

## 한국산 무당개구리 피부에 존재하는 Bombesin 유사면역 반응물질의 순수정제 및 생물학적 활성

한림대학교 의과대학 생리학교실 및 단국대학교 화학과\*

권 혁 일 · 김 일\* · 박 형 진

(1990년 11월 5일 접수)

= Abstract =

### Purification and Biological Activities of Bombesin Like Immunoreactivity from Skin of the Frog, *Bombina orientalis* in Korea

Hyeok Yil Kwon, Yil Kim\* and Hyoung Jin Park

Department of Physiology, College of Medicine, Hallym University, Kangwon-Do  
and Department of Chemistry, Dankook University\*, Seoul, Korea

The present investigation was performed to purify bombesin-like immunoreactivity (BBS-LI) from the skin of frogs, *B. orientalis* inhabiting Korea. For extraction of BBS-LI, the fresh skin of 360 g from frogs was immersed in 1,800 ml of 100% methanol and then kept at 4°C for 5 days. BBS-LI was partially purified by liquid chromatography using an alkaline alumina column followed by a Sephadex G-10 column. BBS-LI was further purified by using sequential HPLC of reversed phase C18 preparation, gel permeation, SP-ion exchange and reversed phase C18 analysis. BBS-LI in fractions of each step was monitored by radioimmunoassay for which bombesin antiserum with a titer of 1 : 188,800 was raised in a guinea pig. Eventually, two different BBS-LI were successfully purified and each BBS-LI showed the following character.

1) BBS-LI was well separated into two peaks in SP-ion exchange HPLC. One (BBS-LI-K1) bound to the column while the other (BBS-LI-K2) did not.

2) BBS-LI-K1, 73.8% of total BBS-LI, was not differentiated from synthetic bombesin in reversed phase C18 analytical and gel permeation HPLC.

3) BBS-LI-K2, 26.2% of total BBS-LI, eluted later than synthetic bombesin in reversed phase C18 analytical HPLC, but it eluted with a retention time identical to that of synthetic bombesin in gel permeation HPLC.

4) The two forms of BBS-LI and synthetic bombesin identically stimulated gastrin release and pancreatic exocrine secretion including volume, protein output and amylase output in anesthetized rats.

It is concluded from the above results that the skin of *B. orientalis* contains two different forms of BBS-LI which are very identical to bombesin immunologically and biologically. In comparison with synthetic bombesin containing 14 amino acid residues, the major form shows quite similar pattern in all HPLC used in the present study, but the minor form exhibits quite different pattern in SP-ion exchange and reversed phase C18 analytical HPLC.

**Key Words:** Bombesin, RIA, Frog, HPLC

## 서 론

오래전 부터 양서류의 피부에는 생리적 활성을 지닌 peptide나 amine 등이 많이 함유되어 있는 것으로 알려져 왔다. 1960년경 부터 체계적으로 시작된 연구로 인하여 양서류의 피부와 연체동물의 조직으로부터 eleudoisin, physalaemin, phyllokinin, caerulein, phylloceaurlein 그리고 phyllomedusin이 발견되었으며(Erspamer et al, 1984), 1970년에는 Erspamer et al에 의하여 bombesin이 유럽산 무당개구리의 일종인 *Bombina orientalis*의 피부에서 추출되었다. 그 후 여러 종류의 개구리 피부에서 ranatensin(nakajima et al, 1970), alytesin(Erspamer et al, 1970), litorin(Anastasi et al, 1975), ranatensin C(Yasuhara et al, 1979), phyllolitorin(Yasuhara et al, 1983) 등과 같은 새로운 bombesin 유사 peptide가 계속 보고되었다. 이 peptide들은 C-말단의 amino acid 조성과 생물학적 활성이 bombesin과 매우 유사하기 때문에 bombesin-like peptide(BBS-LP)로 분류되며 현재까지 27종류의 BBS-LP가 알려져 있다(Erspamer, 1988).

한편, 포유류에서도 bombesin 유사면역반응물질(bombesin-like immunoreactivity, BBS-LI)이 발견되었다. McDonald et al(1978)은 돼지의 위점막으로부터 gastrin releasing peptide(GRP)를, Minamino et al(1983)은 돼지의 척수에서 neuromedin을 추출하였다. 방사면역측정법(radioimmunoassay, RIA)과 면역세포화학법(immunocytochemistry)의 발달로 인하여 BBS-LI가 사람을 포함한 여러 동물의 위장관 및 신경계에서 관찰되었다(Greely et al, 1984; Major et al, 1983; Moody & Pert, 1979; Roth et al, 1982; Walsh et al, 1982).

BBS-LP는 위장관 및 신경계에서 생물학적 작용을 나타내는 것으로 알려져 있다. 즉, BBS-LP는 위산(Bertaccini et al, 1973), 췌장액(Erspamer et al, 1974) 그리고 몇가지 종류의 위장관 peptide(Ghatei et al, 1982)의 분비를 촉진시킨다. 중추신경계에서는 체온조절(Brown et al, 1977), 행동(Cowan, 1988) 및 혈당조절(Woods et al, 1983) 등에 깊이 관여하며 뇌하수체 전엽 hormone의 분비를 조절하

는 것으로 알려져 있다(Minamino et al, 1988). 또한 BBS-LP는 폐암의 일종인 oat cell carcinoma와 carcinoid tumor 등에서도 관찰되어 이들 질환과 밀접한 관계가 있을 가능성이 제시되었다(Erisman et al, 1982; Moody et al, 1981). 그러므로 BBS-LP의 생리학적 기능을 이해하고 이것이 지닌 폐암과의 상관관계를 이해하기 위하여서는 BBS-LP의 분자적 특성과 생물학적 활성에 관한 연구가 필요한 것으로 생각한다.

저자들은 이미 한국산 무당개구리(*Bombina orientalis*)의 각 조직에 존재하는 BBS-LI의 함량 및 분자적 이질성(Park et al, 1988)과 피부로부터 BBS-LI를 부분정제하여 생물학적 활성을 관찰한 바 있다(Park et al, 1989). 따라서 본 연구에서는 부분정제한 BBS-LI를 high performance liquid chromatography(HPLC)을 이용하여 단일물질로 순수정제하고 그 분자적 특성 및 생물학적 활성을 합성 bombesin의 것과 비교하고자 하였다.

## 실 험 방 법

### 1. BBS-LI의 순수정제

1) **Alkaline alumina column chromatography**: 신선한 무당개구리 피부 360 g을 5배 부피(v/w)의 100% methanol에 담근 다음 4°C에서 5일 동안 방치하였다. Methanol 추출액을 감압증류하여 methanol과 물을 제거시킨 다음 petroleum ether를 200 ml씩 두번 가해 지방질을 제거시켰다. 지방질이 제거된 추출액을 alkaline alumina column(3.6×65 cm)에 흡착시키고 ethanol 농도를 95%에서 60%까지 5%씩 단계적으로 감소시키면서 용출액을 모았다. 각 용출액 중의 BBS-LI 함량을 RIA 법으로 측정하였다.

2) **Sephadex G-10 column liquid chromatography**: 상기 용출액 중 BBS-LI 함량이 높은 분획들(85%, 80% 용출액)을 농축하여 5 ml의 10 mM acetic acid에 용해시키고 불용성 물질들은 원심분리(Sorvall, 17,000 rpm, 30 min)하여 제거시켰다. 상청액을 Sephadex G-10 column(1.6×95 cm)에 부하하고 10 mM acetic acid로 용출시키면서 3 ml의 분획 140개를 모았으며 각 분획의 흡광도를 254 nm

(Uvikon 930, Kontron Inc, Swiss)에서 측정하는 한편 BBS-LI 함량을 측정하였다.

**3) Reversed phase C18 preparative HPLC :** Sephadex G-10에서 얻은 분획 중에서 BBS-LI 함량이 높은 분획들을 한데 모아 냉동 건조시킨 뒤 400  $\mu$ l의 starting buffer (0.1% trifluoroacetic acid, TFA : 50% CH<sub>3</sub>CN in 0.1% TFA=6 : 4)에 용해시켜 syringe filter (Gelman, 0.45  $\mu$ m $\times$ 3 mm)로 여과하고 150  $\mu$ l씩 2회에 나누어 HPLC (model #2150, LKB, Sweden)에 부착된 reversed phase C18 preparative column (ODS-120 T, 7.8 $\times$ 300 mm)에 주입하였다. CH<sub>3</sub>CN 농도를 20%에서 30%까지는 30분에 그리고 50%까지는 100분에 걸쳐 직선적으로 증가시키면서 1.5 ml의 분획을 100개 모았다. 이때 flow rate는 1.5 ml/min로 하였으며 용출액의 흡광도를 HPLC variable wavelength monitor (LKB, model 2141)을 사용하여 254 nm에서 측정하는 한편 각 분획의 BBS-LI 함량을 RIA 법으로 측정하였다.

**4) Gel permeation HPLC :** C18 preparative HPLC에서 얻은 BBS-LI 분획들을 건조시킨 다음 다시 100  $\mu$ l의 50 mM acetic acid 용액에 용해시켜 50  $\mu$ l씩 2회에 나누어 gel permeation column (G 2000 SW, 7.5 $\times$ 300 mm)에 주입하였다. 50 mM acetic acid 용액으로 0.8 ml/min의 속도로 용출시키면서 흡광도를 측정하는 한편 0.4 ml의 분획 40개를 받아 각 분획의 BBS-LI 함량을 측정하였다.

**5) SP-ion exchange HPLC :** Gel permeation HPLC에서 얻은 BBS-LI 분획을 건조시킨 다음 다시 100  $\mu$ l의 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 5.5) buffer에 용해시켜 SP-ion exchange column (SP-5PW, 7.5 $\times$ 75 mm)에 흡착시키고 NaCl 농도를 80분에 걸쳐 0 mM에서 250 mM까지 직선적으로 증가시키면서 용출시켰다. 이때 flow rate는 1 ml/min이었으며 용출액의 흡광도를 측정하는 한편 1 ml의 분획 80개를 받아 각 분획의 BBS-LI 함량을 측정하였다.

**6) Reversed phase C18 HPLC :** SP-ion exchange HPLC에서 BBS-LI는 두개의 peak로 분리되었다. 각 peak에 존재하는 BBS-LI를 순수정제하기 위하여 각 peak의 분획을 peak 별로 모아 Sephadex G-25 column (0.7 $\times$ 40 cm)에 각각 부하하고 10 mM acetic acid로 용출하여 무기염들을 제거시켰다.

BBS-LI 분획들을 모아 냉동건조시키고 다시 starting buffer 50  $\mu$ l에 용해시켜 reversed phase C18 analytical column (ODS-120T, 4.6 $\times$ 250 mm)에 각각 주입하였다. CH<sub>3</sub>CN 농도를 20%에서 50%까지 40분 동안에 직선적으로 증가시키면서 BBS-LI를 용출시켰다. 이 때 flow rate는 0.8 ml/min이었으며 용출액의 흡광도를 측정하는 한편 0.4 ml의 분획을 80개 받아 BBS-LI 함량을 측정하였다.

## 2. BBS-LI의 생물학적 활성 측정

**1) 마취한 흰쥐에서 혈장 gastrin 분비에 미치는 영향 :** 300 g 정도되는 흰쥐 수컷 20마리를 24시간 절식시킨 다음 urethane을 1g/kg씩 복강내 주사하여 마취시켰다. 경정맥을 통하여 1.5 ml의 혈액을 뽑은 뒤 1 ml의 생리식염수를 혈액내로 보충시키고 15분 후에 정제한 BBS-LI-K1, BBS-LI-K2 그리고 합성 bombesin을 0.5  $\mu$ g/kg씩 각각 경정맥으로 일회에 투여하였다. 투여 30분 후에 경정맥으로부터 4 ml의 혈액을 채취하여 혈장을 원심분리하고 혈장 gastrin 농도를 RIA 법 (Tai & Chey, 1976)으로 측정하였다.

**2) 마취한 흰쥐에서 췌장 외분비 기능에 미치는 영향 :** 300 g 정도되는 흰쥐 수컷 17마리를 24시간 절식시킨 다음 urethane을 1g/kg씩 복강내 주사하여 마취하였다. 동물의 수술은 Park et al (1986)의 방법을 따랐으며 췌장액 채취는 매 15분 간격으로 내경이 0.64 mm되는 polyethylene 관에 모았다. 기초 상태에서 15분간에 분비되는 췌장액을 2회 채취한 다음 정제한 BBS-LI-K1, BBS-LI-K2 또는 합성 bombesin을 0.1  $\mu$ g/kg씩 각각 경정맥으로 투여하고 췌장액을 채취하였다. 채취한 췌장액으로부터 15분간의 분비량 (volume), 단백질 분비량 (protein output), amylase 분비량 (amylase output)을 측정하였다. 단백질 농도는 280 nm에서의 흡광도를 측정하여 산출하였고 amylase 활성도는 Rick & Stegbauer (1974)의 방법에 따라 측정하였다.

## 3. Bombesin의 방사면역측정

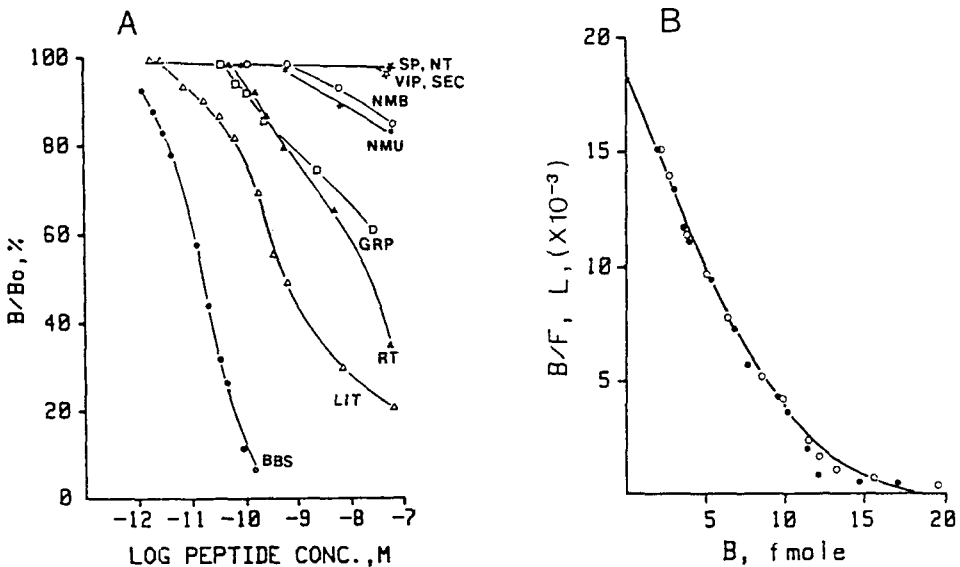
**1) Bombesin 항체의 생산 :** 합성 [Lys<sup>3</sup>]-bombesin을 bovine serum albumin (BSA)에 1-ethyl-3-(3-diethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC)를 촉매로

하여 접합시켜 항원으로 사용하였다(Boehm et al, 1974; Goodfriend et al, 1964; Park et al, 1989). 2 mg의 합성 [Lys<sup>3</sup>]-bombesin, 20 mg의 BSA 그리고 200 mg의 EDC를 4 ml의 증류수에 넣고 상온에서 20시간 접합반응을 일으켰다. 반응액을 4°C에서 생리식염수로 충분히 투석시킨 다음 125  $\mu$ l (50  $\mu$ g 상당의 [Lys<sup>3</sup>]-bombesin 포함)씩 소분하여 -70°C에 보관하였다. 소분한 항원과 500  $\mu$ l의 Freund complete adjuvant 그리고 생리식염수 375  $\mu$ l를 혼합하여 충분히 섞어준 다음 이유시킨지 2주되는 guinea pig에게 피하주사 하였다. 두번째 면역는 첫번째 면역 2주 후에 같은 양을 주사하였으며 세번째 면역부터는 매 4주 간격으로 주사하였다. 두번째 면역 후부터 매 2주째 되는 날에 심장천자법으로 채혈하고 혈청중의 항체를 적정하였다.

Bombesin 항체의 역가를 측정하기 위하여 1 ml의 용액 (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5% BSA, 0.02% NaN<sub>3</sub>, pH 7.0)에 5,000 cpm (0.86 fmole)의 <sup>125</sup>I-[Tyr<sup>4</sup>]-bombesin과 연속 희석한 항혈청을 혼합하여 4°C에서 72시간 방치한 후 50%의 <sup>125</sup>I-[Tyr<sup>4</sup>]-bombesin

이 결합하는 항혈청의 희석비율을 항체의 역가로 표시하였다. 면역한 3마리의 guinea pig중 한마리에서 (LBE 2G-2) 8회 면역한 후에 역가가 1 : 188,800이며 bombesin에 특이성이 높은 항체를 얻었다.

**2) Bombesin 항체의 평가:** 본 실험에서 얻은 bombesin 항체 (LBE 2G-2)의 특이성을 알아보기 위하여 bombesin, litorin, ranatensin, GRP, neuromedin 등의 BBS-LP 그리고 substance P, neurotensin, vasoactive intestinal polypeptide (VIP), secretin 등의 위장관 peptide들과의 교차반응성을 측정하였다 (Fig. 1-A). 항체의 친화력 (affinity)과 총 결합부위 (total binding sites)는 Scatchard의 식 (Scatchard, 1949)을 항원-항체 반응에 적용시켜 얻은 Scatchard plot (Chang & Chey et al, 1980; Rehfeld et al, 1972)으로부터 산출하였으며 (Fig. 1-B), 항체의 이질성 지수 (heterogeneity index)는 Karush의 직선회귀분석법 (Karush, 1962)을 이용한 Sips의 식 (Sips, 1948)으로부터 산출하였다. Bombesin 항체 LBE 2G-2는 bombesin에는 친화력이 매우 높았으나 그 외 다른 BBS-LP와는 친화력이 매우 낮았다. Bom-



**Fig. 1. A:** cross-reactivity of bombesin antiserum, LBE 2G-2 raised in a guinea pig. Extent of the cross-reactivity was expressed as tracer binding ratio at various peptide concentrations comparing with that of zero concentration (Bo). Abbreviations: BBS, bombesin; LIT, litorin; RT, ranatensin; GRP, gastrin releasing peptide; NMB, neuromedin B; NMU, neuromedin U; SP, substance P; NT, neurotensin; VIP, vasoactive intestinal polypeptide; SEC, secretin. **B:** Scatchard plot of labeled (open circle) and unlabeled (filled circle) bombesin to bombesin antiserum, LBE 2G-2.

besin의 half saturation concentration ( $C_{0.5}$ )이 15.8 pM인 반면에 bombesin을 제외한 peptide 중에서 LBE 2G-2와 교차반응성이 가장 높은 litorin은 562.3 pM로 bombesin에 비하여 36배 높았다. Ranatensin과 GRP에 대한 교차반응성은 bombesin의 0.1%와 0.05%를 나타내었다. 기타 다른 peptide들과는  $10^{-7}$  M까지의 농도에서 교차반응이 일어나지 않았다(Fig. 1-A). LBE 2G-2의 유효 친화력상수(effective affinity constant)는  $1.03 \times 10^{11}/M$ , 평균 친화력상수(average affinity constant)는  $0.65 \times 10^{11}/M$ , 총 결합부위(total binding sites)는  $3.79 \mu M$  그리고 이질성 지수(heterogeneity index)는 0.85를 나타내었다.

3) Bombesin의 방사성 표지 :  $^{125}I$ -[Tyr<sup>4</sup>]-bombesin의 제조는 Park et al(1989)의 방법을 따랐다. 이 방법에 따라 제조한  $^{125}I$ -[Tyr<sup>4</sup>]-bombesin의 specific activity는 self-displacement method (Stadil & Rehfeld, 1972)에 의해 측정된 결과 3,300  $\mu Ci/nmole$ 이었으며 면역성함량(immunoreactive content)은 82%이었다. Standard curve로부터 계산한 RIA의 측정한계(detection limit)는 3.2 pM이었다.

4) 시약 : Peptide는 모두 합성한 것을 사용하였

다. Bombesin, litorin, ranatensin, neuromedin B와 U, substance P, VIP는 Sigma (USA)에서 [Tyr<sup>4</sup>]-bombesin, [Lys<sup>3</sup>]-bombesin, GRP, secretin은 Penninsula Lab, Inc.(USA)에서 각각 구입하였다. BSA (Fr. V)와 EDC, Freund complete adjuvant는 Sigma(USA)에서, Sephadex G-10, Sephadex G-25, SP-Sephadex, C-25는 Pharmacia(Sweden)에서, alkaline alumina는 Merck(Germany)에서, lactoperoxidase는 Cal Biochem(USA)에서,  $NaI^{125}$ 는 Amersham(England)에 각각 구입하였다. 기타 시약은 reagent grade(Sigma, USA)와 HPLC grade를 사용하였다.

## 실 험 성 적

### 1. BBS-LI의 순수정제

무당개구리 피부 360g에서 얻은 methanol 추출액의 BBS-LI 함량은 17.8  $\mu g/g$  of wet tissue로 총 BBS-LI 함량은 6.41 mg이었다. Alkaline alumina column의 ethanol 용출액중 80% ethanol에서 1.77 mg 그리고 85% ethanol에서 2.25 mg의 BBS-LI가 각각 용출되어 alkaline alumina column에 부하한 총 BBS-LI중 83.4%가 80~85% ethanol에서 용출되

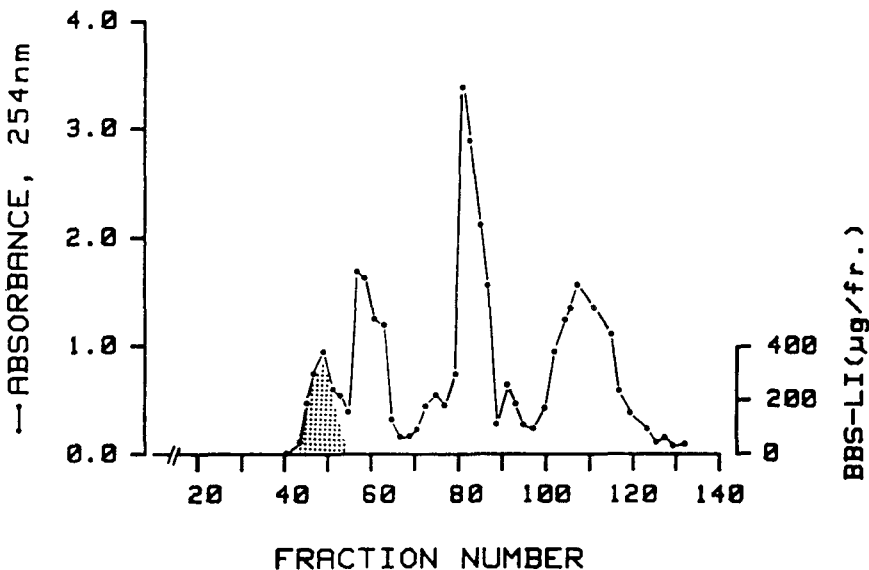


Fig. 2. Chromatogram of BBS-LI in 80~85% ethanol eluent from a column of alkaline alumina on a column of Sephadex G-10, fine (1.6×95 cm). Dotted area represents content of BBS-LI in the fractions.

었다. 80%와 85% ethanol 용출액을 농축하여 Sephadex G-10 column에 부하하고 용출시키면서 분획을 받아 각 분획의 흡광도를 254 nm에서 측정하였을 때 6개의 peak가 출현하였으며, BBS-LI는 첫번째 peak 분획에서 용출되었다(Fig. 2). Sephadex G-10 column에서 얻은 총 BBS-LI 함량은 3.2 mg 이었다. Sephadex G-10 column에서 얻은 BBS-LI 분획들은 냉동건조 시킨 뒤 최소량(400  $\mu$ l)을 C18 column의 starting buffer에 녹여 원심분리(17,000 rpm, 30 min)하고 상청액을 취하여 syringe filter(0.45  $\mu$ m $\times$ 3 mm)로 여과하였다(최종부피, 300  $\mu$ l). Reversed phase preparative C18 HPLC column에 농축한 BBS-LI 분획을 주입하였을 때 20% CH<sub>3</sub>CN에서 이물질이 많이 제거되었으며 이것은 254 nm에서 보다는 214 nm에서 더 많이 흡광하는 물질들이었다. 이 과정에서 BBS-LI는 retention time이 78분과 80분인 두개의 peak를 나타내었으나 대부분 중첩되어 용출되었다(Fig. 3-A). 두개의 BBS-LI를 분리하기 위하여 gel permeation HPLC column에 BBS-LI 분획들을 주입하였으나 약간의 이물질들만 제거되었을 뿐 BBS-LI는 하나의

peak로 용출되었다(Fig. 3-B). BBS-LI 분획들을 다시 농축하여 SP-ion exchange HPLC column에 주입하였을 때 BBS-LI는 두개의 peak로 확실히 분리가 되었다(Fig. 3-C). 첫번째 peak는 전체 BBS-LI의 26.2%를 함유하고 있으며 column 세척과정에서 용출되었고, 두번째 peak는 BBS-LI의 73.8%를 함유하고 있으며 180 mM NaCl에서 용출되었다.

저자들은 임시적으로 SP-ion exchange resin에 잘 결합하는 물질을 BBS-LI-K1 그리고 결합하지 않는 다른 하나를 BBS-LI-K2라 명명하였으며 이들을 각각 순수정제하였다. BBS-LI-K1과 BBS-LI-K2 분획에 포함된 무기염들은 이 분획들을 Sephadex G-25 column에 통과시키므로서 효과적으로 제거되었다. 무기염들이 제거된 BBS-LI-K1과 BBS-LI-K2 분획들을 최종적으로 reversed phase C18 analytical HPLC column에 각각 주입하였을 때 이들은 하나의 peak로 각각 용출되었으며 chromatogram상 95% 이상의 순도를 나타내었다(Fig. 4-A, 5-A). 정제한 BBS-LI-K1 5  $\mu$ g을 SP-ion exchange column(SP-5PW)에 주입하였을 때에도 하나의 peak로 용출되어 순수정제되었음을 확인하였다(Fig. 4-B). 정

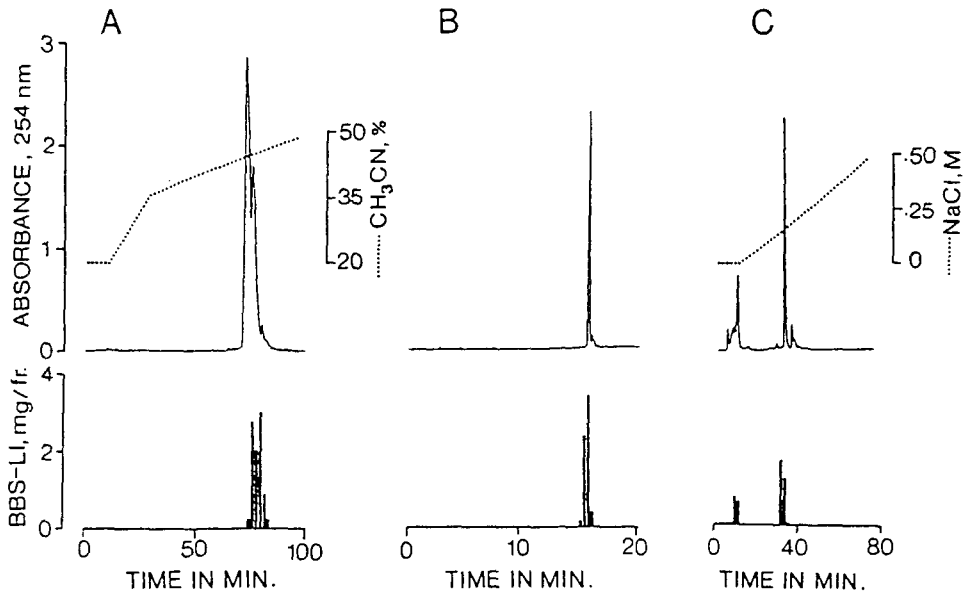
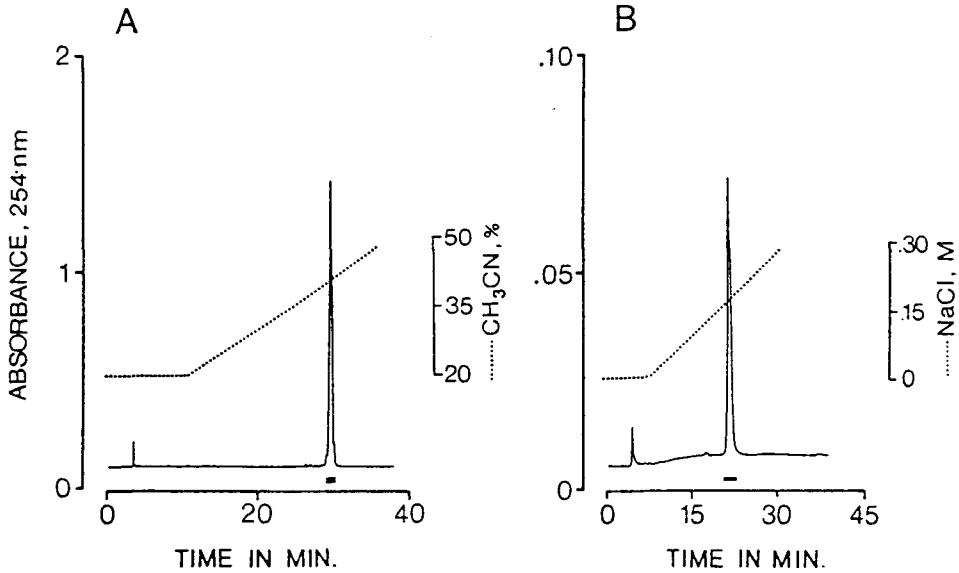
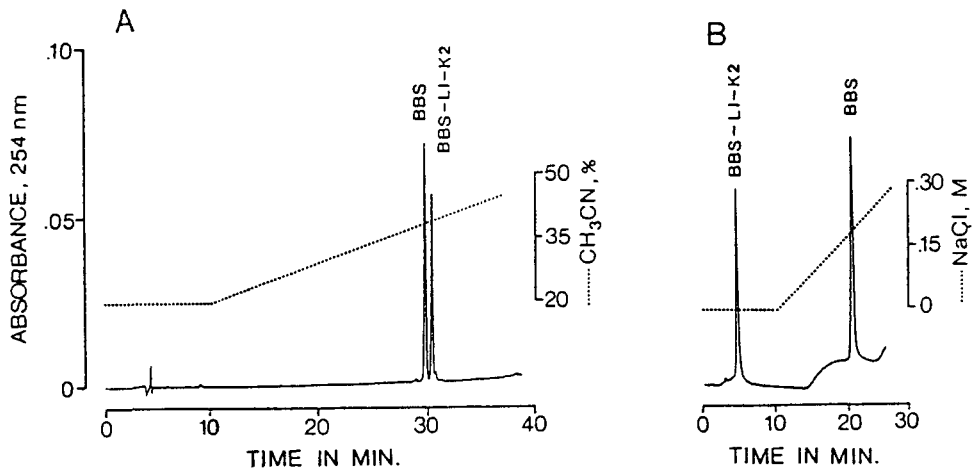


Fig. 3. Further purification of BBS-LI by using reversed phase C18 preparative (A), gel permeation (B) and SP-ion exchange (C) HPLC. The experimental procedure is described in Methods. Upper panels represent the absorbance at 254 nm and filled bars in lower panels represent the content of BBS-LI in each fraction.



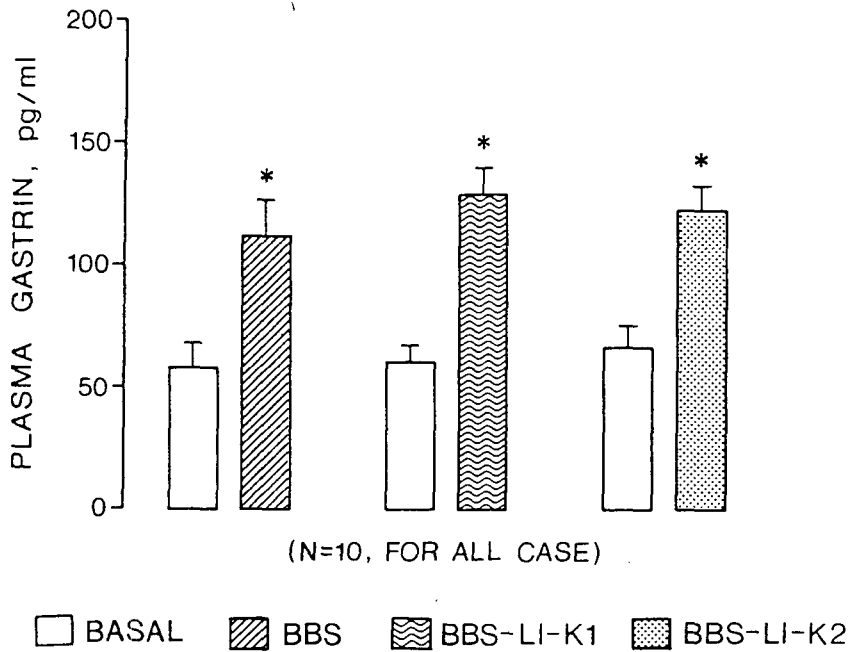
**Fig. 4.** A: a reversed phase C18 analytical HPLC for final purification of BBS-LI-K1. B: a SP-ion exchange HPLC of purified BBS-LI-K1. The experimental procedure is described in Methods. A thick bar below the chromatogram represents fractions containing BBS-LI.



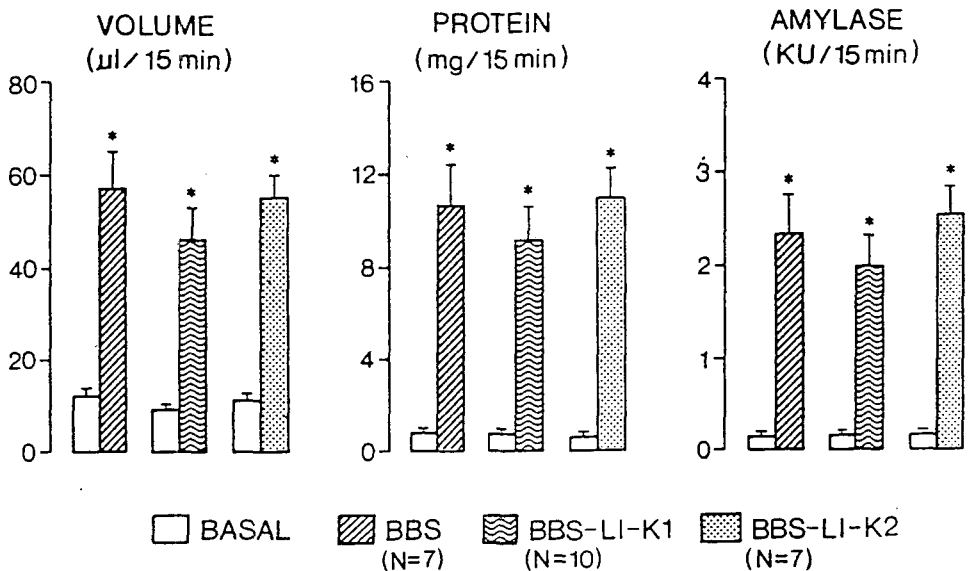
**Fig. 5.** Comparison of BBS-LI-K2 with synthetic bombesin by using reversed phase C18 (A) and SP-ion exchange (B) HPLC. The experimental procedure is described in Methods.

제한 BBS-LI-K1과 합성 bombesin을 HPLC 상에서 비교하기 위하여  $5 \mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ 의 정제한 BBS-LI-K1과 합성 bombesin을 혼합하여 reversed phase C18, SP-ion exchange 그리고 gel permeation HPLC column에 주입하였을 때 모두 하나의 peak로 용출되어 두

물질간에 차이점을 발견할 수가 없었다(data는 제시하지 않았음). 그러나,  $5 \mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ 의 정제한 BBS-LI-K2와 합성 bombesin을 혼합하여 reversed phase C18 analytical column에 주입하였을 때 BBS-LI-K2는 합성 bombesin보다 다소 늦게 용출되



**Fig. 6.** Effects of purified BBS-LI-K1, BBS-LI-K2 and synthetic bombesin on mean plasma gastrin concentration in fasted anesthetized rats. Each bar represents mean  $\pm$  SD. An asterisk means the value is significantly ( $p < 0.05$ ) different from that of the basal state.



**Fig. 7.** Effects of purified BBS-LI-K1, BBS-LI-K2 and synthetic bombesin on spontaneous pancreatic exocrine secretion in fasted anesthetized rats. Each bar represents mean  $\pm$  S.D. An asterisk means the value is significantly ( $p < 0.01$ ) different from that of the basal state.



었으며 (Fig. 5-A), SP-ion exchange HPLC에서는 예상대로 BBS-LI-K2는 0 mM NaCl에서 그리고 합성 bombesin은 180 mM NaCl 농도에서 각각 용출되어 (Fig. 5-B) BBS-LI-K2와 합성 bombesin이 서로 상이한 물질임을 나타내었다. 한편 BBS-LI-K2와 합성 bombesin은 gel permeation HPLC 상에서는 분리되지 않았다.

## 2. 순수정제한 BBS-LI의 생물학적 활성

1) 마취한 흰쥐에서 혈장 gastrin 분비에 미치는 영향 : Fig. 6에 제시한 바와 같이 정제한 BBS-LI-K1, BBS-LI-K2 그리고 합성 bombesin 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 를 각각 흰쥐의 경정맥으로 투여했을 때 투여 30분 후의 혈장 gastrin 농도가 모두 유의하게 ( $p < 0.05$ , paired t test) 증가하였으며 세 물질간에 통계적인 차가 없었다.

2) 마취한 흰쥐에서 췌장 외분비기능에 미치는 영향 : Fig. 7에 제시한 바와 같이 정제한 BBS-LI-K1, BBS-LI-K2 그리고 합성 bombesin 0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 를 각각 흰쥐의 경정맥으로 투여했을 때 췌장액, 단백질 그리고 amylase 분비량 모두가 유의하게 ( $p < 0.01$ , paired t test) 증가하였으며, 세 물질간에 통계적인 차가 없었다.

## 고 찰

본 실험에서는 모든 과정에서 RIA 법으로 BBS-LI 함량을 측정하였다. RIA 법은 민감성 (sensitivity)은 높은 반면 구조상으로 유사한 물질과의 교차 반응을 완전히 배제할 수 없는 단점이 있다. 이러한 이유 때문에 정확한 측정을 위해서는 특이성 (specificity)이 높고 유사물질과의 교차반응성 (cross-reactivity)이 낮은 항체를 사용하는 것이 중요하다. 항원-항체의 반응을 분석함에 있어 Scatchard plot의 초기경사도 (initial slope)로부터 계산하는 유효 친화력상수 (effective affinity constant)가 RIA의 특이성 (specificity)을 반영하는 중요한 요소로 알려져 있다 (Ekins, 1970). 본 실험에서 얻은 bombesin 항체인 LBE 2G-2의 유효 친화력상수는  $1.03 \times 10^{11}/\text{M}$ 이어서 낮은 생리적 농도를 측정하였는데 요구되는 것으로 알려진 값인  $1.00 \times 10^{11}/\text{M}$  (Rehfeld et al,

1972)보다 높아 BBS-LI의 측정에 있어 충분한 특이성을 지니는 것으로 생각한다. 또한 LBE 2G-2는 bombesin과 [Tyr<sup>4</sup>]-bombesin에 대하여 매우 높은 반응성을 보인 반면 bombesin 유사 peptide인 litorin, ranatensin, GRP와의 교차반응성은 매우 낮아서 이들과의 교차반응성은 bombesin과의 반응성에 대하여 각각 2.7%, 0.1% 그리고 0.05%를 나타내었을 뿐이다. 그리고 LBE 2G-2는 위장관 peptide인 secretin, substance P, VIP 등과는 거의 반응을 하지 않았다. 이러한 결과들로 보아 LBE 2G-2는 bombesin RIA에 매우 적합한 항체라고 판단되어 본 실험에서 BBS-LI의 RIA에 사용하였다.

이미 언급한 바와 같이 bombesin은 *Bombina* 속의 *B. bombina*와 *B. variegata*의 피부에서 분리되었다 (Anastasi et al, 1971; Erspamer et al, 1970). 그러나 아직까지 한국을 포함한 극동지방에 주로 서식하는 *B. orientalis*에서는 bombesin의 존재가 보고된 바 없으며 단지 bombesin 유사물질이 존재할 가능성이 면역형광법을 이용한 연구에서 제시된 바 있다 (Yoshie et al, 1985). 한편 저자들은 이미 *B. orientalis*의 각 조직에 상당량의 BBS-LI가 존재함을 보고하였으며 (Park et al, 1988), 피부에서 BBS-LI를 부분 정제하여 그 생물학적 활성과 분자적 이질성을 보고하였다 (Park et al, 1989). HPLC를 이용하여 순수정제한 본 실험의 결과에 의하면 *B. orientalis*의 피부에는 2가지 종류의 BBS-LI가 존재한다. 전체 BBS-LI의 73.8%를 점유하는 BBS-LI-K1은 SP-ion exchange와 reversed phase C18 analytical HPLC에서 14개의 amino acid로 구성된 합성 bombesin과 동일한 양상을 나타내는 반면 26.2%를 점유하는 BBS-LI-K2는 SP-ion exchange HPLC column에 잘 결합하지 않을 뿐만 아니라 reversed phase C18 analytical column에서도 합성 bombesin에 비하여 늦은 retention time을 보이는 등 상당히 다른 양상을 나타내었다. 이러한 본 실험의 결과를 종합하여 볼 때 BBS-LI-K1은 합성 bombesin과 상당히 유사한 물질이라 추측되며, BBS-LI-K2는 소수성이거나 또는 비극성 amino acid를 포함하는 등 합성 bombesin과는 분자적 이질성을 지닌 물질일 것으로 추측된다.

본 실험에서 순수정제한 BBS-LI-K1과 BBS-LI-

K2가 bombesin의 생물학적 활성을 지니고 있는지를 검토하기 위하여 이들이 bombesin의 특징적인 생물학적 활성으로 알려진 gastrin 분비(Walsh et al, 1981)와 췌장 외분비(Erspamer et al. 1974) 촉진에 미치는 영향을 관찰하였다. 그 결과 이들은 마취한 흰쥐에서 gastrin 분비, 췌장액 분비, 췌장단백질 분비, 췌장 amylase 분비 등을 촉진하였으며 촉진정도를 동량의 합성 bombesin과 비교할 때 이렇다할 차이가 없었다. 그러므로 본 실험에서 순수정제된 두가지 종류의 BBS-LI는 모두 bombesin과 동일한 생물학적 활성을 지닌 물질이라고 생각된다.

Bombesin과 분자적 이질성을 지닌 peptide가 개구리의 다른 속에서도 발견되었다. 즉, Papua New Guinea에 서식하는 *Rana*속 개구리에서 bombesin nonapeptide인 [pGlu<sup>1</sup>]-bombesin<sub>6-14</sub>가 추출되었고(Nakajima, personal communication), *Rana catesbiana*의 뇌와 위에서 각각 3종류의 BBS-LI가 존재함이 알려져 있다(Walsh, 1982). 한편 포유류에 존재하는 bombesin 유사 peptide (GRP)도 분자적 이질성을 지니고 있는 것으로 알려졌으며(Ghatei et al, 1983; Moody & Pert, 1979; Orloff et al, 1984; Villarreal & Brown, 1978), 아미노산 조성이 확인된 것으로는 개의 소장에서 추출한 BBS-24와 BBS-10이 있다(Reeve et al, 1983). 다른 속의 개구리 피부에 존재하는 bombesin 유사 peptide에서도 분자적 이질성이 밝혀졌다. 즉, Anastasi et al (1975; 1977)은 *Litoria aurea*의 피부에서 litorin과 Glu(OMe)<sup>2</sup>-litorin을 발견하였다. 또한 litorin 계열의 peptide인 Glu(OEt)<sup>2</sup>-litorin과 rohdei-litorin이 *Litoria*와 다른 속의 개구리인 *Uperoleia rugosa*와 *Phyllomedusa rohdei*의 피부에서 각각 추출되었다(Barra et al, 1985; Nakajima et al, 1980). Litorin 계열 외에도 *Phyllomedusa sauvagei*의 피부로부터 phyllolitorin과 [leu<sup>8</sup>]-phyllolitorin이 분리되었으며(Yasuhara, 1983) *Phyllomedusa rohdei*의 피부로부터 [Thr<sup>5</sup>, Leu<sup>8</sup>]-phyllolitorin과 [Leu<sup>2</sup>, Thr<sup>5</sup>]-litorin이 동시에 추출되었다(Barra et al, 1985). 이러한 결과들은 *B. orientalis*의 피부에도 2가지 이상의 분자적 이질성을 지닌 bombesin 유사 peptide가 존재할 가능성을 뒷받침하여 주는 것으로 생각한다.

본 연구결과에서 한국산 무당개구리의 피부에는

bombesin과 동일한 면역학적 특성 및 생물학적 활성을 지니나 분자적 이질성을 지니는 것으로 생각되는 2가지 종류의 BBS-LI가 존재하고 있음을 확인하였다. 그러나 이물질들이 bombesin 유사 peptide로 확인되기 위하여서는 앞으로의 연구에서 이들의 화학적 구조가 규명되고 생물학적 활성이 폭 넓게 연구되어야 할 것으로 생각된다.

## 결 론

본 실험에서는 한국산 무당개구리의 피부에 존재하는 BBS-LI를 순수정제하여 14개의 amino acid로 구성된 합성 bombesin과의 분자적 이질성 및 생물학적 활성을 비교하고자 하였다. 무당개구리의 피부에 존재하는 BBS-LI는 methanol extraction, alkaline alumina LC, Sephadex G-10 LC 그리고 이어서 reversed phase C18 preparative, gel permeation, SP-ion exchange, reversed phase C18 analytical HPLC를 순차적으로 실시하여 두가지 종류의 BBS-LI로 순수정제되었으며 다음과 같은 특성을 지니고 있었다.

1) BBS-LI는 SP-ion exchange HPLC에서 column에 잘 결합하는 BBS-LI-K1과 그렇지 않은 BBS-LI-K2로 잘 분리되었다.

2) BBS-LI-K1은 전체 BBS-LI의 73.8%를 점유하며 reversed phase C18 analysis, gel permeation 그리고 SP-ion exchange HPLC 모두에서 모두 합성 bombesin과 동일한 양상을 나타내었다.

3) BBS-LI-K2는 전체 BBS-LI의 26.2%를 점유하며 reversed phase C18 analytical HPLC column에서 합성 bombesin보다 다소 늦게 용출되었고 SP-ion exchange HPLC column에 결합하는 정도가 합성 bombesin에 비하여 낮았다.

4) 순수정제한 BBS-LI-K1과 BBS-LI-K2는 마취한 흰쥐에서 혈장 gastrin 농도와 췌장액, 단백질 그리고 amylase 분비량을 모두 유의하게 증가시켰으며 그 증가율은 동량의 합성 bombesin을 투여한 경우와 유사하였다.

이상의 실험 결과를 종합하면 한국산 무당개구리의 피부로부터 두가지 종류의 BBS-LI가 순수정제되었다. 전체 BBS-LI의 73.8%를 점유하는 BBS-LI-

K1은 분자적 특성 및 면역학적 특성과 생물학적 활성이 bombesin과 매우 유사하였으며, 26.2%를 점유하는 BBS-LI-K2는 면역학적 특성과 생물학적 활성은 합성 bombesin과 유사하나 분자적 특성에서는 이질성을 지닌 것으로 생각된다.

## REFERENCES

- Anastasi A, Erspamer V & Bucci M (1971). Isolation and structure of bombesin and alytesin, two analogous active peptides from the skin of the European amphibians. *Bombina* and *Alytes*. *Experientia* 27, 166-167
- Anastasi A, Erspamer V & Edean R (1975). Amino acid composition and sequence of litorin, a bombesin-like nonapeptide from the skin of the Australian frog *Litoria aurea*. *Experientia* 31, 510-511
- Anastasi A, Melchiorri P, Angelucci F, Erspamer V & Edean R (1977). Glu (OMe)<sup>2</sup>-litorin, the second bombesin-like peptide occurring in methanol extracts of the skin of the Australian frog *Litoria aurea*. *Experientia* 33, 1288-1290
- Barra D, Erspamer G, Simmaco M, Bossa F, Melchiorri P & Erspamer V (1985). Rhodei-litorin: A new peptide from the skin of *Phyllomedusa rohdei*. *FEBS Lett* 182, 53-56
- Bertaccini G, Erspamer V & Impicciatore M (1973). The actions of bombesin on gastric secretion of the dog and the rat. *Br J Pharmac* 49, 437-444
- Boehm M, Lee Y & Chey WY (1974). Radioimmunoassay of secretin, I. Production of secretin antibodies and development of the radioimmunoassay, In: Chey WY & Brooks F (ed) *Endocrinology of the gut*. Charles B Slack Publication, Thorofare New Jersey, p 310-319
- Brown M, Rivier J & Vale W (1977). Bombesin: Potent effects on thermoregulation in the rat. *Science* 196, 998-1000
- Chang TM & Chey WY (1980). Radioimmunoassay of secretin. A critical review and current status. *Dig Dis Sci* 25, 529-552
- Cowan A (1988). Behavioral effects of bombesin. In: Tache Y, Melchiorri P & Negri L (ed) *Bombesin-like peptide in health and disease*, The New York Academy of Science, New York, p 204-209
- Ekins RP (1970). Mathematical treatment of data and automation. In: Kirkham KE & Hunter WH (ed) *Radioimmunoassay methods*, Churchill Livingstone, Edinburgh & London, p 614-615
- Erismann MD, Linnoila RI, Hernandez O, DiAugustine RP & Lazarus LH (1982). Human lung small-cell carcinoma contains bombesin. *Proc Natl Acad Sci USA* 79, 2379-2383
- Erspamer V, Erspamer G & Inselvini M (1970). Some pharmacological actions of alytesin and bombesin. *J Pharm Pharmac* 22, 875-876
- Erspamer V, Improta G, Melchiorri P & Soprani N (1974). Evidence of cholecystokinin release by bombesin in dogs. *Br J Pharmac* 52, 227-232
- Erspamer V (1984). Half a century of comparative research on biogenic amines and active peptides in amphibian skin and molluscan tissues. *Comp Biochem Physiol* 79C, 1-7
- Erspamer V (1988). Discovery, isolation, and characterization of bombesin-like peptides. In: Tache Y, Melchiorri P & Negri L (ed) *Bombesin-like peptide in health and disease*, The New York Academy of Science, New York, p3-9
- Ghatei MA, Jung RT, Stevenson JC, Hillyard CJ, Adrian TE, Lee YC & Bloom SR (1982). Bombesin: Action on the gut hormones and calcium in man. *J Clin Endocrinol Metabol* 54, 980-985
- Ghatei MA, Sheppard MN, Henzen-Logman S, Blank MA, Polak JM & Bloom SR (1983). Bombesin and vasoactive intestinal polypeptide in the developing lung: Marked changes in acute respiratory distress syndrome. *J Clin Endocrinol Metabol* 57, 1226-1232
- Goodfriend TL, Levine L & Fasman GD (1964). Antibodies to bradykinin and angiotensin: A use of carbodiimides in immunology. *Science* 144, 1344-1346
- Greely GH, Spannagel A, Burdett JB, Dinh T, Hill FLC, Trowbridge J & Thompson JC (1984). Distribution of gastrin-releasing peptide and bombesin-like peptide in the alimentary canal of rats, rabbits, dogs and humans. *Gastroenterology* 86, 580-585
- Karush F (1962). Immunologic specificity and molecular structure. *Adv Immunol* 2, 1-40
- Major J, Ghatei MA & Bloom SR (1983). Bombesin-like immunoreactivity in the pituitary gland. *Experientia* 39, 1158-1159
- McDonald TJ, Nilsson G, Vagne M, Ghatei M, Bloom

- IR & Mutt V (1978). A gastrin releasing peptide from the porcine non-antral gastric tissue. *Gut* 19, 767-774
- Minamino N, Kangawa K & Matsuo H (1983). Neuromedin B: A novel bombesin-like peptide identified in porcine spinal cord. *Biophys Res Commun* 114, 541-548
- Minamino N, Kangawa K & Matsuo H (1988). Neuromedin B and Neuromedin C. In: Tache Y, Melichiori P & Negri L (ed) *Bombesin-like peptides in health and disease*, The New York Academy of Science, New York, p373-390
- Moody TW & Pert CB (1979). Bombesin-like peptides in rat brain: Quantitation and biochemical characterization. *Biochem Biophys Res Comm* 90, 7-14
- Moody TW, Pert CB, Gazdar AF, Carney DN & Minna JD (1981). High levels of intracellular bombesin characterize human small-cell lung carcinoma. *Science* 214 1246-1248
- Nakajima T, Tanimura T & Posano JJ (1970). Isolation and structure of new vasoactive polypeptide. *Fed Proc* 29, 282
- Nakajima T, Yasuhara T, Erspamer V, Erspamer G, Negri L & Endean R (1980). Physalaemin and bombesin-like peptides in the skin of the Australian leptodactylid frog *Uperoleia rugosa*. *Chem Pharm Bull* 28, 680-685
- Orloff MS, Reeve JR, Ben-Avram CM, Shively JE & Walsh JH (1984). Isolation and sequence analysis of human bombesin-like peptides. *Peptides* 5, 865-870
- Park HJ, Lee YL, Kwon HY, & Shin WI (1986). Exocrine pancreatic secretion in response to electrical stimulation of reticular formation in mesencephalone in rats. *Kor J Physiol* 20, 1-7 (in Korea)
- Park HJ, Lee YL, Kwon HY, Shin WI & Suh SW (1988). Molecular heterogeneity of bombesin-like immunoreactivity extracted from tissues of Korean frog, *Bombina orientalis*. *Hallym Univ J* 6, 121-143 (in Korea)
- Park HJ, Lee YL, Kwon HY, Shin WI & Suh SW (1989). Isolation of bombesin-like substances from the skin of the frog, *Bombina orientalis*: Its molecular heterogeneity and biological activity. *Kor J Physiol* 23, 79-87 (in Korea)
- Park HJ, Kwon HY, Lee YL, Shin WI, Suh SW & Oh YS (1989). Production and evaluation of anti-gastrin serum for radioimmunoassay. *Kor J Physiol* 23, 89-98 (in Korea)
- Reeve JR, Walsh JH, Chew P, Clark B, Hawke D & Shively JE (1983). Amino acid sequences of three bombesin-like peptides from canine intestinal extracts. *J Biol Chem* 258, 5582-5588
- Rehfeld JF, Stadil F & Rubin B (1972). Production and evaluation of antibodies for radioimmunoassay of gastrin. *Scand J Clin Lab Invest* 30, 221-232
- Rick W & Stehbauer HP (1974). In: Bergmeyer HU (ed) *Methods of enzymatic analysis*, Vol 2, Verlag Chemie, Weinheim. p885-890
- Roth KA, Weber E & Barchas JD (1982). Distribution of gastrin releasing peptide-, bombesin-like immunostaining in rat brain. *Brain Res* 251, 277-282
- Scatchard G (1949). The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann NY Acad Sci* 51, 660-672
- Sips P (1948). On the structure of a catalyst surface. *J Chem Phys* 15, 490-495
- Stadil F & Rehfeld JF (1972). Preparation of <sup>125</sup>I-labelled synthetic human gastrin-I for radioimmunoanalysis. *Scand J Clin Invest* 30, 361-368
- Tai HH & Chey WY (1976). Simultaneous radioimmunoassay of secretin and gastrin. *Anal Biochem* 74, 12-24
- Villarreal JA & Brown MR (1978). Bombesin-like peptide in hypothalamus: Chemical and immunological characterization. *Life Sci* 23, 2729-2734
- Walsh JH, Maxwell V, Ferrari J & Varner AA (1981). Bombesin stimulates human gastric function by gastrin-dependent and independent mechanism. *Peptides* 2 (Suppl 2), 193-198
- Walsh JH, Lechago J, Wong HC & Rosenquist GL (1982). Presence of ranatensin-like and bombesin-like peptides in amphibian brains. *Regul pept* 3, 1-13
- Woods SC, Stein LJ, Figlewicz DP & Porte JD (1983). Bombesin stimulates insulin secretion and reduces food intake in the baboon. *Peptides* 4, 687-691
- Yasuhara T, Ishikawa O & Nakajima T (1979). The studies on the active peptides in the skin of *rana rugosa*. II. The structure of ranatensin-R, the new ranatensin analogue, and granuliberin-R, the new mast cell degranulating peptide. *Chem Pharm Bull* 27, 492-498
- Yasuhara T, Nakajima T, Nokihara K, Yanaihara C, Yakaiharu V, Erspamer V & Erspamer G (1983).

—권혁일 외 2인 : 한국산 무당개구리 피부에 존재하는 Bombesin 유사면역반응물질의 순수정제 및 생물학적 활성—

Two new frog skin peptides, phyllolitorins of the bombesin-ranatensin family from *phyllomedusa sawagei*. *Biomed Res* 4, 407-412

Yoshie S, Iwanaga T & Fujita T (1985). Coexistence of

bombesin and 5-hydroxytryptamine in the cutaneous gland of the frog, *Bombina orientalis*. *Cell Tiss Res* 239, 25-29