

Isoflavone 섭취가 흰쥐의 지방대사 및 면역능력에 미치는 영향*

정미경 · 방명희 · 설소미 · 김우경[§]

단국대학교 식품영양학과

The Effects of Isoflavone on Lipid Metabolism and Immune Responses in SD Rats*

Jeong, Mi Kyoung · Bang, Myung Hee · Seol, So Mi · Kim Woo Kyoung[§]

Department of Food Science and Nutrition, Dankook University, Seoul 140-714, Korea

ABSTRACT

This study was performed to investigate the effects of isoflavone consumption on plasma and liver lipid profiles and immune responses in Sprague-Dawley male rats. Experimental animals fed isoflavone at various doses for 4 weeks (0, 1095, 2190, 4380 isoflavone mg/kg diet). Exposure to isoflavone decreased the food consumption and final body weights of rats without decreasing the relative weights of organs, hemoglobin and hematocrit. And the plasma cholesterol and LDL-cholesterol, liver total lipid, cholesterol and triglyceride concentrations were significantly decreased by isoflavone intakes. The absolute and relative weights of thymus were significantly decreased in groups fed isoflavone than in control. Also splenocyte proliferations with Con A or PHA were decreased according to isoflavone consumption in rats, although there was not significant. These results demonstrate that isoflavone intakes significantly improve lipid profiles in plasma and liver. But the effects of isoflavone intakes on immune responses are needed further experiments. (*Korean J Nutrition* 35(6): 635~642, 2002)

KEY WORDS: isoflavone, lipid metabolism, immune response.

서 론

Flavonoids는 isoflavone, lignan, phytosterol, coumes-tan, flavones, catechins, anthocyanidin, dihydroflavonols, chalcones로 분류되며 식품 중에는 glycoside나 methylated된 형태로 존재한다.¹⁾ Flavonoids는 식물 중에 함유된 비 열량 물질이지만 최근 혈관확장성,²⁾ 골다공증 예방,^{3,4)} 항산화능력,^{5,6)} 모세혈관 투과성과 유연성 감소⁷⁾ 등 다양한 생리활성들이 보고되면서 많은 주목을 받고 있다.

Isoflavone은 대두에 많이 함유되어 있는 flavonoid로 genistein과 daidzein이 주요 성분이고, 이들은 당류와 결합된 genistin과 daidzin, 메틸화된 biochanin A, formononetin의 형태로 식품에 존재한다.⁸⁾ 식품중 당류와 결합되어 있는 isoflavone은 섭취된 후 장에서 미생물에 의해 가수분해되어 당과 분리된 aglycone 형태인 genistein과 daidzein으로 흡수되어 혈액 내 나타난다. 흡수된 Iso-

flavone들은 궁극적으로는 glucuronide나 sulfate와 결합된 형태로 뇌로 배출된다.⁹⁾

Isoflavone은 estrogen과 유사한 구조를 가지고, 체내에서 estrogen receptor와 약하게 결합함으로서 antiestrogen, estrogenic 효과를 가지며, 체내에서 여러 생리효과를 나타낸다.⁸⁾ 우리나라의 경우 1998년에 보고된 국민영양조사 결과¹⁰⁾에 의하면 두류 섭취는 전국 1인 1일당 31.0 g이고, 두류 100 g당 약 30 mg의 isoflavone이 함유되어 있어,¹¹⁾ 두류를 통해서 약 10 mg 내외의 isoflavone을 섭취한다고 추정해 볼 수 있다. 또한 농촌지역의 여성들 대상으로 5 종류의 대두 가공식품의 섭취를 조사한 결과, 하루에 27.3 mg의 isoflavone을 섭취한다고 한다.¹²⁾

우리 나라와 같이 콩의 섭취가 많은 아시아 지역 사람들 을 대상으로 한 역학조사에서 두류의 섭취는 유방암과 전립선암의 위험을 감소시키고,^{13,14)} isoflavone의 섭취는 사람과 실험동물에서 항동맥경화효과를 가지며,^{15,16)} 골다공증을 예방하고,⁴⁾ 면역능력에 영향을 미친다고 한다.¹⁷⁾ 이러한 생리활성들이 알려지면서 isoflavone을 함유한 여러 건강식품들이 판매되고 있으나 섭취량 증가에 대한 체내 영향 등에 대해서는 아직 많은 연구가 필요하다.

그러므로 본 연구는 isoflavone의 농도를 달리한 식이로

접수일 : 2002년 6월 22일

채택일 : 2002년 7월 15일

*The research was conducted by the research fund of Dankook University in 2000.

[§]To whom correspondence should be addressed.

실험동물을 사육하여 isoflavone 섭취량에 따라 일반적인 성장과 지방대사, 면역능력에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물의 사육 및 식이

실험동물은 생후 4주된 Sprague-Dawley (SD)계 수컷 흰쥐로 40마리를 구입하여 체중에 따라 난괴법에 의해 4군으로 나누었다. 실험식이는 AIN-93G식이¹⁸⁾를 기준으로 하였고, isoflavone powder를 식이에 0, 0.5, 1, 2% 함유된 4가지 식이 (Control, IsoL, IsoM, IsoH)를 제조하여 실험동물을 4주간 사육하였다. 실험식이에 사용한 isoflavone powder (선플라본, (주)신동방)는 콩의 배아에서 제조한 것으로 genistein 38 mg/g, daidzein 116 mg/g, glycitein 65 mg/g 함유되어 총 isoflavone이 219 mg/g aglycone 형태로 들어 있는 것을 사용하였다. 그러므로 Control 식이에는 isoflavone이 함유되어 있지 않으며, IsoL 식이에는 genistein 190 mg/kg diet, daidzein 580 g/kg diet, total isoflavone 1,095 mg/kg 들어 있으며, IsoM 식이에는 genistein 380 mg/kg diet, daidzein 1,160 mg/kg diet, total isoflavone 2,190 mg/kg이 들어있으며, IsoH 식이에는 genistein 720 mg/kg diet, daidzein 2320 mg/kg diet, total isoflavone 4380 mg/kg이 포함되어 있다. 실험식이의 자세한 성분조성은 Table 1과 같다. 실험동물은 한 마리씩 stainless steel cage에서 물과 식이를 자유롭게 섭취하도록 하였으며, 식이섭취량은 일주일에 2회, 체중은

일주일에 1회 일정한 시간에 측정하였다. 식이 효율 (food efficiency ratio: FER)은 사육기간동안의 체중증가량을 같은 기간동안 섭취한 식이량으로 나누어 산출하였다.

$$\text{식이 효율 (FER)} = \frac{\text{총 실험기간의 체중증가량 (g)}}{\text{총 실험기간의 식이 섭취량 (g)}}$$

2. 실험동물 희생 및 시료 채취

사육기간이 끝난 실험동물들을 12시간 절식시킨 후 ethyl-ether로 마취하여 심장에서 주사기로 채혈하여 희생하였다. 채혈된 혈액의 일부 전혈은 hemoglobin과 hematocrit 측정에 사용하였고 나머지는 EDTA가 함유된 시험관에 넣고, 3,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 혈장을 분리하였다. 비장은 무균적으로 채취하여 무게를 측정하였으며, 비장세포 증식실험에 사용하였다. 간, 신장, 부고환지방, 고환, 혼선은 채취하여 생리 식염수로 세척하고 여과지로 물기를 제거하고 무게를 측정하였다. 혈장과 간은 생화학적인 분석 전 까지 -70°C에서 냉동보관 하였다.

3. 혈액성분 분석

전혈상태로 hemoglobin은 kit 시약 (아산제약, 한국)을 이용하여 측정하였고, hematocrit은 전혈을 모세혈관에서 원심분리하여 hematocrit reader로 측정하였다. 혈장내 albumin 농도는 kit 시약 (아산제약, 한국)을 이용하여 측정하였다.

4. 혈장과 간내 지방성분 분석

혈장의 총 지방은 효소법에 의한 kit 시약 (국제약품, 일본)에 의하여 측정하였고, 중성지방, 총 콜레스테롤, HDL-

Table 1. Composition of experimental diets (g/kg diet)

Ingredients	Control	IsoL	IsoM	IsoH
Corn starch	529.486	524.486	519.486	509.486
Casein	200.0	200.0	200.0	200.0
Sucrose	100.0	100.0	100.0	100.0
Soybean oil	70.0	70.0	70.0	70.0
Fiber (cellulose)	50.0	50.0	50.0	50.0
Mineral mix ¹⁾	35.0	35.0	35.0	35.0
Vitamin mix ²⁾	10.0	10.0	10.0	10.0
L-Cystine	3.0	3.0	3.0	3.0
Choline	2.5	2.5	2.5	2.5
Tert-butylhydroquinone	0.014	0.014	0.014	0.014
Soy isoflavone powder	-	5.0	10.0	20.0

1) Mineral mixture (per kg): Calcium carbonate, 357g; monopotassium phosphate, 196 g; Potassium citrate, 70.78 g; Sodium chloride, 74 g; Magnesium oxide, 24 g; Ferric citrate, 6.06 g; Zinc carbonate, 1.65 g; Manganous carbonate, 0.63 g; Cupric carbonate, 0.30 g; Potassium iodate, 0.01 g; Ammonium paramolybdate, 0.00785 g; Powdered sucrose, 269.56215 g

2) Vitamin mixture (per kg): Nicotinic acid, 3.0 g; Ca Pantothenate, 1.6 g; Pyridoxine HCl 0.7 g; Thiamin HCl, 0.6 g; Riboflavin 0.6 g; Folic acid, 0.2 g; D-Biotin, 0.02 g; Vitamin B₁₂, 2.5 g; Vitamin E, 15.0 g; Vitamin A, 0.8 g; Vitamin D₃, 0.25 g; Vitamin K, 0.075 g; Powdered sucrose, 974.655 g

콜레스테롤도 효소법을 이용한 kit 시약 (아산제약, 한국)을 이용하여 측정하였다. LDL-콜레스테롤은 Friedwald 법¹⁹⁾ [LDL-콜레스테롤=총 콜레스테롤-HDL-콜레스테롤-(중성지방/5)]에 의해 계산하였다. 간내 지방성분은 Folch 법²⁰⁾을 변형하여 chloroform: methanol (2 : 1, v/v) 용액으로 추출하였고, 총 지방과 중성지방은 혈장 내 지방성분 측정과 같은 방법을 사용하였고, 콜레스테롤은 Zak 법²¹⁾에 의해 측정하였다.

5. 비장세포증식 실험

비장은 무균적으로 분리하여 RPMI 1640 (Gibco, Grand Island N.Y.: 200 mM glutamin, 25 mM Hepes, 1.4 µl/ml gentamycin) 배양액에 넣고, 멸균 seive를 이용하여 single cell suspension을 만들었다. Spleen single cell suspension을 10% fetal calf serum을 함유한 RPMI 1640 배양액 내의 세포농도가 2.5×10^6 cells/ml되게 하여 96 well plate에 각 well당 100 µl씩 분주하였다. 각 well에 mitogen으로 Con A (concanavalin A, Sigma) 0.1 µg/10 µl, 0.75 µg/10 µl, PHA 10 µg/10 µl 씩 첨가하였다. Control well에는 mitogen을 첨가하지 않았고, 모든 실험은 3회 반복하여 실시하였다. 분주된 plate를 37°C, CO₂ incubator에서 68시간 배양한 후 각 well에 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid, Sigma: 5mg/ml PBS)를 20 µl씩 첨가하여 다시 4시간 배양하였다. 배양 후 DMSO (Dimethylsurfoxide, Sigma)를 각 well에 200 µl씩 첨가하여 세포를 용해한 후 ELISA reader로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 비장 면역세포의 증식율 (stimulation index)은 mitogen을 처리한 well의 흡광도를 mitogen을 처리하지 않은 well의 흡광도로 나누어 산출하였다.

6. 자료 처리 및 분석

본 연구의 결과는 SAS (statistical analysis system)

program을 이용하여 분석하였다. 각 실험군의 결과는 평균치와 표준편차로 나타내었고, 각 실험군간의 비교는 ANOVA로 분석 후 유의적인 차이가 있는 항목에 대해서만 Duncan's multiple range test에 의해 실험군간의 차이를 검정하였다.

결 과

1. 일반 성장 및 혈액성분

실험 시작 당시의 체중은 약 134 g으로 실험군간의 차이가 없었으나 4주간의 실험식이 섭취 동안 대조군의 체중증가가 171 g으로 가장 커서 최종 체중이 유의적으로 증가하였다 (Table 2). 식이내 isoflavone의 농도가 높을수록 식이섭취량이 감소하여 체중증가가 적었다. 식이효율은 대조군이 isoflavone을 섭취한 군들에 비해 높았으나 isoflavone 섭취군들간에는 차이가 없었다.

장기의 무게는 신장과 간, epididymal fat pad 무게가 isoflavone 섭취에 따라 유의적으로 감소하였으나 testis는 실험식이에 따른 차이가 없었다 (Table 3). 그러나 장기의 무게를 체중당으로 계산한 경우에는 신장과 간, testis는 isoflavone 섭취시 대조군에 비해 유의적으로 무거웠다. 체내 지방축적을 나타내는 epididymal fat pad 무게는 체중으로 나누어도 isoflavone 섭취시 대조군에 비해 유의적으로 무게가 적었다.

혈액내 hemoglobin 양은 대조군에 비해 isoflavone 섭취군에서 유의적으로 증가하였다. Hematocrit 값도 isoflavone 농도에 의존하지는 않지만 isoflavone 섭취에 의해 대조군에 비해 유의적으로 증가하였고 (Table 4), 혈장내 albumin 양은 실험식이에 따른 차이가 없었다.

2. 혈장과 간내 지방성분

혈장내 지방성분은 Table 5에 제시하였다. 혈장내 총 지방량과 중성지방량은 isoflavone의 섭취에 영향을 받지 않

Table 2. Initial body weight, final body weight, weight gain, diet intake and food efficiency ratio (FER) of rats fed experimental diets for four weeks

Group ¹⁾	Initial weight (g)	Final weight (g)	Weight gain (g/4 weeks)	Diet intake (g/4 weeks)	FER ²⁾
Control	134.3 ± 5.9 ^{3)(NS4)}	305.6 ± 13.4 ^{a5)}	171.2 ± 10.2 ^a	495.2 ± 41.3 ^a	0.35± 0.03 ^a
IsoL	134.1 ± 6.3	269.3 ± 26.2 ^b	135.2 ± 21.9 ^b	443.9 ± 39.8 ^b	0.30± 0.04 ^b
IsoM	134.0 ± 7.1	255.6 ± 29.6 ^{bc}	121.6 ± 27.6 ^{bc}	409.6 ± 40.2 ^c	0.29± 0.05 ^b
IsoH	133.8 ± 6.9	246.0 ± 12.6 ^c	112.2 ± 15.8 ^c	389.9 ± 33.6 ^c	0.29± 0.03 ^b

1) Control, none isoflavone; IsoL, 1,095 mg isoflavone per kg diet, IsoM, 2,190 mg isoflavone per kg diet, IsoH, 4,380 mg isoflavone per kg diet
2) FER = body weights gain for experimental period/food intake for experimental period

3) Mean ± SD

4) NS : Not Significant

5) Values in a column with no common superscript letters are significantly different ($p < 0.05$)

Table 3. Organ weights of rats fed experimental diets for four weeks

Group	Kidney ¹⁾		Liver		Epididymal fat pad		Testis	
	Absolute	Relative	Absolute	Relative	Absolute	Relative	Absolute	Relative
Control	2.3 ± 0.1 ²⁾³⁾	0.7 ± 0.1 ^b	9.8 ± 0.9 ^a	3.2 ± 0.3 ^b	3.5 ± 0.8 ^a	1.1 ± 0.1 ^a	3.4 ± 0.2 ^{NS4)}	1.1 ± 0.9 ^b
IsoL	2.1 ± 0.1 ^{ab}	0.8 ± 0.1 ^a	9.4 ± 1.5 ^{ab}	3.5 ± 0.3 ^a	2.7 ± 0.8 ^b	1.0 ± 0.3 ^{ab}	3.5 ± 0.2	1.3 ± 0.2 ^a
IsoM	2.0 ± 0.3 ^b	0.8 ± 0.1 ^a	9.1 ± 1.1 ^{ab}	3.6 ± 0.3 ^a	2.5 ± 0.3 ^{bc}	1.0 ± 0.2 ^{ab}	3.3 ± 0.3	1.3 ± 0.1 ^a
IsoH	2.0 ± 0.2 ^b	0.8 ± 0.1 ^a	8.6 ± 0.7 ^b	3.5 ± 0.2 ^a	2.1 ± 0.3 ^c	0.9 ± 0.1 ^b	3.3 ± 0.2	1.3 ± 0.1 ^a

1) Absolute : absolute weights of organ (g), Relative : relative weights of organ (g/100 g body weights)

2) Mean ± SD

3) Values in a column with no common superscript letters are significantly different ($p < 0.05$)

4) NS : Not Significant

Table 4. Hemoglobin, hematocrit and albumin concentrations in plasma of rats fed experimental diets for four weeks

	Hemoglobin (g/dl)	Hematocrit (%)	Albumin (g/dl)	Glucose (mg/dl)
Control	22.4 ± 3.3 ^{1)b2)}	46.5 ± 2.0 ^c	3.5 ± 0.2 ^{NS3)}	124.1 ± 23.6 ^{NS}
IsoL	24.7 ± 1.4 ^a	49.3 ± 2.6 ^{ab}	3.5 ± 0.2	129.0 ± 23.5
IsoM	24.7 ± 1.7 ^a	50.6 ± 2.2 ^a	3.6 ± 0.3	124.8 ± 25.4
IsoH	24.5 ± 1.5 ^a	48.4 ± 2.7 ^{bc}	3.6 ± 0.2	139.0 ± 20.8

1) Mean ± SD

2) Values in a column with no common superscript letters are significantly different ($p < 0.05$)

3) NS : Not Significant

Table 5. Concentrations of plasma lipids of rats fed experimental diets for four weeks

Group	Total lipid	Triglycerides	Total cholesterol	LDL cholesterol	HDL-Cholesterol	(mg/dl)
Control	234.8 ± 49.2 ^{1)NS2)}	81.7 ± 20.5 ^{NS}	101.7 ± 10.3 ^{a3)}	45.7 ± 15.2 ^a	39.6 ± 9.2 ^{NS}	
IsoL	247.5 ± 66.0	80.6 ± 35.0	101.4 ± 21.9 ^a	47.2 ± 25.9 ^a	38.0 ± 6.2	
IsoM	225.6 ± 55.6	69.2 ± 21.2	81.9 ± 18.5 ^b	31.1 ± 18.2 ^{ab}	37.0 ± 8.3	
IsoH	238.2 ± 44.6	86.1 ± 25.9	77.4 ± 13.8 ^b	27.7 ± 10.8 ^b	32.4 ± 9.3	

1) Mean ± SD

2) NS : Not Significant

3) Values in a column with no common superscript letters are significantly different ($p < 0.05$)

았다. 그러나 혈장내 총 콜레스테롤량과 LDL-콜레스테롤량은 대조군에서 가장 높았으며, isoflavone의 섭취가 많을수록 유의적으로 감소함을 보였다. HDL-콜레스테롤량은 실험식이간에 유의적인 차이가 없었다.

간내 지방성분중 총지방량은 isoflavone이 포함된 식이를 섭취하면 대조군에 비해 유의적으로 감소하였으나 isoflavone 섭취량에 따른 차이는 없었다 (Table 6). 간내 중성지방량은 isoflavone 섭취시 대조군에 비해 유의적으로 감소하였고, isoflavone 섭취에 따라 dose dependent하게 유의적으로 감소하였다. 간내 콜레스테롤량도 isoflavone 섭취에 의해 유의적으로 감소하였다.

3. 면역능력

면역능력을 담당하는 면역기관의 절대 무게와 체중당 무게는 Table 7과 같다. T-cell의 성숙기관인 흥선의 무게는 isoflavone의 섭취에 따라 유의적으로 감소하였으며, 체중당 무게도 마찬가지로 isoflavone의 섭취가 많을수록 감소

Table 6. Concentrations of liver lipids of rats fed experimental diets for four weeks (mg/g wet liver)

Group	Total lipid	Triglycerides	Total cholesterol
Control	37.1 ± 10.8 ^{1)a2)}	28.0 ± 8.6 ^a	12.9 ± 1.7 ^a
IsoL	25.7 ± 6.3 ^b	18.2 ± 5.5 ^b	12.2 ± 2.0 ^b
IsoM	24.4 ± 5.9 ^b	13.8 ± 1.5 ^{bc}	11.5 ± 1.0 ^b
IsoH	23.4 ± 7.5 ^b	12.3 ± 2.7 ^c	11.5 ± 0.6 ^b

1) Mean ± SD

2) Values in a column with no common superscript letters are significantly different ($p < 0.05$)

하였다. 말초 면역기관인 비장의 절대 무게는 실험군간에 유의적인 차이가 없었으나 체중당 무개는 흥선과는 반대로 isoflavone 섭취시 유의적으로 증가하였다.

비장세포를 분리하여 T-cell을 자극하는 Con A와 B-cell을 자극하는 PHA를 mitogen으로 사용하여 면역세포의 증식을 실험하였을 때 Con A와 PHA 모두 실험군간에 유의적인 차이는 없었으나 isoflavone 섭취시 증식율이 감소하는 경향이었다(Table 8).

Table 7. Weights of immune organs of rats fed experimental diets for four weeks

Group	Thymus ¹⁾		Spleen	
	Absolute	Relative	Absolute	Relative
Control	0.72 ± 0.08 ^{a,b}	0.23 ± 0.03 ^a	0.57 ± 0.20 ^{NS}	0.19 ± 0.07 ^b
IsoL	0.57 ± 0.10 ^b	0.21 ± 0.03 ^{ab}	0.63 ± 0.16	0.23 ± 0.05 ^a
IsoM	0.52 ± 0.07 ^{bc}	0.20 ± 0.03 ^b	0.63 ± 0.11	0.24 ± 0.03 ^a
IsoH	0.47 ± 0.08 ^c	0.19 ± 0.03 ^b	0.57 ± 0.07	0.23 ± 0.03 ^a

1) Absolute : absolute weights of organ (g), Relative : relative weights of organ (g/100 g body weights)

2) Mean ± SD

3) Values in a column with no common superscript letters are significantly different ($p < 0.05$)

4) NS : Not Significant

Table 8. Splenocyte proliferation of rats fed experimental diets for four weeks (stimulation index)

Group	Con A (0.1 µg/10 µl)	Con A (0.75 µg/10 µl)	PHA (10 µg/10 µl)
Control	1.8 ± 0.6 ^{1,NS}	3.1 ± 1.0 ^{NS}	2.2 ± 0.6 ^{NS}
IsoL	1.3 ± 0.3	2.7 ± 1.2	1.9 ± 0.6
IsoM	1.5 ± 0.5	2.4 ± 1.1	1.8 ± 0.5
IsoH	1.5 ± 0.8	2.7 ± 1.1	1.8 ± 0.5

1) Mean ± SD

2) NS : Not Significant

고 찰

Isoflavone의 섭취가 생리활성을 가지기 위해서는 섭취된 양이 체내 흡수되어야 한다. Chang 등²²⁾은 SD rat에게 aglycone 형태인 genistein을 식이 kg 당 5, 100, 500 mg를 섭취시켰을 때 혈청내 농도가 유의적으로 증가하였으며, 100 mg 이상 첨가한 군들에서 전립선, 고환, 간, 뇌등의 조직에 genistein 양이 유의적으로 증가하였다고 한다. 본 실험에 사용한 IsoL, IsoM, IsoH 식이에는 식이 kg 당 각각 190 mg, 380 mg, 760 mg의 genistein이 함유되어 있으므로 본 연구에 사용된 양으로 혈액과 각 장기에 식이 isoform의 영향을 주었을 것으로 사료된다.

본 연구에서 isoform power의 섭취가 증가할 수록 식이 섭취량이 감소하고 체중이 감소하는 것으로 나타났다 (Table 2). Nagago 등²³⁾은 출생 직후의 SD rat을 5군으로 나누어 5일 동안 genistein을 구강으로 체중 kg 당 0, 12, 5, 25, 50, 100 mg를 투여하고, 다음 9주간 일반 식이로 성장시켰을 때 9주 후 최종 체중이 genistein을 섭취한 모든 군에서 유의적으로 적게 나타나 genistein의 섭취가 체중을 감소시키는 효과가 있다고 하였으나 그 확실한 기전에 대해서는 아직 밝혀져 있지 않다. 또한 epididymal fat pad 무게는 genistein을 섭취한 모든 군이 대조군에 비해 유의적으로 가벼웠다고 하여 본 연구 결과와 일치하였다.

Weber 등²⁴⁾은 SD rat에게 isoform이 식이 kg 당 60 mg 들어 있는 식이를 섭취시켰을 때 체중이 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다고 하였다. Delcols 등²⁵⁾은 식이에 genistein을 0, 5, 25, 100, 250, 625, 1250 mg/kg 되도록 만든 식이를 임신 7일째부터 어미 SD rat에게 수유기까지 공급하고, 태어난 새끼에게는 생후 50일까지 어미와 같은 식이를 공급하였다. 그 결과 분만 전 어미의 체중과 식이 섭취량이 genistein의 양이 증가할수록 유의적으로 감소하였으며, 새끼의 출생시 체중도 genistein 섭취시 유의적으로 감소하였다. 아직까지 isoform 섭취에 의한 식이 섭취량과 체중감소에 대한 정확한 기전은 알려져 있지 않으나 genistein 섭취시 체중이 감소하다는 연구결과가 보고되고 있으며 본 연구결과도 이와 같은 경향을 보였다.

체중당 장기의 무게를 보면 간, 신장, testis의 경우는 isoform 섭취시 유의적으로 증가하였고, epididymal fat pad는 감소하였다. 또한 혈액내 Hb 농도나 Hct가 isoform 섭취시 증가하였다 (Table 3, 4). Payne 등²⁶⁾은 닭에게 대조군에 비해 isoform이 2배와 5배 많이 들어 있는 식이를 공급하여 52일 동안 사육하였을 때 isoform 섭취군이 식이 효율을 감소시켰으나 cacass trait에서 는 군간의 차이가 없었다고 하였다. 이러한 결과들은 isoform이 일반적인 성장에는 영향이 없이 체중과 체지방축적 감소 효과가 있는 것으로 보이나 isoform의 체중과 체지방축적 감소효과를 조사하기 위해 pair feeding 등에 의한 더 많은 연구가 필요하다고 사료된다.

Isoform의 섭취는 혈장내 콜레스테롤과 LDL-콜레스테롤, 간내 총지방량, 콜레스테롤, 중성지방량을 dose dependent하게 감소시켜 혈액내 지방성분과 간내 지방성분을 저하시키는 효과가 있는 것으로 나타났다 (Table 5, 6). Setchell 등²⁷⁾은 isoform이 약한 estrogenic effect를 가지고 있어 LDL receptor를 유도할 수 있기 때문에 혈액내 LDL-콜레스테롤을 감소시킬 수 있다고 하였다. Merz-Demlow 등²⁸⁾은 건강한 폐경전 여성에게 isoform을 10,

64.7, 128.7 mg/day로 3달간 섭취시켰을 때 isoflavone 섭취에 따라 혈액내 총 콜레스테롤과 HDL-cholesterol에는 영향이 없었으나 LDL-cholesterol, HDL-cholesterol/Total, HDL-cholesterol/LDL-cholesterol의 비율이 유의적으로 감소하였다고 하였다.

Wiseman 등²⁹⁾은 isoflavone은 혈액내 LDL-콜레스테롤을 감소시키는 것과는 독립적으로 동맥경화를 예방할 수 있다고 하였는데 Yamakoshi 등¹⁶⁾은 토끼에게 aglycone 형태의 isoflavone을 kg 당 0. 330, 1,000 mg 포함되어 있는 식이를 섭취시켰을 때 혈액내 cholesterol과 LDL-cholesterol은 대조군과 차이가 없었으나, isoflavone 섭취량에 따라 산화된 LDL이 유의적으로 감소되어 동맥경화증을 예방하였다고 보고하였다. 그리고 Anthony 등³⁰⁾은 isoflavone은 smooth muscle cell의 증식을 억제하여 동맥벽의 plaque 형성을 억제하며, endothelial function을 개선 하므로 혈관 확장의 기능으로 동맥경화증을 예방할 수 있다고 하였다. 동맥경화증의 plaque는 상처에 의해 유도되는 동맥벽의 증식에 의해 시작되며,³¹⁾ 동맥벽의 증식에는 여러 tyrosine kinase를 활성화가 필요하다.³²⁾ 그런데 isoflavone의 성분인 genistein은 잘 알려진 tyrosine kinase inhibitor로,³³⁾ 동맥벽 세포의 tyrosine kinase 활성을 억제하여 동맥벽의 plaque 형성을 억제할 수 있다고 한다.

한편 isoflavone은 여러 암의 예방과 치료에 효과가 있는데 이것이 체내 면역능력을 증가시키기 때문이라고 한다.¹⁷⁾ Guo 등³⁴⁾은 mice에서 체중당 2, 6, 20 mg의 genistein을 28일 동안 매일 구강으로 투여하였을 때 비장의 무게가 genistein의 섭취에 따라 증가하였고, cytotoxic T cell과 NK cell의 activity를 증가시켰다고 한다. 또한 T-cell의 발달이 부족한 mice에게 genistein을 섭취시켰을 때 estrogen dependent, estrogen-independent tumor를 억제하는 효과가 나타나지 않았는데 이것은 genistein의 항암작용에 T-cell 작용이 매우 중요하다는 것을 말하고 있다.^{14,35)}

그러나 isoflavone의 섭취는 실험동물에서 흉선 무게를 감소시키며,²⁴⁾ in vitro 실험에서 T-cell 배양시 genistein 처리는 T-cell의 apoptosis를 유도시킨다는 보고들도 있다.³⁶⁾ Sakabe 등³⁷⁾은 estrogen이 thymus epithelial cell culture에서 thymic hormone의 production을 감소시킨다고 보고하였는데, estrogenic effect가 있는 isoflavone도 흉선에서 분비되는 hormone의 production을 감소시켜 흉선의 발달을 저해하는 것으로 사료되며, 이는 본 연구에서 흉선 무게가 isoflavone의 섭취에 따라 감소하는 것을 설명할 수 있다고 생각한다.

본 연구에서 isoflavone의 섭취가 증가할수록 Con A와 PHA에 대한 비장세포의 증식이 감소하는 경향을 보이고 있다 (Table 8). Fernandis 등³⁸⁾은 Con A에 의한 T-cell의 활성은 protein tyrosine phosphorylation-dephosphorylation에 의한 signal transduction에 영향을 받는다고 하였고, Dearden-Badet 등³⁹⁾은 Bcell을 배양하면서 genistein을 첨가하면 tyrosine kinase를 억제하므로 bacterial lipopolysaccharide (LPS)에 의한 B-cell의 증식이 억제되었다고 하였다. 본 연구에서 isoflavone의 섭취에 따른 Con A와 PHA에 의한 비장세포 증식감소가 isoflavone powder에 들어 있는 genistein의 tyrosine kinase 억제작용이 아닌가 사료된다.

그러나 Zhang 등⁴⁰⁾은 mice에게 식이 kg 당 10, 20, 40 mg의 daidzein을 섭취시켰을 때 흉선의 무게가 20, 40 mg 섭취한 군에서 유의적으로 증가하고, peritoneal macrophage의 phagocytic response로 알아본 비특이적 면역능력이 유의적으로 증가하였다고 보고하였다. 또한 sheep RBC에 대한 spleen immunoglobulin M의 생성도 증가하였으며, peripheral blood에서의 lymphocyte의 비율도 증가하였다고 한다. 결과적으로 daidzein의 과량섭취는 비특이적, 특이적 면역능력을 모두 증가시킨다고 하여 isoflavone 성분 중 daidzein은 독립적으로 면역능력을 향상시킨다고 보고하였다. 그러므로 isoflavone이 면역능력에 미치는 영향에 대해서는 더 많은 연구가 필요하며 각각의 성분의 효과에 대한 개별적인 연구가 필요하다고 사료된다.

요약 및 결론

본 연구는 isoflavone 섭취가 일반적인 성장, 지방대사 및 면역능력에 미치는 영향을 알아보고자 실시되었다. SD rat를 isoflavone powder가 식이 무게의 0, 0.5, 1, 2% 첨가된 4가지 실험식이 (0, 1,095, 2,190, 4,380 isoflavone mg/kg diet)로 4주간 사육시켰을 때 isoflavone의 섭취는 체중당 장기무게, Hb, Hct를 증가시켰으며, 식이 섭취량과 체중증가를 감소시켰다. 그리고 isoflavone의 섭취는 혈장 내 콜레스테롤과 LDL-콜레스테롤, 간내 총지방, 콜레스테롤, 중성지방을 dose dependent하게 감소시켜 지방대사를 개선한 것으로 보인다. 그리고 isoflavone의 섭취는 흉선의 무게를 감소시키고, 유의적이지는 않으나 비장세포의 증식을 감소시키는 경향을 보였다. 그러나 본 연구에서 나타난 isoflavone 섭취에 따른 체중감소가 지질대사 및 면역능력에 영향을 주었을 제한점에 대해서는 앞으로 pair feeding에 의한 연구가 계속되어야 할 것으로 사료된다.

Literature cited

- 1) Horn-Ross PL. Phytoestrogens, body composition, and breast cancer. *Cancer Causes Control* 6: 567-573, 1995
- 2) Duarte J, Vizcaino FP, Utrilla P, Jimenes J, Zaruelo A. Vaso-dilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle, structure activity relationships. *Biochem Pharmacol* 24: 857-862, 1993
- 3) Wang D, Li F, Jiang Z. Osteoblastic proliferation stimulating activity of Psoralea corylifolia extracts and two of its flavonoids. *Planta Med* 67(8): 748-749, 2001
- 4) Ishma Y, Miyaura C, Ohmura M, Onoe Y, Sato T, Uchiyama, Ito M, Wang X, Suda T, Ikegami S. Selective effects of genistein, a soybean isoflavone, on B-lymphopoiesis and Bone loss caused by estrogen deficiency. *Endocrinology* 140(4): 1893-1900, 1999
- 5) Hanasaki Y, Ogawa A, Fukui S. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biol Med* 16: 845-850, 1994
- 6) Fraga CG, Martino VS, Ferraro GE, Coussio JD, Boveris A. Flavonoids as antioxidants evaluated by in vitro and in situ liver chemiluminescence. *Biochem Pharmacol* 36: 717-720, 1987
- 7) Torel J, Cillard J, Cillard P. Antioxidants activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochemistry* 25: 383-385, 1986
- 8) Denis L, Morton MS, Griffiths K. Diet and its preventive role in prostatic disease. *Eur Urol* 35: 377-387, 1999
- 9) Griffiths K, Adlercreutz H, Boyle P, Denis L, Nicholson RI, Morton MS. Nutrition and Cancer. Oxford, ISIS Medical Media, 1996
- 10) Ministry of health and welfare. Report on 1998 national health and nutrition survey, 1999
- 11) Wakai K, Egami I, Kato K, Kawamura T, Tamakoshi A, Lin Y, Nakayama T, Wada M, Ohno Y. Dietary intake and sources of isoflavones among Japanese. *Nutrition and Cancer* 33 (2): 139-145, 1999
- 12) Suh CJ, Choi SH, Kim MH, Park MH, Ko BS, Kim HK. A study of dietary isoflavone intake from soy foods and urinary isoflavone excretion and menopausal symptoms in Korean women in rural areas. *Kor J Comm Nutr* 5(1): 120-129, 2000
- 13) Lee HP, Gourley L, Duffy SW, Esteve J, Day NE. Dietary effects on breast-cancer risk in Singapore. *Lancet* 337: 1197-1200, 1991
- 14) Hirose K, Tajima K, Hamajima N. A large-scale, hospital-based case-control study of risk factors of breast cancers according to menopausal status. *Jpn J Cancer Res* 86: 146-54, 1995
- 15) Tikkannen MJ, Adlercreutz H. Dietary soy-derived isoflavone phytoestrogens. *Biochem Pharm* 60: 1-5, 2000
- 16) Yamakoshi J, Piskula MK, Izumi T, Tobe K, Saito M, Kataoka S, Obata A, Kikuchi M. Isoflavone aglycone-rich extract without soy protein attenuates atherosclerosis development in cholesterol-fed rabbits. *J Nutr* 130: 1887-1893, 2000
- 17) Hsieh CY, Santell RC, Haslam SZ, Helferich WG. Estrogenic effects of genistein on the growth of estrogen receptor-positive human breast cancer (MCF-7) cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 58: 3833-3838, 1998
- 18) Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. 1993. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *J Nutr* 123: 1939-1951
- 19) Friedwald WT, Levy RL, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifugation. *Clin Chem* 18: 499-502, 1972
- 20) Folch JM, Lees G, Stanley HS. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Bio Chem* 223: 497-509, 1957
- 21) Zak B. Total and free cholesterol. In Standard method chemistry. Academic Press, New York, pp.79-89, 1968
- 22) Chang HC, Churchwell MI, Delclos KB, Newbold RR, Doerge DR. Mass spectrometric determination of genistein tissue distribution in diet-exposed sprague-dawley rats. *J Nutr* 130: 1963-1970, 2000
- 23) Nagago T, Yoshimura S, Saito Y, Nakagomi M, Usumi K, Ono H. Reproductive effects in male and female rats of neonatal exposure to genistein. *Reproduc Toxicol* 15: 399-411, 2001
- 24) Weber KS, Setchell KD, Stocco DM, Lephart ED. Dietary soyphytoestrogens decrease testosterone levels and prostate weight without altering LH, prostate 5 alpha-reductase or testicular steroidogenic acute regulatory peptide levels in adult male Sprague-Dawley rats. *J Endocrinol* 170: 591-599, 2001
- 25) Delclos KB, Bucci TJ, Lomax LG, Latendresse JR, Warbritton A, Weis CC, Newbold RR. Effects of dietary genistein exposure development on male and female CD (Sprague-Dawley) rats. *Reproduc Toxicol* 15: 647-663, 2001
- 26) Payne RL, Binder TD, Southern LL, Mcmillin KW. Dietary effects od soy isoflavone on growth and cacass traits of commercial broiler. *Poul Sci* 80: 1201-1207, 2001
- 27) Setchell KDR. Naturally occurring non-steroidal estrogens of dietary origin. In: Estrogens in the environment II: Influences on development (Ed. MaLachlan JA), pp.69-85, Elsevier, New York, 1985
- 28) Merz-Demlow BE, Duncan AM, Wangen KE, Xu X, Carr TP, Phipps WR, Kurzer MS. Soy isoflavones improve plasma lipids in normocholesterolemic, premenopausal women. *Am J Clin Nutr* 71: 1462-1469, 2000
- 29) Wiseman H, Lewis P, Wajala K, Adlercreutz H, Mallet AI, Bowey EA, Rowland IR, Sanders TA. Isofлавone phytoestrogens consumed in soy decrease F2-isoprostane concentrations and increase resistance of low density lipoprotein to oxidation in human. *Am J Clin Nutr* 72: 396-400, 2000
- 30) Anthony MS, Clarkson TB, Williams JK. Effects of soy isoflavones on atherosclerosis: Potential mechanism. *Am J Clin Nutr* 68: 1390S-1393S, 1998
- 31) Honore EK, Williams JK, Anthony MS, Clarkson TB. Soy isoflavones enhance coronary vascular reactivity in atherosclerotic female macaques. *Fertil Steril* 67: 148-154, 1997
- 32) Raines EW, Ross R. Biology of atherosclerotic plaque formation: Possible role of growth factors in lesion development and the potential impact of soy. *J Nutr* 125: 624S-630S, 1995
- 33) Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M, Fukami Y. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinase. *J Biol Chem* 262: 5592-5595, 1987
- 34) Guo TL, McCay JN, Zhang LX, Brown RD, You BL, Karrow NA, Germolec DR, White Jr KL. Genistein modulates immune responses and increases host resistance to B16F10 tumor in adult female B6C3F1 mice. *J Nutr* 131: 3251-3258, 2001
- 35) Santell RC, Kieu N, Helferich WG. Genistein inhibits growth of estrogen-independent human breast cancer cells in culture but not in athymic mice. *J Nutr* 130: 1665-1669, 2000
- 36) Spinozzi F, Pagliacci MC, Agea E, Migliorati G, Riccardi C, Berutto A, Nicoletti I. Protein tyrosine kinase inhibition and cell

- proliferation: is the [³H]-thymidine uptake assay representative of the T-lymphocyte proliferation rate? *J Investig Allergol Clin Immunol* 5: 91-96, 1995
- 37) Sakabe K, Okuma M, Karaki S, Matsuura S, Yoshida T, Aikawa H, Izumi S, Kayama F. Inhibitory effect of natural and environmental estrogens on thymic hormone production in thymus epithelial cell culture. *Int J Immunopharmacol* 21: 861-868, 1999
- 38) Fernandis AZ, Subrahmanyam G. Concanavalin A modulates tyrosine phosphorylation and activation of a type II phosphatidylinositol 4-kinase in rat splenic lymphocytes. *Mol Immunol* 35: 935-941, 1998
- 39) Dearden-Badet MT, Revillard JP. Requirement for tyrosine phosphorylation in lipopolysaccharide-induced murine B-cell proliferation. *Immunology* 80: 658-660, 1993
- 40) Zhang R, Li Y, Wang W. Enhancement of immune function in mice fed high doses of soy daidzein. *Nutr Cancer* 29: 24-28, 1997