체중은 통계학적인 차이를 보이지 않았다.

방사선 조사 후 8일째에는 시험군 간에 유의성 있는 체

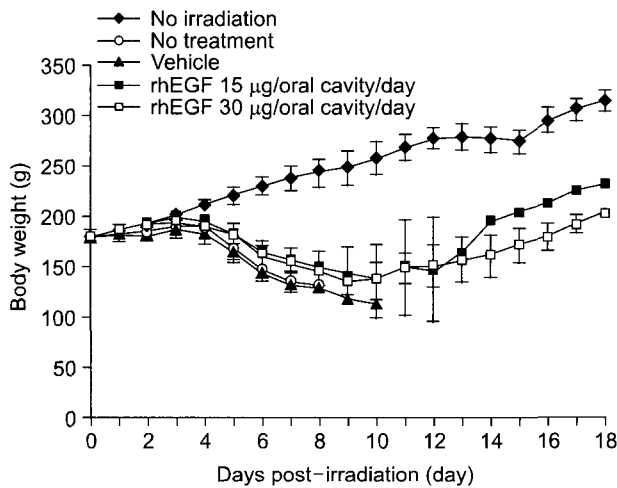


Fig. 2. Effect of EGF on rat body weight. Irradiated rats, treated as described in the legend to Figure 1, were weighed daily. In all groups, rat body weight tended to decrease, starting on days 4 and 5, but rats treated with EGF (Groups 3 and 4) lost significantly less weight than rats not treated with EGF (Groups 1 and 2). Moreover, EGF treated rats started to gain weight on days 9 and 10, with the rate of weight gain similar to that of non-irradiated animals (Group 0), beginning on day 13. Values reported are means. * $p < 0.05$, **, $\dagger p < 0.01$ compared with Groups 1 and 2.

중 차이를 관찰할 수 없었는데, 이는 무처리군과 부형제 처치군의 사망으로 인한 개체 수 감소 때문에 비교가 더 이상 어려웠다. rhEGF 15 또는 30 $\mu\text{g/day}$ 구강 내 처치군은 방사선 조사 후 지속적으로 체중이 감소하는 추세를 보이다가 9일째부터 증가하였으며, 13일째에는 체중이 증가되는 양상이 뚜렷하게 관찰되었다(Fig. 2).

4. 사료섭취율

방사선 조사를 받은 모든 시험군에서 방사선 조사 후 4일부터 평균 사료섭취율이 감소하는 양상을 보였고, 방사

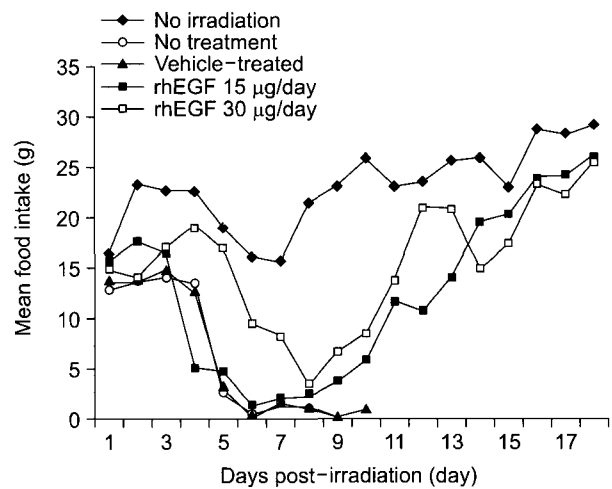


Fig. 3. Effect of EGF on rat oral intake. Food intake of all irradiated animals started to decline between days 3 and 5. In rats treated with 50 $\mu\text{g/ml}$ EGF (Group 3) or 100 $\mu\text{g/ml}$ EGF (Group 4), food intake began to increase, beginning on days 6 and 8, respectively. Beginning on day 14, the rate of food intake in these rats was close to that of non-irradiated animals (Group 0). Values reported are means.

Table 4. Food Intake of Each Group

Group	No irradiation (n=7)	EGF (-)		EGF (+)	
		No treatment (n=7)	Vehicle-treated (n=7)	rhEGF 15 $\mu\text{g/day}$ (n=7)	rhEGF 30 $\mu\text{g/day}$ (n=7)
Day 1	16.2	12.9	13.8	15.6	14.7
Day 2	23.2	13.8	13.7	17.7	14.0
Day 3	22.7	14.1	14.9	16.5	17.1
Day 4	22.6	13.4	12.6	5.1	19.4
Day 5	19.1	2.6	3.3	4.7	17.0
Day 6	16.2	0.4	0.4	1.37	9.6
Day 7	15.7	1.3 (n=6) [†]	1.6 (n=6)	2.0 (n=6)	8.3 (n=6)
Day 8	21.5	1.0 (n=3)	1.1 (n=3)	2.4 (n=6)	3.3 (n=6)
Day 14	26.0	All dead	All dead	19.6 (n=2)	14.9 (n=2)
Day 18	29.4	All dead	All dead	26.4 (n=2)	25.6 (n=2)

Data are mean value. [†]one rat was necropsied for histopathological evaluation from each group at 7 days post-irradiation

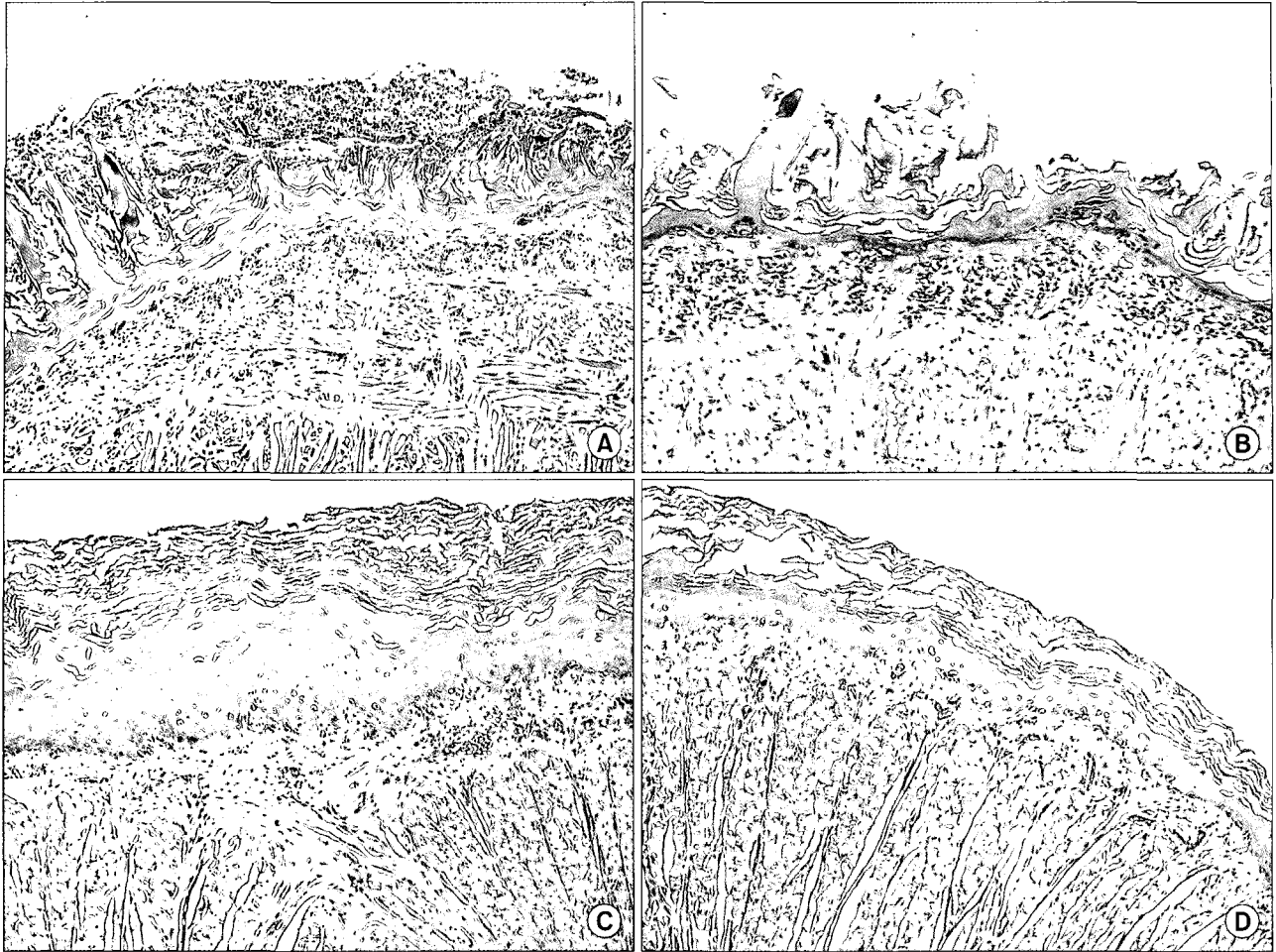


Fig. 4. Histology of oral mucosa of irradiated animals on day 7. Note the inflammatory reactions, formation of pseudomembranes, ulcerations and poor definition of the epidermal layer in the negative control (A, Group 1) and vehicle control (B, Group 2) animals, whereas rats treated with 50 µg/ml EGF (C, Group 3) or 100 µg/ml EGF (D, Group 4) maintained a relatively better definition of the epidermal layer with fewer inflammatory reactions (H&E staining, ×100).

선 조사 후 5일째에 정상시험군(19.1 g)에 비하여 무처리군(2.6 g), 부형제 처치군(3.3 g), rhEGF 15 µg/day 구강 내 처치군(4.7 g)의 사료섭취율이 급격하게 감소하였다. 하지만 rhEGF 30 µg/day 구강 내 처치군은 상대적으로 높은 17.0 g의 사료섭취율을 보였다(Table 4, Fig. 3). 방사선 조사 후 9일째에 rhEGF 15 및 30 µg/day 구강 내 처치군의 사료섭취율이 증가하기 시작하였으며, 14일째에는 정상시험군(26.0 g)과 비교하였을 때, 각각 19.6 g 및 14.9 g으로써 뚜렷한 사료섭취율의 증가를 관찰할 수 있었다. 또한 실험종료 18일째에 rhEGF 15 및 30 µg/day 구강 내 처치군의 평균 사료섭취율을 정상시험군(29.4 g)과 비교하였을 때, 각각 26.4 g 및 25.6 g으로써 정상시험군과 매우 유사하게 관찰되었다(Table 4, Fig. 3).

5. 조직학적 관찰

방사선 조사 후 7일째에 부검한 무처리군과 부형제 처치군의 Rat에서 혀와 구강점막의 표피층의 심한 위축, 진피층의 충혈과 염증세포의 침윤, 그리고 각질층의 염증세포 및 괴사세포의 침윤에 의한 뚜렷한 위막 형성이 관찰되었다. 전형적인 심한 위막성 구내염 또는 궤양성 구내염이 관찰되었다. 주로 관찰되는 염증세포는 호중구였다. 이에 반하여 rhEGF 15 및 30 µg/day 구강 내 처치군의 Rat에서는 점막 표피층 각질세포의 종창 및 변성이 관찰되었을 뿐, 무처리군과 부형제 처치군에서 관찰되었던 심한 위막성 구내염 또는 궤양성 구내염은 관찰되지 않았다(Fig. 4). 방사선 조사 18일째에 rhEGF 15 및 30 µg/day 구강 내 처치군에서 회복된 개체를 부검하여 육안 및 조직학적으로 관찰한 결과, rhEGF 15 또는 30 µg/day 구강 내 처치군의

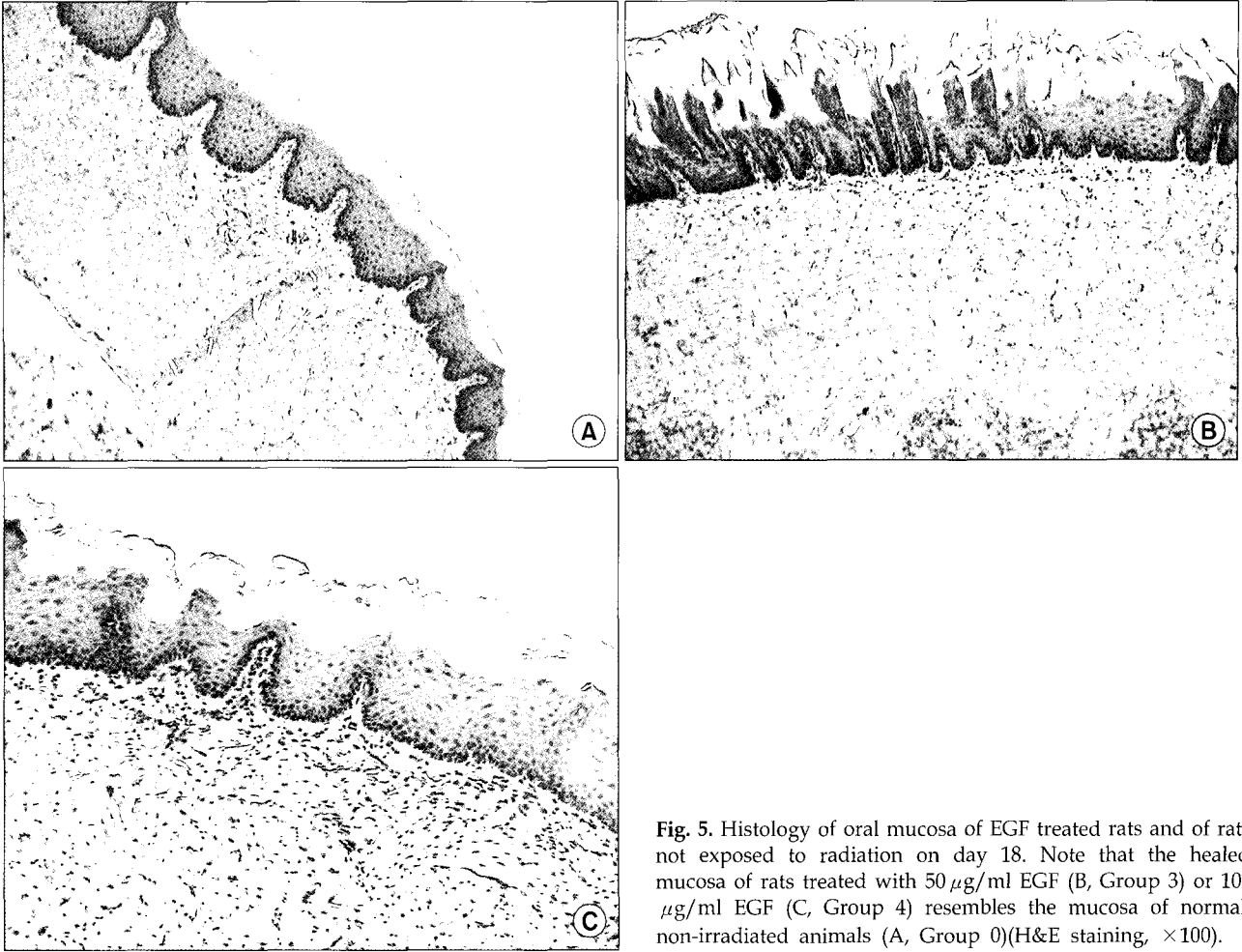


Fig. 5. Histology of oral mucosa of EGF treated rats and of rats not exposed to radiation on day 18. Note that the healed mucosa of rats treated with 50 µg/ml EGF (B, Group 3) or 100 µg/ml EGF (C, Group 4) resembles the mucosa of normal, non-irradiated animals (A, Group 0)(H&E staining, ×100).

Rat는 육안적으로 혀 및 구강점막에 어떠한 병변도 관찰되지 않았고, 조직학적으로도 정상의 점막상피세포를 가지고 있었으며, 점막 표피층과 진피층에서 어떠한 염증세포도 관찰되지 않았다(Fig. 5).

고안 및 결론

구내염은 두경부종양이 있는 암환자에게 방사선 치료 시술 시 매우 흔하게 발생하며, 암환자를 매우 고통스럽게 만드는 원인이다. 구내염은 논문에 따라 다르지만 두경부종양에 대한 방사선 치료를 받는 환자의 90% 이상에서 발생한다고 보고되어 있다.⁵⁾ 특히 구내염 발생이 방사선 치료의 중단 및 식이섭취의 불량을 초래하기 때문에, 환자의 전신적인 상태를 악화시켜서 전반적으로 방사선 치료를 받은 환자의 예후를 나쁘게 할 수 있다.^{2,5)} 방사선 치료 후 발생하는 구내염에 대한 치료법을 찾기 위해 많은 연구가 진행되고 있다.^{3,6,7)} 냉동요법, 레이저 요법, Chlorhexidine,

Amifostine, Pentoxifylline, Glutamine, 그리고 hematologic growth factor인 granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) 와 granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) 등이 연구되었으나, 이런 구내염 치료법들의 효과에 대해 학계 및 의료계에서도 아직은 논란의 여지가 많다.^{6,7)} G-CSF와 GM-CSF는 투여 후 여러 상반된 효력 결과로 인하여 아직까지 연구 단계에 머물러 있으며, 가격대비 효력에 대한 경제성 문제에서도 의문점이 남아있다.⁷⁻¹⁰⁾ 최근에는 Keratinocyte growth factor (KGF)가 혈액암 환자에게 전신 방사선 조사 시 발생하는 구내염 예방에 효과가 있음이 확인되어 미국 FDA로부터 허가를 받아 혈액암 환자에게 제한적으로 사용되고 있다.¹¹⁻¹⁴⁾ 하지만 혈액암 환자와 골수 이식 전 방사선 조사시에 발생하는 구내염 예방에만 KGF의 사용이 제한되어 있다. 따라서, 두경부종양 환자에서 방사선과 항암제 병행치료 또는 방사선 단독 치료시 발생하는 구내염에 대한 치료해법이 없는 실정이다.

다양한 인간 재조합 성장인자(recombinant human growth

factor)들이 급성 그리고 만성 창상 치료를 위해 개발되고 있다. 인간 재조합 성장인자들은 상처 치유 과정에 있어 표피세포, 섬유아세포 및 대식세포 등의 활성화에 작용을 하여 피부 재생을 촉진한다. 방사선 조사를 받은 부위의 섬유아세포의 손상으로 인하여 상처 치유가 저하된다는 사실을 고려하면, 섬유아세포의 형성 및 이동을 촉진하는 epidermal growth factor (EGF), KGF 및 fibroblast growth factor가 방사선 조사로 인해 손상된 점막 및 피부의 재생을 촉진 할 것으로 생각한다.¹⁵⁾

EGF는 1962년 마우스의 악하선으로부터 신경 성장 인자를 분리하던 중 발견된 최초의 성장인자이다.¹⁶⁾ EGF는 표피세포와 섬유아세포의 EGF수용체와 반응하여 피부 창상을 재상피화, 수축, 육아조직형성 및 교원질 합성 등을 유도하여 치유한다.¹⁷⁾ EGF의 주요 분비 장소는 혈소판, 대식세포와 단핵세포 등으로 밝혀져 있다.¹⁸⁾ 당뇨병성 족부궤양 같은 만성 상처의 치유에 그 효과가 이미 증명되어 있고, 동물 피부의 부분층 및 전층 창상에서 치유 기간을 단축시키는 recombinant human EGF (rhEGF)의 효력 또한 입증되었다.^{19~21)} 아직까지 EGF의 구내염에 대한 효과는 입증되지 않았지만 EGF가 방사선 조사성 구내염 발생의 병리학적 기전 및 그 치유에 밀접한 관련이 있으며, 위장막에 발생한 궤양 등에 치유 효과가 있을 것으로 보고되어 있기 때문에, EGF가 구내염에 충분히 효과적일 것으로 생각되어 방사선 치료 시 발생하는 구내염에 대한 EGF의 효과를 보고자 하였다.^{5,15,22,23)}

EGF는 주로 침샘에서 분비되어 입안의 점막에 존재한다. 입안의 EGF는 구강 점막을 보호하고, 구강 내 정상 세균총을 유지하여 세균감염을 예방한다. 또한 발생한 구내염에 대한 치유를 돕는 중요한 역할을 한다. 그런 이유 때문에 침 내에 EGF의 농도가 낮을수록 구내염의 회복은 늦어진다. 특히, 두경부종양 환자에 방사선을 조사하면 침샘 세포가 파괴되어서 침의 분비량이 감소되고 더불어 침 내 EGF 농도가 항상 낮은 수준으로 유지되기 때문에 구내염이 빈번하게 발생하고, 구내염 회복도 일반적으로 상당한 시간이 요구된다.^{5,23)} 본 실험에서도 방사선 조사를 받은 시험군의 구강 점막에서 구내염을 육안 및 조직학적으로 확인할 수 있었으며, 방사선 처치 후 7일째에 rhEGF 15 또는 30 $\mu\text{g/day}$ 구강 내 처치군의 구강 점막은 조직학적으로 무처치군 및 부형제 처치군에 비하여 표피층이 잘 보존되어 있고, 염증반응도 감소되어 있어 빠른 치유를 기대할 수 있었다. 그러나, 무처치군과 부형제 처치군에서는 상피조직의 심한 손실과 심한 염증 및 가성 점막이 확연하게 관찰되어 나쁜 예후를 예상할 수 있었다. rhEGF 15 또는

30 $\mu\text{g/day}$ 구강 내 처치군의 방사선 처치 후 18일째의 구강 점막은 방사선 조사를 받지 않은 정상시험군의 구강 점막과 비교하였을 때, 거의 정상에 가까워 구내염으로부터 완전하게 회복된 것으로 판단되었다. 이는 rhEGF가 점막을 덮고 있는 상피세포의 당단백질 수용체의 하나인 EGF 수용체와 결합하여 상피세포의 DNA합성을 유도하여 세포분열을 촉진하기 때문에 점막 내에 발생한 상처 및 궤양 치유를 촉진한 것으로 예상된다.^{22,24,25)}

구내염에 rhEGF를 처치함으로써 Rat의 사료섭취율 및 체중에서 유의성 있는 결과를 얻을 수 있었다. rhEGF 15 또는 30 $\mu\text{g/day}$ 구강 내 처치군에서 방사선 조사 후 6일 및 9일 사이에 사료섭취율이 증가하는 것을 확인함으로써, 사료섭취율의 증가 시점과 점막 치유 시점간의 상관관계를 예상할 수 있었다. 하지만 점막 치유가 되지 않은 무처치군 및 부형제 처치군의 Rat는 방사선 조사 후 10일 이전에 모두 사망하였다. rhEGF 15 또는 30 $\mu\text{g/day}$ 구강 내 처치군에서 사료섭취율이 6일 및 9일 사이에 증가함에 따라 체중이 9일 및 10일 사이에 증가하였다. 체중은 회복 초기에 사료섭취율에 비례해 빠르게 회복되었고, 16일째부터는 정상시험군과 유사한 체중 증가를 관찰할 수 있었다. 체중 변화에서도 방사선 조사를 받은 시험군들의 체중이 감소하는 시점인 2일 및 3일째부터 rhEGF 15 $\mu\text{g/day}$ 구강 내 처치군에서 무처치군 및 부형제 처치군에 비하여 체중이 더 무거웠으며, 체중 감소가 확연한 5일 및 7일째에는 rhEGF 15 또는 30 $\mu\text{g/day}$ 구강 내 처치군 모두에서 통계학적으로 유의한 체중 차이를 보였다. 이 사실로 rhEGF의 구내염에 대한 치유 효과가 방사선 조사를 받은 후 초기부터 작용하였다고 판단되었다.

본 실험 결과, 5일 및 8일 사이에 rhEGF 15 또는 30 $\mu\text{g/day}$ 구강 내 처치군의 평균 사료섭취량은 무처치군과 부형제군에 비하여 높았으며, rhEGF 15 또는 30 $\mu\text{g/day}$ 구강 내 처치군의 Rat의 사망 시점은 무처치군 및 부형제 처치군에 비하여 현저히 지연되었다. 또한, rhEGF 15 또는 30 $\mu\text{g/day}$ 구강 내 처치군과 무처치군 및 부형제 처치군간에 생존율의 명확한 차이를 보였다. rhEGF 15 또는 30 $\mu\text{g/day}$ 구강 내 처치군의 실험종료시의 생존율이 각각 33%이었던 반면, 무처치 및 부형제 처치군에서는 회복되는 개체없이 실험종료시의 생존율이 0%이었다. 임상에서 구내염의 악화로 인하여 환자의 식이섭취가 불량해지고, 이로 인하여 전신상태의 악화되어 방사선 치료를 중단하는 경우가 발생되기 때문에 본 실험의 결과를 기초로 rhEGF를 임상적인 치료제로써 고려해 볼 수 있다. 하지만 이런 결과들로 rhEGF의 구내염에 대한 효과가 구내염 발생 전에 예방적

인 작용을 나타내었는지, 아니면 치유 효과만을 나타낸 것인지 본 실험으로는 증명할 수 없었기 때문에, 차후 이에 대한 추가적인 연구가 진행되어야 할 것이다.

rhEGF 15 또는 30 $\mu\text{g}/\text{day}$ 구강 내 처치군에서 생존율, 체중 회복 및 사료섭취율에 있어 무치치군 및 부형제 처치군에 비하여 각각 유의성 있는 효과를 보였지만, rhEGF 15 또는 30 $\mu\text{g}/\text{day}$ 구강 내 처치군 사이에는 유의성 있는 차이를 관찰할 수는 없었다. 피부의 창상 치유에 있어 일정 농도 이상에서 rhEGF의 상처 치유 효과는 비슷하다는 점을 고려하였을 때, 방사선 조사로 인하여 발생한 구내염에서도 일정 농도 이상에서 유사한 결과가 발생하기 때문에 rhEGF의 농도 변화에 따른 차이가 없을 것으로 생각된다.¹⁹⁾

EGF가 구강 및 위장막내를 비롯한 체내에 다량으로 존재하지만, 방사선 치료 시 구강 내에 EGF 농도가 국소적으로 감소함에 따라 구내염 발생이 용이하게 되기 때문에 EGF와 구내염 발생은 밀접한 관계가 있을 것으로 판단된다.^{2,5,23)} 본 연구 결과를 종합하여 볼 때, 방사선 조사에 유발된 Rat의 구내염 모델을 대상으로 rhEGF 15 또는 30 $\mu\text{g}/\text{day}$ 구강 내 처치군 처치가 구내염에 대한 치료 효과가 있음을 확인하였다.

참 고 문 헌

1. Sonis ST. Mucositis as a biological process: a new hypothesis for the development of chemotherapy-induced stomatotoxicity. *Oral Oncol* 1998;34:39-43.
2. Eting LS, Bodey GP, Keefe BH. Septicemia and shock syndrome due to viridans streptococci: a case-control study of predisposing factors. *Clin Infect Dis* 1992;14:1201-1207
3. Hong JP, Jung HD, Kim YW. Recombinant human epidermal growth factor (EGF) to enhance healing for diabetic foot ulcers. *Ann Plast Surg* (In press)
4. Potten CS, Booth D, Cragg NJ, et al. Cell kinetic studies in the murine ventral tongue epithelium: mucositis induced by radiation and its protection by pretreatment with keratinocyte growth factor (KGF). *Cell Prolif* 2002;35:32-47
5. Epstein JB, Gorsky M, Guglietta A, Le N, Sonis ST. The correlation between epidermal growth factor levels in saliva and the severity of oral mucositis during oropharyngeal radiation therapy. *Cancer* 2000;89:2258-2265.
6. Saadeh CE. Chemotherapy- and radiotherapy-induced oral mucositis: review of preventive strategies and treatment. *Pharmacotherapy* 2005;25:540-554
7. Rubenstein EB, Peterson DE, Schubert M, et al. Clinical practice guidelines for the prevention and treatment of cancer therapy-induced oral and gastrointestinal mucositis. *Cancer* 2004;100:2026-2046
8. Wagner W, Alfrink M, Haus U, Matt J. Treatment of irradiation-induced mucositis with growth factors (rhGM-CSF) in patients with head and neck cancer. *Anticancer Res* 1999; 19:799-803
9. Makkonen TA, Minn H, Jekunen A, Vilja P, Tuominen J, Joensuu H. granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) and sucralfate in prevention of radiation induced mucositis: a prospective randomized study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;46:525-534
10. Saarilahti K, Kajanti M, Joensuu T, Kouri M, Joensuu H. Comparison of granulocyte-macrophage colony stimulating factor and sucralfate mouthwashes in prevention of radiation induced mucositis: a double-blind prospective randomized phase III study. *Int J of Radiat Oncol Biol Phys* 2002;54:479-485
11. Hille A, Rave-Frank M, Praider O, et al. Effect of keratinocyte growth factor on proliferation, cologenic capacity and colony size of human epithelial tumour cells in vitro. *Int J Radiat Biol* 2003;79:119-128
12. Slonina D, Hoinkis C, Dorr W. Effect of keratinocyte growth factors on radiation survival and colony size of human epidermal keratinocytes in vitro. *Radiation Res* 2001;156:761-766
13. Meropol NJ, Somer RA, Gutheil J, et al. Randomized phase I trial of recombinant human keratinocyte growth factor plus chemotherapy: potential role as mucosal protectant. *J Clin Oncol* 2003;15:1452-1458
14. Spielberger R, Stiff P, Bensinger W, et al. Palifermin for oral mucositis after intensive therapy for hematologic cancers. *N Engl J Med* 2004;16:2590-2598
15. Dormand EL, Banwell PE, Goodacre TEE. Radiotherapy and wound healing. *Int Wound J* 2005;2:112-127
16. Cohen S. Isolation of mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new born animal. *J Biol Chem* 1962;237:1555-1562
17. Nanney LB, Magid M, Stoscheck CM, King LE. Comparison of epidermal growth factor binding and receptor distribution in normal human epidermis and epidermal appendage. *J Invest Dermatol* 1984;83:835
18. Nanney LB. Epidermal and dermal effect of epidermal growth factor during wound repair. *J Invest Dermatol* 1990;94:624-629
19. Brown GL, Curtsinger L 3rd, Brightwell JR, et al. Enhancement of epidermal regeneration by biosynthetic epidermal growth factor. *J Exp Med* 1986;163:1319-1324
20. Tsang MW, Kam G, Keubg WKR, et al. Human epidermal growth factor enhances healing of diabetic foot ulcers. *Diabetes Care* 2003;26:1856-1861
21. Brown GL, Curtsinger L, Jurkiewics MJ, Nahai F, Schlitz G. Stimulation of healing of chronic wounds by epidermal growth factor. *Plast Reconstr Surg* 1991;88:189-196
22. Chao JC, Liu KY, Chen SH, Fang CL, Tsao CW. Effect of oral epidermal growth factor on mucosal healing in rats with duodenal ulcer. *World J Gastroenterol* 2003;9:2261-2265
23. Dumbrigue HB, Sandow PL, Nguyen KH, Humphreys-Beher MG. Salivary epidermal growth factor levels decrease in patients receiving radiation therapy to the head and neck. *Oral Surg Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000;89:710-716
24. Riegler M, Sedivv R, Sogukoglu T, et al. Epidermal growth factor promotes rapid response to epithelial injury in rabbit

duodenum in vitro. Gastroenterology 1996;111:28-36
25. Skov Olsen P, Poulsen SS, Therkelsen K, Nexø E. Oral

administration of synthetic human urogastrone promotes healing of chronic duodenal ulcers in rats. Gastroenterology 1986;90:911-917

Abstract

Effects of Recombinant Human Epidermal Growth Factor (rhEGF) on Experimental Radiation-Induced Oral Mucositis in Rats

Kwonil Jung, Ph.D.*, Sunhee Kim, M.S.[†], Soo Young Moon, M.S.[§], Yeon Wha Kim, M.S.[†], Joon Pio Hong, M.D.[†], Hyun Sook Kim, M.D.^{||} and Sang-wook Lee, M.D.[§]

Departments of *Toxicology and Pharmacology, [†]Protein Drug Development, Institute of Bioscience and Biotechnology, Daewoong Pharmaceutical Co., LTD., Yongin, Departments of [†]Plastic Surgery and [§]Radiation Oncology, University of Ulsan College of Medicine, Asan Medical Center, Seoul, ^{||}Department of Radiology, Gyeongsang National University College of Medicine, Jinju, Korea

Purpose: Oral mucositis is a common toxicity of radiation or chemotherapy, which is used a treatment for head and neck cancer. We investigated effects of recombinant human epidermal growth factor (rhEGF) on radiation-induced oral mucositis in rat model.

Materials and Methods: Sprague-Dawley rats (7 per group) exposed to a single dose of 25 Gy (day 0) on their head, except for one group, were randomly divided into un-treated, vehicle-treated, and two rhEGF-treated groups. Rats were topically applied with rhEGF (15 or 30 μ g/oral cavity/day) or vehicle to their oral mucosa. Survival rate of rats, weight changes, and food intakes were examined from day 0 to 18 after radiation. Histology study was performed from oral mucosa of rats at day 7 and 18 after radiation.

Results: rhEGF-treated groups (15 or 30 μ g/day) showed all survival rate 33%, whereas un-treated and vehicle-treated groups showed all survival rate 0% at the end of experiment. rhEGF-treated groups statistically had less weight loss compared to vehicle-treated group from day 2 to 7 after radiation. Food intake of rats with rhEGF treatment turned to increase at day 14 after radiation. At 7 day after radiation, un-treated and vehicle-treated groups showed severe pseudomembraneous or ulcerative oral mucositis. On the other hand, rhEGF-treated groups had no more than cellular swelling and degeneration of epidermal cells in oral mucosa of rats.

Conclusion: These results suggest that rhEGF has significantly positive effects on radiation-induced oral mucositis in rats. rhEGF display a therapeutic potential on a clinical level.

Key Words: Oral mucositis, Radiation, Epidermal growth factor, Rat model