

## 임신부 뇨로부터 정제된 인간 상피세포 증식 인자 유사체의 *in vitro* bioassay 및 특성

박세철 · 전재현 · 남정현 · 권태종<sup>1</sup> · 고인영 · 유광현\*  
(주)유한양행 중앙연구소, <sup>1</sup>건국대학교 미생물공학과

***In vitro* Bioassay and Characterization of Human Epidermal Growth Factor Derivatives from Pregnant Human Urine.** Se-Cheol Park, Jae-Hyun Jun, Jung-Hyun Nam, Tae-Jong Kwon<sup>1</sup>, In-Young Ko and Kwang-Hyun You\*. *Laboratory of Biotechnology, Yuhan Research Center, Yuhan Corporation, Kunpo-si 435-030, Korea, <sup>1</sup>Department of Microbial Engineering, Kon Kuk University, Seoul 133-701, Korea* – Natural human epidermal growth factor (nhEGF) was purified from pregnant human urine by benzoic acid adsorption, DEAE-Sepharose ion exchange, and immunoaffinity chromatography. The purified nhEGF was further separated into four fractions using Bondapak C<sub>18</sub> HPLC system. Following characterization by Western blot analysis and double immunodiffusion, we found that each fraction corresponds to four derivatives of the nhEGF. For biological analysis of nhEGF, we optimized the labeling time and serum concentration for the incorporation of 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU), a non-radioactive alternative for [<sup>3</sup>H]-thymidine uptake, into NIH 3T3 cells. The DNA synthesis of NIH 3T3 cells was gradually increased at the nhEGF concentrations between 0.1~10 ng/ml in the Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) containing 0.2% Fetal calf serum (FCS). When we assayed the biological activity of four fractions, the activity of the second fraction was superior to that of the others. Based on the results from the HPLC analysis spiked with recombinant human epidermal growth factor (rhEGF) and amino acid sequencing, we concluded that the second fraction was nhEGF and the other three fractions were the derivatives of nhEGF. In addition, the proportion of nhEGF was approximately 46% as compared with that of the other three derivatives.

1930년대에 임신 기간에 위궤양에 걸리는 경우가 매우 적다는 임상적 관찰 이후 임신한 사람의 뇨에서 위산 분비를 억제하는 물질이 있다는 것이 처음으로 밝혀졌고(1), 그 후에 임신한 여자뿐만 아니라 보통 사람에서도 이러한 물질이 분비됨(2)을 알게 되었다. 이 물질은 뇨에서만 존재하는 것이 아니라 모유, 조식, 침, 혈장 등에서도 소량 검출되는데 1975년에 Stanley 등(3)에 의하여 human epidermal growth factor(hEGF)로 규명되었으며 위산 분비 억제 기능에 대하여 urogastrone으로도 불리어 졌다. hEGF는 53개의 아미노산으로 이루어진 polypeptide(4, 5)로서 C-말단 부분이 다양한 형태로 존재하며 C-말단의 arginine 잔기의 유무에 따라 β,γ-urogastrone으로 구분되는데 hEGF는 β-urogastrone으로 알려져 있다(6). hEGF precursor는 1,207개의 아미노산으로 구성되어 있으며 renal tubular cell에서 생합성되며 분자량이 약 128,000 dalton에 달하는 거대 분자 형태로 존재한다. 이 커다란 hEGF precursor는 nephron의 lumen에서 순환하고 있는 extracellular protease에 의해 잘려져서 성인의 경우 하루에 약 50 μg 정도 뇨로 방출한다고 보고되어 있다(7). 뇨에서 hEGF의 농도는 임신 여부와 성에 따라 다소 다른데

임신부뇨에서의 hEGF 분포에 관련된 연구는 비교적 활발히 이루어져 임신 초기(20~21주)에 hEGF의 농도가 최대로 상승하고 그 이후에는 보통사람과 유사한 농도가 되는 것으로 미루어 임신부뇨에 존재하는 hEGF는 태반(fetoplacenta) 형성에 주요한 역할을 하는 것으로 추측된다(8, 9). 한편 혈장 내의 농도는 거의 변화가 없으며 위암, 폐암, 자궁암, 유방암 환자의 뇨에서는 정상보다 높은 농도로 검출되는 것으로 밝혀졌다(10). 이러한 hEGF는 표피세포 증식을 촉진하는 성질을 이용하여 상처 및 화상의 치료, 안과 수술후 처리, 당뇨병 케양 치료, 피부 이식, 무혈청 배지 등에 사용되고 있다(11, 12).

뇨에 존재하는 hEGF의 유사체에는 C-말단 부분의 dipeptide(Arg-Leu)가 없는 hEGF(1-51)가 있는데 이러한 유사체도 정상적인 hEGF와 동등한 생물학적 활성을 가지고 있는 것으로 보고되어 있다(13). 또한 C-말단의 pentapeptide가 없는 hEGF 유사체도 존재하는데 이 hEGF(1-48)의 경우에는 원래 활성의 약 10% 정도밖에 나타나지 않는 것으로 알려져 있다(14, 15). 이와 같은 결과에서, hEGF 유사체의 경우 N-말단을 포함하여 50개 이상의 아미노산 잔기를 가지고 있을 때에만 hEGF의 생물학적 활성을 나타낼 수 있으며 C-말단에 위치하는 아미노산 잔기들은 hEGF의 3차구조 형성에 중요한 역할을 하는 것으로 추정하였으나, 보통사람과

\*Corresponding author.

Key words: Human epidermal growth factor, hEGF derivatives, *in vitro* bioassay, pregnant human urine

비교하여 임신부 뇨에 존재하는 hEGF 유사체들의 자세한 특성은 아직까지 밝혀져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 hEGF에 대한 단일클론항체 affinity chromatography를 이용하여 임신부의 뇨에서 hEGF를 정제하고 HPLC를 통해 4종류의 hEGF 유사체가 뇨에 존재하는 것을 확인하였으며 이 유사체들에 대하여 NIH 3T3 세포주를 이용한 *in vitro* bioassay를 통하여 생물학적 활성을 비교하였다.

## 재료 및 방법

### 세포주 및 세포배양

hEGF *in vitro* bioassay에 사용한 세포주는 한국 세포주은행(KCLB)으로부터 분양 받은 NIH 3T3을 사용하였고 hEGF에 대한 단세포군 항체를 분비하는 세포주, EGF(8-9-1)는 (주)녹십자로부터 분양 받아 사용하였다. 세포 배양에는 10% fetal calf serum(FCS)을 포함하는 Dubecco's Modified Eagles Medium(DMEM)을 사용하여 37°C, CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다.

### 시약

hEGF에 대한 *in vitro* bioassay에 사용된 5-bromo-2'-deoxy-uridine labelling and detection kit III와 recombinant human epidermal growth factor(rhEGF)는 Boehringer Mannheim 사에서, rhEGF에 대한 단세포군 항체는 Promega 사에서, EGF의 RIA kit는 Amersham 사로부터 각각 구입하였다.

### 임신부 뇨로부터 hEGF 정제

**단세포군 항체의 정제** hEGF에 대한 단세포군 항체의 정제는 세포배양 상등액을 ammonium sulfate로 45%(W/V)되게 처리하고 4°C에서 하룻밤 방치한 다음 원심분리하여 침전물을 회수하였다. Phosphate buffered saline(PBS)으로 평형화된 protein A-Sepharose CL-4B column에 투석된 시료를 loading한 후 동일 buffer로 세척한 다음 0.1M glycine(pH 2.5)으로 용출시킨 후 즉시 중성화하였다. 정제된 항체는 ELISA 및 double immunodiffusion으로 확인하고 -35°C에 보관하여 사용하였다.

**Immunoaffinity resin의 제조** CNBr-activated Sepharose resin 5g을 0.1M NaHCO<sub>3</sub> buffer(pH 8.5)에 swelling하고 1mM HCl로 세척한 다음 25 ml의 0.2M NaHCO<sub>3</sub> buffer(pH 8.5)에 현탁하여 정제된 항체 150mg을 혼합한 후 4°C에서 하룻밤 동안 교반하였다. 반응이 끝난 resin을 회수하고 10배 부피의 0.5M NaCl/0.2M NaHCO<sub>3</sub> buffer(pH 8.5)로 세척한 다음 0.1M Tris-HCl buffer(pH 8.2)로 4°C에서 2시간 blocking시켰다. 10배 부피의 1mM HCl 용액 및 0.5M NaCl/0.1M Tris buffer(pH 8.2)로 세척하고 A<sub>280</sub>의 흡광도와

ELISA로 anti-EGF Ab의 결합 여부를 확인하였다.

**Column chromatography** 임신부 뇨를 benzoic acid 침전법(16)으로 분말화한 후 증류수로 추출하였다. 추출액은 탈염과 농축과정을 거쳐 DEAE-Sepharose ion exchange column(3×30 cm)에 흡착시키고 0.05M ammonium acetate 완충 용액(pH 5.5)으로 일차 세척한 후 0.3M ammonium acetate 완충 용액(pH 5.5)을 사용하여 시간당 100 ml의 용출속도로 elution 하였다. 용출액은 Amicon YM3 membrane(molecular weight cut off : 3,000 dalton)을 이용하여 농축 및 탈염시킨 다음 PBS 완충 용액으로 미리 평형시킨 anti-EGF Sepharose 4B column(3×10 cm)에 흡착시키고 0.1M glycine 완충 용액을 사용하여 elution하였다. 용출된 hEGF는 1M Tris·Cl(pH 8.0) 완충 용액으로 중성화하였으며 1/100 부피로 농축 후 HPLC를 위한 분석 시료로 사용하였다.

### HPLC 분석

Hitachi HPLC system(L-7400)을 이용하여 75% solvent A(0.1% trifluoro acetic acid)와 25% solvent B(0.1% TFA, 88% acetonitrile, 2% isopropanol)로 평형화되어 있는  $\mu$  Bondapak C<sub>18</sub> column(4×250 mm, Waters)에 시료 100  $\mu$ l를 loading 한 후 평형화 용매로 column 부피만큼 세척하고 25% solvent A와 75% solvent B로 분당 1%씩 증가시키는 linear gradient로 hEGF를 용출하였다. 분리된 각 hEGF 유사체들은 speed vac. concentrator로 완전히 증발시킨 후 증류수에 녹여 사용하였다.

### N-말단 amino acid 서열 결정

HPLC에서 분리된 hEGF 유사체는 아미노산 분석기(476A, ABI)를 사용하여 아미노산 서열을 분석하였다.

### hEGF 유사체 확인

hEGF 유사체는 Laemmli의 방법(17)에 의하여 SDS-PAGE를 수행한 후 hEGF에 대한 단일 클론 항체를 이용하여 Towbin 등의 방법(18)을 변형하여 Western blotting하였다.

### Radioimmuno assay

rhEGF 표준 물질과 시료를 assay buffer(10 mM sodium phosphate(pH 7.2), 0.9% NaCl, 0.1% bovine serum albumin)에 희석하여 100  $\mu$ l의 표준액과 시료액을 각각 제조하고 여기에 I<sup>125</sup>-EGF 용액(200 cpm/ $\mu$ l)을 100  $\mu$ l씩 가한 다음 hEGF에 대한 IgG 용액을 1 : 1,000으로 희석하여 200  $\mu$ l씩 첨가하였다. 37°C에서 2시간 반응시킨 후 Amerlex-M donkey anti-rabbit reagent(Amersham 사)를 500  $\mu$ l 첨가하여 20분간 반응시킨 다음 magnetic separator를 이용하여 donkey anti-rabbit reagent

gent와 결합된 부분만을 회수하고  $\gamma$ -counter(LB 951G, Berthold 사)로 hEGF를 정량 하였다.

#### BrdU(5-Bromo-2'-deoxy uridine) *in vitro* assay

24 well의 cell culture cluster(Costa 사)를 사용하여 10% FCS가 포함되어 있는 1 ml의 DMEM에 well당  $5 \times 10^4$  cell이 되도록 NIH 3T3 세포주를 접종하고 37°C, 5.0% CO<sub>2</sub> 조건하에서 이틀간 배양하였다. 2% FCS가 포함되어 있는 1 ml의 DMEM으로 배지를 교환한 후 이틀간 더 배양하였다. 각 well에서 500  $\mu$ l씩의 세포배양액을 제거하고 생물학적 활성을 측정하고자 하는 hEGF 시료 용액 500  $\mu$ l씩을 첨가하여 18시간 배양하였다. 100  $\mu$ l의 BrdU labelling solution(10 nM)을 첨가하여 37°C, 5.0% CO<sub>2</sub> 조건하에서 8시간 배양하고 DMEM 배지로 3회 세척한 후 pre-cooled fixing solution(70% ethanol, 1.6% HCl)을 가하여 -25°C에서 30분간 방치하였다. Fixing solution을 제거하고 DMEM으로 3회 세척한 후 1 ml의 nuclease S1(Boehringer Mannheim 사) 10 unit를 가하여 37°C에서 1시간 반응시켰다. 상기의 세척 과정을 거친 후 peroxidase가 결합된 anti-BrdU 항체용액 1 ml를 가하여 37°C에서 2시간동안 반응시키고 peroxidase substrate를 이용하여 발색하였다. OD<sub>405 nm</sub>에서 흡광도를 측정하여 시료액을 넣지않은 blank와의 비교로서 각 시료의 활성을 측정하였다.

### 결과 및 고찰

#### hEGF의 정제

지금까지 뇨로부터 순수한 hEGF를 정제하기 위하여 고전적인 column을 이용하려는 시도(19-21)가 있었으나 정제 과정이 복잡하였고 최종 수율도 8% 정도로 매우 낮았다. 이후 단일클론항체를 이용하거나(22) precolumn 형태의 immunoaffinity chromatography를 수행하여 hEGF를 순수 정제하는 방향으로 연구(23)가 진행되었으나 정상인 뇨와의 비교연구로서 임신부 뇨로부터 hEGF를 순수 정제하려는 시도는 이루어지지 않았다. 본 연구에서는 임신부 뇨가 흡착된 benzoic acid 추출액으로부터 hEGF를 순수정제하는 조건을 검토하

였다. 즉 Table 1에 나열한 바와 같이 ultrafiltration (molecular weight cut off : 3,000~30,000 dalton), DEAE Sepharose fast flow column, immunoaffinity chromatography 과정을 거쳐 2,315배 정제되었으며 정제수율은 41%이었다. hEGF의 분자량은 6,000 dalton으로 알려져있으며 Fig. 1에서와같이 각 정제 단계를 거쳐 정제된 분획이 SDS-polyacrylamide gel 전기영동 상으로 표준 물질과 동일한 위치에서 단일 band로 확인되었다.

#### hEGF 유사체의 특성

위에서 정제된 hEGF를 HPLC로 분석한 결과 4종류의 hEGF 유사체를 얻었으며 natural hEGF와 동일한 유사체를 확인하기 위하여 rhEGF 표준 물질과의 spiking 및 아미노산 서열 분석 등을 실시하였다. Retention time 27.8분에 분리된 fraction #2가 Fig. 2에 나타난 바와 같이 natural hEGF와 동일한 것을 알 수 있었으며, N-말단 잔기를 결정하여 실제 hEGF와 동

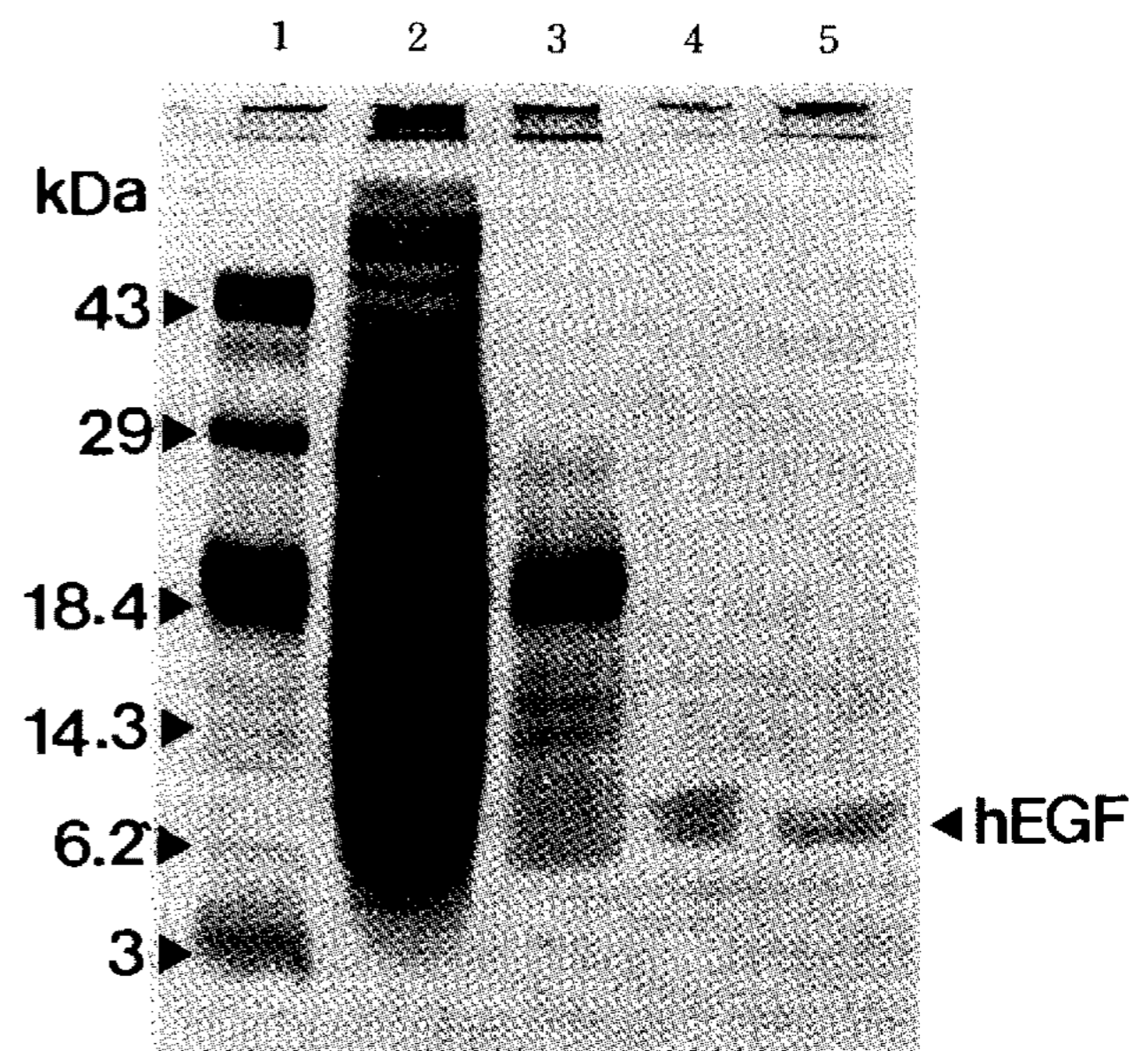


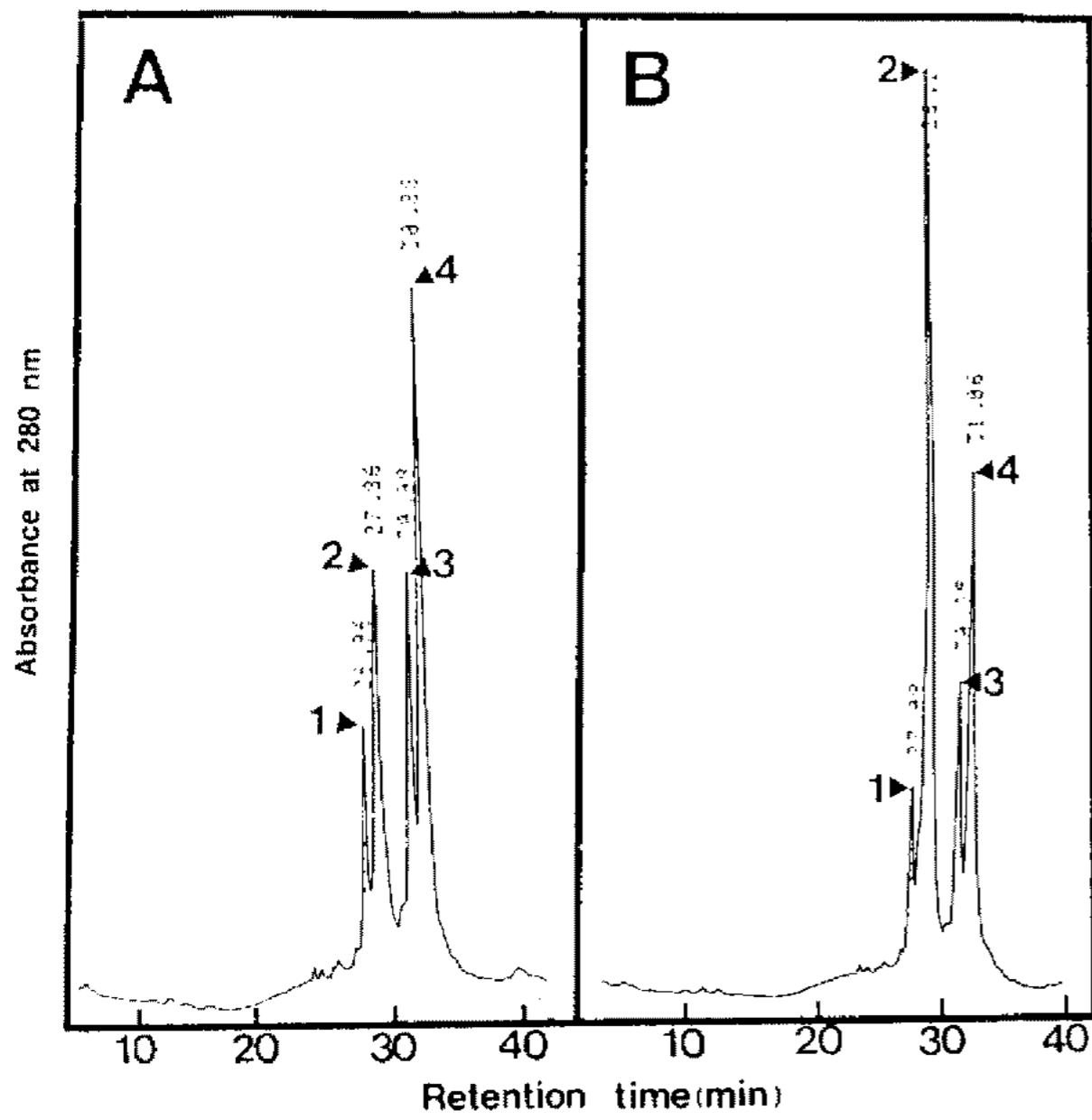
Fig. 1. SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis of hEGF, each purification steps.

Lanes 1, low range marker; 2, concentrated urine fraction; 3, DEAE Sepharose fraction; 4, immuno affinity fraction; 5, rhEGF.

Table 1. Summary of the purification of hEGF\*

Purification steps	Total Protein (mg)	hEGF ( $\mu$ g)	Specific activity [hEGF ( $\mu$ g)/total protein (mg)]	Yield (%)	Purification fold
Benzoic acid extracts	1719	399	0.2	100	1
Ultrafiltration	537.2	363	0.7	91	3.5
DEAE Sepharose chromatography	14.8	261.4	17.7	66	88.5
Immuno affinity chromatography	0.4	162	463	41	2,315

\*EGF was determined by radioimmunoassay.

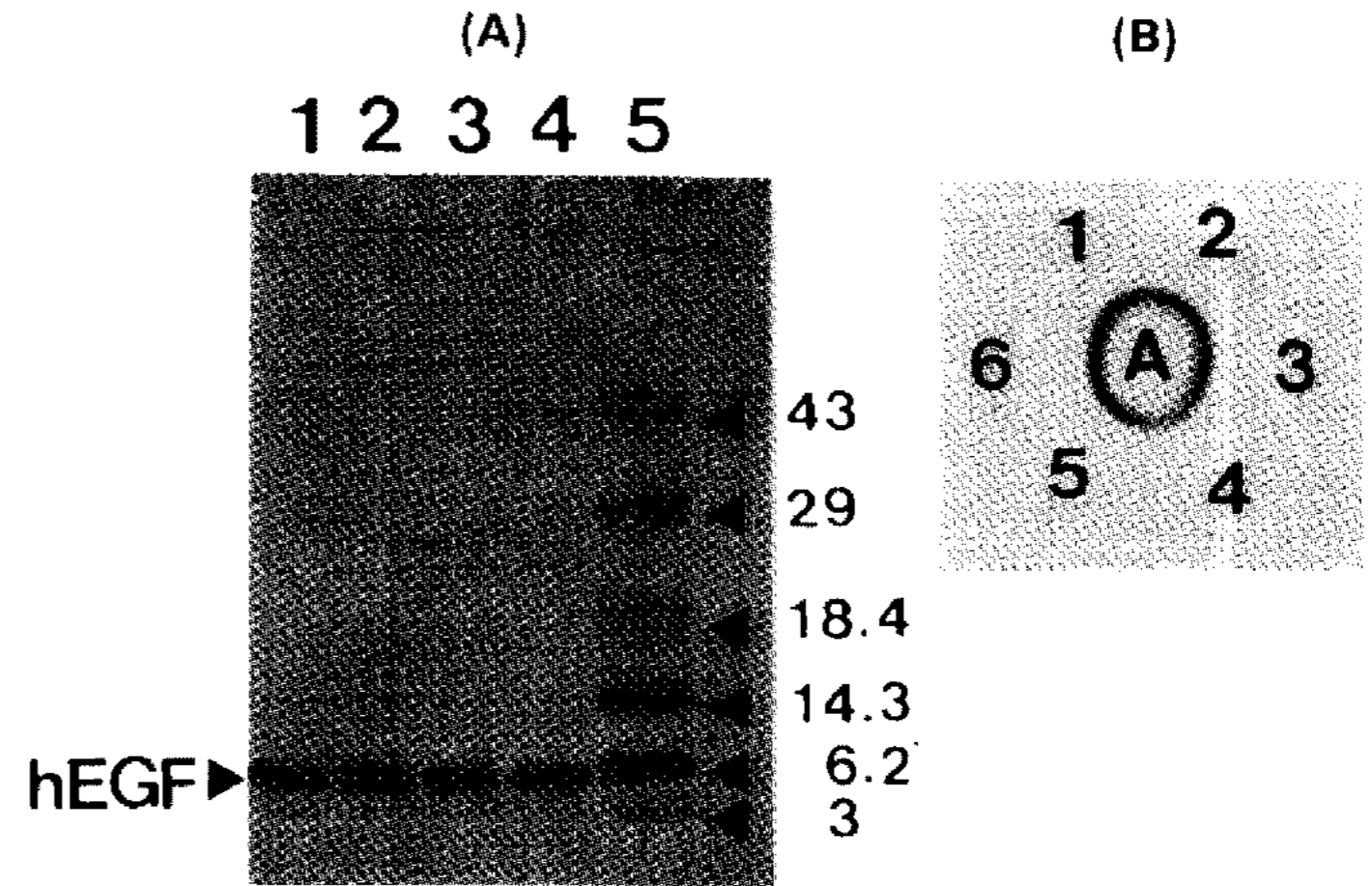


**Fig. 2. Chromatography of the purified hEGF (A), and co-chromatography of the purified hEGF and rhEGF standard (B) on a  $\mu$  Bondapak C<sub>18</sub> column.**  
Solvent system: the column was eluted with a linear gradient of 22~66% acetonitrile in 0.1% trifluoroacetic acid. The flow rate was 1 ml/min and each fraction was collected.

일한 아미노산 서열을 갖는지 확인하였다. 표준물질로 사용한 recombinant hEGF는 Boehringer Mannheim사의 N말단에 methionine이 하나 더 추가된 54개의 형태이었으나 HPLC 분석 결과 본 저자 등이 사용한 용매조건에서는 53개의 hEGF와 동일한 retention time에서 분리되었는데 이는 methionine과 같이 크기가 적고 극성이 없는 아미노산의 경우 resolution에 차이를 주지 않았을 것으로 추정된다. N말단으로부터 10개의 잔기를 판독하였을 때 Asn-Ser-Asp-Ser-Glu-Cys-Pro-Leu-Ser-His로 나타나 정확하게 천연형의 hEGF와 아미노산 염기 서열이 일치하였다. 또한 HPLC 분석에서 나타난 각각의 hEGF의 특성을 조사하기 위하여 Western blotting 및 double immunodiffusion을 수행한 결과 (Fig. 3) 모두 면역학적으로 동일한 물질인 것으로 나타났다. 인뇨로부터 분리된 hEGF 유사체중에서 53개의 아미노산 서열을 갖는 natural hEGF의 분포도는 Hiyashi 등(15)에 의하여 HPLC 분석 결과 48%로 밝혀져 있는데 임신부뇨로부터 분리 정제된 경우에도 이와 비슷한 46%의 분포도를 나타내어 정상인의 뇨로부터 분리된 뇨와 임신부 뇨 모두 유사한 hEGF 유사체가 분포하는 것으로 사료된다.

**hEGF 유사체의 생물학적 활성**

4종류의 hEGF 유사체가 생물학적인 활성에 어떠한 차이가 있는가를 알아보기 위하여 기존의 hEGF 분석 방법으로 사용하던 [<sup>3</sup>H]-thymidine uptake 방법(24) 대



**Fig. 3. Western blot analysis (A) and double immunodiffusion (B) of four hEGF-containing fractions.**  
Approximately 2  $\mu$ g of hEGF-derivatives was loaded in each lane.  
(A) Lane 1, fraction #1; 2, fraction #2; 3, fraction #3; 4, fraction #4; 5, low range marker.  
(B) Center well A, anti-hEGF MAb. Side wells 1, fraction #1; 2, fraction #2; 3, fraction #3; 4, fraction #4; 5, immuno affinity purified hEGF; 6, rhEGF.

신에 BrdU incorporation(25)에 의한 *in vitro* cell culture bioassay로 활성을 측정하였다. 먼저 BrdU가 세포내로 삽입되는 반응시간을 결정하였는데 4시간 이상 범위에서는 세포내 삽입의 결과인 흡광도값의 증가폭이 일정하게 유지되어 반응 시간을 8시간으로 정하였다 (Fig. 4-A). hEGF와 같은 성장인자의 생물학적인 활성 측정에는 FCS의 잔류로 인하여 오히려 성장인자의 정확한 측정을 어렵게 하는 요인으로 작용하므로 혈청 농도에 따른 NIH 3T3 세포주의 영향을 살펴보기 위하여 각 혈청농도에 따른 세포 성장의 변화를 72시간 동안 관찰하였다. 혈청농도가 0.2% 이하일 경우에는 세포수의 증가가 이루어지지 않는 lag phase를 유지하였기 때문에 최적 혈청농도를 0.2% 이하로 정하였다 (Fig. 4-B). Well당 세포수를  $5 \times 10^4$ 개로 하여 1일 배양한 후 BrdU labelling solution을 0, 0.5, 10, 15, 20 nM씩 첨가하여 8시간 반응하였을 경우에 농도에 따라 흡광도값이 비례하여 증가하는 결과를 얻었으나, 세포내로 BrdU 유입으로 인한 영향을 고려하여 BrdU 농도를 10 nM로 정하였다. Fig. 4-C에서와 같이 세포수가  $10^5$ 에서  $8 \times 10^5$ 로 증가함에 따라서 OD<sub>405nm</sub> 값이 0.25에서 0.804로 흡광도와 세포수가 정확히 비례하였으며 이때 상관 계수는 0.995를 보여 기 확립된 조건이 세포수 및 DNA의 증가를 정확히 감지할 수 있는 방법임을 알 수 있었다. NIH 3T3 세포주를 이용하여 hEGF의 측정 가능한 농도 범위는 50 ng/ml로 보고(26)되어 있는데 well당 세포수를  $5 \times 10^4$ 개로 1일 배양하여 hEGF를 100 pg/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml 범위로 첨가한 *in vitro* assay에서는 세포수의 증가에 따라서 비례관계를

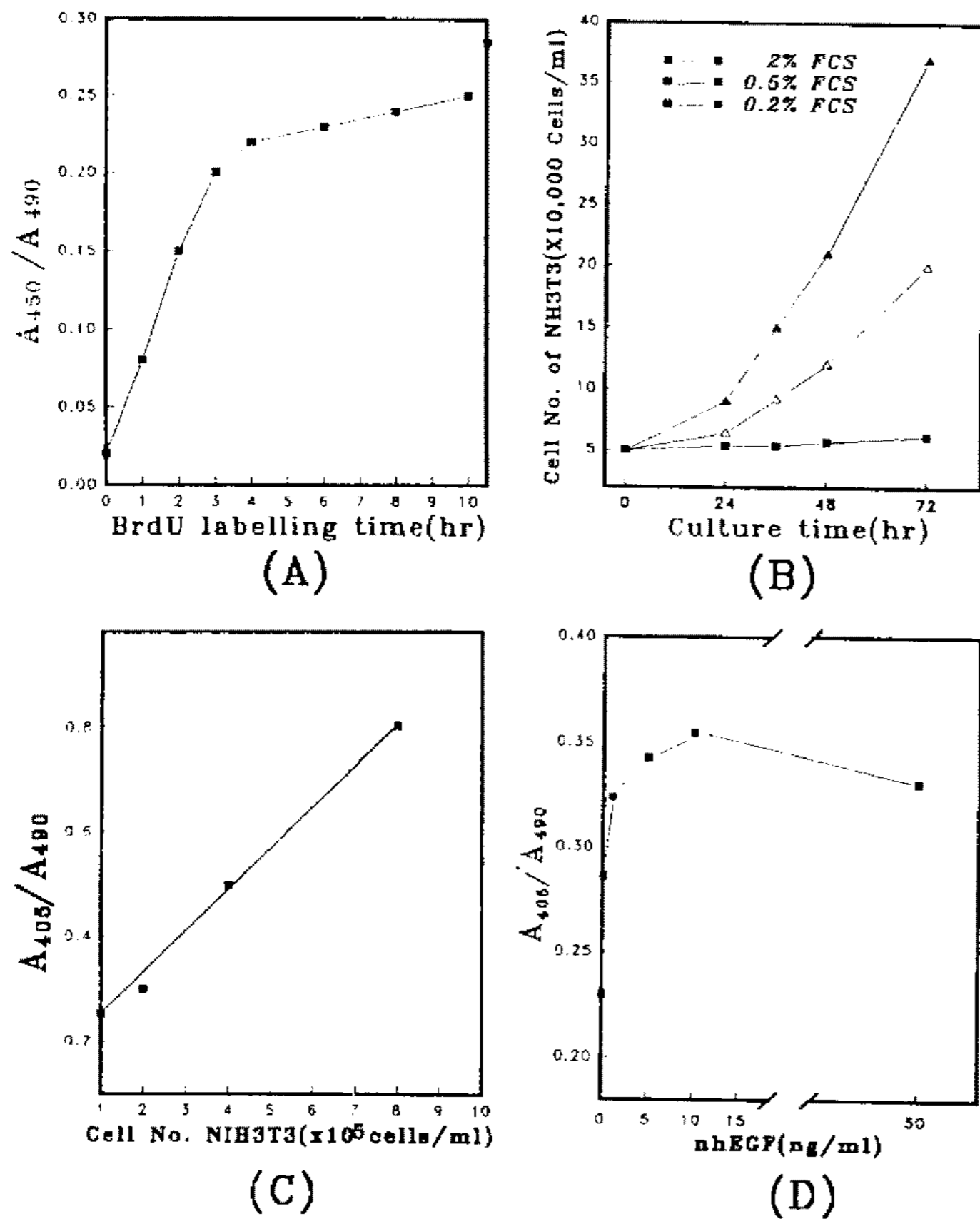


Fig. 4. Effects of BrdU labeling time (A), serum concentration (B), cell number (C) and hEGF concentration (D) on DNA synthesis in NIH 3T3 cells.

보였으며 10 ng/ml 이상 범위에서는 흡광도값의 변화가 없거나 약간 감소하였는데 이는 Stanley 등의 보고(27)와 일치된 결과이다(Fig. 4-D).

Well당 세포 수를  $5 \times 10^4$ 개로 하여 1일 배양하고 BrdU labeling을 8시간으로 하는 조건에서 시료를 10 ng/ml(RIA 결과)로 동일하게 희석하여 각 HPLC에서 얻은 4가지 유사체들의 생물학적인 활성을 비교하였을 때 retention time이 26.9분(fraction #1)과 27.8분(fraction #2)의 유사체가 30분(fraction #3)과 30.8분대(fraction #4)의 유사체와 비교하여 약 10% 정도 생물학적인 활성이 높은 것으로 나타났다(Fig. 5). Nishimuro 등은 인노로부터 정제된 hEGF 유사체의 특성 연구(11, 13)에서 N-말단을 포함하여 50개 이상의 아미노산 잔기를 가질 경우에만 생물학적 활성을 갖으며 50개 이하의 아미노산으로 구성된 유사체는 거의 생물학적 활성을 가지지 않는다고 보고하였다. 임신부 노로부터 분리된 4가지의 유사체들은 모두 생물학적인 활성을 갖고 있으므로 C-말단의 아미노산 잔기가 상이한 50개 이상의 아미노산으로 구성된 유사체들로 추정되며 앞서의 표준 물질과의 spiking과 아미노산 분석으로 nhEGF로 판명된 27.8분(fraction #2)이 생물학적 활성 역시 가장 높았다. 본 연구결과로서 임신 초기 임신부노에 다량으로 존재하는 hEGF는 placenta

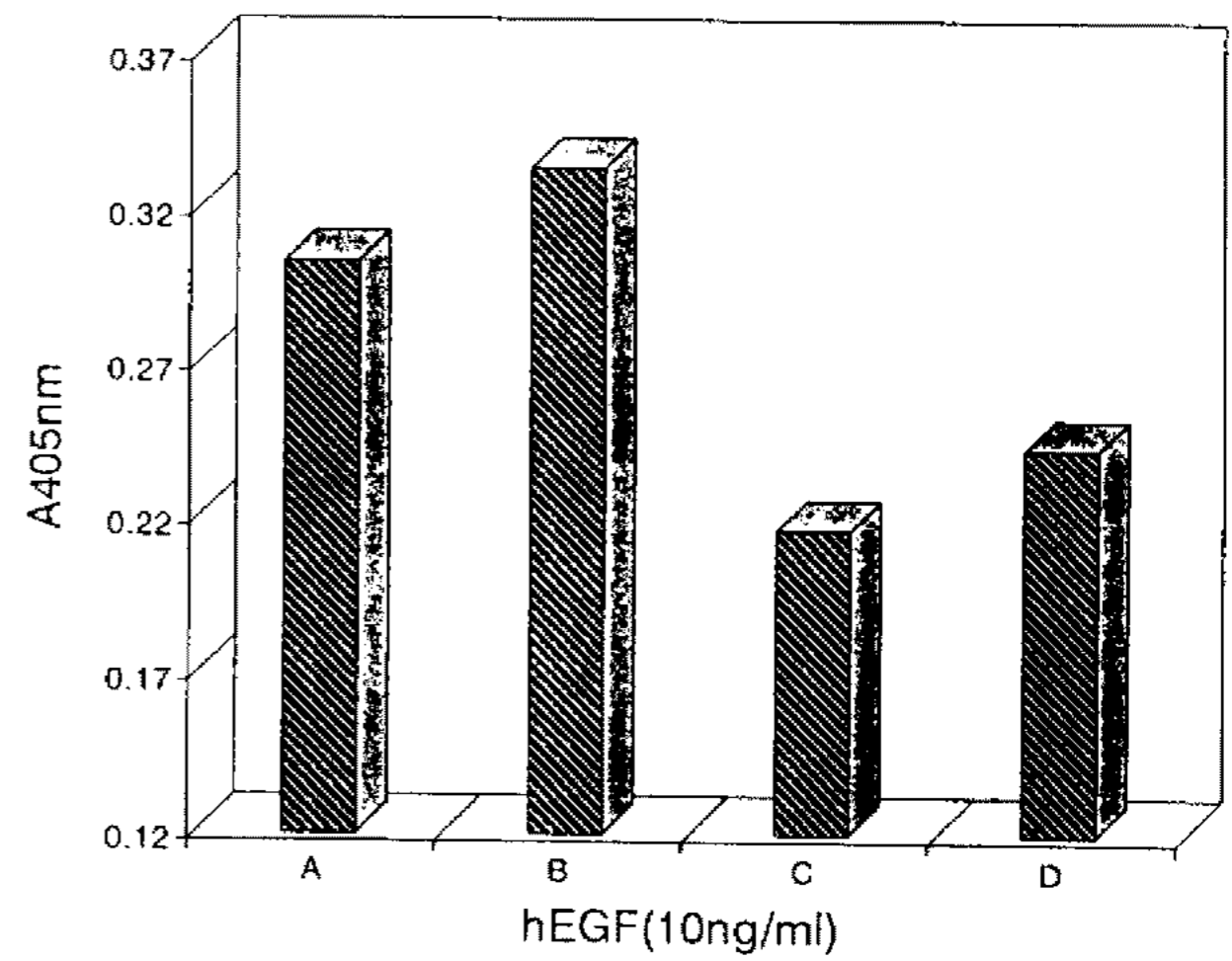


Fig. 5. Effects of hEGF derivatives on the DNA synthesis in NIH 3T3 cells. A, fraction #1; B, fraction #2; C, fraction #3; D, fraction #4.

membrane에 존재하는 EGF receptor에 의하여 최근 규명되고 있는 hEGF의 대사경로(28)와 유사한 경로로 대사되리라 추정되며 본 연구에 덧붙여 임신부 노로부터 분리된 유사체에서 C-말단 잔기의 역할을 보다 명확히 규명하기 위하여 hEGF 아미노산 서열중 50번째 이상에 위치한 C-말단 잔기의 아미노산을 다른 아미노산으로 치환시킨 각각의 유사체를 합성하여 각 구조와 활성의 상관에 관한 연구를 통하여 분리된 유사체들에 대한 특성 규명이 가능하리라 판단된다.

요 약

벤조산흡착, 음이온 교환수지, 단일클론항체를 이용한 immunoaffinity chromatography를 통하여 임신부 노로부터 천연의 hEGF를 정제하였다. 정제된 hEGF는  $\mu$  Bond C<sub>18</sub> column을 사용한 HPLC 분석을 통하여 4개의 fraction으로 분리가 가능하였으며 western blot과 double immunodiffusion 실험 결과, 각각의 fraction이 hEGF의 특성을 가진 유사체인 것을 알 수 있었다. 또한 rhEGF 표준 물질과의 spiking 및 아미노산 분석 등을 통하여 두 번째 fraction이 nhEGF와 동일한 것으로 확인하였다. nhEGF 및 그 유사체의 생물학적 활성 비교를 위하여 NIH 3T3 세포주에서 5'-BrdU incorporation 측정을 위한 labelling 시간, 혈청 농도의 최적 조건을 결정하였다. NIH 3T3 세포주의 DNA 합성능은 0.2% FCS가 포함된 저혈청 배지에서 hEGF가 0.1~10 ng/ml 농도로 첨가하였을 때 증가하는 경향을 나타냈다. HPLC를 통하여 분리된 두 번째 hEGF 유사체가 다른 유사체보다도 생물학적인 활성이 우수하였으며, rhEGF 표준물질과의 spiking 및 아미노산 서열 분석등을 통하여 nhEGF로 밝혀졌다. 임신부 노의 hEGF 유사체 함량중 natural hEGF는 46%이었다.

## 감사의 말

본 연구는 1993년도 통산산업부의 공업기반기술개발 사업의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Hofman, G., E.C.V. Rao, M.J. Brown, L.F. Murray, and G.S. Schultz. 1988. Epidermal growth factor in urine of nonpregnant women and pregnant women throughout pregnancy and at delivery. *J. Clin. Endo. Meta.* **66**: 119-123.
- Gregory, H. and I.R. Willshire. 1975. The isolation of the urogastrones-inhibitors of gastric acid secretion from human urine. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **356**: 1765-1774.
- Stanley, C. and N.O. David. 1975. Epidermal growth factor: Identification of a new hormone in urine. *Science* **189**: 800-802.
- Carpenter, G. 1978. The regulation of cell proliferation: Advances in the biology and mechanism of action of epidermal growth factor. *J. Invest. Derma.* **71**: 383-387.
- Gregory, H. and B.M. Preston. 1977. The primary structure of human urogastrone. *Int. J. Peptide protein Res.* **9**: 107-118.
- Carpenter, G. 1979. Epidermal growth factor. *Ann. Rev. Biochem.* **48**: 193-216.
- Gregory, H., S. Walsh, and C.R. Hopkins. 1979. The identification of urogastrone in serum, saliva and gastric juice. *Gastroenterology* **77**: 313-318.
- Leon, F.D., R. Vijayakumar, M. Brown, C.H. Rao, M. A. Yussman, and G. Schultz. 1986. Peritoneal fluid, estrogen, progesterone, and epidermal growth factor concentrations in patients with and without endometriosis. *Obstetrics and Gynecology* **68**: 189-194.
- Hofmann, G.E., C.V. Rao, M.J. Brown, L.F. Murray, G.S. Schultz, and T.A. Siddiqi. 1988. Epidermal growth factor in urine of nonpregnant women and pregnant women throughout pregnancy and at delivery. *J. Clin. Endo. Metab.* **66**: 119-123.
- Mattila, A., L.J. perheentupa, J. Salmi, and L. Viinikka. 1987. Human epidermal growth factor concentrations in urine, but not in saliva and serum, depend on thyroid state. *Life Sciences* **41**: 2739-2747.
- Buckly, A., J.M. Davidson, C.D. Kamerth, T.B. Wolt, and S.C. Woodward. 1985. Sustained release of epidermal growth factor accelerates wound repair. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**: 7340-7344.
- Franklin, T.J., H. Gregory, and W.P. Morris. 1986. Acceleration of wound healing by recombinant human urogastrone. *J. Lab. Clin. Med.* **108**: 103-108.
- Nishimuro, S., T. Nishimuro, N. Uchida, H. Shirono and H. Hiratani. 1985. Heterogeneity of human epidermal growth factor/urogastrone from human urine. *Chem. Pharm. Bull.* **33**: 4037-4040.
- Savage, C.R. and C. Cohen. 1972. Epidermal growth factor and a new derivative. *J. Biol. Chem.* **247**: 7609-7611.
- Hayashi, T., S. Sakamoto, and I.H. Yoshida. 1989. I. HPLC analysis of human epidermal growth factor using immunoaffinity precolumn. II. Determination of hEGFs in biological fluids. *Chromatographia* **27**: 574-580.
- Philip, A.K. and A.D. Edward. 1932. Preparation of extracts of the anterior pituitary-like substance of urine of pregnancy. *J. Biol. Chem.* **98**: 739-754.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Towbin, H.T., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**: 4350-4355.
- Savage, C.R. and R. Happer. 1981. Human epidermal growth factor/urogastrone: Rapid purification procedure and partial characterization. *Anal. Biochem.* **111**: 195-202.
- Taspar, J.M. and P. Granchimont. 1987. Purification of human growth factor (urogastrone) from urine. *Eur. J. Biochem.* **166**: 295-301.
- Charles, D.M., J.L. Thomas and N.O. David. 1985. Purification and characterization of epidermal growth factor and epidermal growth factor fragments from large volumes of human urine. *Archives of Biochem. Biophysics.* **240**: 33-42.
- Hissey, P.H. and K.J. Thompson. 1985. Single-step monoclonal affinity purification of human urogastrone from urine. *J. Immunol. Methods.* **78**: 211-216.
- Hayashi, T., S. Sakamoto, T. Fuwa, I. Wada, and H. Yoshida. 1988. Determination of epidermal growth factors in human urine by high performance liquid chromatography using anti-hEGF antibody precolumn. *Anal. Sciences.* **4**: 313-316.
- Nakagawa, S., A. Yoshida, Y. Hirao, S. Kasuga, and T. Fuwa. 1985. Biological effects of biosynthetic human EGF on the growth of mammalian cells *in vitro*. *Differentiation* **29**: 284-288.
- Gratzner, H.G. 1982. Monoclonal antibody to 5-Bromo- and 5-Iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. *Science* **218**: 474-475.
- Carpenter, G. and J. Zendequi. 1985. A biological assay for epidermal growth factor and related polypeptides. *Anal. Biochem.* **153**: 27-282.
- Stanley, C., C. Graham, and J.L. Kenneth. 1975. Interaction of epidermal growth factor with cultured fibroblasts. *Adv. Metab. Disord.* **8**: 265-284.
- McGwire, G.B. and R.A. Skidgel. 1995. Extracellular conversion of epidermal growth factor (EGF) to des-Arg53-EGF by carboxypeptidase M. *J. Biol. Chem.* **270**: 17154-17158.

(Received 19 March 1996)