Immune Network Vol. 1, No. 1, 2001

rhGM-CSF(Leucogen®)의 비감염성 상처 치유 효과에 관한 연구

고려대학교 의과대학 내과학교실[1], 성형외과학교실[2], 병리학교실[3]

한승규[2] · 김병수[1] · 김애리[3] · 서재홍[1] · 최철원[1] · 신상원[1] · 김열홍[1] · 김우경[2] · 김준석[1]

The healing effect of rhGM-CSF on uninfected wounds

Seung Kyu Han[2], Byung Soo Kim[1], Aeree Kim[3], Jae Hong Seo[1], Chul Won Choi[1], Sang Won Shin[1], Yeul Hong Kim[1], Woo Kyung Kim[2], Jun Suk Kim[1]

Department of Internal Medicine[1], Plastic Surgery[2], and Pathology[3], School of Medicine, Korea University, Seoul, Korea

Background: rhGM-CSF has been shown to enhance the migration and proliferation of endothelial cells and to promote keratinocyte growth. This study was tried to evaluate the effect of rhGM-CSF dressing on the uninfected wounds. **Methods:** Thirty Sprague-dawley white mice(250-300g) were selected in this study. The number of wound with the diameter of 5 mm, was 3 in left and 3 in right at the symmetric sites, respectively. The site of rhGM-CSF dressing was decided by a randomization. rhGM-CSF(Leucogen®) was diluted in the distilled water(5 μg/mL). The experimental wound group was dressed by 1 mL of distilled water mixed with rhGM-CSF and control wound group was dressed by 1 mL of distilled water. The dressing was done, every 24 hours. The criteria of comparison were the duration of wound healing duration, histologic findings and the bacterial culture of wound sites. **Results:** The duration of wound healing was 10.3±1.7 days in experimental group and 10.2±2.8 days in control group, without significant difference. There was no specific difference of histologic findings between both groups. The pathogen was not found, at all. **Conclusion:** It seems to be that rhGM-CSF has no prominent effect on the uninfected wound healing in the mice without immune suppression.

Key Words: rhGM-CSF, uninfected wound healing

서 론

최근에 대량생산이 가능하여진 recombinant human (rh) GM-CSF는 골수에서 백혈구의 분화 및 증식을 촉진시키는 효과를 통하여 화학요법이나 조혈모세포이식을 시행받는 환자들에서 저과립구 기간을 감소시켜 치료효율의 증진을 이룩할 수 있게 하였다. 그런데, rhGM-CSF는 단순한 백혈구 수의 증가 외에도 면역세포의 유착분자의 표현 및 화학주성과 탐식능을 향상시키고 수지상세포(dendritic cells)의 증식, 이동을 촉진시킴으로써 백신의 효과를 증강시킬 뿐만 아니라 점막염이나 상처의 치유에도 효과가 있다는 연구결과들(1-8)이 근자에 제시되고 있다. 특히, rhGM-CSF의 상처치유 효과는 최근에서야 제기되기 시작하였는데, 그 이유는 rhGM-CSF가 주로 혈액학적인 내과 질환에 연구가 많이 된 관계로 상처를 주로 다루는 외과적 연구에서는 그리 주목을 받지 못한 때문으로 생각이 되어진다. 이에 저자 등은 면역저하를 시키지 않은 쥐에 세균을 감염시키지 않은 일반적인 상처를 인위적으로 만들어 rhGM-CSF의 도포가 그렇

책임저자: 김병수, 고려대학교 부속 안암병원 혈액종양내과 부교수
136-705, 서울시 성북구 안암동 5가 126-1
전화: 920-5713, 팩스: 926-4534
E-mail: kbs0309@kumc.or.kr

지 않은 경우보다 상처 치유 효과가 우월한가를 규명하고자 본 실험을 계획하게 되었다.

대상 및 방법

1. 동물 모델

실험에 이용된 쥐는 면역기능 장애가 없고 일반적인 실험에서 널리 사용되는 Sprague-dawley 흰 쥐(250-300 g)로 암수 구별 없이 30 마리였다. 동일한 쥐에서 rhGM-CSF로 dressing한 상처와 그렇지 않은 상처의 치유 효과를 비교하는 것이 보다 객관적이라고 저자 등은 생각하여 등뼈를 중심으로 대칭적인 부위에 각각 3 개씩 총 6 개의 상처를 만들었다(Fig 1). 상처는 penthobarbital sodium (Entobar®) 2 mg/100g 마취하에 멸균소독된 punch biopsy 기를 이용하여 만들어졌으며, 직경 5 mm로 둥글게 전층의 피부를 박리하였다. rhGM-CSF의 도포 부위는 오른쪽, 왼쪽의 상처를 무작위 선정을 통하여 대조군 상처와 실험군 상처로 분류하였다. 쥐는 일반적인 상태에서 청결을 유지하며 일반적인 물과 사료로 사육하였다.

2. rhGM-CSF 국소 도포 방법

rhGM-CSF(Leucogen®)를 3차 증류수에 5 μg/mL의 농도로 희석하여 4℃ 냉장고에서 최장 15일까지 저장하여 사용하였다. 실험군 상처에는 rhGM-CSF으로 희석된 3차 증류수 1mL를 도포하였고 대조군 상처에는 3 차 증류수 1mL만을 도포하였다. 상처 부위에 도포 후 3 차 증류수가 상처 부위에만 머물러 있게 하기 위하여 Saline tape(Opsite® 투명 테이프)를 부착하였다. 상처 부위의 치료는 24 시간 간격으로 시행하였다.

Fig. 1. This figure is the gross appearance of a Sprague-dawley white mouse with six punched wounds on the back.

3. 평가

상처 부위의 치료를 시행하면서 매일 상처를 관찰하여 상피화가 완전히 이루어지기까지의 기간을 비교하였다. 상피화란 육안적 소견으로 상처가 주위 정상 표피와 동일하게 회복된 상태로 정의하였다. 그리고, 상피화의 육안적 관찰은 개인적인 주관이 개입될 수 있기 때문에 rhGM-CSF가 어느 상처에 도포되었는지를 모르는 다른 연구자 2 명의 판단을 종합하여 그 중간값으로 결정하였다. 또한 3일 간격으로 상처 부위 외곽에서 조직 생검을 시행하고 세균배양 검사를 실시하여 상처 치유 과정에서 양군간에 조직학적인 소견과 세균 감염 유무의 차이를 관찰하였다. 조직학적 소견 또한 rhGM-CSF가 어느

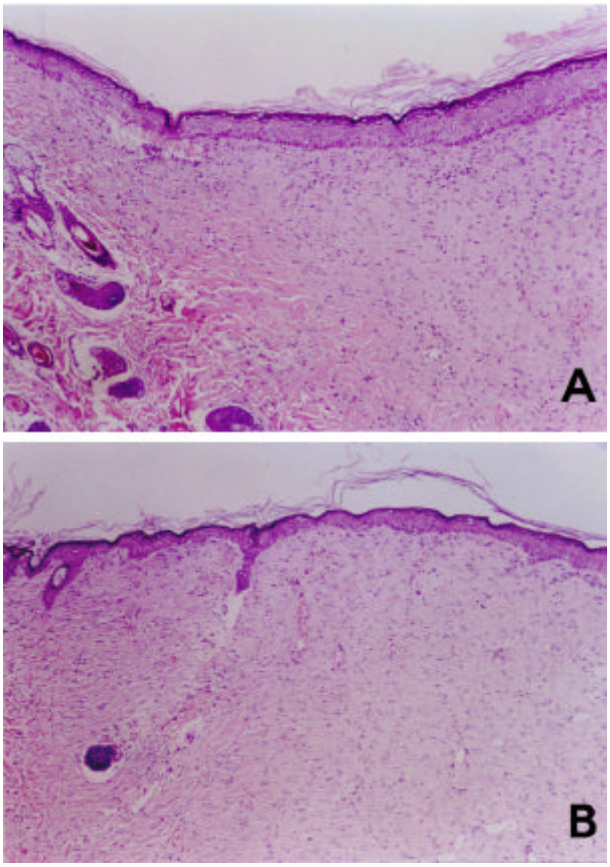

Fig. 2. (A) This figure is the microscopic findings(H&E Stain, X40) of the wounds at 3 days after dressing of the GM-CSF dressed experimental group. (B) This figure is the microscopic findings(H&E Stain, X40) of the wounds at 3 days after dressing of the GM-CSF undressed control group.

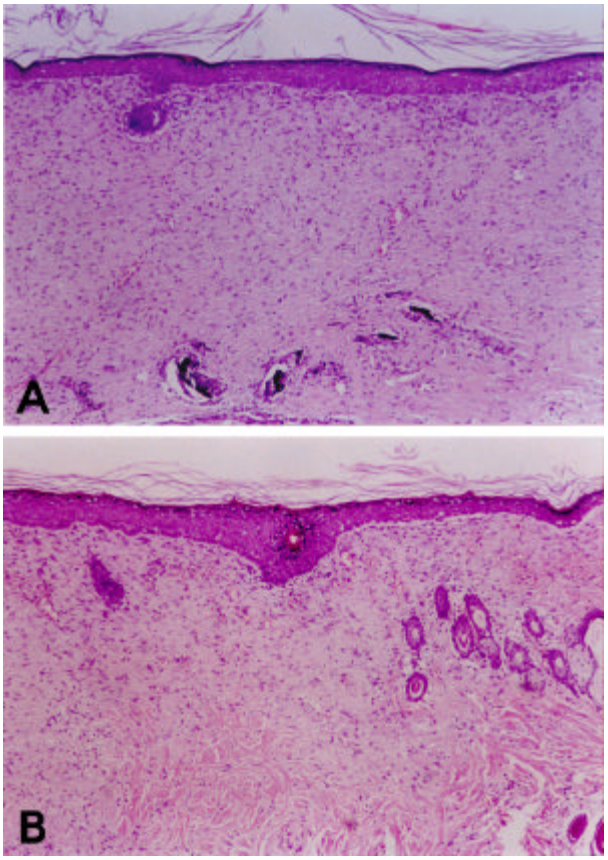

Fig. 3. (A) This figure is the microscopic findings(H&E Stain, X40) of the wounds at 6 days after dressing of the GM-CSF dressed experimental group. (B). This figure is the microscopic findings(H&E Stain, X40) of the wounds at 6 days after dressing of the GM-CSF undressed experimental group.

상처에 도포되었는지를 모르는 병리전문의가 양군간의 차이를 판정하였으며, 그 주된 판단 기준은 염증세포의 침윤 및 상피화의 진행 정도였다. 그리고, 실험 쥐에서의 전신적인 기타 이상 소견 여부도 참조하였다. 상피화까지의 기간은 평균±(표준편차)로 표시하였다. 두 군 사이의 비교는 같은 쥐에 대조군 및 실험군 상처가 모두 있기 때문에 Paired t test를 사용하였으며 P 값이 0.05 이하인 경우를 유의한 차이로 판정하였다.

결 과

육안적으로 상피화가 완성되기까지의 기간은 실험군 상처가 10.3± 1.7 일, 대조군 상처가 10.2±2.8 일로 차이가 없었다. 또한 조직학적 소견에서도 염증 세포의 침윤 및 상피화의 진행과정상 양군 모두 비슷한 양상을 보였다(Fig. 2, 3). 그리고 상처 모두에서 배양된 균은 발견되지 않았다. 그리고, 전신적 이상 소견은 관찰되지 않았으며 실험이 끝날 때까지 사망한 쥐는 없었다.

고 찰

rhGM-CSF가 혈관 내피세포의 이동 및 증식을 촉진시키고 keratinocyte의 성장을 촉진시키는 실험 보고가 있은 후 본 제재의 상처 치유 효과에 관한 관심이 높아졌으며(1-3), 이는 나병 환자의 상처에 rhGM-CSF를 피하 주사하여 keratinocyte의 성장이 촉진되고 상처 치유가 촉진됨이 관찰됨으로써 증명된 바 있었다(4).

이에 rhGM-CSF의 상처 치유 효과에 관한 연구들이 다수 진행되었다. Arnold 등(5)은 10 명의 정맥 질환에 기인한 난치성 족부 궤양에 매 2 주마다 rhGM-CSF 50 μg을 총 4 회 피하 주사하여 전례에서 완전 혹은 부분 효과가 관찰되었다고 하였고, Marques 등(6)은 난치성 족부 궤양 환자 40명을 무작위 추출 이중 맹검법을 통하여 rhGM-CSF 400 μg을 국소 투여한 군과 그렇지 않은 군으로 나누어 상처 치유효과를 비교한 결과 rhGM-CSF 국소 투여군에서 유의하게 우수한 상처 치유 효과가 관찰되었다고 보고한 바 있었다. 또한 hydroxyurea로 인하여 발생한 다리의 난치성 궤양성 상처에서 rhGM-CSF의 국소 도포 효과를 관찰한 Stagno 등의 보고(7)도 있었다. 그런데 상기한 여러 연구들은 정맥순환이 안되어 발생한 궤양이나 화학요법제와 관련된 상처에 적용된 보고들로 국소적 혹은 전신적으로 상처 치유시 면역기능의 저하를 유발시키는 상황이기 때문에 rhGM-CSF가 일반적인 상처에 효과가 있는지를 가늠하기에는 문제가 있었다.

그러므로 일반적인 상처 치료에 대한 rhGM-CSF의 효과가 있는지를 알아보려는 동물 실험들이 일부 진행되었는데, 전례에서 감염된 상처를 통한 실험이었다(2,8). 이에 관한 최근의 보고로서 Grazybowski 등(8)은 Pseudomonas에 감염된 상처를 지닌 쥐를 대상으로 한 실험에서 rhGM-CSF가 포함된 dressing을 시행한 군이 일반적인 dressing을 시행한 군에 비하여 상처 치유 기간이 유의하게 짧았음을 보고한 바 있었다. 그런데, 본 연구는 세균에 감염된 상처이기 때문에 rhGM-CSF가 호중구와 같은 염증세포의 상처 부위로의 이동을 촉진시켜 감염의 정도를 감소시킴으로써 상처 치유가 빨리 된 것인지, 아니면 육아조직의 증식을 촉진시킴으로써 상처

치유가 빨리 된 것인지를 구별할 수가 없다는 문제점이 있었다.

이에 연구자 등은 면역 기능이 정상인 쥐에서 멸균소독된 punch biopsy 기를 사용하여 인공적으로 상처를 낸 다음에 rhGM-CSF의 상처 치유 효과를 관찰하고자 하였다. 사실 연구자 등은 본 실험을 시행하면서 rhGM-CSF를 국소 도포한 상처의 치유가 그렇지 않은 경우보다 빠를 것을 기대하였었다. 그러나, 실험 결과는 예상과 달리 두 군간의 차이를 전혀 발견할 수 없었다. 이에 연구자 등은 본래 계획한 실험 대상 쥐 20 마리에 10 마리를 추가하여 연구를 더 진행하였으나 결과는 마찬가지였다. 결국 본 연구에서는 rhGM-CSF의 상처 치유 효과를 관찰할 수 없었다. 세균에 감염된 상처를 대상으로 rhGM-CSF의 효과를 관찰한 다른 보고들과는 달리 세균 감염이 없었던 본 연구 결과를 보면서 연구자 등은 정상적 혈관순환이 되면서 세포 독성 약제에 노출이 되지 않고 감염이 없는 상처에서는 rhGM-CSF의 상처 치유 효과가 현저하지 않다고 가정하여 보았다.

그러나 , 본 연구의 상처는 punch biopsy 기를 통하여 피부 전층 만을 제거시킨 비교적 경미한 상처이었고 투여된 rhGM-CSF의 용량 또한 5 μg/mL의 농도로 일정하였기 때문에, 상처의 정도 및 rhGM-CSF의 용량의 가감에 따른 상처 치유 효과의 차이를 비교하지 못하였다는 한계가 있었다. 그러므로 이에 관한 추가 연구가 계속 필요하리라고 사료된다.

감사의 글

본 연구를 위하여 rhGM-CSF(Leucogen®)를 제공하여 주신 LG 제약회사에게 진심으로 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Jyung RW, Wu L, Pierce GF, Mustoe TA: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor: Differential action on incisional wound healing. Surgery 115;325-334, 1994
2. Kucukcelebi A, Carp SS, Hayward PG, Hui P-S, Cowan WT, Ko F, Cooper DM, Robson MC: Granulocyte-macrophage colony stimulating factor reverses the inhibition of wound contraction caused by bacterial contamination. Wounds 4;241-246, 1992
3. Vyalov S, Desmouliere A, Gabbiani G: GM-CSF--induced granulation tissue formation: Relationships between macrophage and myofibroblast accumulation. Arch B Cell Pathol 63;231-239, 1993
4. Braunstein S, Kaplan G, Gottlieb AB, Schwartz M, Walsh G, Abalos RM, Fajardo TT, Guido LS, Krueger JG: GM-CSF activates regenerative epidermal growth and stimulates keratinocyte proliferation in human skin *in vivo*. J Invest Dermatol 103;601-605, 1994
5. Arnold F, O'Brien J, Cherry G: Granulocyte monocyte-colony stimulating factor as an agent for wound healing. J Wound Care 4;400-402, 1995
6. Marques da Costa R, Jesus FM, Aniceto C, Mendes M: Double-blinded randomized placebo-controlled trial of the use of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in chronic leg ulcers. Am J Surg 173;165-168, 1997
7. Stagno F, Guglielmo P, Consoli U, Fiumara P, Russo M, Giustolisi R: Successful healing of hydroxyurea-related leg ulcers with topical Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Blood 94;1479-1480, 1999.
8. Grzybowski J, Janiak MK, Oidak E, Lasocki K, Jolanta W-W, Cheda A, Malgorzata A-B, Pojda Z: New cytokine dressing Ⅱ. Stimulation of oxidative burst in leukocytes *in vitro* and reduction of viable bacteria within an infected wound. Int J Pharmacol 184;179-187, 1999