

미꾸라지(*Misgurnus mizolepis* G.)의 심장에 존재하는 Immunoreactive Atrial Natriuretic Peptide의 특성에 관하여

류 훈 · 이금영

전북대학교 자연과학대학 생물학과

포유류의 심방에 주로 존재하여 체액 및 전해질 대사의 조절과 혈압 조절에 관여하는 atrial natriuretic peptide(ANP)가 담수어류인 미꾸라지(*Misgurnus mizolepis* G.)의 심장 및 기타조직에도 존재하는지 알아보고 이들의 분자적 특성 및 온도차에 의한 함량변동을 조사하였다.

미꾸라지의 심장과 동맥구의 추출액은 모두 희석농도에 따라 표준곡선에 평행하는 ANP immunoreactivity를 나타냈다. 미꾸라지의 심장과 동맥구 모두에서 저분자량 및 고분자량의 immunoreactive ANP(irANP)가 관찰되었다. 한편 미꾸라지의 심장내 irANP 함량은 61.56 ± 5.08 pg/mg이었으며, 심장의 조직인 동맥구는 60.59 ± 5.04 pg/mg으로 거의 동량의 irANP를 함유하였다. 미꾸라지를 저온상태에 적응시킨 경우에는 심장보다도 동맥구에서 더 유의한 irANP의 함량변동을 보였다($p < 0.01$).

미꾸라지의 심장 및 동맥구에 존재하는 irANP는 주로 고분자량의 pro-ANP가 관찰되므로써 미꾸라지의 심장과 동맥구 모두가 irANP를 조직내에서 합성할 것임을 시사하였다. 아울러 온도는 미꾸라지의 경우에서 irANP의 함량변동에 영향을 주는 요인임을 알 수 있었다.

KEY WORDS: IrANP, Molecular form, Cold acclimation, Loach.

포유동물의 심방세포내에 분비성과립이 존재한다는 사실은 오래전에 밝혀진 바 있다(Kisch, 1956). 과립내의 물질은 대부분이 단백질이며(Cantin *et al.*, 1975), 아울러 흰쥐에서 혈장내 수분 또는 전해질량이 감소할 때 이러한 과립의 수는 증가되어 나타나는 것으로 보고되었다(De Bold, 1979). De Bold 등(1979)은 흰쥐의 심방추출물을 다시 흰쥐의 정맥내에 투여하여 신속하고도 강력한 요량 및 요중 Na이온 배설량의 증가를 관찰하였다. 그러나 심실추출물은 심방추출물과 같은 효과를 보이지 않아 요량의 증가 및 요중 Na이온의 증가와 관련된 물질은 심방에 국한하여 존재한다고 여겨졌다(Garcia *et al.*, 1982). 이와 같이 심방에 주로 존재하며 그 기능이 요량과 Na이온의 배설을 증가시키는 것과 관련된 이 물질은 peptide로 구성되어 있음이 밝혀져 atrial natriuretic peptide(ANP)로 명명되었으며, ANP가 혈류중으로 분비됨에 따라 심장은 일반적인 순환

기관 이외에 내분비기관으로서의 기능을 더 추가하게 되었다(Cantin and Genest, 1986).

ANP는 앞서 언급한 기능 뿐만 아니라 혈관의 평활근을 이완시키고(De Bold *et al.*, 1981; Cantin and Genest, 1985), renin과 aldosterone의 분비를 억제(De Lean *et al.*, 1984; Obana *et al.*, 1985)하는 등 다양한 생리현상에 관여함이 여러 연구자들에 의하여 밝혀졌다. 아울러 ANP는 포유동물 뿐만 아니라 포유동물 이하의 심방에도 존재하며, 그 분포 및 생물학적 활성도는 종에 따라서 차이가 있는 것으로 나타났다(De Bold and Saleno, 1983). 방사면역측정법(RIA)을 이용 ANP의 미량측정이 가능하여짐에 따라 포유동물에서는 irANP가 심방에 주로 존재하나 포유동물 이하의 척추동물에서는 심방 뿐만 아니라 심실에도 많은 양의 irANP가 존재함이 밝혀졌다(Netchitailo *et al.*, 1986).

최근 다양한 동물군의 심방에 존재하는 irANP

의 비교연구에서는 포유류로부터 어류에 이르기 까지 심장조직내 irANP의 정량적인 수준과 분자적 특성등이 조사되었다(Kim *et al.*, 1989). 어류의 심장에 irANP가 존재한다는 사실로부터 어류의 심장 역시 포유류에서와 마찬가지로 내분비 기관으로서 작용할 수 있으리라 추측되었으나(Nakamura *et al.*, 1987; Kim *et al.*, 1989), 어류의 심장내 irANP의 함량을 변화시키는 요인이 무엇인지 등에 관하여서는 아직까지 조사된 바가 적다. 따라서 본 연구에서는 담수어류인 미꾸라지를 재료로 심장 및 기타조직 내 irANP의 존재와 그 분자적 특성을 밝히고 아울러 온도변화에 의한 irANP의 함량변동을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

미꾸라지 (*Misgurnus mizolepis* G.)는 체중이 20-30 g인 것으로 암수 구별없이 구입하여 사용하였다.

조직내 irANP의 추출

심장과 동맥구를 미꾸라지로부터 각각 적출하여 4°C의 생리식염수(0.65% NaCl)로 혈액을 제거하고 조직무게의 10배 부피에 해당하는 0.1 N acetic acid(aprotinin 200 KIU, EDTA 1 mg/ml, PMSF 100 mg/ml 첨가)에 넣어 100°C에서 10분간 가열하였다. 그 후 조직을 4°C에서 Polytron homogenizer로 분쇄한 후 10,000 g로 15분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 이 상층액은 Sep-pak C₁₈ cartridge(Waters Associates, Milford, MA, USA)를 통과시켜서 irANP를 농축하였는데, 그 과정은 다음과 같다(Cho *et al.*, 1988a, b, c). 4 ml의 100% acetonitrile과 4 ml의 0.1% trifluoroacetic acid(TFA)로 활성화시킨 Sep-pak C₁₈ cartridge에 앞서 얻은 상층액을 채우고 4 ml의 0.1% TFA로 씻어냈다. Sep-pak cartridge에 흡착된 irANP는 1.5 ml의 60% acetonitrile로 용출시켰으며, 여기서 얻은 추출물은 Speed-Vac concentrater(Savant, U.S.A.)를 이용하여 건조시켰다.

irANP의 분자적 특성 조사

1) Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography

시료의 준비과정은 상기한 바와 같았으며 Column은 μ Bonda-pak C₁₈(Waters제)를 사용하였다. Sep-pak를 통과시켜 농축건조된 irANP는 0.1 ml의 0.1% TFA에 다시 녹여 10,000 g로 원심분리한 후 상층액만을 얻어 column에 주입하였다. 시료의 용출은 acetonitrile(0.1% TFA 포함)을 20%에서 60%까지 일정한 농도구배를 유지하면서 40분간 하였다. 용출속도는 분당 1 ml이었으며, 여기서 얻어진 시료는 Speed-Vac concentrater를 이용하여 건조시킨 뒤 방사면역측정에 사용하였다.

2) Gel Permeation High Performance Liquid Chromatography

Column은 TSK-GEL G 2000 SW(7.5 × 300 mm, Toyo Soda제)를 사용하였다. 용출에 사용한 완충액은 30% acetonitrile(0.1% TFA 포함)이었으며 용출속도는 분당 0.3 ml이었다. 분획한 시료는 RP-HPLC에서와 같은 과정을 거친 후 정량하였다.

미꾸라지 심장내 irANP의 측정

1) Atriopeption III(AP III)의 항체 생산

Goodfriend 등(1964)의 방법에 따라 AP III를 bovine thyroglobulin과 conjugation시키고 이 conjugate를 같은 량의 Freund's complete adjuvant와 혼합하여 6주간 매주 1회씩 토끼(Newzealand white)의 여러부위(피하층과 근육 등)에 주사하였다(Cho *et al.*, 1988a). 제 1차 면역 실험을 실시한 2주 후 채혈하여 혈청내 항체의 titer를 측정하였다. 항혈청은 56°C에서 30분간 비등화시켜 사용하였다. Titre가 결정된 항혈청은 사용에 편리하도록 소량(10-20 μ l)으로 나누어 -70°C에 보관하였다.

2) Second antibody의 생산

제 2차 항체의 생산은 일반적인 방식에 준하였다(Johnstone and Thorpe, 1987). 토끼의 gam-

maglobulin(Sigma제) 5 mg을 생리적 식염수 1 ml에 녹인 후 Freund's complete adjuvant 1 ml과 섞어 염소 당 1 ml씩 근육주사 또는 피하주사하여 1차 면역시켰다. 제 1차 면역 후, Freund's incomplete adjuvant에 동일항원을 섞어 1주일 간격으로 1개월간 추가 면역하였으며, 최종 면역 1개월 후에 다시 추가면역을 1회 실시하고, 그 1주일 뒤에 채혈하여 항혈청을 얻었다. 항혈청은 -70°C 에 보관하였으며 방사면역측정시에는 20배 희석하여 사용하였다.

3) AP III의 iodination

^{125}I -AP III의 제조를 위한 iodination은 chloramin-T 방법을 응용한 Cho 등의 방법에 의하였다(Cho *et al.*, 1988a, b, c). 간략히 기술하면 500 mM sodium phosphate buffer(pH 7.4)가 25 μl 들어있는 Eppendorf 실험관에 5 μg 의 iodide-125(1 mCi/10 μl , Amersham제) 10 μl 를 첨가하였다. 여기에 iodination 직전에 만든 chloramin-T(1 mg/ml)를 첨가하고 실온에서 40초간 조심스럽게 혼합하였다. 이어 30% BSA를 첨가하여 반응을 정지시킨 후 이 시료를 Sephadex G-25 column에 채우고 0.5 ml/min의 속도로 용출하였다. 용출 완충액은 0.1 N acetic acid(0.3% BSA, 0.3% lysozyme과 0.1% glycine 첨가)을 사용하였다. 방사활성도가 높은 분획에는 aprotinin(200 KIU/ml)이 들어있는 완충액을 3 ml 더 첨가하여 AP III의 파괴를 방지하였다. 분획한 시료중 iodinated AP III의 위치에 해당하는 분획은 시험관당 3×10^6 cpm이 되도록 분주하여 -20°C 에 보관하였다. irANP의 정량분석시에는 시험관당 8×10^3 cpm으로 희석하여 사용하였다.

4) IrANP의 방사면역측정법

IrANP의 방사면역측정법에 사용한 완충액은 0.1 M Tris acetate 완충액(0.2% neomycin, 3 mM EDTA, 50 BAEE/ml soybean trypsin inhibitor, 0.02% sodium azide 및 1% BSA 첨가)이었다. 본 실험에서는 100 μl 의 항혈청(4천배 희석)과 시료 100 μl 를 4°C 에서 24시간 반응시키고 ^{125}I -AP III를 100 μl 첨가하였으며, 그

24시간 후에 제 2차 항체를 이용하여 bound form과 free form을 분리하였다. 분리된 bound form은 gamma counter를 이용하여 그 radioactivity를 측정하였다.

Immunoprecipitation

농축건조된 조직추출물을 100 mM Tris-HCl buffer(pH 7.4)에 재조성 한 후 항 AP III 항혈청(anti-AP III antiserum)을 약 1:100의 비가 되도록 혼합하여 4°C 에서 12시간 이상 반응시켰다. 이어서 제 2차 항체를 1:100의 비로 첨가하고 4°C 에서 6시간 반응시킨 후 반응액을 10,000 g로 원심분리하고 침전물을 얻었다. 침전물은 전기영동에 사용하는 시료 완충액(0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 10% glycerol, 10% (w/v) sodium dodecyl sulfate(SDS), 5% (v/v) β -mercaptoethanol, 0.05% (w/v) bromophenol blue)에 녹여 100°C 에서 3분간 끓이고 다시 원심분리하여 상층액을 구하였다. 전기영동은 Laemmli(1970)의 방법에 따라 SDS의 존재하에서 17% (w/v) acrylamide slab겔을 사용하여 실시하였으며, 전기영동 후 단백질을 silver staining kit(Bio-Rad, Richmond, CA, U.S.A.)를 이용하여 염색하였다.

Western blot analysis

순수한 조직 추출물을 상기한 바대로 전기영동한 후 겔을 20% (v/v) glycerol이 포함되어 있는 50 mM Tris-HCl buffer(pH 7.4)에 30분간 renaturation시켰다(Rosenbaum *et al.*, 1989). 이어서 겔을 12시간 동안 확산에 의하여 nylon membrane(Bio-Rad, U.S.A.)에 transfer하였으며, blots상의 비특이적인 결합을 방지하기 위하여 3% BSA-phosphate buffered saline(PBS)로 blocking을 하였다. PBS로 nylon membrane을 두차례 씻어낸 뒤 항 AP III 항혈청 및 horse radish peroxidase가 결합된 2차 항체(Sigma, U.S.A.)를 단계별로 각각 반응시키고, 마지막으로 0.06% (w/v) 3,3'-diamino benzidine(DAB)과 3% (v/v) 과산화수소수가 들어 있는 50 mM Tris-HCl 완충액에 membrane을 넣어 발색시켰다.

온도차에 따른 irANP의 함량변화조사

온도가 조직내 irANP 함량변동에 따라 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 미꾸라지를 각각 21°C와 6°C의 수온에 1주일간 적응시켰다. 미꾸라지가 들어있는 수조는 항상 온도를 일정하게 유지하였고, 공기 펌프를 이용하여 공기를 주입시켰다. IrANP의 추출 및 방사면역 측정은 앞서 언급한 바와 같았다.

통계처리

실험결과의 통계처리는 student paired t-test와 unpaired t-test에 의하였으며 p값이 최소한 0.05 이하인 경우 유의한 것으로 판정하였다. 실험치는 평균 ± 표준오차로 나타내었다.

결 과

IrANP의 측정을 위한 방사면역 측정법

미꾸라지의 심장에 미량으로 존재하는 irANP의 방사면역측정법은 disequilibrated condition으로 하였으며, 이때 항원-항체 복합체의 분리에는 제 2 차 항체를 이용하였다. 미꾸라지의 심장 및 동맥구 추출액의 연속적인 희석곡선은 AP III의 표준곡선에 평행한 ANP immunoactivity를 보여 조직내 irANP의 존재를 알 수 있었으며 아울러 본 연구에 사용한 항 AP III rabbit antibody는 미꾸라지의 irANP 측정에도 유용함을 관찰하였다 (Fig. 1). 그러나 미꾸라지의 혈장내 irANP의 측정은 미꾸라지의 혈장이 극히 적은양으로 얻어진다는 점과 혈장내 irANP의 direct assay에 어려움이 있으므로 해서 측정이 이루어 지지 않았다.

미꾸라지의 심장 및 동맥구의 irANP의 분자적 특성

분자의 극성을 이용하여 분리하는 RP-HPLC에서는 심장뿐만 아니라 동맥구의 추출물에도 두 위치의 용출부위를 관찰하였다(Fig. 2). 합성 AP III의 위치와 동일한 retention time을 나타낸 미꾸라지의 irANP는 저분자량으로, rat의 pro-ANP와 retention time이 일치되어 나타난다

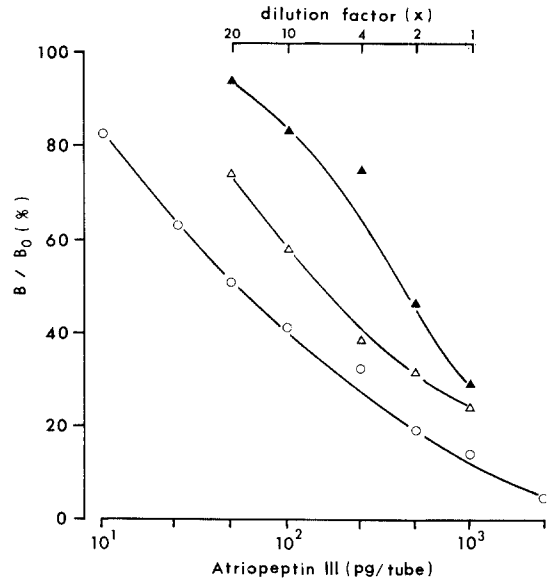


Fig. 1. A representative standard curve of atriopeptin III (○) and serial dilution curves of the heart (△) and bulbus arteriosus (▲) extract of the loach, *Misgurnus mizolepis* G. Bo. ¹²⁵I-labelled tracer bound at zero-dose; B, ¹²⁵I-labelled tracer bound at dose shown on abscissa. Bo and B values are corrected for non-specific binding (NSB).

른 하나의 irANP는 고분자량인 것으로 여겨졌다. 한편, 저분자량의 irANP는 고분자량의 irANP보다도 더 극성인 성질을 보였다.

미꾸라지 irANP의 분자량 확인을 위한 gel permeation HPLC에서는 marker로 사용한 cytochrome C(CC, 분자량 12.4 K)의 부위 및 합성 AP III(분자량 2.8 K)와 retention time이 일치하는 두가지 분자형태가 관찰되었다(Fig. 3). 이로써 미꾸라지의 심장과 동맥구의 조직내에는 고분자량의 pro-ANP와 저분자량의 irANP가 존재함을 확인하였다.

한편 HPLC를 이용한 irANP의 분자특성관찰에 있어서 심장조직과 동맥구조직 사이의 irANP 농도차이는 여러 개체로부터 배어낸 두 조직의 무게(wet weight) 차로 인한 것으로, 시료제작과정을 거쳐 HPLC column에 주입한 조직추출액의 irANP 함량이 다르게 농축되어 있기 때문이다.

Immunoprecipitation 및 Western blot analysis

미꾸라지의 심장과 동맥구 조직내 irANP의 분

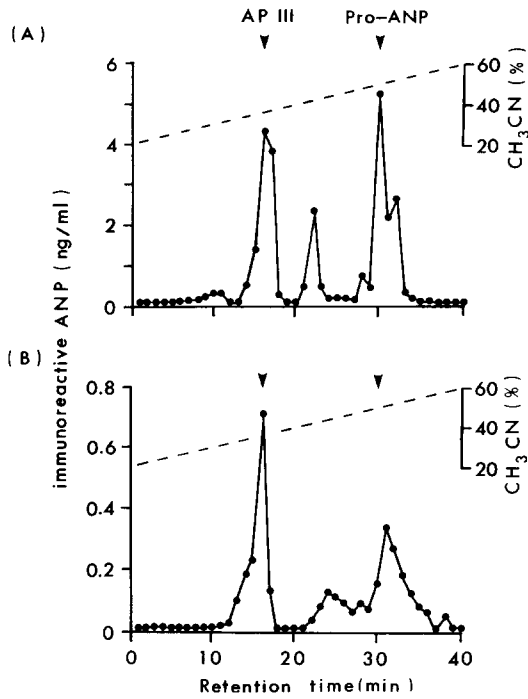


Fig. 2. Reverse phase HPLC profiles of irANP in the heart (A) and bulbus arteriosus (B) of the loach, *Misgurnus mizolepis* G.. Arrows indicate the retention time of AP III and rat pro-ANP, respectively.

사양 확인을 전기영동법과 관련된 immunoprecipitation(Fig. 4) 및 Western blot analysis(Fig. 5)를 실시한 결과, 분자량이 14 K인 lysozyme과 거의 동일선상에 위치한 band가 관찰되므로써 심장과 동맥구 조직추출액내의 pro-ANP의 존재를 확인하였다.

온도차에 따른 irANP의 함량변동

21°C 상태하에서 미꾸라지의 동맥구는 60.59 ± 5.04 pg/mg(n = 8), 심장은 61.56 ± 15.08 pg/mg(n = 7)으로서 두 조직간의 정량적인 차이를 보이지 않았다(Fig. 4). 그러나 저온(6°C)에 적응시킨 미꾸라지의 경우에 있어서는 동맥구 조직의 irANP는 32 ± 3.89 pg/mg(n = 9)으로 21°C에서보다 유의하게 낮았으며(p < 0.01), 심장의 irANP는 49.01 ± 6.87 pg/mg(n = 10)으로서 21°C에서와 큰 차이가 없었다. 한편 저온상태하의 미꾸라지 동맥구 조직내 irANP 함량은 심

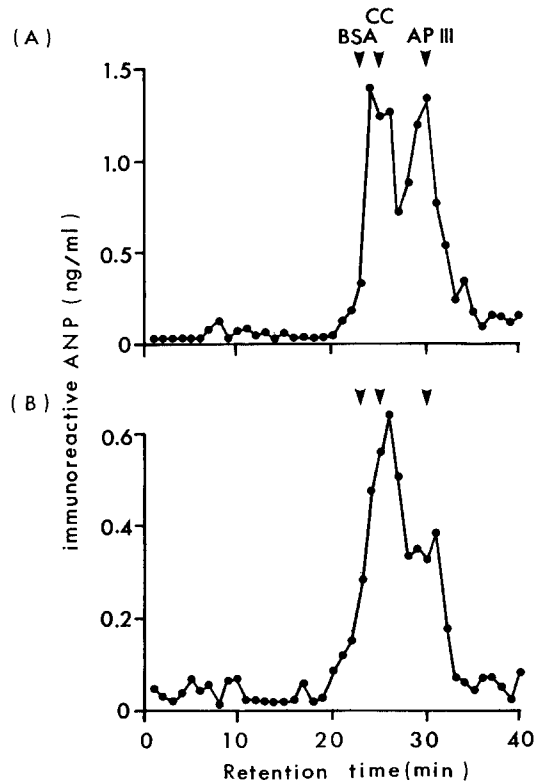


Fig. 3. Gel permeation PHLC profiles of irANP in the heart (A) and bulbus arteriosus (B) of the loach, *Misgurnus mizolepis* G.. Arrows indicate the retention time of bovine serum albumin (BSA), cytochrome C (12.3 K), and AP III, respectively.

장조직에서 보나도 현저하게 감소되어 있음이 관찰되었다(p < 0.05; Fig. 6).

고 찰

포유동물의 심장에 존재하는 단백질 호르몬인 ANP는 심실보다는 주로 심방에 함유되어 있는데, 유전자 수준에서 조사한 바에 의하면 심실내 ANP의 mRNA는 심방의 1-2% 밖에 되지 않아 ANP의 합성이 심방보다도 적게되기 때문인 것으로 나타났다(Baxter et al., 1988). 그러나 확장된 심실벽에서는 ANP의 함량이 증가되는 것으로 보고되었다(Lattion et al., 1986; Day et al., 1987). 이와는 달리 벽장어(Reinecke et al., 1987)와 뱀

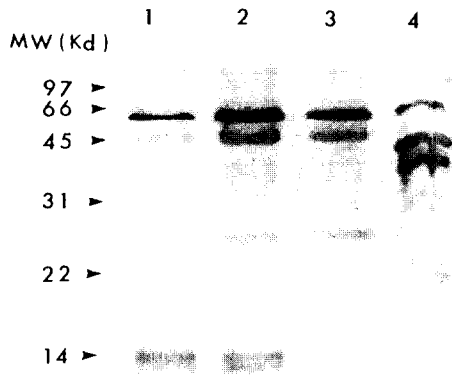


Fig. 4. SDS-PAGE (17%) of immunoprecipitated products of the heart and the bulbus arteriosus extract of the loach. Lane 1: immunoprecipitate of the heart extract; lane 2: immunoprecipitate of the bulbus arteriosus extract; lane 3: blank of the immunoprecipitate of anti-serum and secondary antibody; lane 4: molecular weight marker. Molecular weight markers were phosphorylase B (97 K), bovine serum albumin (66 K), ovalbumin (45 K), carbonic anhydrase (31 K), soybean trypsin inhibitor (22 K), and lysozyme (14 K).

장어(Nakamura *et al.*, 1987)를 재로로한 연구결과에서는 ANP를 지닌 과립물질이 심방과 심실 모두에 많이 분포하고 있음이 밝혀져 포유동물과는 다른 양상을 나타내는 것으로 보고되었다. 한편 어류의 심장에도 존재하는 ANP의 분자적 특성에 관해서는 연구된 바가 적다. 본 연구에서는 담수어류인 미꾸라지의 심장전체조직을 사용함으로써 심방과 심실조직내 irANP의 함량차이를 확인하지 못하였으나, 심장조직과 심장의 조직인 동맥구 조직내의 irANP의 분자적 특성과 함량변동을 조사하므로써 심장의 조직의 irANP 존재 및 특성을 비교할 수 있었다.

포유동물뿐만 아니라 포유동물 이하의 여러 척추동물의 심방에 존재하는 irANP는 두가지 형태인 고분자량(15 K)의 pro-ANP와 저분자량(2.8 K)의 irANP로 되어있음이 알려져 있다(Miyata *et al.*, 1985; Cernacek *et al.*, 1988; Kim *et al.*,

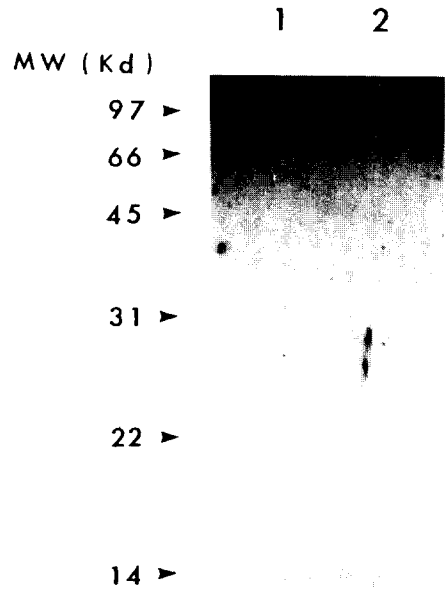


Fig. 5. Western blot analysis of the bulbus arteriosus (lane 1) and the heart extract (lane 2) of the loach. Proteins in the extracts were separated by electrophoresis in 17% SDS-PAGE. The gel was transferred onto a nylon membrane by simple diffusion, incubated with anti-AP III antiserum and then with horse radish peroxidase conjugated secondary antibody, and developed with 3,3'-diaminobenzidine and hydrogen peroxide.

1989). 본 연구를 통하여 미꾸라지의 심장과 동맥구에도 모두 분자량 및 특성이 포유동물과 유사한 두가지 형태의 irANP가 관찰되었으며 그 주된 분자형태는 고분자량인 것으로 나타났다.

포유동물의 심방으로부터 irANP 유리에 영향을 주는 요인으로는 심방조직의 물리적인 확장(Cho *et al.*, 1988b, c)이나, 식염수의 섭취 또는 정맥내 주입(Kato *et al.*, 1986; Kohno *et al.*, 1987; Hodsman *et al.*, 1988; Nishida *et al.*, 1988) 등이 알려져 있으며, 조직내 irANP의 함량변동 요인으로는 glucocorticoid의 처리와 심근경색증에 의한 심장조직의 손상 등으로 알려져 있다(Mendez

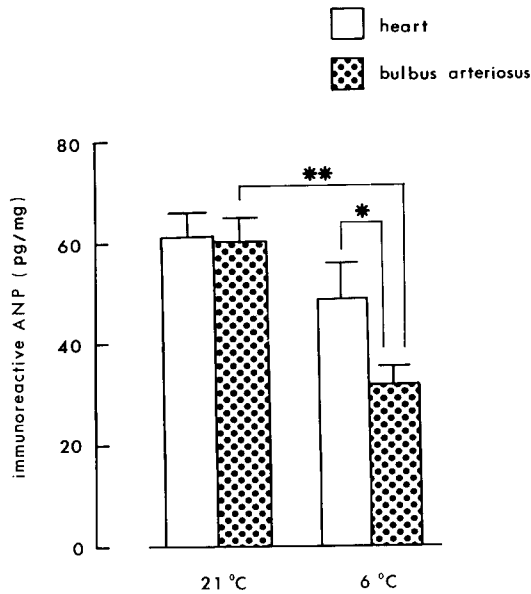


Fig. 6. Change of irANP content in heart and bulbus arteriosus of the loach, *Misgurnus mizolepis* G., according to the cold acclimation (6°C). Horizontal bars show standard error mean. *P < 0.05, **P < 0.01.

et al., 1987; Edward *et al.*, 1988). 또한 쥐의 심방을 이용하여 온도에 따른 irANP의 유리를 *in vitro* 실험을 통해 관찰한 Bilder 등(1986)의 연구에서는 온도를 낮춤으로써 심방조직으로부터 irANP의 유리가 현저히 감소한다고 보고하였다. 이와 같은 현상은 온도가 세포막과 원형질의 유동성, 그리고 vesicle fusion 및 이온 유출입에 영향을 미치기 때문인 것으로 해석하였다.

포유동물 이하의 척추동물을 이용한 irANP의 조직내 함량변동 및 생리적인 기능을 관찰한 예는 아직까지 많지 않다. 담수어류인 미꾸라지를 재료로 한 본 연구에서는 미꾸라지를 저온에 적응시킨 경우 심장내의 irANP 함량은 약간 감소한 경향을 나타냈으며, 동맥구에서는 유의한 감소를 보였다. 이로써 변온동물인 미꾸라지에서는 온도차가 irANP 합성의 변화와 관계될 것으로 사료되었다.

이상 논의한 바와 같이 미꾸라지의 심장 및 동맥구에 존재하는 irANP는 포유동물에서 발견된 irANP와 분자적 특성이 유사하며, 또한 고분자량의 irANP가 관찰되므로써 미꾸라지의 irANP

는 이들 조직내에서 합성되어질 것으로 생각되었다. 또한 온도는 조직내의 irANP의 함량변동을 일으키는 요인임을 알수 있었다. 한편 ANP의 기능이 체액의 조절과 전해질대사의 항상성을 유지하는데 있다는 점을 감안하여 볼 때, 어류가 서식하는 물의 염류농도가 변화됨에 따라서 어류체내의 생리적인 변화와 더불어 조직내 irANP의 함량변동이 예상되고 있는 바 이에 대한 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

사 사

본 연구를 수행함에 있어서 물심양면의 도움을 베풀어 주신 전북의대 생리학교실의 교수님 및 교실직구들에게 감사함을 드립니다. 또한 논문의 원고교정에 도움을 주신 우석대학교 생물공학과 소준노교수님과 Western blot analysis에 필요한 peroxidase conjugated anti-IgG를 제공하여준 전북대학교 생물학과 생화학교실의 유강열선생님께 감사함을 포함합니다.

인용문헌

- Baxter, J. D., J. A. Lewicki, and D. G. Gardner, 1988. Atrial natriuretic peptide. *Biotechnology* **6**: 529-546.
- Bilder, G. E., T. L. Schofield, and E. H. Blaine, 1986. Release of atrial natriuretic factor. Effects of repetitive stretch and temperature. *Am. J. Physiol.* **251**: F817-F821.
- Cantin, M., S. Benthimol, J. C. Berlinguer, Y. Castonguay, and M. Huet, 1975. Ultrastructural cytochemistry of atrial muscle cells. V. Characterization of the specific granules in the human left atrium. *J. Ultrastruc. Res.* **52**: 179-192.
- Cantin, M., and J. Genest, 1985. The heart and the atrial natriuretic factor. *Endocrine Rev.* **6**: 107-127.
- Cantin, M., and J. Genest, 1986. The heart as an endocrine gland. *Sci. Am.* **254**: 62-67.
- Cernacek, P., E. Macher, J. C. Crawhall, and M. Levy, 1988. Molecular forms of atrial natriuretic peptides in dog atrium and plasma. *Life Sci.* **42**: 2533-2539.
- Cho, K. W., S. H. Kim, G. Y. Koh, and K. H. Seul, 1988a. Renal and hormonal response to atrial natriuretic peptide and turtle atrial extract in the freshwa-

- ter turtle, *Amyda Japaonica*. *J. Exp. Zool.* **247**: 139-145.
- Cho, K. W., K. H. Seul, H. Ryu, S. H. Kim, and G. Y. Koh, 1988b. Characteristics of distention-induced release of immunoreactive atrial natriuretic peptide in isolated perfused rabbit atria. *Regul. Pept.* **22**: 333-345.
- Cho, K. W., K. H. Seul, S. H. Kim, H. Ryu, K. M. Seul, and G. Y. Koh, 1988c. Epicardial release of immunoreactive atrial natriuretic peptides in inside-out perfused rabbit atria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **153**: 815-821.
- Day, M. M., D. Schwartz, R. C. Wiegand, P. T. Stockman, S. R. Brunnert, H. E. Tolunay, M. G. Currie, D. G. Standaert, and P. Needleman, 1987. Ventricular atropoception: unmasking of mRNA and peptide synthesis by hypertrophy or dexamethasone. *Hypertension* **9**: 485-491.
- De Bold, A. J., 1979. Heart atria granularity effects of changes in water electrolyte balance. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **162**: 508-511.
- De Bold, A. J., H. B. Borenstein, A. T. Veress, and H. Sonnerberg, 1981. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci.* **28**: 89-94.
- De Bold, A. J., and T. A. Salerno., 1983. Natriuretic activity of extracts obtained from various rat tissues. *Can. J. Pharmacol.* **61**: 127-130.
- De Lean, A., K. Racz, J. Gutkowska, T. T. Nguyen, M. Cantin, and J. Genest, 1984. Specific receptor-mediated inhibition by synthetic atrial natriuretic factor of hormone-stimulated steroidogenesis in cultured bovine adrenal cells. *Endocrinology* **115**: 1636-1638.
- Edwards, B. S., D. M. Ackermann, M. E. Lee, G. S. Leeder, L. E. Wold, and J. C. Burnett, 1988. Identification of atrial natriuretic factor within ventricular tissue in hamsters and humans with congestive heart failure. *J. Clin. Invest.* **81**: 82-86.
- Garcia, R., M. Cantin, G. Thibault, H. Ong, and J. Genest, 1982. Relationship of specific granules to the natriuretic and diuretic activity of rat atria. *Experientia* **38**: 1071-1073.
- Goodfriend, T. L., L. Levine, and G. D. Fasman, 1964. Antibodies to bradykinin and angiotensin: A use of carbodiimides in immunology. *Science* **144**: 1344-1346.
- Hodsman, G. P., R. W. Harrison, E. Sumithran, and C. I. Johnston, 1988. Atrial natriuretic peptide and total exchangeable body sodium: relationship in rats with chronic myocardial infarction. *Clin. Sci.* **74**: 659-663.
- Johnstone, A., and R. Thorpe, 1987. Immunocytochemistry in practice (2nd ed.). *Blackwell Sci. Public., London*, pp. 30-34.
- Kato, J., O. Kida, S. Nakamura, A. Sasaki, K. Takiguchi, and K. Tanaka, 1986. Dissociation between plasma and atrial content of atrial natriuretic polypeptide (ANP) following sodium load in rats. *Life Sci.* **39**: 2623-2627.
- Kim, S. H., K. W. Cho, G. Y. Koh, K. H. Seul, J. N. So, and H. Ryu, 1989. Phylogenetical studies on the immunoreactive atrial natriuretic peptide in the heart. *Gen. Comp. Endocrinol.* **74**: 127-135.
- Kisch, B., 1956. Electron microscopy of the atrium of the heart. I. Guinea pig. *J. Exp. Med. Surg.* **14**: 99-112.
- Kohno, M., P. Sambhi, P. Eggena, K. Clegg, Y. Kanayama, K. Takaori, and T. Takeda, 1986. An accelerated increase of circulating atrial natriuretic polypeptide (ANP) in salt-loaded spontaneously hypertensive rats. *Hormone Metab. Res.* **18**: 147-148.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lattion, A. L., J. B. Michel, e. Arnauld, P. Corvol, and F. Sombrier, 1986. Myocardial recruitment during ANF mRNA increase with volume over load in the rat. *Am. J. Physiol.* **251**: H890-H896.
- Mendez, R. E., J. M. Peffer, F. V. Ortola, K. D. Bloch, S. Anderson, J. G. Siedman, and b. M. Borenner, 1987. Atrial natriuretic peptide transcription, storage, and release in rat with myocardial infarction. *Am. J. Physiol.* **253**: H1449-H1455.
- Miyata, A., K. Kangawa, T. Toshimori, T. Hatoh, and H. Matsuo, 1985. Molecular forms of atrial natriuretic polypeptides in mammalian tissues and plasmas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **129**: 248-255.
- Nakamura, S., T. Hirohama, H. Umera, and T. Aoto, 1987. Effect of salinity on ANP-like substance and ultrastructures in eel cardiocytes. *18th ann. Meeting of the Zool. Soc. of Japan.* **6**: 1087.
- Nechitailo, P., M. Feuilleley, G. Pelletier, M. Cantin, A. De Lean, F. Le Boulenger, and H. Vandry, 1986. Localization and characterization of atrial natriuretic factor (ANF) like peptide in the frog atrium. *Peptides* **7**: 573-579.
- Nishida, Y., A. Miyata, H. Morita, N. Umera, K. Kangawa, H. Matsuo, and H. Hosome, 1988. Effect of rapid sodium load on circulating atrial natriuretic polypeptide. *Am. J. Physiol.* **254**: F540-F546.
- Obana, K., M. Naruse, K. Naruse, H. Sakurai, H. Demura, t. Inagami, and K. Shizume, 1985. Synthetic rat atrial natriuretic factor inhibits in vitro and in vivo renin secretion in rats. *Endocrinology* **117**: 1282-1284.
- Reinecke, M., D. Betzler, and W. G. Forssman, 1987. Immunocytochemistry of cardiac polypeptide hormones (cardiodilatin/atrial natriuretic polypeptide) in

- brain and hearts of *Myxine glutinosa* (Cyclostomata).
Histochemistry **86**: 233-239.
- Rosenbaum, L. C., G. Nilaver, H. M. Hagman, and E. A.
Neuwelt, 1989. Detection of low-molecular-weight polypeptides on nitrocellulose with monoclonal antibodies. *Anal. Biochem.* **183**: 250-257.
- (Accepted October 30, 1991)

**Characterizations of Immunoreactive Atrial Natriuretic Peptide
in the Heart of the Loach, *Misgurnus mizolepis* G.**

Hoon Ryu and Geum Young Lee (Department of Biology, College of Natural Sciences, Chunbuk National University, Chonju 560-756, Korea)

In this study we partially characterized the immunoreactive atrial natriuretic peptide (irANP) in the heart of the loach (*Misgurnus mizolepis* G.). We have also determined whether temperature change has any effect on irANP levels in the heart.

IrANP was found both in the heart and the bulbus arteriosus of the loach. Mainly two forms of irANP, high and low molecular weight, were found in the heart and the bulbus arteriosus of the loach. During the cold temperature (6°C) acclimation of the loach decrease in irANP levels was observed more significantly in the bulbus arteriosus than in the heart.

The presence of pro-ANP in the heart and the bulbous arteriosus of the loach indicates that these tissues contain irANP as well as in the mammalian heart.