

## 지렁이(地龍)의 解熱成分에 관한 研究

金泳垠 · 李王圭 · 李鍾淳 · 尹喜貞

서울대학교 藥學大學

(Received November 23, 1981)

Young Eun Kim, Wang Kyu Lee, Chong Soon Lee and Hee Jeong Yoon

*College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151, Korea*

### Studies of Antipyretic Component of the Earthworm

**Abstract**—In order to confirm the exact antipyretic component in the earthworm, etherial extract of American earthworm (Red Worm) was fractionated into five fractions by using silica gel column chromatography and thin layer chromatography. The fraction including free fatty acids was found to possess antipyretic response and standard arachidonic acid showed marked antipyretic response on typhoid vaccinated rabbits. Arachidonic acid was identified from the free fatty acid fraction of the earthworm by using gas liquid chromatography. Thus it was considered that the antipyretic activity of the free fatty acid may be due to the presence of arachidonic acid. Lipid-free earthworm powder was extracted with phosphate buffer (pH 8.0, 0.1M) and all the proteins was salted out by ammonium sulfate. The crude precipitate was dialyzed and the impure proteins were eliminated at pH 5.4 and 4.6. The remaining protein solution was fractionated with various concentrations of acetone. The acetone fractions were identified by using S. D. S. polyacrylamide gel electrophoresis and disc gel electrophoresis. The precipitate at 85% acetone concentration and the remaining proteins in the supernatant did not exhibit the antipyretic activity.

지렁이는 예로부터 한국 중국 일본에서 해열제로 민간요법에 널리 사용되어 왔으며 또한 소염 작용도 있음이 일반적으로 알려져 있다.

지렁이가 함유하고 있는 해열성분에 대하여 A. Ogata<sup>1)</sup>는 지렁이에서 해열활성물질로 lumbroferin 을 물로 끓여 추출한 다음 에탄올을 가하여 침전시켜 얻었다. 지렁이를 효소 분해하여 농축한 후 투석하면 활성물질은 반투막을 통과하여 투석되며 이것을 에탄올로 침전시켜 얻은 침전을 건조 후 아밀알콜로 추출하면 흑갈색의 기름을 얻었으며 이것은 불용성이었다. 이 물질을 KOH 용액으로 끓이면 다시 아밀알콜을 재생하였다. 따라서 이것은 활성물질이 아밀에스테르로 변하였거나 또는 지렁이 추출물중에 존재하는 불순물의 아밀에스테르 유도체 인것 같다고 보고된 것을 비롯하여 현재 알려져 있는 보문은 3가지가 있다. Kim 등<sup>2)</sup>은 지렁이에서 추출한 단백질 성분을 티푸스 백신으로 토기를 발열시킨 다음 3.5시간 후에 이경맥(耳靜脈)으로 투여하였을 때 해열효과를 인정하였다는 보문과 지렁이를 유기용매로 추출하여 얻은 물질중 유리지방산의 아라키돈산 부분을 pyrogen 으로 토기를 발열시킨 다음 1시간 후에 복강내로 주사한 결과

해열효과를 나타내었다는 M. Hori 등<sup>3)</sup>의 보고가 있다.

이에 저자는 위의 3 가지 보고를 재검토하여 어는 것이 진정한 지렁이의 해열인자 인가를 규명하고자 미국산 지렁이(*Lumbricus terrestris*)를 유기용매로 추출하여 얻은 지용성 성분을 실리카 겔 크로마토그래피를 이용하여 분별분리한 다음 얇은 막 크로마토그래피와 기체-액체크로마토그래피로 유리지방산 부분과 아라키돈산의 존재를 확인하는 한편 단백질성 검체로는 위의 유기용매 추출잔사를 Kim 등이 이용한 방법에 따라 추출하여 아세톤농도에 따른 분별침전법으로 분리하여 85% 아세톤농도에서 침전하는 부분과 상층액부분(아세톤을 감압증발시킨 후 냉동건조함)에 대하여 포리아크릴아미드 겔 디스크 전기이동법으로 용존하는 단백질을 비교검토하였다. 한편 검체로 단백질성분, 유리지방산부분 및 표준아라키돈산을 각각 장티프스 백신으로 발열시킨 토기에 대하여 해열효과를 비교검토한 결과 지렁이의 해열인자는 유리지방산인 아라키돈산 부분임을 확인하였으므로 보고하는 바이다.

### 實驗方法 및 實驗結果

**지렁이**—미국산 지렁이(*Lumbricus terrestris*)를 경기도 부천시 6.6농장에서 물로 세척하여 부착된 오물을 제거한 다음 드라이 아이스로 동결시켜 실험실로 가지고 와서 시료로 사용하였다.

**실험동물**—1.9~2.4kg의 집토끼 숫컷을 동일한 실험실 조건에서 일정기간 사육한 다음에 실험전 24시간 물을 제외하고는 절식시켜 해열실험동물로 사용하였다.

**시약**—acrylamide, urea, glycine, tris(hydroxymethyl)-aminoethane 은 Waco Pure Chemical 제품, ammonium persulfate, sodium dodecyl sulfate (SDS), 2-mercaptoethanol 은 Katayama Co. 제품, N, N'-methylene bis (acrylamide), N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine (TEM ED), Coomassie brilliant blue R (acid cyanin. 6 B)은 Toky Casei Co. 제품, riboflavine, methanol (column 용), silica gel 60G (TLC 용)은 E. Merck 제품 arachidonic acid 는 Nakarai Chemical 제품, aminopyrin 은 Dona Pharma. Co. typhoid vaccine 은 녹십자제품을 사용하였으며 기타 일반시약은 특급 또는 일급 시약을 정제하여 사용하였다.

**유리 지방산의 추출**—드라이 아이스로 냉동된 지렁이를 증류수로 세척한 다음 습중량 1 kg 을 아세톤으로 탈수 처리한 후 원심분리 하였다. 아세톤상층액은 감압농축한 다음 에테르로 2회 추출하고 한편 아세톤 탈수찌꺼기(86g)는 분말로 한 다음 에테르로 2회 추출하였다. 에테르 추출액은 합하여 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 탈수 여과 한 다음 여액을 감압농축 한 후 유리지방산 분리 자료로 하였다. 아세톤-에테르 추출 찌꺼기는 해열단백질성분의 추출시료로 하였다(Fig. 1).

**단백질성분의 추출**—아세톤-에테르 추출 찌꺼기는 CHCl<sub>3</sub> : CH<sub>3</sub>OH 1 : 2 용액으로 지질성분을 충분히 추출하여 제거한 찌꺼기(82g)를 0.1M 인산완충용액(pH 8.0)으로 3회 추출하여 얻은 추출액에 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 가하여 완전 포화시켜 용존하는 단백질을 염석시킨 다음 다시 소량의 증류수에 녹여서 투석하여 혼재하는 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 제거하고 냉동건조 시켰다. 여기 얻은 조단백질을 소량의 pH8.0의 증류수에 녹인 다음에 pH5.4 및 pH4.6의 등전점에서 침전되어 불순 단백질을 원심분리하여 제거한 다음에 아세톤 분별침전을 행하였다. 즉 50% 아세톤농도, 70% 아세톤농도, 85% 아세톤농도에서 침전되는 각각의 단백질을 원심분리하고 최종의 85% 아세톤농도의 상층액은 감압농축하여 충분히 아세톤을 제거한 후에 냉동건조시켜 각각 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 건조기 중에 저장하였다(Fig. 2).

**S. D S. 포리아크릴아미드겔전기이동**—K. Weber<sup>4)</sup>의 방법에 따라 도데실황산나트륨 존재하

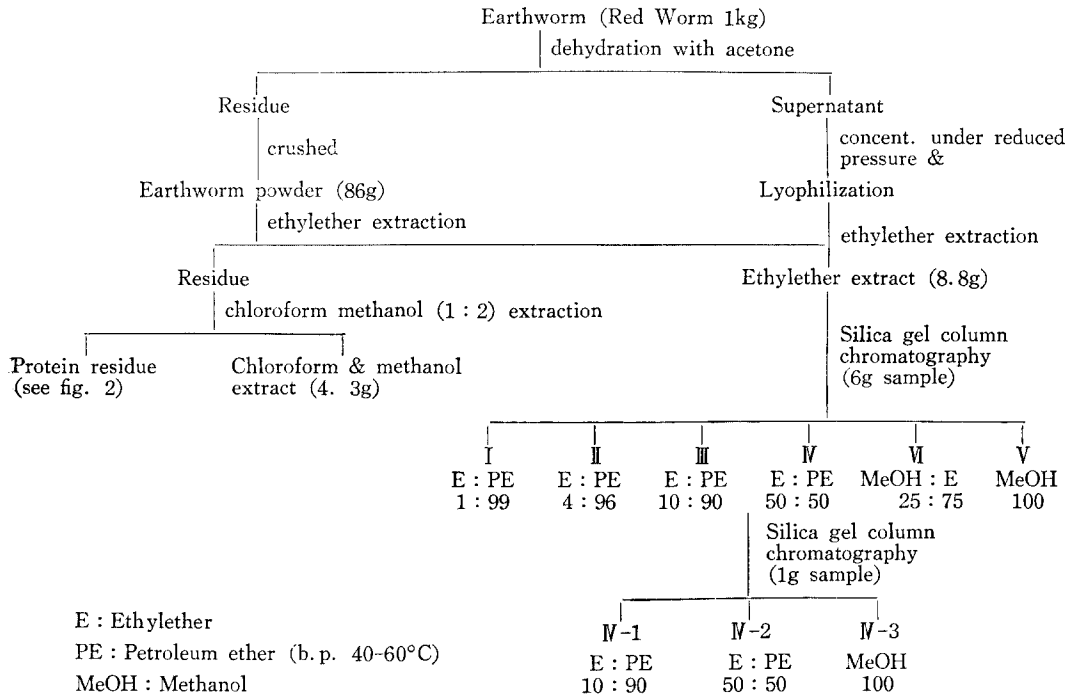


Fig. 1—Extraction and isolation process of free fatty acids.

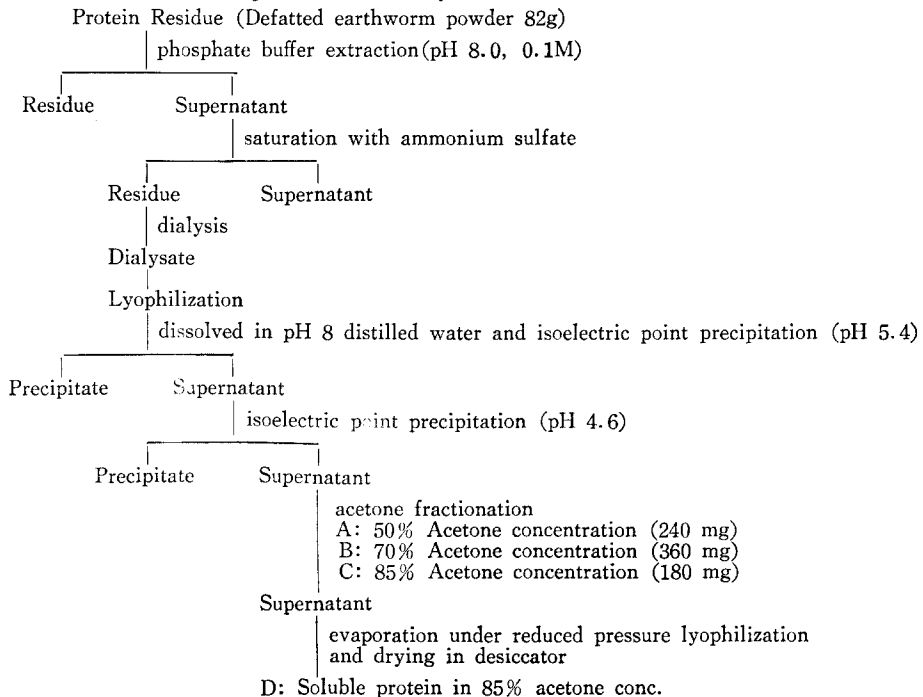


Fig. 2—Extraction process of protein.

에 7.5% 아크릴아미드겔을 만들어서 전기이동을 실시하였다.

아세톤의 각농도에서 분별침전된 단백질 부분 즉 A : 50% 아세톤 농도의 침전단백질, B : 70% 아세톤 농도의 침전단백질, C : 85% 아세톤 농도의 침전단백질

D : 85% 아세톤 농도에서 용존하는 단백질을 각각 0.2mg 씩 취하여 8M 요소(urea), 2% 테실황산나트륨, 2% 2-멜캅토에탄올과 잘 섞어서 37°C에서 2시간 인큐베이션 시킨다음 0.1% 브롬페놀블루(tracking dye) 5  $\mu$ l 와 글리세롤 1적을 가하고 잘 혼합한 후 검체로 50  $\mu$ l (0.1 mg 함유)를 취하여 겔위에 첨가하고 그 위에 저장완충액(reservoir buffer, gel buffer: water 1:1)을 채우고 하부를 (+)극으로 하여 전기이동을 실시하였다. 이때 전류는 8mA/tube, 전압 100volt 로써 7시간 행하였으며 겔의 염색은 CH<sub>3</sub>OH : H<sub>2</sub>O : HAc=5:5:1용액의 0.2% coomassie brilliant blue R(acidcyanin 6 B)를 사용하였으며 탈색은 CH<sub>3</sub>OH : H<sub>2</sub>O : HAc=25:68:7의 용액을 사용하였다. 염색의 결과는 Relative mobility를 아래와 같이 산출하여 표시하였으며 전기이동의 결과는 Fig 3에 표시하였다.

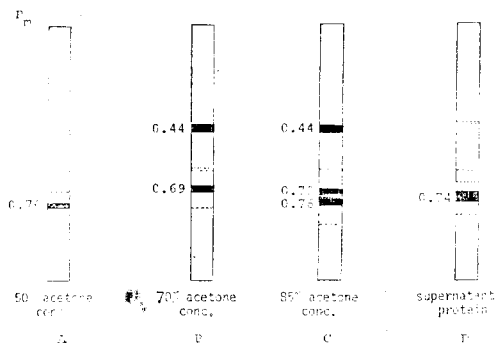


Fig. 3—S. D. S. Polyacrylamide gel electrophoresis.

디스크 겔 전기이동—분리겔의 조성은 Gabriel<sup>5)</sup>의 방법에 준하였으며 7.5% 아크릴아미드 겔을 만들어서 전기이동을 실시하였다. 아세톤 분별분리에 의한 각각의 검체 0.2mg를 취하여 10%글리세롤 50  $\mu$ l 와 0.1% 브롬페놀블루 5  $\mu$ l 식을 가한 후 잘 혼합하여 그 중에서 25  $\mu$ l (0.1

$$R_m = \frac{\text{단백질의 이동거리}}{\text{tracking dye의 이동거리}} \times \frac{\text{염색전의 겔의 거리}}{\text{염색후의 겔의 거리}}$$

디스크 겔 전기이동—분리겔의 조성은 Gabriel<sup>5)</sup>의 방법에 준하였으며 7.5% 아크릴아미드

겔을 만들어서 전기이동을 실시하였다. 아세톤 분별분리에 의한 각각의 검체 0.2mg를 취하여 10%글리세롤 50  $\mu$ l 와 0.1% 브롬페놀블루 5  $\mu$ l 식을 가한 후 잘 혼합하여 그 중에서 25  $\mu$ l (0.1

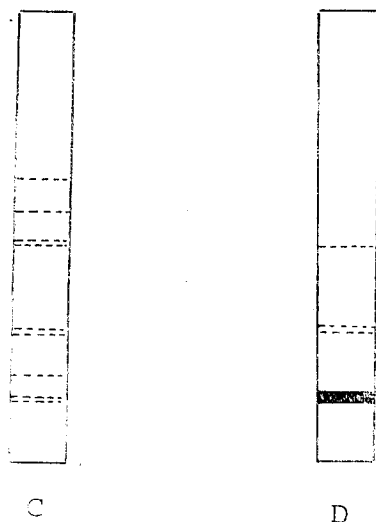


Fig. 4—Disc gel electrophoresis.  
C : 85% acetone conc. ppt protein  
D : supernatant protein

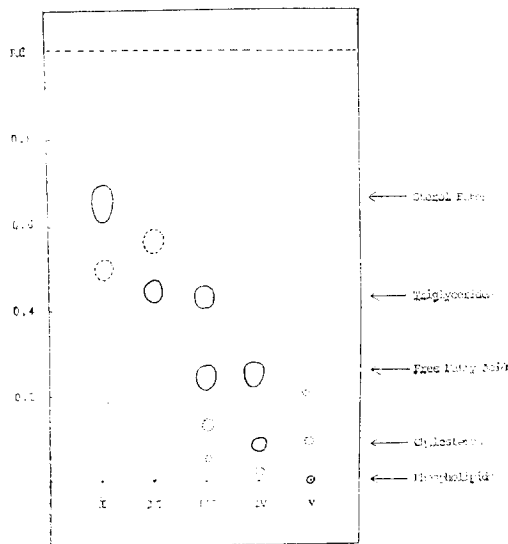


Fig. 5—TLC pattern of lipid fractions.  
Solvent: petroleum ether (b. p. 60-80°C)  
: ether: acetic acid(80:20:1)  
Detection method: sulfuric acid: acetic acid(1:1) spray

mg 함유)을 취하여 각각의 겔위에 첨가한 후 그 위에 트리스-글리신 완충액을 채우고 하부를 (+)극으로 하여 전기이동을 실시하였다. 이때 전류는 4 mA/tube, 전압은 150volt로 하여 2.5 시간 전기이동을 실시하였다. 염색과 탈색은 S.D.S. 포리아크릴아미드겔 전기이동 때와 같은 시약을 사용하였다. 전기이동의 결과는 Fig. 4에 표시하였다.

유리 지방산의 분리와 얇은막크로마토그래피(TLC) 및 기체·액체 크로마토그래피(GLC)—에테르 추출물을 스테롤에스테르, 트리글리세리드, 코레스테롤, 유리지방산, 인지질을 각각 분리하기 위하여<sup>7)</sup> 실리카 겔 관(5×14cm)을 만들어 무수메탄올, 아세톤, 과산화물이 없는 에테르, 석유에테르(b. p. 60~70°C)의 순서로 충분히 서서 평형을 이루게 한 후 에테르 추출물 6g을 흡착시키고 유속 3 ml/min로 5분 간격으로 자동분별분취기를 사용하여 다음의 용매계로 용출시켰다. 용매 I : 석유에테르 중 1%에테르, 용매 II : 석유에테르 중 4%에테르, 용매 III :

석유에테르 중 10%에테르, 용매 IV : 석유에테르 중 50%에테르, 용매 V : 에테르 중 25% 메탄올, 용매 VI : 100% 메탄올

용출 각 부분의 TLC의 결과는 Fig. 5에 도시하였으며, 유리 지방산 부분이 잘 분리되어 있지 않으므로 다시 실리카겔 관 크로마토그래피를 실시하였다. 즉 용매계 IV 용출액을 감압농축하여 얻은 물질 1g을 실리카겔 관(2×25cm)에

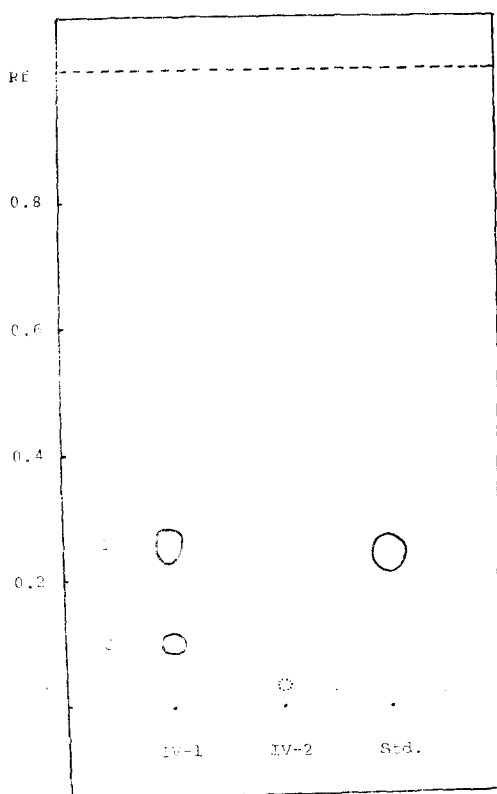


Fig. 6—TLC pattern of solvent IV reperfired fraction and arachidonic acid.

Solvent: petroleum ether (b. p. 60-80°

C): ether: acetic acid (80:20:1)

Detection method: sulfuric acid: acetic acid (1:1) spray

F: free fatty acid

Std.: standard arachidonic acid

C: cholesterol

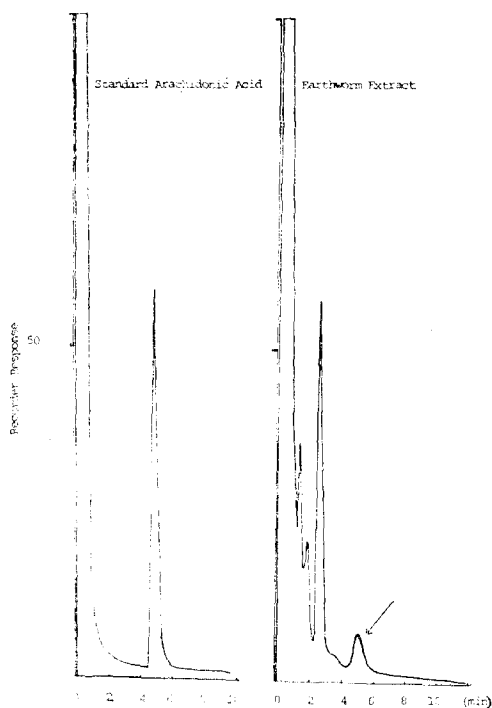
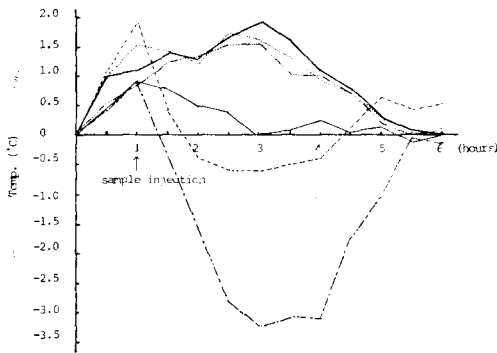


Fig. 7—Gas chromatogram of arachidonic acid and free fatty acid.

**Table I**—Measurement conditions of GLC for free fatty acid and arachidonic acid.

Gas chromatograph column	Shimadzu GC-4BM 3% OV-17(80-100 mesh shimalite) 3mm $\phi$ ×1.5 boronsilicate glass column
Detector	F. I. D.
Carrier gas	N <sub>2</sub> , 40ml/min.
Sensitivity	10 <sup>2</sup> ×32
Temperature	column 180°C injector 190°C detector 230°C
Chart speed	0.5cm/min.



**Fig. 8**—Antipyretic effects against typhoid vaccine induced fever in rabbits.

- ..... : Protein (100mg/kg)
- : Aminopyrine (100mg/kg)
- : Free fatty acid (10mg/kg)
- : Arachidonic acid (10mg/kg)
- ..... : Protein (10mg/kg)
- : Control

라비아고무 현탁액을 만들어서 복강내에 주사하였다. 또한 대조실험으로 아미노피린 100mg/kg 체중을 0.9% (w/v) 생리식염수 6 ml 에 녹여서 복강내로 주사하여 해열효과를 비교관찰 하였다.

## 考 察

Fig. 8에서 보는 바와 같이 티프스 백신을 주사한 1시간 후에 각각의 검체를 주사한 결과 유리지방산 주사군은 정상체온으로 회복되었으며 표준 아라키돈산 주사군의 현저한 해열효과로 미루어 보아 유리지방산 부분의 해열효과는 아라키돈산에 기인됨을 알 수 있다. 단백질성분을

흡착시킨 다음 유속 2 ml/min, 5분 간격으로 자동 분별 분취기를 사용하여 다음의 용매계로 용출시켰다.

용매 IV-1: 석유에테르 중 10% 에테르

용매 IV-2: 석유에테르 중 50% 에테르

용매 IV-3: 메탄올

용출결과 및 각 부분의 TLC는 Fig. 6에 도시하였다.

해열실험의 시료로 아라키돈산과 동일한 Rf 값을 나타내는 유리지방산부분을 사용하였다. 따라서 이것이 아라키돈산인지의 여부를 확인하기 위하여 G. L. C. 를 실시하였다. 즉 유리지방산부분과 표준 아라키돈산을 bis(trimethyl) acetamid로 silylation을 하여 바로 기체크로마토그래피에 적용하였다. 그 결과 표준 아라키돈산의 머무른시간(retention time)이 5분위치에서 피크를 나타내었으며 한편 시료의 유리지방산부분도 이것과 동일하였으므로 아라키돈산의 존재가 확인되었다(Fig. 7).

**해열 시험**—실험 전 24시간 물을 제외하고는 절식시킨 체중 1.9~2.4kg의 숫토끼 귀정맥 장티프스 백신 0.2mg/kg을 주사하여 발열시킨 다음 1시간 후에 각각의 검체를 주사하여 30분 간격으로 직장온도계로 체온을 관찰하였다.

검체로서 85%아세톤농도에서 불용단백질 100 mg/kg 체중과 85% 아세톤농도에서 가용단백질 (Fig 2-D 동결건조물) 10mg/kg 체중을 0.9% (w/v) 생리식염수 2 ml에 녹여 각각 5마리씩의 토끼 복강내의 귀정맥으로 주사하였다. 한편 유리 지방산 부분 10mg/kg 체중과 대조물질로써 표준 아라키돈산 10mg/kg 체중을 각각 0.9% (w/v) 생리식염수 2 ml 중에 0.3% 농도의 아

주사한 군에서는 아무런 해열효과가 나타나지 않았다. Kim 등<sup>2)</sup>이 발표한 보고에 의하면 티프스 백신을 주사하고 3.5시간 후에 단백질 시료를 주사한 것으로 되어 있으므로 그 시간에는 토끼의 체온이 하강하는 상태이므로 단백질 시료를 주사한 결과 단백질시료가 해열효과가 있는 것으로 오인하였거나 혹은 단백질시료에 유리지방산이 잔존된 것이 해열효과를 나타낸 것으로 사료된다.

아라키돈산은 리놀산 및 리놀렌산와 함께 필수지방산의 1종이며 최근에 이르러 아라키돈산이 프로스타글란딘의 전물질이라는 사실이 밝혀짐에 따라<sup>8,9)</sup> 프로스타글란딘에 대한 연구가 활발히 진행되어 그 대사경로가 밝혀지고 있다. 즉 아라키돈산이 prostaglandin endoperoxide synthetase에 의하여 프로스타글란딘 G<sub>2</sub>와 프로스타글란딘 H<sub>2</sub>가 형성된 후 각종 효소에 의하여 각각의 프로스타글란딘이 형성된다고 보고되어 있다<sup>10,11)</sup>.

아라키돈산을 실험동물에 주사 후 가끔 나타나는 죽음은 폐 혈관계의 혈소판의 축적으로<sup>13)</sup> 또는 혈소판 응집에 의한 뇌순환 장애에 기인하며<sup>14)</sup> 이것은 아스피린의 전 처리로써 방지된다고 보고되어 있다<sup>13)</sup>.

pyrogen은 프로스타글란딘 E, (PGE<sub>1</sub>)을 유리시킴으로써 강한 발열작용을 나타내며<sup>15,16,17)</sup> 이것의 작용부위는 열 조절 중심부로 간주되는 시상하부 전엽이라하며 아스피린, paracetamol과 같은 해열제는 prostaglandin synthetase를 저해하여 PGE<sub>1</sub>의 유리를 억제하여 해열효과를 나타내는 것으로 되어 있다<sup>16~18)</sup>.

아라키돈산의 해열효과는 명확하지는 않으나 위와 같이 그 대사와 관련이 있는 것으로 사료된다.

본 연구는 1980년도 문교부 학술연구조성비로 이루어진 것이며 충심으로 감사의 뜻을 표한다.

## 文 獻

1. A. Ogata and Mori, *Nippon Yakugaku Aasshi* **58**, 859 (1938).
2. Y. E. Kim and I. C. Kim, *Seoul Univ. J. (C)* **16** (1965).
3. M. Hori, K. Kondo, T. Yoshida, E. Konishi and S. Minami, *Biochemical Pharmacology* **23**, 1583 (1974).
4. K. Weber, J. R. Pringle and M. Osborn, *Method in Enzymology* **26**, 3 (1972).
5. O. Gabriel, *Method in Enzymology* **22**, 565 (1971).
6. B. J. Davis, *Annals New York Academy of Sciences* **121**, 404 (1964).
7. D. L. Fillerrup and J. F. Mead, *Proc. Soc. Exp. Biol. Mod.* **83**, 574 (1953).
8. D. A. Van Dorp, R. K. Beerthrio, D. H. Nugteren and H. Vonkeman, *Biochim. Biophys. Acta.* **90**, 204 (1964).
9. S. Bergstrom, H. Daniellson and B. Samuelson, *Biochim. Biophys. Acta.* **90**, 207 (1964).
10. A. J. Marcus, *Journal of Lipid Research* **19**, 793 (1978).
11. B. Samuelsson, M. Goldyne, E. Gantrom, M. Hamberg, S. Hammarstrom and C. Malmsten, *Ann. Rev. Biochem.* **47**, 997 (1978).
12. D. H. Kim, *Arch. Pharm. Res.* **1**(1), 41 (1978).
13. M. J. Silver, W. Hoch, J. J. Kocsis, C. M. Ingberman and J. B. Smith, *Science* **183**, 1085 (1974).
14. T. W. Furlow and N. H. Bass, *Science* **187**, 658 (1975).
15. A. S. Milton and S. Wendlandt, *J. Physiol.* **218**, 325 (1971).
16. W. Feldberg and P. N. Saxena, *J. Physiol.* **217**, 547 (1971).
17. A. S. Milton and S. Wendlandt, *J. Physiol.* **207**, 76p (1970).
18. R. J. Flower and J. R. Vane, *Nature* **240**, 377 (1972).