

## 한국산 양서류피부의 생물학적활성물질에 관한 검색\*

延世大學校 醫科大學 藥理學教室

趙 台 淳 · 李 宇 柱 · 洪 思 爽

=Abstract=

### Active Polypeptides in Korean Amphibian Skin Extracts

T.S. Cho, W.C. Lee and S.S. Hong

Department of Pharmacology, Yonsei University College of Medicine  
Seoul, Korea

The effect of skin extracts of Korean amphibian, poisonous snake and fresh-water fish were determined for their caerulein-like action on rabbit gall bladder strips.

The isolated gall bladder strips were prepared according to the technique described by Amer and Becvar(1969). The strips were placed in a bath containing 100ml of Locke-Ringer solution maintained at 38°C. Oxygen was continuously bubbled through the solution. The tension of the muscle strip was initially adjusted to 0.7g. The contractile response was measured isometrically by a force-displacement transducer connected to a polygraph.

In this rabbit gall bladder strip caerulein produced contraction of CCK-PZ type. The skin extract of Korean amphibian also elicited similar contraction as caerulein, which extracted from Australian amphibian, *Hyla caerulea*, by Erspamer et al. The calculated amount was approximately 2 $\mu$ g caerulein per gram of skin tissue in Korean amphibian and the potency was about 1/200 of that seen in Australian amphibian. The contraction of gall bladder strip by our amphibians occurs in decreasing order; *Rana nigromaculata coreana* Okada, *Rana nigromaculata* Hallowell, *Hyla arborea japonica* Günther and *Bombina orientalis* Boulenger.

The skin extracts of poisonous snake and fresh-water fish produced no caerulein-like activity.

### I. 서 론

양서류 피부에 함유된 생물학적활성 polypeptide 의 연구는 1962년 Erspamer 등<sup>1)</sup>이 남미의 양서류 *Physalaemus fuscumaculatus* 에서 eleudoisin 양 polypeptide 인 physalemin 을 추출 보고함으로써 이목을 끌게 되었다. 그후 1966~1967년에 Erspamer 등<sup>2-4)</sup>은 오스트라리아산 개구리 *Hyla caerulea* 에서 caerulein 을 분리

하는데 성공하였다. 화학조성을 보면 말단탄소 5위까지의 아미노산 서열이 gastrin, cholecystokinin-pancreozymin(CCK-PZ)과 동일한 peptide 이며 위액분비를 촉진시키는 gastrin 양작용과 위액분비 및 담낭수축을 항진시키는 CCK-PZ 양작용이 현저하고 그외에 혈압강하작용과 위장평활근수축작용을 나타냄이 보고되고 있다<sup>5-9)</sup>. 1967년 De Caro 등<sup>10)</sup>은 오스트라리아산 Hyilidae 과 개구리 15종중 9종에서 caerulein 양작용을 관찰 보고하고 1969년 Anastasi 등<sup>11)</sup>은 남아메리카의 양서류인 phyllomedusa 속에서 caerulein 과 작용이 비슷한 nonapeptide, phyllocaerulein 을 분리하였고 1971년 Luis 등<sup>12)</sup>은 미국산 개구리인 *Rana pipiens* 에서

\* 본 논문의 일부는 제26회 대한약리학회(1974. 11. 1)에서 발표하였음.

본 연구는 연세의대 교수연구비(1974년도)로 이루어졌음.

angiotensin 과 작용이 비슷한 undecapeptide, ranatensin 을 분리하였다. 또 1971년 Anastasi 등<sup>13)</sup>과 Erspamer 등<sup>14)</sup>에 의하여 유럽의 양서류인 *Alytes obstetricans* 와 *Bombina* 속에서 평활근수축 작용을 나타내는 ranatensin 과 구조가 유사한 tetradecapeptide, alytensin 과 bombesin 을 각각 분리하였다.

이와같이 각대륙에 서식하는 양서류중에서 아미노산의 구성은 다르나 생물학적활성을 나타내는 polypeptide 가 분리되었으므로 한국산 개구리에서도 caerulein 양물질이 있지 않을까 사료되어 가토적출담낭절편표본을 이용한 생물학적검정방법으로 검색하였다. 아울러 독사류 및 담수어의 피부에 대해서도 검토하였다.

## II. 실험재료 및 방법

생물학적 활성물질은 주로 양서류에서 추출하였다. 양서류는 무당개구리과(discoglossidae)에 속하는 무당개구리(*Bombina orientalis* Boulenger)는 삼악산에서 채집하였고, 청개구리과(Hylidae)에 속하는 청개구리(*Hyla arboera japonica* Günther)는 광릉에서 채집하였고, 개구리과(Ranidae)에 속하는 개구리(*Rana nigromaculata* Hallowell)와 금개구리(*Rana nigromaculata coreana* Okada)는 서울근교에서 채집하였다. 추출방법으로는 개구리의 피부를 벗겨 잘게 썬다음 5배량의 methanol 을 넣고 冷暗所에 일주일간 방치하였다가 상등액을 경사하여 취하고 다시 5배량의 methanol 을넣어 일주일간 방치하였다가 상등액을 취하여 먼저 상등액과 합하여 실험에 사용하였다.

담수어로는 잉어과(Cyprinidae)에 속하는 잉어(*Cyp-*

*rinus carpio* Linné)와 붕어(*Carassius carassius*(Linne)), 참장어과(Anguillidae)에 속하는 뱀장어(*Anguilla japonica* Temmink et. Schlegel), 가물치과(Opicephaliae)에 속하는 가물치(*Opicephalus argus* Cantor), 드렁허리과(Symbbranchida)에 속하는 드렁허리(*Fluta alba* (Zuiew))를 남매문시장에서 산채로 구하여 껍질을 벗겨 양서류와 같이 처리하였다.

독사로는 살모사과(Crotalinae)에 속하는 살모사(*Agkistrodon blomhoffi brevicaudus*), 까치살모사(*Agkistrodon saxatilis*), 볼독사(*Agkistrodon caliginosus*)를 원주지방에서 채집하여 껍질을 벗겨 ethanol 에 담아 저장하였다가 사용하였다.

본실험에 사용한 caerulein 은 Milano 의 Farmitalia, Italia 제 F.I. 6934 caerulein 이며 V. Erspamer 교수가 제공하였다.

담낭절편은 24시간 절식시킨 토끼(1.5~2.5kg)에서 적출하였다. 적출담낭은 Amer 및 Becvar<sup>15)</sup>의 방법에 준하여 담낭절편표본을 작성하였다. 즉 산소를 포화시키고 38°C로 가온한 영양액중에 담낭을 즉시 넣고 그 속에서 간장을 잘 분리해 버린다음 담낭관쪽을 절개하여 담즙을 흘려 버리고 담낭을 라선상으로 절개하여 폭 5 mm, 길이 30~40 mm 정도의 절편을 만들고 38°C의 muscle chamber 에 넣고 30분 간격으로 영양액을 갈아 넣으면서 6시간 방치한후 실험을 시작하였다. 영양액은 Locke-Ringer 액 (NaCl 0.9, KCl 0.042, CaCl<sub>2</sub> 0.024, NaHCO<sub>3</sub> 0.05, glucose 0.1%)을 사용하였다. 담낭절편의 운동은 GRASS model 7 polygraph 에 의하여 수축곡선을 묘기하였으며 처음 담낭절편을 매달 때 장력이 0.7 g 내외가 되도록 조절하였다.

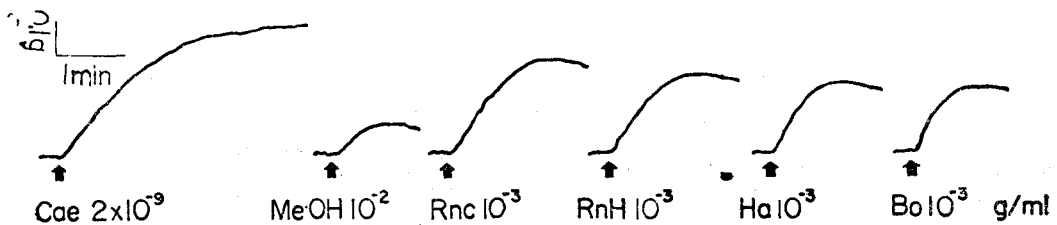


Fig. 1. Effect of frog skin extracts on the isolated rabbit gall bladder strip.

Cae : caerulein  
 Rnc : *Rana nigromaculata coreana* Okada  
 RnH : *Rana nigromaculata* Hallowell  
 Ha : *Hyla arborea japonica* Günther  
 Bo : *Bombina orientalis* Boulenger

### Ⅲ. 실험성적

#### 1) 한국산 양서류 피부침출액의 caerulein 양작용

토끼 담낭절편에 대하여 caerulein 은 강한 수축작용을 나타내 역가가 현저히 높으나 개구리침출액은 약한 담낭수축작용을 나타냈다. 즉 침출액 1ml 가 caerulein  $2 \times 10^{-9}$ g/ml 보다 약한 수축작용을 나타냈다(그림 1).

양서류간에 큰 역가차이는 없으나 정도의 차이를 나타내 제일 강한 예가 금개구리이며 다음이 개구리, 청개구리, 무당개구리의 순이었다.

caerulein 의 함량을 산출해 보면 제일 강한 금개구리가 조직 g당 2 $\mu$ g 정도가 된다.

#### 2) 담수어피부침출액의 작용

본실험의 모든 담수어추출액이 methanol 단독작용에 의한 수축작용 외에는 별다른 작용을 나타내지 못했다. 즉 생물학적활성물질이 없었다.

#### 3. 독사류 피부추출액의 작용

독사류 피부추출용매인 ethanol 자체가 강한 담낭이완작용을 나타내는데 독사류 추출액들은 모두 ethanol의 단독작용 외에는 각별한 작용을 나타내지 못하였다. 즉 생물학적 활성물질이 없었다.

### Ⅳ. 고 찰

양서류피부의 생물학적활성물질의 연구는 주로 Ers-pamer 교수와 그의 협동연구자들<sup>1-7, 10, 11, 13, 14</sup>에 의하여 이루어졌다. 그중 가장 생물학적작용이 강한 물질은 caerulein 으로 지금까지 알려진 물질중에서 담낭수축작용이 제일 강함이 알려졌다. 즉 Vagne 및 Grossman<sup>10</sup>에 의하면 개의 담낭부 실험에서 담낭수축작용이 CCK-PZ 보다 47배나 강함을 보고 하였고 조등<sup>9</sup>도 토끼담낭절편수축효과로 비교할때 CCK-PZ 보다 40배나 강함을 관찰하였으며 Bertaccini 등<sup>11</sup>은 개의 담낭조영 실험에서 caerulein 은 CCK-PZ 과 비슷한 작용을 나타내나 작용이 더욱 강함을 입증하고 나아가 Bertaccini<sup>10</sup> 등은 임상응용을 시도하여 42명의 건강인 사람과 10명의 담낭계질환을 가진 환자에서 담낭조영관찰을 한바 caerulein 의 반응역가는 0.5~1.0ng/kg 이고 20ng/kg 에서 작용이 90분 이상 지속되었으나 부작용은 경미하였음을 관찰하였고 Agosti 및 Bertaccini<sup>10</sup>는 사람의 담낭조영시에 비강으로 분무하여 하여도 잘 흡수

유효함을 관찰하였다.

한국의 양서류의 분포를 보면 개구리목에 5과가 있다. 즉 무당개구리과에 무당개구리, 두꺼비과에 두꺼비, 물두꺼비, 청개구리과에 청개구리, 맹꽁이과에 맹꽁이, 개구리과에 개구리, 금개구리, 북방산개구리, 산개구리, 조선산개구리, 움개구리 등이다.

이중에서 청개구리과(Hylidae)의 청개구리(Hyla arborea japonica Günther)는 caerulein 이 추출된 오스트라리아산 Hyla caerulea 와 같은 과이며 무당개구리과(Discoglossidae)의 무당개구리(Bombina orientalis Boulenger)는 bombesin 이 추출된 유럽산 Bombina 속 개구리와 같은 과이므로 한국산개구리피부에서도 생물학적활성 polypeptide 가 추출되지 않을까 생각되어 토끼담낭절편을 이용한 생물학적 방법으로 caerulein 양물질의 작용을 비교 검토하였다. 조등<sup>9</sup>에 의하면 적출토끼담낭절편은 histamine, serotonin 등 다른 아민류의 영향은 별로 없고 CCK-PZ 양 물질에 만 에민하게 반응하는 표본으로 지적되고 있다.

본실험에서 한국산 개구리의 피부에는 caerulein 양물질의 함량이 적어 조직 g 당 2 $\mu$ g 도 안되는데 De Caro 등<sup>10</sup>에 의하면 오스트라리아산 Hylidae 과 개구리중에서 Hyla caerulea 가 가장 함량이 많아 caerulein 의 함량이 평균 약 400 $\mu$ g/g 이 되어 한국산 개구리는 이에 비하면 역가가 1/200 정도 밖에 안되었다. 이는 오스트라리아산 Hyla 속 개구리에 있어서도 16종중 10종에만 미량이나마 함유되고 6종에는 전혀 없었다는 De Caro 등<sup>10</sup>의 보고를 환기시키며 caerulein 은 Hyla 속 개구리에 예외없이 개재되는 polypeptide 는 아닌것 같다.

한국산 개구리중에서도 역가에 차이가 있어 금개구리, 개구리, 청개구리, 무당개구리의 순으로서 청개구리나 무당개구리보다 금개구리가 활성이 더 강한 것은 흥미있는 사실이다.

독사류의 피부나 담수어의 피부에는 caerulein 양작용이 보이지 않는 것은 평활근에 작용하는 생물학적활성 polypeptide 는 양서류에만 있는 특이한 물질인 것으로 생각된다.

### V. 결 론

토끼 적출담낭절편의 수축반응으로 한국산 양서류 독사류 및 담수어의 피부추출액의 caerulein 양작용을 검토하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 한국산 양서류피부 methanol 추출액의 caerulein

역가는  $2\mu\text{g/g}$ 으로 생물학적활성물질의 함량은 비교적 적었다.

2) 한국산 양서류중 피부추출액의 caerulein 역가는 금개구리가 제일 강하였고 다음이 개구리, 청개구리, 무당개구리의 순이었다.

3) 독사류, 담수어 등의 피부에서는 caerulein 양작용을 관찰하지 못하였다.

## REFERENCES

- 1) Erspamer, V., Bertaccini, G. and Cei, J.M.: Occurrence of eledoisin-like polypeptide (physalaemin) in skin extracts of *Physalaemus fuscumaculatus*. *Experientia*, 18:562-563, 1962.
- 2) Erspamer, V., Roseghini, M., Endean, R. and Anastasi, A.: Biogenic amines and active polypeptides in the skin of Australian amphibians. *Nature*, 212:204, 1966.
- 3) Anastasi, A., Erspamer, V. and Endean, R.: An active decapeptide from the skin of *Hyla caerulea*. *Experientia*, 23:699-700, 1967.
- 4) Anastasi, A., Erspamer, V. and Endean, R.: Isolation and amino acid sequence of caerulein, the active decapeptide of the skin of *Hyla caerulea*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 125:57-68, 1968.
- 5) Erspamer, V., Bertaccini, G., De Caro, G., Endean, R. and Impicciatore, R.: Pharmacological actions of caerulein. *Experientia*, 23:702-703, 1967.
- 6) Erspamer, V.: Progress report: Caerulein. *Gut*, 11:79-87, 1970.
- 7) Bertaccini, G.: Active polypeptide in amphibian skin. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 269:139-152, 1971.
- 8) 趙台淳, 申昌珍, 李炳學, 洪思爽: 흰쥐의 胃·十二指腸同時灌流標本에 대한 caerulein의 作用. 대한약리학잡지, 9:17-27, 1973.
- 9) 趙台淳, 李宇柱, 洪思爽: 토끼 담낭절편에 대한 caerulein의 作用. 대한약리학잡지, 10:47-54, 1974.
- 10) De Caro, G., Endean, R., Erspamer, V. and Roseghini, M.: Occurrence of caerulein in extracts of the skin of *Hyla caerulea* and other Australian Hylids. *Br. J. Pharmac. Chemother.*, 33:48-58, 1968.
- 11) Anastasi, A., Bertaccini, G., Cei, J.M., De Caro, G., Erspamer, V. and Impicciatore, M.: Structure and pharmacological actions of phyllocerulein, a caerulein-like nonapeptide: its occurrence in extracts of skin of *Phyllomedusa sauvagei* and related *Phyllomedusa* species. *Br. J. Pharmac. Chemother.*, 37:198-206, 1969.
- 12) Louis, W.J., Tanimura, T. and Pisano, J.J.: The relationship between the vascular responses to the peptides ranatensin and angiotensin. *European. J. Pharmacol.*, 14:340-343, 1971.
- 13) Anastasi, A., Erspamer, V. and Ducci, M.: Isolation and structure of bombesin and alytesin, two analogous active peptides from the skin of the European amphibians *Bombina* and *Alytes*. *Experientia*, 27:166-177, 1971.
- 14) Erspamer, V., Erspamer, G.F., Inselvini, M. and Negri, L.: Occurrence of bombesin and alytesin in extracts of the skin of three European discoglossid frogs and pharmacological actions of bombesin on extravascular smooth muscle. *Br. J. Pharmac. Chemother.*, 45:333-348, 1972.
- 15) Amer, M.S. and Becvar, W.E.: A sensitive *in vitro* method for the assay of cholecystokinin. *J. Endocr.*, 43:637-642, 1969.
- 16) Vagne, M. and Grossman, M.I.: Cholecystokinetic potency of G-I hormones and related peptides. *Am. J. Physiol.*, 215:881-884, 1968.
- 17) Bertaccini, G., Ballarini, G., Agosti, A. and Zennetti, G.: Action of caerulein on the biliary system of the dog. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 183:261-269, 1970.
- 18) Bertaccini, G., Braibanti, T. and Uva, F.: Cholecystokinetic activity of the new peptide caerulein in man. *Gastroenterology*, 56:862-867, 1969.
- 19) Agosti, A. and Bertaccini, G.: Nasal absorption of caerulein. *Lancet*, Vol. I for 1969:580-581, 1969.