

흰쥐에서 sinigrin 대사에 관한 연구

허 근⁺ · 신억섭 · 이상일* · 송민익**

영남대학교 약학대학, *계명실업전문대 식영과, **東京大學 先端研究所

Studies on the Metabolism of Sinigrin in Rat

Keun HUH⁺, Uk Seob SHIN, Sang Il LEE* and Min Ik SONG**

Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyongsan 713-749.

*Department of Food and Nutrition, Keimyung Junior College, Taegu 705-701.

**Lab. of biosensors, Tokyo University, Tokyo, Japan.

(Received January 26, 1994; accepted March 21, 1994)

Abstract—The detoxifying properties of cruciferous vegetables components have been the subject of several recent investigations. Evidences from many biochemical and pharmacological studies indicated that higher consumption of cruciferous vegetables is associated with lower incidence of harmful actions such as hepatotoxicity and oxidative stress in animal and human populations. Recently, it has been reported that drug metabolizing and detoxifying enzyme activities were increased by cruciferous vegetable extract in which sinigrin is known to be a main active component, accounting for about 2 to 3 percents of total extract. The detoxifying effect of sinigrin has been well reported in several literatures. The metabolism of sinigrin in animal, however, has not been reported yet. That led us to study the metabolism of sinigrin in rat. Sinigrin is known to be metabolized into three compounds, *i.e.*, allyl isothiocyanate, glucose and potassium phosphate in cruciferous vegetables. Allyl isothiocyanate was formed in rat hepatic mitochondrial fraction in dose and incubation time dependent manner, that was confirmed by HPLC. Glucose formation was came up with results similar to that of allyl isothiocyanate. Three hours after *i.p.* administration of sinigrin to rat, allyl isothiocyanate appeared in rat liver, and five hours later it was detected in liver and blood. The above results suggested that sinigrin might be metabolized into allyl isothiocyanate, glucose and potassium phosphate in rat.

Keywords □ sinigrin, allyl isothiocyanate, sinigrin metabolizing enzyme, HPLC.

Cabbage, mustard, 냉이 등과 같은 십자화과 식물의 추출물을 장기간 섭취시킨 실험동물에서 약물대사계 주효소인 cytochrome P450이 관여하는 mixed function oxidase의 활성이 증가하며(Conney, 1967; Kappas 등, 1976; Mcdanell 등, 1987; Pantuck 등, 1976; Pantuck 등, 1979) 또한 xenobiotics 대사의 phase II 과정에서 중요한 역할을 수행하고 있는 glutathione 포함 반응을 촉진시키는 glutathione S-transferase의 활성을 증가시킨다는 보고가 있다(Bradfield 등, 1984; Lee, 1989). 한편 이 식물의 잎을 먹고 서식하는 곤충들은 점차 살아가는 동안에 살충제에 대한 내성을 갖게 된다는 보고(Yu, 1983)와 포유류에서도 이식물의 추출물을 식이로 섭취시켰을 때 acetaminophen을 과량 투여하여 유도한 독

성으로부터 생체를 보호하는 작용을 나타낸다는 연구 보고(Pantuck 등, 1984)가 있어 십자화과 식물 중에는 해독반응을 촉진시켜 xenobiotics에 대한 독작용을 감소시키는 성분이 함유되어 있을 것이라는 것을 시사해 주고 있다. 뿐만 아니라 최근에는 이식물의 주성분인 sinigrin을 실험동물에 투여하였을 때 oxygen radical의 scavenger 효소활성들이 증가하였다는 연구보고가 있어 관심을 갖게하고 있다(Huh 등, 1991). Sinigrin은 십자화과 식물에 비교적 다양으로 함유되어 있는 glucosinolate 배당체로(Haibao 등, 1987; Halba 등, 1986) 식물체 내에서는 십자화과식물 특유의 효소인 myrosinase에 의해 가수분해되어 지고(Gaines와 Goering, 1962) 있으나 포유류에서는 sinigrin의 대사가 검토되어 있지 않다. 그 러므로 저자 등은 sinigrin의 약리작용을 검토하는 연구의 일환으로 rat간에서 sinigrin의 대사를 관찰하여 흥미있는

⁺ To whom correspondence should be addressed.

결과를 얻었다.

실험방법

시약 및 기기

Sinigrin, bovine serum albumin은 Sigma사(St Louis, MO), allyl isothiocyanate는 Aldrich사(Milwaukee, WI), glucose 및 potassium sulfate는 Junsei사(Tokyo, Japan), GL zyme Kit(glucose 정량용)는 Eiken사(Tokyo, Japan)의 것을 사용하였다.

Acetonitrile, methanol 및 water는 Fisher사(New Jersey, USA)의 HPLC용을 사용하였으며 기타 실험에 사용한 모든 시약은 특급 내지는 일급품을 사용하였다.

실험에 사용한 기기로는 Pharmacia사(Sweden) HPLC로서 Pump(LKB 2248), system controller(LKB LCC 2252), UV detector(LKB VWH 2141) 및 integrator(Shimadzu CR6A, Japan)를 사용하였으며, column은 μ -Bondapak C₁₈(250×4.6 mm id., Altech Assoc., Deerfield, USA)을 사용하였다. Spectrophotometer는 Hitachi(model 200-20)사 기기를 사용하였다.

실험동물 및 처치

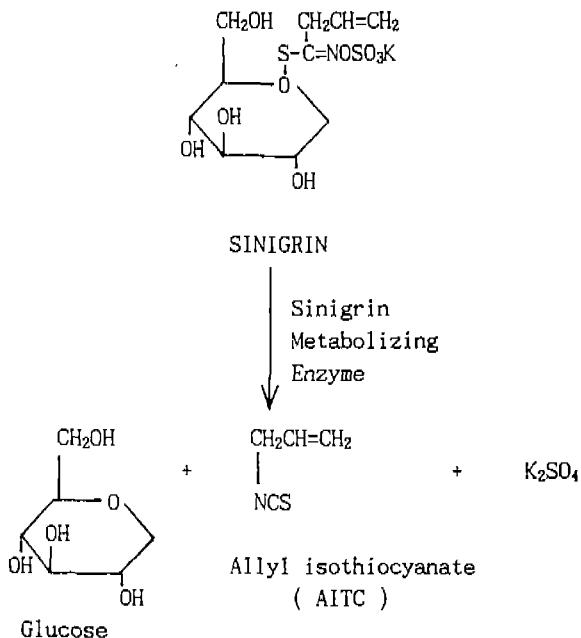
본 대학 동물사에서 일정한 온도($20\pm3^{\circ}\text{C}$)와 습도(50~60%)가 유지되며 오전 7시에 점등되고 오후 7시에 소등되는 조건에서 사육한 건강한 250 g 내외의 웅성 흰쥐를 사용하였다. Sinigrin의 투여는 500 mg/kg의 용량을 1회 복강투여한 후 시간 경과에 따라 실험을 실시하였다.

Sinigrin 대사체의 확인 실험

Sinigrin 대사체의 확인 실험은 식물체내에 존재하는 효소인 myrosinase 활성 측정법(Gaines와 Goering, 1962)에 준해 실시하였다. 0.1 M sodium citrate buffer(pH 6.2) 3.0 mL에 기질인 sinigrin 4.8 mM, 효소액(mitochondria 분획, 2~4 mg)을 가하여 37°C에서 3시간 반응시킨 후 20% TCA로 제단백시키고 원심분리한 다음 생성된 glucose와 allyl isothiocyanate를 아래 각각의 방법으로 확인하였다.

Allyl isothiocyanate의 확인

Sinigrin 주 대사산물인 allyl isothiocyanate의 확인 및 정량은 HPLC법을 이용하였다. 표준액으로는 allyl isothiocyanate를 50% methanol(v/v)에 용해하여 10 mM의 농도가 되게 하였다. 시료의 조제는 *in vitro*인 경우 0.1 M sodium citrate buffer(pH 6.2) 3.0 mL에 sinigrin과 효소액(mitochondrial fraction)을 가하여 37°C에서 시간별로 반응시킨 다음 제단백시키고 원심분리하여 상층액을 allyl isothiocyanate 정량용 시료로 사용하였으며 *in vivo*인 경우는 sinigrin 투여 후 시간별에 따라 조직을 적출하여 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.2)액에 마쇄하여 20% 마쇄액을 만든 다음, 이 마쇄액 1.0 mL을 제단백, 원심분리하여 상층액을 취한 후 이것을 시료로 사용하



Scheme 1. Metabolic pathway of sinigrin.

였다. 한편 HPLC의 측정 조건은 아래와 같았다.

| | |
|------------------|---|
| Mobile phase | ; Acetonitrile : water = (50 : 50, v/v) |
| Flow rate | ; 1.0 mL/min |
| Detector | ; UV 245 nm |
| Injection volume | ; 5 μL |
| AUFS | ; 0.1 |

Glucose 정량

0.1 M sodium citrate buffer(pH 6.2)액, sinigrin 및 효소액을 가하여 37°C에서 일정 시간 반응시킨 다음 생성된 glucose는 Kunst 등의 방법(Kunst 등, 1983)에 준하여 Kit시약으로 측정하였다. 반응액을 제단백시켜 얻은 상층액 일정량에 효소시약 3.0 mL를 가하여 37°C에서 충분히 발색시킨 다음 파장 500 nm에서 흡광도의 변화를 읽고 농도를 산정하였다.

단백질의 정량

단백질의 정량은 Lowry 등의 방법(Lowry 등, 1951)에 준하여 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 정량하였으며 실험 결과의 통계처리는 student's t-test를 이용하였다.

실험결과 및 고찰

시험관내에서 sinigrin 대사효소에 의한 allyl isothiocyanate 생성 확인

Rat의 간에서도 sinigrin이 십자화과 식물체에서처럼 기수분해되어 allyl isothiocyanate, glucose 및 potassium sulfate의 3가지 구성성분으로 대사되는지(Scheme

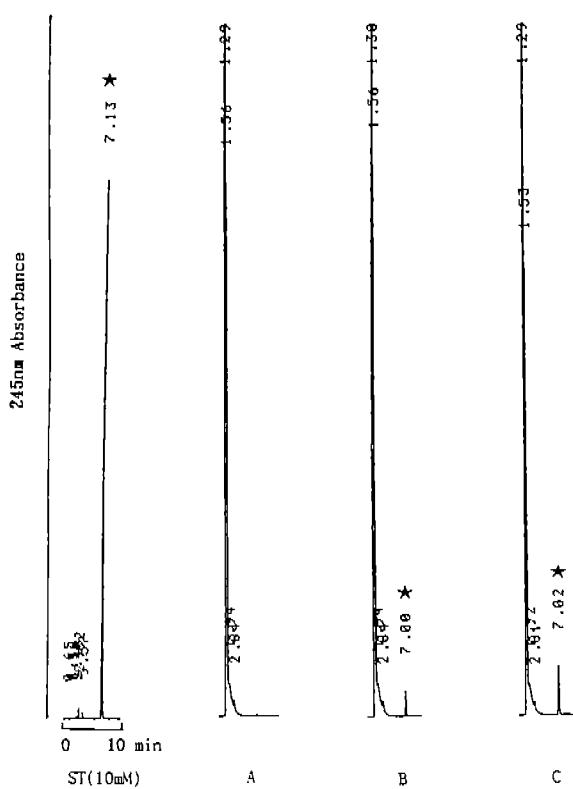


Fig. 1. Dose dependent chromatograms of allyl isothiocyanate (AITC), a main metabolite of sinigrin by sinigrin metabolizing enzyme *in vitro*.

The assay procedure was described in the experimental methods. ST: AITC standard chromatogram, A: none of sinigrin, B: 10 mg of sinigrin as substrate, C: 20 mg of sinigrin as substrate.

1 참조) 아니면 이와 다른 대사경로를 거쳐 분해되어지는지를 관찰하기 위하여 아래 실험을 실시하였다. 먼저 실험결과로 제시는 하지 않았지만 sinigrin 대사효소가 세포내 mitochondria분획에 존재함을 확인하였다.

*In vitro*에서 간 mitochondria분획을 sinigrin과 같이 incubation하면서 비교관찰 하였다. 시험관내에서 sinigrin 대사효소에 의한 allyl isothiocyanate 생성을 sinigrin 농도별에 따라 HPLC로 확인한 성적이 Fig. 1이다.

그림에서 알 수 있듯이 allyl isothiocyanate 표준액(10 mM)의 HPLC chromatogram은 7.13분에서 주peak를 확인할 수 있었으며, sinigrin을 첨가하지 않은 상태에서는 이와 같은 peak를 확인할 수 없었으나 sinigrin을 10 mg을 첨가하였을 때는 allyl isothiocyanate의 생성량이 107.4 nmoles, 20 mg을 첨가한 실험조건에서는 207.51 nmoles로 용량의존적으로 allyl isothiocyanate의 생성이 증가되어 짐을 확인할 수 있었다. 한편 10 mg의 sinigrin을 시험관내에 첨가한 다음 37°C에서 반응시간 별로 allyl isothiocyanate의 생성을 확인하였을 때도(Fig. 2) 1 시간의 경우 32.12 nmoles, 3시간의 경우 114.56 nmoles,

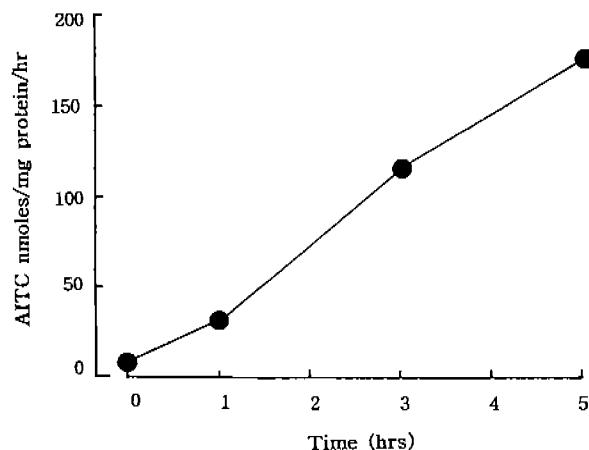


Fig. 2. Incubation time dependent chromatograms of allyl isothiocyanate (AITC), a main metabolite of sinigrin by sinigrin metabolizing enzyme *in vitro*. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are means for 3 separate experiments.

Table I. Dose dependent formation of glucose from sinigrin by sinigrin metabolizing enzyme *in vitro*

| Dose(mg) | Glucose content (nmoles/mg protein/hr) |
|----------|--|
| 0 | 12.47±1.99 |
| 10 | 46.33±2.42*** |
| 20 | 83.47±3.04*** |

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are means±S.E. for 3 separated experiments. Significantly different from control (***: p<0.001).

Table II. Incubation time dependent formation of glucose from sinigrin by sinigrin metabolizing enzyme *in vitro*

| Time (hrs) | Glucose content(nmoles/mg protein/hr) |
|------------|---------------------------------------|
| 0 | 12.47±1.99 |
| 1 | 20.39±2.36 |
| 3 | 46.33±2.42*** |
| 5 | 66.71±2.39*** |

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are means±S.E. for 3 separated experiments. Significantly different from control (***: p<0.001).

5시간인 경우 173.44 nmoles로서 반응시간 의존적으로 allyl isothiocyanate의 생성이 증가됨을 HPLC로 확인정량할 수 있었다. 이와 같은 실험 성적은 sinigrin이 포유류 생체내에서도 가수분해되어 allyl isothiocyanate로 대사되어 지고 있음을 보여주고 있다.

시험관내에서 sinigrin 대사효소에 의한 glucose 생성 확인

Sinigrin이 십자화과 식물체내에서는 glucose로 대사되어지므로 앞에서와 같은 실험조건에서 glucose의 생성을 관찰한 성적이 Table I, II이다.

Fig. 1에서 관찰한 sinigrin 용량의존적 allyl isothiocyan-

Table III. The formation of allyl isothiocyanate (AITC) by sinigrin treatment in rat liver

| Group | AITC formation (nmoles/ml of homogenate) |
|----------------------|---|
| Control | ND |
| 3hrs after treatment | 17.80±2.40 |
| 5hrs after treatment | 31.77±4.01 |

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are means±S.E. for 4 animals. ND: not detected.

anate생성증가와 같은 양상으로 glucose의 생성도 점차적으로 증가됨을 알 수 있었다. Table I에서 볼 수 있듯이 sinigrin을 첨가하지 않았을 때는 glucose함량이 12.47 nmoles 이었으나 10 mg, 20 mg을 첨가하였을 경우는 46.33, 83.47 nmoles로서 sinigrin 첨가량을 증가 시킬수록 이에 비례하여 glucose생성량이 용량의존적으로 현저하게 증가 되어짐을 볼 수 있었다. Table II에서도 sinigrin 10 mg을 첨가시킨 다음 37°C에서 반응시간별로 glucose의 생성정도를 관찰하였을 때 Fig 2에서와 마찬가지로 반응시간 의존적으로 glucose의 생성이 현저히 증가됨을 알 수 있었다. 이상의 실험결과는 sinigrin의 대사가 지금까지는 식물체 내에서만 확인(Gaines와 Goering, 1962)되었고 동물체내에서는 전혀 보고된 바가 없는 상태이므로 매우 의의 있는 결과라고 사료되어 진다. 한편 이러한 결과를 더욱 뒷받침 할 수 있는 성적을 얻기 위해서 실험동물인 흰쥐에 sinigrin을 주사한 후 대사산물의 생성을 확인하고자 다음 실험을 실시하였다.

Sinigrin 투여 후 체내 조직 중 allyl isothiocyanate 생성 확인

흰쥐에 sinigrin 500 mg/kg의 용량을 복강투여한 후 시간 경과에 따라 조직 중의 allyl isothiocyanate생성을 HPLC chromatogram으로 확인하여 정량한 성적이 Table III, IV이다. Table III에서 알 수 있듯이 sinigrin 투여 직후에는 간조직 중에서 allyl isothiocyanate의 생성을 확인 할 수 없었으나 투여 3시간 경과후 부터는 allyl isothiocyanate의 생성을 확인 할 수 있었으며 5시간 때는 3시간 때보다 더 많은 량의 생성을 확인 할 수 있었다. Table IV에서는 sinigrin을 투여한 후 혈액 중의 allyl isothiocyanate의 생성을 확인한 성적으로 투여 3시간 경과 후 까지는 allyl isothiocyanate의 혈중 존재를 확인할 수 없었으나 투여 5시간 경과 후에는 혈중에 출현하고 있음을 확인 할 수 있었다. 한편 실험성적으로 제시는 하지 않았지만 sinigrin의 또 다른 대사산물인 glucose함량도 sinigrin 투여 후 시간 경과에 따라 혈액중 농도가 점차 증가됨을 볼 수 있었다. 이는 sinigrin이 생체내 주된 약물대사 장기인 간장 중에서 매우 빠르게 대사되어지며, 대사산물이 용이하게 혈액 중으로 분포되어 짐을 시사해 주고 있다. 이상의 실험성적을 종합

Table IV. The formation of allyl isothiocyanate (AITC) by sinigrin treatment in rat blood

| Group | AITC formation (nmoles/ml of blood) |
|----------------------|--|
| Control | ND |
| 3hrs after treatment | ND |
| 5hrs after treatment | 8.25±1.04 |

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are means±S.E. for 4 animals. ND: not detected.

해보면 sinigrin은 십자화과 식물체에서와 마찬가지로 흰쥐 체내에서도 대사되어 allyl isothiocyanate, glucose 및 potassium sulfate를 생성하며 그 대사속도도 빠르게 일어나는 것을 알 수 있었다. 하지만 sinigrin을 대사시키는 효소가 식물체내의 대사효소와 동일한 효소인지는 앞으로 계속 수행해야할 연구과제로 남아있다.

참고문현

- Bradfield, C. A. and Bjeldanes, L. F. (1984). Effect of dietary indole-3-carbinol on intestinal and hepatic monooxygenase, glutation S-transferase and epoxide hydrolase activities in the rat. *FD. Chem. Toxic.* **22**(12), 977-982.
- Conney, A.H. (1967). Pharmacological implications of microsomal enzyme induction. *Pharmacol. Rev.* **IP**, 317-366.
- Gaines, R. D. and Goering, K. J. (1962). Myrosinase II. The Specificity of the myrosinase system. *Arch. Biochem. Biophys.* **96**, 13-19.
- Haibao, S., Guoping, P. and Zhengping, J. (1987). Comparison between the sinigrin content in sinapis semen(Brassica Juncea) before and after processing. *Zhongyao Tongbao.* **12**(4), 210-212.
- Halva, S., Hirvi, T., Makinen, S. and Honkanen, E. (1986). Yield and glucosinolate in mustard seeds and volatile oils in caraway seeds and coriander fruit. I. Yield and glucosinolate contents of mustard (sinapis sp., Brassica. S. P.) *J. Agric. Sci. Finl.* **58**(4), 157-161.
- Huh, K., Song, M. I. and Lee, S. L. (1991). Effect of sinigrin on the hepatic xanthine oxidase and free radical scavenging enzyme activities in mice. *Korean Biochem. J.* **24**(1), 1-4.
- Kappas, A., Anderson, K. E., Conney, A. H. and Alvares, A. P. (1976). Influence of dietary protein and carbohydrate on antipyrine and theophylline metabolism in man. *Clin. Pharmacol. Ther.* **20**(6), 643-653.
- Kunst, A., Draeger, B. and Ziegenhorn, J. (1983). D-Glucose: Colorimetric methods with glucose oxidase and peroxidase. In *Methods of enzymatic analysis*, 3rd. ed. Vol. **6**, 178-185.
- Lee, S. I. (1989). The effect of sinigrin on the hepatic cytosolic glutatione S-transferase activity in mice. *계명연구논총*. **7**, 291-301.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). Protein Measurement with folin phenol reagent.

- J. Biol. Chem.* **193**, 265.
- McDanell, R., MCLean, A. E. M., Hanley, A. B., Heaney, R. K. and Fenwick, G. R. (1987). Differential induction of mixed Function oxidase(MFO) activity in rat liver and intestine by diets containing processed cabbage: correlation with cabbage levels of glucosinolates and glucosinolate hydrolysis product. *Fd. Chem. Toxic.* **25**(5), 363-368.
- Pantuck, E. J., Hsiao, K. C., Loub, W. O., Wattenberg, L. W. and Kuntzman, R. (1976). Stimulatory effect of vegetables on intestinal drug metabolism in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **198**(2), 278-283.
- Pantuck, E. J., Pantuck, C. B., Anderson, K. E., Wattenberg, L. W., Conney, A. H. and Kappas, A. (1984). Effect of brussels sprouts and cabbage on drug conjugation. *Clin. Pharmacol. Ther.* **35**(2), 161-169.
- Pantuck, E. J., Pantuck, C. B., Garland, W. A., Min, B. H., Wattenberg, L. W., Anderson, K. E., Kappas, A. and Conney, A. H. (1979). Stimulatory effect of brussls sprouts and Cabbage on human drug metabolism. *Clin. Pharmacol. Ther.* **25**(1), 88-95.
- Yu, S. J. (1983). Induction of detoxifying enzymes by allelochemicals and host plant in the fall armyworm. *Pestic. Biochem. Physiol.* **19**, 330.