

먹장어 (*Eptatretus burgeri*)의 피부로부터 Bradykinin-Related Peptide의 정제

신미정 · 김은정 · 김찬희 · 고혜진 · 김인혜 · 류홍수* · 허민도** · 정준기** · 박남규[†]
부경대학교 수산과학대학 생물공학과, *식품생명과학과, **수산생명의학과

Purification of a Bradykinin-Related Peptide from the Skin of Hagfish, *Eptatretus burgeri*

Mi Jung SHIN, Eun Jung KIM, Chan-Hee KIM, Hye-Jin GO, In Hae KIM
Hong-Soo RYU*, Min-Do Huh**, Joon-Ki CHUNG**, Nam Gyu PARK[†]

Department of Biotechnology and Bioengineering

*Department Food and Life Science

**Department of Aquatic Life Medicine, College of Fisheries Science,
Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

A hagfish bradykinin(BK)-related peptide was isolated and characterized from the skin of hagfish, *Eptatretus burgeri*. The hagfish BK with a molecular mass of 875.8 Da was purified to a homogeneity using C₁₈ reverse-phase and cation-exchange high performance liquid chromatography. The primary structure of the hagfish BK was determined as Gly-Thr-Ala-Gly-Ile-Gly-Pro-Phe-Arg by a combination of an automated amino acid sequencing and MALDI-TOF mass spectrometry. This amino acid sequence contains five substitutions (Arg¹ → Gly, Pro² → Thr, Pro³ → Ala, Phe⁶ → Ile, Ser⁶ → Gly) compared with that of mammalian BK. The hagfish BK showed a contractile action on the intestine of hagfish, *Eptatretus burgeri*. The threshold concentration of hagfish BK was around 10⁻¹¹ M.

Key words: Hagfish bradykinin (BK), Purification, Contractile action

서 론

최근에 nontetrapod vertebrate들로부터 kallikrein-kinin system의 존재에 관한 보고가 증가하고 있다 (Lipke and Olson, 1990). Bradykinin (BK)은 포유류 혈액에서 kallikrein-kinin system의 활성화로 인해 생성된다. 조직의 상처부위 또는 이온화된 조직표면의 접촉을 통한 Factor XII (Hageman factor)가 활성화되고, Factor XII의 활성화로 인하여 조직 또는 glandular kallikrein의 2차 serine protease는 lysyl-BK (kallidin)을 만들기 위해 저분자량의 kininogen들을 분해한다 (Clements, 1994). 그 결과 방출된 BK는 혈관이완 및 투과성을 증가시키며, 장관의 운동성을 바꿀 뿐만 아니라 통증을 유발시킨다 (Geppetti, 1993). BK는 9개의 아미노산으로 구성된 호르몬 펩타이드이며, 일차구조는 다음과 같다: Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-OH.

최근 여러 종류의 개구리 피부로부터 BK가 정제되었다. European frog (*Rana temporaria*)의 피부는 200~250 µg/g tissue의 양만큼의 BK를 포함하고 있으며 (Roseghini et al., 1988), African frog (*Rana galanensis*) 피부는 150 µg/g을 포함한다고 보고되었다 (Roseghini et al., 1989).

개구리 뿐만 아니라 거북이 (Conlon et al., 1990), 악어 (Cormeau et al., 1992), 뱀 (Conlon and Lance, 1994), 송어 (Conlon et al., 1996), 대구 (Platzack and Conlon, 1997)에서도 BK-related

peptides가 발견되었다. 그러나 아직까지 원구류인 먹장어로부터 BK의 정제에 관한 보고는 없다.

따라서 본 연구에서는 먹장어의 피부 추출물로부터 smooth muscle bioassay를 이용하여 새로운 BK-related peptide를 분리 정제하고, 이전에 밝혀진 BK-related peptide와의 구조의 비교 및 생리활성 측정에 대해 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험동물

실험에 사용된 먹장어 (*Eptatretus burgeri*)는 1999년 민락동 해변시장에서 구입하였다. 살아있는 상태의 먹장어로부터 피부를 분리한 후, 즉시 액체질소로 동결시켜 실험에 사용하기 전까지 -70℃에 보관하였다.

먹장어 피부로부터 추출물의 조제

동결된 먹장어 피부를 추출액 (methanol: 5% acetic acid=94:6)에 넣은 다음, 블렌더로 균질화하여 4℃에서 48시간 추출하였다. 균질화된 추출용액은 원심분리 (10,000×g, 20 min, 4℃)하여 상층액을 모아 감압농축하였고, 농축된 추출액 (3,000 mL)은 NaCl 45g을 첨가한 후, 원심분리 (13,000×g, 30 min, 4℃)하여 다시 감압농축하였다. 감압농축된 추출액은 에테르로 연속 추출하여 물층을 원심분리 (20,000×g, 30 min, 4℃) 한 후 감압농축 하였다. 계속해서 1.0 N HCl 50 mL을 피부추출액 (500 mL)에 첨가하여 원심분

[†]Corresponding author: ngpark@pknu.ac.kr

리 (20,000×g, 30 min, 4°C)하고, Sep-pak C₁₈ cartridge (20 mL, Waters)을 이용하여 분리하였다. 분리된 물층과 10% 메탄올 용출액 (retained materials, RM 10), 60% 메탄올 용출액 (RM 60), 100% 메탄올 용출액 (RM 100)들은 먹장어의 장관 평활근에 대한 수축활성을 조사하였다 (Fig. 1).

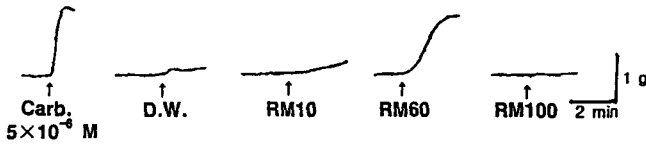


Fig. 1. Typical tracing illustrating the contractile response of hagfish intestine to hagfish skin extracts. Each arrow represents the sample applied to the hagfish intestine.

펩타이드의 분리 및 정제과정

먹장어 장관에 대하여 수축활성을 나타낸 RM 60은 HPLC 정제과정을 하기 전에 CM-cellulose에 적용하여 20 mM phosphate buffer saline (PBS, pH 6.0)과 0.5 M, 1.0 M NaCl을 포함하는 20 mM PBS (pH 6.0)로 각각 용출하여 먹장어 장관에 대한 수축활성을 측정하였다. CM-cellulose에 수축활성을 나타낸 활성분획은 8단계에 걸친 HPLC 정제과정을 거쳐 하나의 순수한 물질로 분리하였다 (Fig. 2). 각각의 분리 단계에서 얻은 분획들은 먹장어 장관을 사용하여 수축활성을 측정하였다.

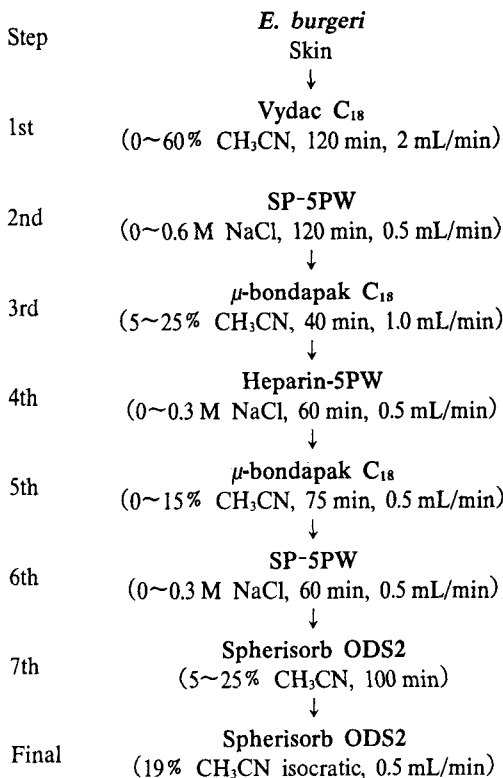


Fig. 2. The flowcharts of HPLC purification steps of hagfish skin extract.

첫 단계로 역상 HPLC (Vydac C₁₈, 7.5×250 mm, 5 μm)를 이용하여 부분 정제하였으며, 분리조건은 다음과 같다. A 용매; 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) 수용액 (pH 2.2), B 용매; 0.1% TFA를 포함한 100% acetonitrile (pH 2.2), B 용매 농도구배; 0 → 60% (120 min), 유속 2.0 mL/min, 파장; 220 nm. 반응을 나타낸 활성분획은 양이온 교환 column인 TSKgel SP-5PW (Tosoh, 7.5×75 mm)에 적용하여 A 용매로 10 mM PBS (pH 6.0)와 B 용매로서 1.0 M NaCl을 포함하는 10 mM PBS (pH 6.0)를 사용하여 0 → 1.0 M B 용매 농도구배로 200분간 0.5 mL/min의 유속으로 행하였다. 두 번째 단계의 양이온교환 HPLC에서 얻어진 활성분획은 계속해서 여러 단계의 역상 HPLC와 양이온교환 HPLC의 교차적인 반복정제하였다. 최종적인 정제 과정은 역상 HPLC (Spherisorb ODS2, 4×125 mm, 5 μm)를 이용하여 유속 0.5 mL/min의 조건으로 0.1% TFA를 포함하는 19% acetonitrile (pH 2.2)의 등용매 조건으로 용출시켰다 (Fig. 3).

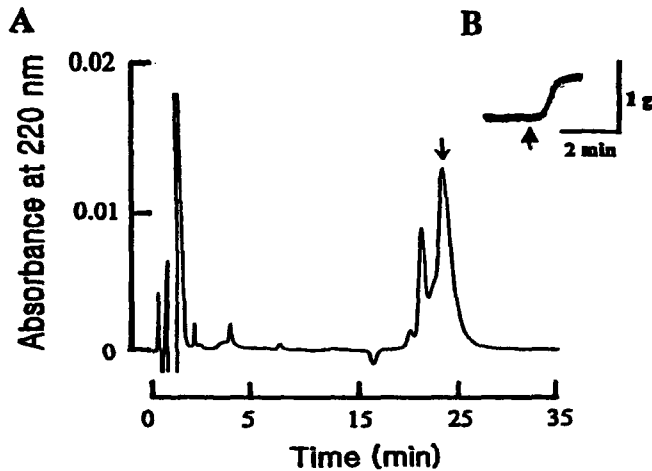


Fig. 3. Reversed-phase HPLC profile of the final step onto Spherisorb ODS2 C₁₈ (4×125 mm) column (A). The arrowed peak shows the contractile activity on the hagfish, *E. burgeri* intestine (B). The active peak was eluted isocratically with 19% acetonitrile in 0.1% TFA at pH 2.2.

일차구조 분석

펩타이드의 아미노산 서열을 결정하기 위하여 peptide sequence analysis (Shimazu PPSQ-21A protein sequencer)를 이용하였다. 또한 분자량 측정을 위하여 MALDI-TOF MASS (Voyager-DETM STR, Perceptive Biosystems)를 사용하였다.

펩타이드의 합성 및 정제

이전에 보고되었던 Fmoc-법을 사용하여 고상법으로 펩타이드를 합성하였고 (Park et al., 1997), HPLC를 이용하여 최종 정제하였다.

먹장어 장관에 대한 수축활성 측정

먹장어 장관의 표본을 만들기 위해 배측부를 향문 쪽으로부터 절

개한 후, 향문 쪽으로부터 1.0 cm 떨어진 부위로부터 위쪽으로 장관을 3~4 cm 길이로 재빨리 적출하였다. 적출된 장관은 1.0 cm 정도의 길이로 양끝을 묶은 후, 아래쪽 말단을 반응조 내의 지지봉에 고정하고 다른 한 쪽 끝을 isometric transducer에 연결하였다. 연결된 장관에 1.0 g의 장력을 준 뒤, 실온에서 15분 간격으로 인공해수 (ASW)를 교체하면서 평형화시켰다. 수축반응의 positive control로서는 cholinergic receptor agonist인 carbachol을 사용하였다. 활성 측정에 사용한 인공 해수의 조성은 다음과 같다: NaCl 445 mM, KCl 10 mM, CaCl₂·2H₂O 10 mM, MgCl₂·6H₂O 55 mM, Glucose 10 mM. 이 용액은 Tris-HCl 완충액을 이용하여 pH 7.8로 보정하였다. 수축활성 측정은 실온에서 반응조 내에 공기를 주입하면서 추출물 및 각 HPLC 정제단계에서 얻은 분획들을 반응조에 주입하여 physiograph로 기록하였다.

농도의존적으로 약리활성의 측정은 행하였으며, mammalian BK 및 hagfish BK의 수축활성 측정은 5×10^{-7} M carbachol의 최대수축에 대한 상대적인 수축 %로서 나타내었다. 모든 약리활성은 ED₅₀ (최고 수축의 50%를 나타낼 때의 농도) 및 Emax (최고 수축 %)로써 비교하였다. ED₅₀ 값은 최소자승법으로 계산하였으며, 통계적 처리는 student's t-test로서 하였다. 모든반응은 means ± S.E.로 표시하였다.

결과 및 고찰

먹장어 피부 추출물의 먹장어 장관 평활근에 대한 수축활성

먹장어 피부로부터 부분 정제한 물층, RM 10, RM 60과 RM 100의 먹장어 장관에 대한 평활근 수축활성을 조사하였다 (Fig. 1). 물층과 RM 100은 먹장어 장관에 대해 수축활성을 나타내지 않았지만, RM 10과 RM 60에서는 수축활성이 나타났다.

Fig. 1에서 나타내듯이 RM 60은 RM 10보다 상대적으로 강한 수축활성을 나타냈기 때문에 장관수축활성 펩타이드를 정제하기 위해 RM 60을 사용하였다. 이전의 연구에 의하면, RM 10의 용출액에는 평활근의 수축을 유도하는 저분자량의 amine류가 존재한다고 보고되어 있기 때문에 (Muneko and Kobayashi, 1992) 먹장어 피부 추출물로부터 분리한 RM 10에서도 마찬가지로 이러한 저분자 amine류의 존재로 인해 장관 수축활성이 나타났다고 생각되어진다.

먹장어 피부로부터 활성 펩타이드의 정제

활성펩타이드를 정제하기 위해서 수축활성을 나타낸 RM 60은 CM-cellulose 컬럼에 주입하였다. NaCl을 포함하지 않는 20 mM PBS (pH 6.0)와 0.5 M, 1.0 M NaCl을 포함하는 20 mM PBS (pH 6.0)으로 step-wise의 NaCl 농도구배로 용출하여 수축활성을 측정 한 결과, NaCl을 포함하지 않은 20 mM PBS 용출액에서 수축활성이 관찰되었다.

먹장어 장관 평활근에 대해 수축활성 효과를 보인 시료는 연속된 8단계의 역상 HPLC와 양이온교환 HPLC를 교차 반복적으로 사용하여 하나의 순수한 펩타이드를 정제하였다 (Fig. 2). 최종단계의 역상 HPLC에서는 0.1% TFA를 포함하는 19% acetonitrile

용매를 사용하여 유속 0.5 mL/min 조건으로 최종물질을 정제하였고, retention time 25분에서 용출되었다 (Fig. 3A). 최종적으로 정제된 분획은 먹장어 장관에 대해 강한 수축활성을 나타냈다 (Fig. 3B).

일차구조 분석 및 천연물 펩타이드의 합성

먹장어의 피부로부터 최종 정제한 물질의 아미노산의 서열과 분자량은 MALDI-TOF 질량분석기와 아미노산 서열 분석기를 사용하여 결정하였다.

최종 정제한 펩타이드의 분자량은 875.8 Da이었고, 아미노산서열은 Gly-Thr-Ala-Gly-Ile-Gly-Pro-Phe-Arg로 구성된 nonapeptide로 밝혀졌다 (Table 1). Nonapeptide의 아미노산 서열의 유사성을 조사한 결과, 정제한 펩타이드는 기존에 알려진 BK들과 유사성을 지니고 있었다 (Table 2). 따라서 본 연구에서 먹장어 피부로부터 정제된 펩타이드는 BK-related peptide로 판명되었다. Mammalian BK와 본 연구에서 정제한 hagfish BK를 비교했을 때 Arg¹ → Gly, Pro² → Thr, Pro³ → Ala, Phe⁵ → Ile 및 Ser⁶ → Gly로 다섯 개의 아미노산이 각각 치환되어 있으며, Gly⁴와 C 말단에 존재하는

Table 1. Automated Edman degradation and molecular weight of hagfish BK isolated from the skin of hagfish (*E. bugeri*)

Cycle No.	Phenylthiohydantion amino acid	Yield (pmol)	m/z (M+H) ⁺
1	Gly	67	
2	Thr	38	
3	Ala	70	
4	Gly	30	
5	Ile	33	878.5
6	Gly	18	
7	Pro	15	
8	Phe	27	
9	Arg	3	

Table 2. Compositions of the primary structures of bradykinin (BK)-related peptides isolated from the species of different vertebrates

Organism	Amino acid sequences									References
Mammal	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe	Arg	Schluter et al., 1997
Chicken	-*	-	-	-	-	Thr	-	Leu	-	Werle et al., 1996
Alligator	-	-	-	-	-	Thr	-	-	-	Erdos et al., 1967
Turtle	-	-	-	-	-	Thr	-	-	-	Seki et al., 1973
Monitor	-	-	-	-	-	Thr	-	-	-	Li et al., 1996
Bullsnake	Val	-	-	-	-	Thr	-	-	-	Li et al., 1998
Amphiuma	Phe	Ile	-	-	Leu	-	-	-	-	Li et al., 1998
Lungfish	Tyr	Gly	-	-	-	-	Ala	Pro	-	Li et al., 1998
Trout	-	-	-	-	Trp	-	-	Leu	-	Conlon et al., 1996
Cod	-	-	-	-	Trp	-	-	Leu	-	Platzack and Conlon, 1997
Bowfin	-	-	-	-	Trp	-	-	-	-	Platzack and Conlon, 1997
Gar	-	-	-	-	Trp	-	-	-	-	Platzack and Conlon, 1997
Sturgeon	Met	-	-	-	Met	-	-	-	-	Li et al., 1998
Hagfish	Gly	Thr	Ala	-	Ile	Gly	-	-	-	This study

*Dash (-) means identity.

3개의 아미노산은 잘 보존되어 있었다. 포유류 BK의 아미노산 서열과 다른 동물 유래의 BK-related peptide의 아미노산 서열을 비교하였을 때 (Table 2), 원구류인 먹장어 피부에서 유래된 hagfish BK에서 더욱 더 많은 아미노산의 치환이 일어났음을 알 수 있다. 이전의 연구에 의하면 mammalian BK에서 Gly⁴와 C 말단의 Phe⁸은 rabbit aorta, jugular vein (Regoli and Barabe, 1980) 및 rat uterus (Stewart, 1979)에 대해서 활성을 나타내기 위해 중요한 역할을 한다고 제시된 바가 있다. 따라서 Gly⁴와 C 말단부가 잘 보존된 hagfish BK도 여러 조직들에 대해 mammalian BK와 유사한

생리활성을 나타낼 수 있다는 것을 제시한다.

합성 펩타이드와 천연물 펩타이드와의 동일성을 비교하기 위해서 고상합성법으로 hagfish BK를 합성하였고, 역상 HPLC를 사용하였다 (Fig. 4). Fig. 4에서 나타내듯이 합성 펩타이드와 정제된 천연의 펩타이드는 같은 시간에서 용출되었다. 이것은 두 펩타이드가 같은 화학적 성분을 가진다는 것을 의미한다. C 말단이 amide화 된 -NH₂ 형태의 hagfish BK를 합성하여 역상 HPLC로 천연물과 비교한 결과, 천연물과 다른 retention time을 나타냈다. 또한 amide화된 hagfish BK는 먹장어에 장관에 대해 수축활성을 나타냈지만, 천연물 보다 낮은 활성을 보였다 (데이터 생략). 이러한 결과들은 hagfish BK가 다른 동물 유래의 BK와 마찬가지로 C 말단에서 amide화되지 않은 -OH 형태로 존재한다는 것을 제시한다.

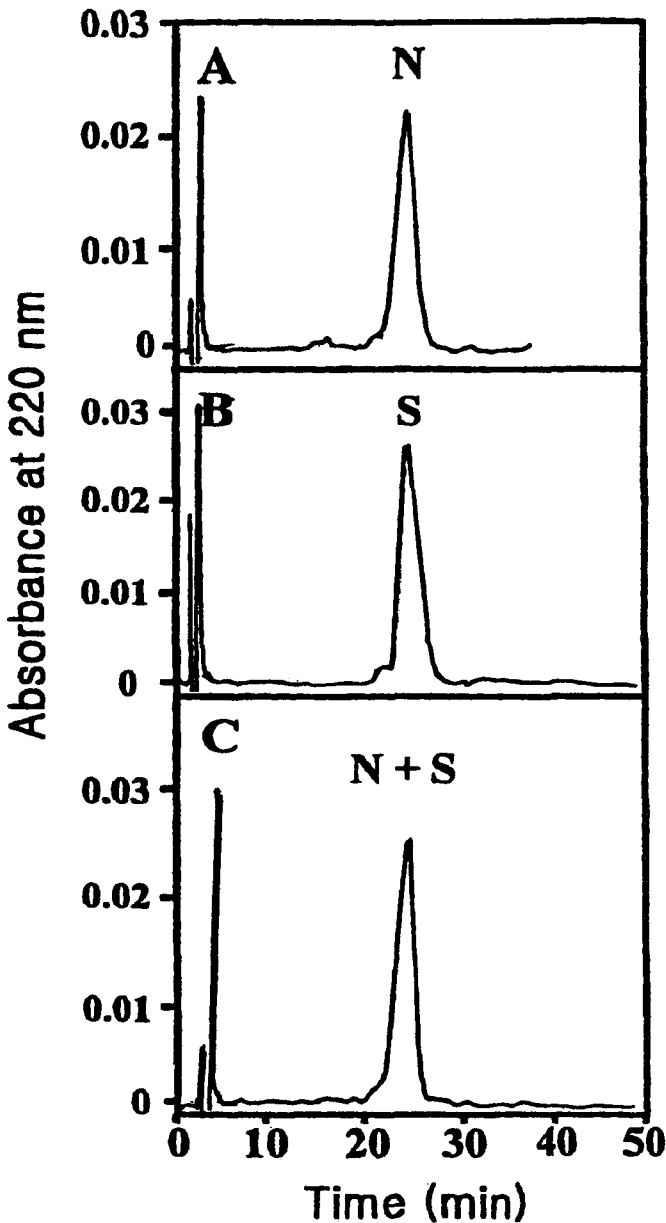


Fig. 4. Comparison of reversed-phase HPLC profile between the native (N) and synthetic hagfish BK (S). Reversed-phase HPLC profile of the native and synthetic hagfish BK expressed (A) and (B). The mixture (N+S) of hagfish BK was co-eluted as a single peak (C).

Hagfish BK의 먹장어 장관 평활근에 대한 수축활성 측정

Hagfish BK의 평활근 수축활성을 조사하기 위하여 먹장어 장관 평활근을 이용하였으며, 비교 물질로 기존에 알려져 있는 mammalian BK를 사용하였다 (Fig. 5). Fig. 5에서 나타내듯이 hagfish BK는 10⁻¹¹ M에서 역치값을 보였지만, mammalian BK는 hagfish BK보다 약 100배 높은 10⁻⁹ M에서 역치값을 나타냈다. 또한 수용체에 대해 친화도를 나타내는 척도인 ED₅₀은 hagfish BK가 2.0 × 10⁻¹⁰ M, mammalian BK가 1.2 × 10⁻⁷ M의 값으로 hagfish BK가 1,000배 정도 낮게 나타났기 때문에 hagfish BK가 먹장어 장관에 대해 수용체 친화도가 현저하게 높음을 알 수 있다. 최대 반응 역시 hagfish BK가 141 ± 11%로 mammalian BK 보다 약 22% 높게 나타났기 때문에 hagfish BK가 mammalian BK보다 먹장어 장관에 대해서 특이적인 활성을 나타냄을 알 수 있다. 이전의 연

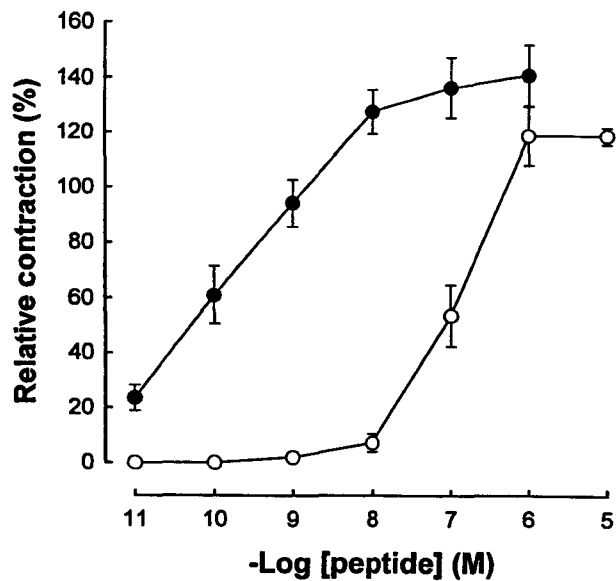


Fig. 5. Concentration response curves to BK induced contraction in the hagfish intestine: mammalian BK (○) and hagfish BK (●). Contractile effects were expressed as % maximal response to carbachol, 5 × 10⁻⁷ M. Each point represents the means ± S.E. for 4 experiments.

구에서 mammalian BK의 활성은 B1과 B2의 수용체를 매개하여 그 활성을 나타낸다고 알려져 있다 (Regoli et al., 1997). 그러나 사용하는 동물의 종류 및 조직에 따라서 B1, B2 수용체의 구조적 차이뿐만 아니라 B1, B2 수용체 이외의 또 다른 BK 수용체의 subtype의 존재를 제시한 바 있다 (Regoli et al., 1997). 본 연구에서 hagfish BK는 먹장어 장관에 대해 mammalian BK보다 특이적인 반응을 나타냈다. 이러한 결과들은 먹장어 장관 내에도 새로운 종류의 BK 수용체가 존재할 가능성이 있다는 것을 포함한다.

요 약

Hagfish bradykinin (BK)-related peptide가 먹장어 (*E. burgeri*)의 피부추출물로부터 분리, 정제되어졌다. 분자량이 875.8 Da인 hagfish BK는 C₁₈ 역상 및 양이온교환 high performance liquid chromatography로 순수하게 정제되었다. 자동아미노산서열분석기와 MALDI-TOF mass spectroscopy에서 얻은 결과의 조합으로 hagfish BK의 일차구조는 Gly-Thr-Ala-Gly-Ile-Gly-Pro-Phe-Arg로 판명되었다. 이 아미노산서열을 mammalian BK와 비교하면 다섯 개의 아미노산의 치환을 (Arg¹ → Gly, Pro² → Thr, Pro³ → Ala, Phe⁵ → Ile, Ser⁶ → Gly) 포함한다. Hagfish BK는 먹장어 장관에 대해 수축활성을 나타냈으며, 약 10⁻¹¹ M의 농도에서 역치반응이 나타났다.

감사의 말씀

본 연구는 1999년 부경대학교 해양식량자원개발 특성화사업단 연구지원비 및 2000년도 KSGP (Korea Sea Grant Program)에 의한 연구지원과제입니다.

참 고 문 헌

- Clewents, J.A. 1994. The human kallikrein gene family: A diversity of expression and function. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 99, C1~C6.
- Comeau, S., V.A. Lance, J.W. Hicks and J.M. Conlon. 1992. Purification and biological activity of alligator bradykinin. *Am. J. Physiol.*, 263, R400~R404.
- Conlon, J.M. and V.A. Lance. 1994. Generation of [Ala¹, Thr⁶] bradykinin in the plasma of a snake, the reticulated python. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 94, 273~278.
- Conlon, J.M., D.D. Smith and J.W. Hicks. 1990. Isolation and biological activity of a novel kinin ([Thr⁶] bradykinin) from the turtle, *Pseudemys scripta*. *Endocrinology*, 126, 985~991.
- Conlon, J.M., B. Platzack, L.E. Marra, J.H. Youson and K.R. Olson. 1995. Isolation and biological activity of [Trp⁵] bradykinin from the plasma of the phylogenetically ancient fish, the bowfin and the longnosed gar. *Peptides*, 16, 485~489.
- Conlon, J.M., J.C. Le Mevel, D. Conklin, L. Weaver, D.W. Duff and K.R. Olson. 1996. Isolation and cardiovascular activity of a second bradykinin-related peptide ([Arg⁰, Trp⁵, Leu⁸] bradykinin) from trout. *Peptides*, 17, 531~537.
- Erdoş, E.G., I. Miwa and W.J. Graham. 1967. Studies on the evolution of plasma kinins: reptilian and avian blood. *Life Sci.*, 6, 2433~2439.
- Geppetti, P. 1993. Sensory neuropeptide release by bradykinin: mechanisms and pathophysiological implications. *Regul. Pep.*, 47, 1~23.
- Li, Z., M.P. Smith, D.W. Duff, B.A. Barton, K.R. Olson and J.M. Conlon. Purification and cardiovascular activity of [Met¹, Mat⁵] bradykinin from the plasma of a sturgeon (*Acipenseriformes*). *Peptides*, 19, 635~641.
- Li, Z., S.M. Secor, V.A. Lance, M. Masii, M. Vallarino and J.M. Conlon. 1998. Characterization of bradykinin-related peptides generated in the plasma of six sarcopterygian species (African lungfish, amphiuma, coachwhip, bullsnake, gila monster and gray's monitor). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 112, 108~114.
- Lipke, D.W. and K.R. Olson. 1990. Enzyme of the kallikrein-kinin system in rainbow trout. *Am. J. Physiol.*, 258, R501~506.
- Muneoka, Y. and M. Kohayashi. 1992. Comparative aspects of structure and action of molluscan neuropeptides. *Experientia*, 48, 448~456.
- Park, N.G., J-K. Seo, H-J. Ku, S. Lee, G. Sugihara, K-H. Kim, J-S. Park and S-W. Kang. 1997. Conformation and biological activity of mastoparan B and its analogs I. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 18, 50~56.
- Platzack, B. and J.M. Conlon. 1997. Purification, structural characterization and cardiovascular activity of cod bradykinins. *Am. J. Physiol.*, 272, R710~717.
- Regoli, D., A. Rizzi, G. Calo, S. Nsa Allogho and F. Gobeil. 1997. B1 and B2 kinin receptors in various species. *Immunopharmacology*, 36, 143~147.
- Regoli, D. and J. Barabe. 1980. *Pharmacology of bradykinin and related kinins*. *Pharmacol. Rev.*, 32, 1~46.
- Rodeghini, R., G. Falconieri Erspamer, C. Severini and M. Simmaco. 1989. Biogenic amines and active peptides in extracts of the skin of thirty-two european amphibian species. *Comp. Biochem. Physiol. [C]*, 94, 455~460.
- Roseghini, R., G. Falconieri Erspamer and C. Severini. 1988. Biogenic amines and active peptides in the skin of fifty-two african amphibian species other than bufonids. *Comp. Biochem. Physiol. [C]*, 91, 281~286.
- Schluter, H., D. Mentrup, I. Grpb, H. E. Meyer, B. Spengler, R. Kaufmann and W. Zidek. 1997. Identification of endogenous Des-Arg⁹-[Hyp³] bradykinin in human plasma with post-source-decay matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, 246, 15~19.
- Seki, T., I. Miwa, T. Nakajima and E.G. Erdoş. 1973. Kallikrein-kinin system in nonmammalian blood: evolution aspects. *Am. J. Physiol.*, 224, 1425~1430.
- Stewart, J.M. 1979. Chemistry and biologic activity of peptides related to bradykinin. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 25, 227~272.
- Werle, E., K. Hochstrasser and I. Trautschold. 1966. Studies of bovine plasma kininogen, ornitho-kallikrein and ornitho-kinin. In: Erdoş E. Bace N., Sicuteri F., Wilde, AF., editors. *Hypotensive peptides*, New York: Springer-verlag, pp. 105~115.

2002년 10월 15일 접수

2003년 1월 18일 수리