

## 난소절제와 Genistein 투여가 간 미토콘드리아 기능에 미치는 영향\*

이영민<sup>1)2)</sup> · 정명호<sup>1)</sup> · 이연숙<sup>2)</sup> · 송지현<sup>1)§</sup>

국립보건연구원 생명과학부 대사영양질환과,<sup>1)</sup> 서울대학교 식품영양학과<sup>2)</sup>

### Effect of Ovariectomy and Genistein on Hepatic Mitochondrial Function\*

Lee, Young Min<sup>1)2)</sup> · Jung, Myeong Ho<sup>1)</sup> · Lee, Yeon Sook<sup>2)</sup> · Song, Jihyun<sup>1)§</sup>

Division of Metabolic Disease,<sup>1)</sup> Department of Biomedical Sciences, National Institute of Health, Seoul 122-701, Korea  
Department of Food and Nutrition,<sup>2)</sup> Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

#### ABSTRACT

Women with menopause or rats with ovariectomy is associated with increased body weight, body fat and insulin resistance, which are components of metabolic syndrome. Increased prevalence of metabolic syndrome after menopause might be associated with mitochondrial dysfunction, since mitochondrial oxidative and phosphorylation activity is strongly correlated with insulin sensitivity. Although estradiol replacement prevents the metabolic syndrome, harmful effect of estradiol hampers the casual usage to prevent the metabolic syndrome. It has been reported that genistein has a mild estrogenic activity, decreases fat mass in mice and has an antidiabetic role in diabetic rats. Although insulin resistance is closely related to mitochondrial functions, there has not been yet any study in regard to the effect of dietary genistein on mitochondrial function in the insulin resistant female subjects induced by ovariectomy or similar situation. The present study investigated whether the supplementation of genistein in the high fat diet affected the mitochondrial function of high fat fed ovariectomized rats. Female Sprague Dawley rats (8 weeks old) were assigned to the following groups: sham-operated + high fat diet (S, n = 6); sham-operated + high fat diet with 0.1% genistein (S + G, n = 7); ovariectomized + high fat diet (OVX, n = 8); ovariectomized + high fat diet with 0.1% genistein (OVX + G, n = 8). Ovariectomy significantly increased body weight compared with S group. Genistein consumption in ovariectomized (OVX + G) rats decreased body weight gain compared with OVX rats. Liver weights were increased by ovariectomy. The hepatic mitochondrial protein density expressed as mg per g liver was lower in the OVX group than in the S group. However, OVX + G group showed the increased mitochondrial protein density similar to the level of S group. When mRNA levels of genes related to mitochondria such as peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 (PGC-1) and cytochrome c oxidase subunit III (COX III) were measured, there were decreases in the mRNA levels of PGC-1 and COX III in S + G, OVX and OVX + G group. The activity of cytochrome c oxidase was not different between groups. We could observe the decrease in succinate dehydrogenase (SDH) activity per g liver in OVX rats. Genistein supplement increased SDH activity. In conclusion, genistein supplementation to the OVX rats enhanced mitochondrial function by increasing mitochondrial protein density and SDH activity. The improvement in mitochondrial function by genistein can contribute to the improvement in metabolic syndrome. (*Korean J Nutrition* 37(9) : 786~793, 2004)

**KEY WORDS** : genistein, mitochondrial protein density, ovariectomy, SDH, COX.

## 서론

미국 등 서구의 연구결과 뿐 아니라, 최근 국내에서도 안

산주민을 대상으로 한 역학연구 등에서 연령이 증가할수록 대사이상증후군의 유병율이 증가하였고, 특히 여성의 경우 50세 이상에서 유병율이 급격히 증가하며 40%이상의 유병율을 나타내어 50세 이후는 유병율이 남성의 경우보다 높았다.<sup>1)</sup> 50세 이후 여성의 대사증후군 유병율의 급격한 증가는 이후 당뇨병 및 심혈관 질환의 발생으로 이어져 보건학적 문제를 야기할 것으로 생각된다.<sup>2,3)</sup>

50세 이후의 시기는 여성의 경우 단순히 연령증가 뿐 아니라 폐경기에 접어들게 되는 시기이다. 따라서 50세 이후의 여성에서 급격히 대사이상 증후가 증가하는 것은 연령 증가에 따른 노화 현상일 뿐 아니라, 폐경기 이전에는 여성

접수일 : 2004년 8월 18일

채택일 : 2004년 10월 18일

\*This work was supported in part by a Korea National Institute of Health intramural research grant (348-6111-213-000-207) and a grant of the Korea Health 21 R & D Project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (03-PJ1-PG3-22000-0014).

§To whom correspondence should be addressed.

호르몬의 존재로 남성의 경우 보다 대사이상증후군의 위험인자들을 억제하는 경향이 있었으나 폐경에 의한 여성 호르몬 부족으로 보호작용이 없어지기 때문인 것으로도 생각해볼 수 있다.<sup>4-7)</sup> 폐경에 의해 혈중지방 수준, 체 지방 분포, 당 대사 등이 변동되고 대사이상 증상을 가중시키는 것으로 생각되나 연구가 많이 되어 있지 않은 상태이다. 성별차이 혹은 sex hormone이 대사이상증후군과 관련이 있는 미토콘드리아 기능과 관련이 있다는 몇 가지 연구들은 있으나 직접적인 연구나 일관성 있는 결과를 보고하고 있지 않다.<sup>7-9)</sup>

미토콘드리아는 세포에서 ATP를 생성하는 기능 외에 TCA cycle, 지방산 산화, heme 합성, hormone 합성 등 여러 가지 반응이 일어나는 곳이며 reactive oxygen species (ROS) 생성 및 제거기능이 있고 칼슘 signaling과 세포사멸에 중요한 역할을 한다.<sup>10)</sup> 따라서 미토콘드리아의 이상은 노화 및 만성질환의 발생과 연관이 깊다고 보고되고 있다.<sup>9-11)</sup>

미토콘드리아를 구성하는 단백질은 핵 유전자에 의해 영향을 받기도 하지만, 미토콘드리아 내에 존재하는 미토콘드리아 DNA (mtDNA)에 의해 영향을 받기도 한다. mtDNA는 16,569 bp 크기의 환상 이중쇄 형태로, cytochrome c oxidase (COX) subunit I, II, III를 포함하는 13개의 미토콘드리아 호흡 chain을 구성하는 단백질과, 22종의 transfer RNA (tRNA) 및 2종의 ribosomal RNA (rRNA)를 encoding 하는 총 37개의 유전자를 가지고 있다.<sup>12)</sup> 최근 proteomics와 RNA expression profiling에 의하면 미토콘드리아에 존재하거나 미토콘드리아와 밀접한 관계가 있는 gene들로 600여개가 거론되며 각각의 mRNA 양과 protein의 발현이 75% 정도 일치하고 있으며, mRNA 농도와 protein 발현의 상관관계가 적은 경우는 주로 posttranscriptional modification에 의해 영향을 받을 것으로 추정된다.<sup>13)</sup> 미토콘드리아는 조직에 따라 기능과 구조가 조정되며, 영양상태 및 질병상태에 따라서도 기능과 구조가 바뀔 것으로 추정되나 이에 대한 연구는 매우 부족하다.<sup>14-16)</sup>

성별에 따른 미토콘드리아의 기능 변화에 대한 연구의 한 예로 암컷 쥐의 간과 뇌에서 수컷의 경우보다 미토콘드리아의 과산화산물 (peroxide) 수준이 낮고 antioxidant enzyme activity와 mRNA 수준이 높다고 보고하고 있으며 estrogen을 주사한 경우 미토콘드리아가 산화 stress로부터 보호받았다.<sup>9)</sup> 그러나 estrogen이 부족하게 되는 폐경기에는 이런 보호 작용이 감소되어 증가된 산화 stress는 mtDNA의 손상 뿐 아니라, mtDNA 양의 감소를 초래하며 이는 미토콘드리아의 구성물질의 합성 저하와 막 성분 변화를 일으키고, 미토콘드리아의 기능을 저하시킬 것으로 생각되며, 적절한 energy 대사를 수행하지 못하게 될 것을 예

상할 수 있으나 이에 대한 연구가 많이 진행되지 않은 상태이다.

폐경 후 모델 쥐에서 미토콘드리아 관련 protein의 감소를 관찰하고 이와 함께 이 모델에서 혈중 지질 이상 뿐 아니라 당 대사의 이상 등 인슐린 저항성을 관찰 할 수 있다면 폐경 후 여성의 대사이상 증후군의 급격한 증가를 미토콘드리아의 기능 이상으로 설명할 수 있으며 estrogen으로 이를 대처 할 수 있으리라 생각한다. 그러나 estrogen의 유해한 성질 때문에 estrogen 대체 물질을 고려해야 하며 그 대안 물질로 phytoestrogen을 생각할 수 있겠다.

대표적인 phytoestrogen에는 isoflavone, lignan 등이 있다.<sup>17)</sup> Isoflavone 중 주요한 물질은 genistein과 daidzein이다. 대두식품에 들어 있는 genistein이 estrogen receptor (ER)에 결합하여 ER-mediated effect를 가진다고 알려져 있다. 반대로 antiestrogenic effect도 있다고 하며, PPAR  $\alpha$ 나  $\gamma$ 를 활성화시켜 비만억제작용이나 혈중지질농도 저하작용, 항산화작용도 있다고 하나 genistein에 대한 대사이상증후군 예방 연구는 매우 미흡하다.<sup>18,19)</sup> Genistein의 대사증후군 예방 효과가 증명된다면 식생활 조절로 폐경기에 증가되는 대사증후군의 예방법을 제시할 수 있을 것이다.

폐경기의 대사이상에 대한 연구는 혈중지방에 대해서만 집중되어 있고 혈중 지방 수준의 변화와 함께 간 조직에서 일어나는 lipid 대사와 에너지 대사에 대해서는 연구가 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 폐경에 의한 에너지 대사에 중요한 역할을 하는 미토콘드리아의 protein density와 미토콘드리아 기능의 변화, 식이 중 genistein의 첨가가 미토콘드리아 기능에 미치는 효과를 관찰하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물의 사육 및 식이

5주령 된 Sprague Dawley계 암컷 쥐를 식품의약품안전청 실험동물실에서 공급받아 3주 동안 적응시킨 후 두 군으로 나누어 sham 수술 (n = 13)과 난소절제수술 (n = 16)을 시행하였다. 3주 후에 각 수술군을 두 군으로 나누어 genistein (BioSpectrum Co. Ltd., Seoul, Korea)이 첨가되지 않은 고지방식이 (지방함량이 식이 중 18% 차지)나 식이 중 0.1% 수준으로 genistein이 첨가된 실험식을 제공하였다 (Table 1). 실험군은 4군으로 1) sham 군 (S, n = 6) 2) sham-genistein 첨가 군 (S + G, n = 7) 3) 난소절제 군 (OVX, n = 8) 4) 난소절제-genistein 첨가 군 (OVX + G, n = 8)으로 구성되었다. 실험식이와 음용수는 자유섭취 시켰으며, 체중은 일주일에 1회, 식이섭취량은 일

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

	S <sup>1)</sup>	S+G	OVX	OVX+G
Cornstarch	469.692	470.692	469.692	470.692
Casein	140	140	140	140
Sucrose	100	100	100	100
Beef tallow	180	180	180	180
Cholesterol	10	10	10	10
Fiber	50	50	50	50
Mineral mixture <sup>2)</sup>	35	35	35	35
Vitamin mixture <sup>3)</sup>	10	10	10	10
L-cystein	1.8	1.8	1.8	1.8
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5	2.5
TBHQ <sup>4)</sup>	0.008	0.008	0.008	0.008
Genistein	-	1	-	1

1) S: sham-operated + high fat diet, S+G: sham-operated + high fat diet with 0.1% genistein, OVX: ovariectomized + high fat diet, OVX+G: ovariectomized + high fat diet with 0.1% genistein

2) Mineral mixture: AIN-93M mineral mixture (ICN, CA, USA)

3) Vitamin mixture: AIN-93VX vitamin mixture (ICN, CA, USA)

4) TBHQ: Tert-butylhydroquinone

주일에 3회 측정하였다.

## 2. 시료 수집 및 저장

4주 동안 실험식이를 공급한 후 식이섭취 조건을 일정하게 하기 위해 희생시키기 전 12시간 동안 절식시킨 (overnight fasting) 후 CO<sub>2</sub>로 마취시키고 복대정맥에서 혈액을 채취하였다. 혈액은 항응고제 (sodium heparin)로 처리된 튜브에 담아 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 혈장을 분리하였다. 혈액 채취 후 신장, 심장, 신장과 난관주변의 지방을 채취하여 무게를 측정하였다. 각 실험동물 군으로부터 간조직을 신속히 적출한 후 무게를 측정하고 일부를 정량 후, 미토콘드리아를 분리하였다. 나머지 간조직은 액체질소로 급속 냉동하였으며 분석 시 까지 -80°C에 보관하였다. 혈액과 조직은 분석 시 까지 -80°C에 보관하였다.

## 3. 미토콘드리아의 분리, 미토콘드리아 protein 정량 및 기능 검색

간조직의 일부를 정량 후 미토콘드리아를 분리하였다.<sup>20)</sup> 약 1 g의 간 조직을 0.9% NaCl 용액으로 씻고 0.025 M Tris-HCl (pH 7.4), 0.25 M Sucrose, 1 mM EDTA를 포함하는 완충용액 9 mL로 균질화하였다. 1,000 g, 4°C에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취한 후 10,900 g, 4°C에서 10분간 원심분리하였다. 상층액은 100,000 g, 4°C에서 1시간 동안 원심분리하여 cytosolic fraction을 얻었고 침전물은 100,000 g, 4°C에서 3시간 동안 원심분리하여 상층액을 버리고 미토콘드리아를 얻었다.

분리된 미토콘드리아를 이용하여 미토콘드리아 기능의 표

지효소인 succinate dehydrogenase (SDH)와 cytochrome c oxidase (COX)의 활성도를 측정하였다. SDH 활성도는 시료에 존재하는 SDH의 작용으로 기질인 succinate에서 유리되는 전자가 반응계의 최종 전자 수용체인 2,6-dichlorophenol-indophenol (DCIP)을 환원하는 정도를 600 nm에서 흡광도 감소율로 측정하였다.<sup>21)</sup> Cytochrome c oxidase (COX) 활성도는 cytochrome c를 sodium dithionite로 환원시킨 후, 시료를 넣어 산화 cytochrome c의 발생도를 550 nm에서 흡광도 감소율로 측정하였다.<sup>22)</sup>

## 4. Real time RT-PCR

간조직에서 TRI reagent (Molecular Research, Cincinnati, Ohio)를 사용하여 RNA를 추출 후 real time RT-PCR 방법으로 미토콘드리아 관련 protein인 PGC-1과 COX III의 mRNA 수준을 정량하였다. 이를 핵 DNA에 의해 code되는 18S rRNA mRNA로 표준화 시켰다. Total RNA (2 µg)에 random primer (0.5 µg/µl)를 첨가시켜 template와 primer를 annealing 시킨 후 MMLV-RTase (200 U), 1 mM dNTPs, RNasin ribonuclease inhibitor (20 U), 50 mM Tris-HCl (pH 8.3 at 25°C), 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dithiothreitol이 포함된 용액에서 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 생성된 cDNA를 이용하여 ABI PRISM 7700 sequence-detection system (PE Applied Biosystems)에서 SYBR green PCR reagents (PE Applied Biosystems)을 이용한 real time quantitative PCR 반응을 수행하였다. SYBR green emission intensity는 PCR product 증가에 따라 유의있게 상승하며 각 target의 PCR 반응 후 감지된 threshold cycle 수인 Ct값을 이용하여 mRNA 수준을 정량한다. 이때 18S rRNA를 endogenous control로 사용하여 sample 간 RNA 농도의 variation을 보정하여 Ct를 구하고 대조군에 대한 Ct 평균치를 실험군의 Ct 치에서 빼어 대조군에 대한 상대값을 2<sup>-ΔΔCt</sup> 값으로 구하였다.<sup>23)</sup> 사용된 rat PGC-1의 forward와 reverse primer는 각기 5-atgtgtcgccttctgtct-3'과 5-atctactgctggggacctt-3'이며 rat COX III는 5'-aag-gccaccacacctt-3'와 5'-aaatgctcagaaaatccggc-3'이다.

## 5. 통계처리

실험의 결과는 SPSS 통계 package를 이용하여 각 실험군마다 평균과 표준오차를 계산한 후, 군간의 차이를 one-way ANOVA test 후 p < 0.05 수준에서 Duncan's multiple range test에 의해 검증하였다. 변수들 간의 상관성은 Pearson correlation으로 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 체중과 식이섭취량, 식이효율

실험 기간 중 체중의 변화를 Table 2에 제시하였다. 난소절제수술과 Sham 수술을 시행하고 3주 후 체중을 측정 한 결과 S 군의 체중은 초기 무계에 비해 15% 증가한 것에 비해 OVX 군의 체중은 31% 증가하여 난소절제술이 유의적으로 체중을 증가시켜 다른 실험들의 결과와 유사하였다.<sup>24,25)</sup>

4주 동안 식이를 공급한 후 체중을 측정하였을 때 난소절제에 의한 체중증가 효과가 처음 3주에 비해서는 약간 감소하기는 했으나 지속적으로 체중이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. OVX 군의 체중이 가장 많이 증가하였고 S 군의 체중이 가장 적게 증가하였다. S 군에게 genistein이 첨가된 고지방식을 먹이는 경우 고지방식에만 공급한 군에 비해 체중감소 효과가 없었으나, genistein 첨가식을 공급한 OVX + G 군의 경우 OVX 군보다 체중증가가 감소하는 경향을 보였다.

식이섭취량의 경우 OVX 군이 더 많이 섭취하는 것을 관찰할 수 있어서 식이섭취량에 대한 체중증가비율을 관찰해 볼 때 OVX 군은 S 군에 비해 2배의 효율을 보였으나 OVX + G 군은 genistein 첨가에 의해 같은 식이섭취량에 대해 OVX 보다 29% 체중 감소 효과를 보였다. 따라서 식이 중 0.1% 수준의 genistein은 유의적이지는 않지만 난소절제군에 대

해서만 체중감소 효과를 보이는 것으로 추정된다.

Okazaki 등<sup>26)</sup>은 암컷이나 수컷 쥐에게 정상식이에 genistein을 28일간 경구투여한 경우 체중변화를 관찰할 수 없었다고 하여 실험조건에 따라 다른 현상을 관찰할 수 있었다. 즉 난소절제로 비만을 유발시킨 동물에게 genistein을 공급한 경우에만 체중증가를 억제하는 효과를 관찰할 수 있는 것으로 고려된다.

### 2. 조직 무게의 변화

S와 S + G 군의 평균 간 조직 무게는 각기 10.04 g와 10.85 g로 genistein 첨가에 의해 약간 증가했으나 통계적으로 유의적이지는 않았다 (Table 3). 한편 OVX 군과 OVX + G 군의 경우 S 군에 비해 간 무게가 각기 34%와 31% 증가하였다. 난소절제에 의해 체중이 증가한 상태이어서 체중에 대한 상대적 간의 무게는 군간에 유의적 차이는 없었다. Okazaki 등은 7주 수컷 흰쥐에게 상용실험식이를 공급하면서 28일간 genistein을 400 혹은 1000 mg/kg body weight 수준으로 경구 투여했을 때는 간의 무게가 증가하였고 체중의 변화가 없어 간의 상대적 무게는 증가했으나 암컷의 경우는 군간의 유의적 차이가 없어 암컷의 경우 genistein 투여에 대해 간이 비대해지는 것은 관찰할 수 없었다고 한다. 본 연구에서는 암컷 쥐에서 난소제거에 의해 식이섭취 증가 및 고지방식에 따른 고지질혈증으로 간에 지방축적이 크게 증가하여 간의 무게 증가를 관찰할 수 있었

**Table 2.** Effect of genistein and ovariectomy on body weight, weight gain, food intake, and FER

	Body weight (g)			Weight gain (g/day)		Food intake (g/day)	FER <sup>3)</sup>
	Initial	At 3 week	At 7 weeks	7 weeks (surgery + diet)	4 weeks (diet)		
S	232.2 ± 3.4 <sup>1)NS2)</sup>	267.4 ± 7.0 <sup>b)</sup>	292.1 ± 7.2 <sup>b)</sup>	1.2 ± 0.2 <sup>b)</sup>	1.0 ± 0.2 <sup>c)</sup>	13.1 ± 0.5 <sup>b)</sup>	0.07 ± 0.02 <sup>c)</sup>
S+G	232.2 ± 3.4	267.4 ± 7.0 <sup>b)</sup>	310.1 ± 15.2 <sup>b)</sup>	1.5 ± 0.2 <sup>b)</sup>	1.2 ± 0.2 <sup>bc)</sup>	12.9 ± 0.5 <sup>b)</sup>	0.08 ± 0.01 <sup>bc)</sup>
OVX	232.2 ± 3.4	304.0 ± 2.9 <sup>a)</sup>	371.0 ± 10.9 <sup>a)</sup>	2.6 ± 0.2 <sup>a)</sup>	2.1 ± 0.2 <sup>a)</sup>	15.2 ± 0.6 <sup>a)</sup>	0.14 ± 0.01 <sup>a)</sup>
OVX+G	232.2 ± 3.4	304.0 ± 2.9 <sup>a)</sup>	356.4 ± 6.8 <sup>a)</sup>	2.4 ± 0.1 <sup>a)</sup>	1.7 ± 0.2 <sup>ab)</sup>	15.0 ± 0.6 <sup>a)</sup>	0.11 ± 0.01 <sup>ab)</sup>

1) Data are expressed as Mean ± SE (n = 6 - 8 per group)

2) Values with different alphabet within the same column are significantly different at p < 0.05 by Duncan's multiple range test. NS: p ≥ 0.05

3) FER: Food efficiency ratio = weight gain (g/day) / food intake (g/day)

**Table 3.** Changes in tissue weight, in sham-operated or ovariectomized rats with genistein supplement

	Liver		Kidney		Heart		Fat <sup>3)</sup>	
	(g)	(g/100 g B.W.)	(g)	(g/100 g B.W.)	(g)	(g/100 g B.W.)	(g)	(g/100 g B.W.)
S	10.04 ± 0.62 <sup>1)NS2)</sup>	3.42 ± 0.14 <sup>NS)</sup>	1.96 ± 0.06 <sup>NS)</sup>	0.67 ± 0.01 <sup>a)</sup>	0.96 ± 0.03 <sup>b)</sup>	0.33 ± 0.01 <sup>a)</sup>	5.06 ± 0.32 <sup>c)</sup>	1.73 ± 0.10 <sup>b)</sup>
S+G	10.85 ± 0.77 <sup>b)</sup>	3.48 ± 0.11	1.99 ± 0.06	0.65 ± 0.02 <sup>a)</sup>	1.02 ± 0.06 <sup>b)</sup>	0.33 ± 0.01 <sup>a)</sup>	6.92 ± 1.26 <sup>bc)</sup>	2.18 ± 0.35 <sup>ab)</sup>
OVX	13.42 ± 0.56 <sup>a)</sup>	3.62 ± 0.14	2.05 ± 0.08	0.55 ± 0.02 <sup>b)</sup>	1.17 ± 0.04 <sup>a)</sup>	0.32 ± 0.01 <sup>ab)</sup>	10.35 ± 0.83 <sup>a)</sup>	2.78 ± 0.19 <sup>a)</sup>
OVX+G	13.14 ± 0.98 <sup>a)</sup>	3.67 ± 0.22	1.99 ± 0.13	0.55 ± 0.03 <sup>b)</sup>	1.07 ± 0.03 <sup>ab)</sup>	0.30 ± 0.01 <sup>b)</sup>	9.69 ± 1.24 <sup>ab)</sup>	2.69 ± 0.36 <sup>a)</sup>

1) Data are expressed as Mean ± SE (n = 6 - 8 per group)

2) Values with different alphabet within the same column are significantly different at p < 0.05 by Duncan's multiple range test. NS: p ≥ 0.05

3) Retroperitoneal fat

으나 체중증가도 동시에 나타나 간의 상대적 무게는 군간의 차이가 없는 것으로 고려된다.

한편 신장의 중량은 군 간에 유의적 차이는 없었다. Okazaki 등의 연구에서는 암컷 및 수컷 쥐에게 정상식에 genistein을 첨가한 경우 체중의 변화가 없었고 신장의 상대적 무게는 차이가 없었으나 본 연구에서는 난소절제에 의한 체중증가로 인해 체중에 대한 상대적 신장의 무게는 감소되었다.<sup>26)</sup> 신장의 중량은 난소절제에 의해서 증가하였으나 체중에 대한 상대적 무게는 유의적인 차이를 보이지 않았다.

난소절제에 의해 fat mass는 S 군에 비해 2배 증가하여 유의적인 차이를 보였으나 genistein에 의해 감소하는 경향을 보였다.

### 3. 간의 미토콘드리아 protein density의 변화

간, 신장, 심장 등은 oxidative phosphorylation 등 대사 작용이 활발히 일어나며 그 중 간은 brain 등과는 달리 intermittent mitotic 하다고 알려져 있다.<sup>13)</sup> 본 연구에서 난소절제에 의해 OVX 군의 간 중량이 유의적으로 증가하였다. Abelenda와 Puerta에 의하면 간 중량당 총 protein이 난소절제에 의해 감소된 것을 관찰 하였지만 신장 등에서는 중량당 총 protein의 변화를 관찰할 수 없었다.<sup>8)</sup> 노화에 의해 간 미토콘드리아가 손상되고 그 기능도 저하되며 열량 제한에 의해서는 간 단위 무게에 대한 미토콘드리아 단백질이 증가하는 것으로 알려져 있다.<sup>16)</sup> 난소절제와 genistein의 섭취로 이와 같은 영향을 받는지를 알고자 미토콘드리아 단백질을 측정하였다. 단위 무게에 대한 평균 미토콘드리아 단백질은 S 군, S + G 군은 각기 7.78 mg과 7.26 mg인데 OVX 군은 4.76 mg으로 S 군에 비해 39% 감소하였다. 이에 비해 OVX + G 군은 다시 32% 정도 증가하여 S 군과 유의적인 차이가 없었다 (Table 4). Genistein이 어떠한 기전에 의해서 미토콘드리아 단백질을 증가시키는지에 관해 비슷한 연구가 수행되지 않았으므로 추가적으로 검토되어야 할 것이다.

**Table 4.** Changes in mitochondrial protein levels in sham-operated or ovariectomized rats with genistein supplement

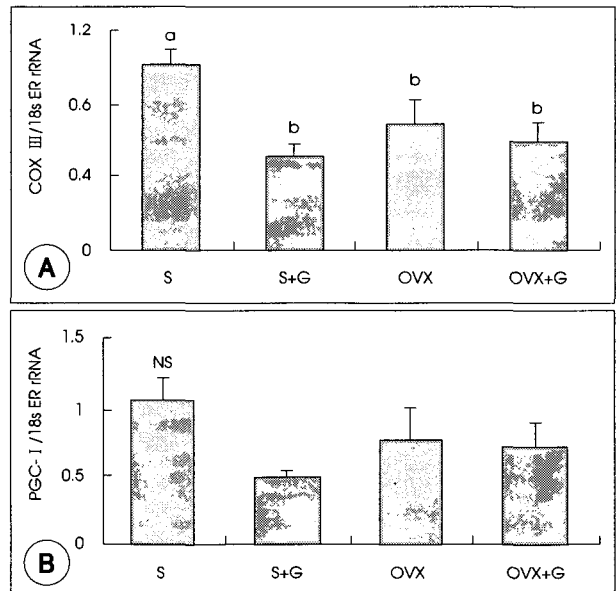
	Mitochondrial protein density	
	(mg protein/g liver)	(mg protein/liver)
S	7.78 ± 0.58 <sup>1) a2)</sup>	76.93 ± 4.74 <sup>NS</sup>
S + G	7.26 ± 0.45 <sup>o</sup>	77.94 ± 5.30
OVX	4.76 ± 0.71 <sup>b</sup>	63.64 ± 9.73
OVX + G	6.27 ± 0.50 <sup>ab</sup>	80.51 ± 6.07

1) Data are expressed as Mean ± SE (n = 6 - 8 per group)  
 2) Values with different alphabet within the same column are significantly different at p < 0.05 by Duncan's multiple range test. NS: p ≥ 0.05

OVX 군의 간조직내 총 미토콘드리아 단백질 평균치는 다른 군에 비해 낮은 경향이였으나 군간에 유의적 차이는 없었다.

### 4. 미토콘드리아 관련 단백질인 PGC-1와 COX III의 mRNA 수준

난소절제에 의해 간 조직의 미토콘드리아 protein density가 감소된 것과 함께 간조직에서 RNA를 추출하여 RT-PCR을 통해 미토콘드리아와 관련된 유전자, 즉 PGC-1과 COX III의 mRNA 수준을 측정하였다 (Fig. 1). PGC-1은 미토콘드리아 단백질의 전사에 관련되어 nuclear respiratory factor 혹은 mitochondrial transcriptional factor 등의 전사를 증가시킬 뿐 아니라 직접 미토콘드리아구성 단백질의 합성도 증가시킨다고 보고되고 있다.<sup>27)</sup> 본 연구에서는 PGC-1의 mRNA 수준이 S 군에 비해 S + G 군에서 낮은 경향을 보였다. OVX 군과 OVX + G 군도 PGC-1 mRNA 수준이 낮아 미토콘드리아 관련 protein의 전사가 비효율적으로 일어나는 것으로 고려된다. 한편 미토콘드리아의 oxidative phosphorylation의 구성체 중에 complex IV에 해당하는 cytochrome c oxidase 중 catalytic 부분을 구성하고 있고 mtDNA에 의해 전사되는 cytochrome c oxidase subunit III의 mRNA 수준을 관찰 하였을 때 S 군에 비해 S + G 군의 수준이 낮았다. OVX 군도 COX III의 mRNA 수준이 S 군에 비해 낮았고 OVX + G 군의 mRNA 수준은 OVX



**Fig. 1.** Changes in levels of mRNA of mitochondria-related proteins (PGC-1, COX III). S: sham-operated + high fat diet, S + G: sham-operated + high fat diet with 0.1% genistein, OVX: ovariectomized + high fat diet, OVX + G: ovariectomized + high fat diet with 0.1% genistein. Data are expressed as Mean ± SE (n = 6 - 8 per group). Values with different alphabet are significantly different at p < 0.05 by Duncan's multiple range test. NS: p ≥ 0.05.

**Table 5.** Correlation coefficients for relationships between hepatic mitochondrial enzymatic activities and mRNA levels of mitochondria related proteins in rats

	SDH <sup>1)</sup>	COX	COX III mRNA	PGC-1 mRNA
Liver weight (g)	-0.408 (0.031) <sup>2)</sup>	-0.255 (0.181)	-0.220 (0.352)	-0.186 (0.431)
Mitochondrial protein density (mg protein/g liver)	0.732 (0.000)	0.709 (0.000)	0.216 (0.361)	0.091 (0.703)
SDH (μ mole/g liver)	1	0.795 (0.000)	0.217 (0.359)	0.199 (0.400)
COX (Units/g liver)	0.795 (0.000)	1	0.031 (0.897)	0.054 (0.822)
COX III mRNA	0.217 (0.359)	0.031 (0.897)	1	0.729 (0.000)
PGC-1 mRNA	0.199 (0.400)	0.054 (0.822)	0.729 (0.000)	1

1) SDH: succinate dehydrogenase activity, COX: cytochrome c oxidase activity, PGC-1: peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1

2) Data are expressed as pearson correlation (p value)

**Table 6.** Effects of genistein and ovariectomy on liver mitochondrial enzymatic activities in sham-operated or ovariectomized rats with genistein supplement

	SDH activity			COX activity		
	μ mole/mg protein	μ mole/g liver	μ mole/liver	Units/mg protein	Units/g liver	Units/liver
S	25.30 ± 1.79 <sup>1)NS2)</sup>	192.01 ± 8.09 <sup>a</sup>	1915.36 ± 101.65 <sup>ab</sup>	0.12 ± 0.01 <sup>NS</sup>	0.90 ± 0.08 <sup>NS</sup>	8.90 ± 0.71 <sup>NS</sup>
S+G	25.42 ± 1.63	177.61 ± 13.90 <sup>a</sup>	1949.89 ± 129.33 <sup>ab</sup>	0.13 ± 0.01	0.95 ± 0.10	10.03 ± 0.91
OVX	25.21 ± 2.10	116.67 ± 19.62 <sup>b</sup>	1567.84 ± 283.61 <sup>b</sup>	0.14 ± 0.02	0.67 ± 0.14	9.16 ± 2.08
OVX+G	29.92 ± 2.71	181.37 ± 13.79 <sup>a</sup>	2351.35 ± 174.06 <sup>a</sup>	0.14 ± 0.01	0.88 ± 0.07	11.43 ± 1.03

1) Data are expressed as Mean ± SE (n = 6 - 8 per group)

2) Values with different alphabet within the same column are significantly different at p < 0.05 by Duncan's multiple range test. NS: p ≥ 0.05

군과 유사하였다. 본 연구에서는 OVX에 의해 PGC-1 수준이 감소하는 경향을 보이고 COX III mRNA 수준이 유의적으로 감소하였으며 genistein에 의해서도 감소하는 경향을 보이는데 OVX 군에서는 genistein 첨가가 추가적 감소효과를 보이지 않았다. Borrás 등에 의하면 male에 비해 female이 mtDNA에 의해 code되는 16S rRNA의 mRNA 수준이 높았고 Van Itallie 등의 연구에서는 estrogen 투여로 COX mRNA가 증가하였다고 발표하였으며 estrogen이 낮은 경우는 mtDNA에 의해 code되는 gene 들의 mRNA 수준이 낮을 것으로 예상되나 난소절제 처리후의 미토콘드리아 관련 protein의 mRNA 수준을 관찰한 연구는 본 연구가 처음이며 난소절제에 의해 감소됨을 알 수 있었다.<sup>9,28)</sup> 그러나 estrogen의 대체 효과를 보일 것으로 예측된 genistein이 오히려 S 군에서는 감소시키는 효과를 보였고 estrogen이 감소된 OVX와 OVX + G 군에서는 genistein에 의한 효과를 보이지 않은 것은 genistein이 hormone 수준에 따라 달리 작용하는 것으로 생각된다. PGC-1 mRNA가 증가할 수록 COX III mRNA 수준이 증가하는 관계가 관찰되어 두 인자 간에 밀접한 상관관계가 존재함을 관찰할 수 있었다 (Table 5).

**5. COX III mRNA 수준과 COX activity의 관계**

본 연구에서는 COX의 활성도는 난소절제에 의한 영향을

받지 않아 군간에 차이가 없었다 (Table 6). mtDNA에 의해 code 되는 COX III의 mRNA는 난소절제에 의해 감소되었으나 COX는 complex 중 3개의 subunit은 mtDNA에 의해, 나머지 10개의 subunit은 핵 DNA에 의해 code되므로 nuclear DNA 등에 의한 조절을 받는 나머지 부분이 종합적으로 작용하여 전체적인 COX의 activity를 나타내는 데 난소절제에 의해 COX activity는 차이가 없는 것은 COX III mRNA는 감소했으나 이 후 stability 증가나 protein expression이 더 효율적으로 일어났을 것으로 예측된다. 혹은 COX III 외의 다른 subunit이 상대적으로 증가해서 전체적 영향이 나타나지 않은 것으로 고려된다. Abelenda와 Puerta는 추위에 노출시킨 암컷 쥐에서 호르몬 상태에 따른 미토콘드리아 기능조절을 보았는데 난소절제에 의해 골격근이나 신장에서 cytochrome c oxidase의 활성이 증가하는 것을 관찰하였고 estrogen 투여로 activity가 감소함을 관찰하였으나 간 COX의 활성은 hormone 상태에 따른 유의적인 변화는 없었던 것을 고려하면 간 COX 활성은 다른 기관에 비해 상대적으로 hormone의 영향을 적게 받는 것으로 고려된다.<sup>9)</sup>

**6. 간 SDH의 효소활성도**

간 미토콘드리아 기능의 대표적 표지자인 SDH의 효소활성도를 측정하였다. 미토콘드리아 oxidative phosphoryla-

tion system이 5개 complex로 이루어지고 이 중 complex II를 이루는 SDH 복합체의 모든 subunit은 핵 DNA에 의해 code된다.<sup>29)</sup> 간 단위무게에 대한 SDH activity는 OVX 군이 낮았으나 genistein 첨가로 S 군 수준으로 복구되었다 (Table 6). 따라서 난소절제에 의해 COX의 경우 mtDNA에 의해 code 되는 subunit인 COX III의 mRNA 수준은 낮아졌으나 activity는 군간에 유의적 차이가 없었던 것에 반해 mitochondria의 OXPHOS의 상당부분을 차지하는 SDH의 경우는 activity가 감소됨을 알 수 있었고 이는 genistein에 의해 미토콘드리아의 protein density 복구와 함께 SDH activity도 복구됨을 관찰하였다. SDH activity는 간 중량과 간 미토콘드리아의 protein density와 매우 밀접한 관계를 가지며 SDH와 COX activity와의 상관관계 또한 매우 높았다 (Table 5). 그러나 COX III mRNA나 PGC-1 mRNA와의 상관관계는 없었다.

## 요약 및 결론

난소절제로 노화촉진 및 폐경 후 상태를 모방한 쥐에서 genistein 투여가 간의 미토콘드리아 기능에 미치는 효과를 연구하기 위해 8주된 SD 중의 암컷 쥐를 sham 및 난소절제 수술 3주 후에 다시 두 군으로 나누어 Sham 군 (S, n = 6), Sham-genistein 첨가 군 (S + G, n = 7), 난소절제 군 (OVX, n = 8), 난소절제-genistein 첨가 군 (OVX + G, n = 8)으로 나누어 처리하였다. 4주 후 채취한 간조직의 미토콘드리아를 분리하여 protein 함량을 측정하였고 간조직의 RNA를 추출하여 미토콘드리아 관련 protein gene들의 mRNA 수준을 관찰하였다. 폐경기 모델에서 미토콘드리아 기능손상 여부를 규명하기 위해 분리된 미토콘드리아에서 대표적 표지효소인 succinate dehydrogenase (SDH)와 cytochrome c oxidase (COX)의 활성도를 측정하였다.

난소절제에 의해 간 중량이 증가하였으나 간 미토콘드리아 protein density가 감소하였다. 간 미토콘드리아 protein density는 genistein 첨가에 의해 S 군과 유사한 수준으로 회복되었다.

난소절제에 의해 미토콘드리아의 COX III mRNA는 감소하였으나 COX activity는 군간에 유의적 차이가 없었다.

난소절제에 의해 mg protein 당 SDH activity는 감소되지 않았으나 미토콘드리아 protein density의 감소로 1g liver 당 SDH activity는 OVX 군에서 유의적으로 감소하였다. OVX 군에 genistein을 첨가하면 SDH activity를 증가시켜 미토콘드리아의 기능이 회복되는 것을 관찰하였다.

폐경상태를 유발한 쥐에게 고지방식을 투여하면 미토콘

드리아의 protein density는 감소하고 SDH activity도 감소하지만 genistein을 첨가하면 미토콘드리아 기능이 개선되고 이러한 미토콘드리아 기능의 개선은 궁극적으로 fat mass 감소 및 인슐린 저항증 개선을 유도하는 것으로 고려된다.

## Literature cited

- 1) Song J, Kim E, Shin C, Kim SS, Lee HK, Jung M, Jung SC, Jo SA, Jo I. Prevalence of the metabolic syndrome among South Korean adults: the Ansan study. *Diabet Med* 21: 1154-1155, 2004
- 2) Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA, Niskanen LK, Kumpusala E, Tuomilehto J, Salonen JT. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA* 288: 2709-2716, 2002
- 3) Laaksonen DE, Lakka HM, Niskanen LK, Kaplan GA, Salonen JT, Lakka TA. Metabolic syndrome and development of diabetes mellitus: application and validation of recently suggested definitions of the metabolic syndrome in a prospective cohort study. *Am J Epidemiol* 156: 1070-1077, 2002
- 4) Carr MC. The Emergence of the Metabolic Syndrome with Menopause. *J Clin Endocrinol Metabolism* 88 (6): 2404-2411, 2003
- 5) Kannel WB, Levy D. Menopause, hormones, and cardiovascular vulnerability in women. *Arch Intern Med* 164 (5): 479-481, 2004
- 6) Relimpio F, Martinez-Brocca MA, Leal-Cerro A, Losada F, Mangas MA, Pumar A, Astorga R. Variability in the presence of the metabolic syndrome in Type 2 diabetic patients attending a diabetes clinic: Influences of age and gender. *Diabetes Res Clin Pract* 65 (2): 135-142, 2004
- 7) Bowles D. A Radical idea: men and women are different. *Cardiovasc Res* 61 (1): 5-6, 2004
- 8) Abelenda M, Puerta M. Dual control of cytochrome-c oxidase activity by female sex steroids. *Eur J Endocrinol* 141 (6): 630-636, 1999
- 9) Borrás C, Sastre J, Garcia-Sala D, Lloret A, Pallardo FV, Vina J. Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radic Biol Med* 34 (5): 546-552, 2003
- 10) Nicholls DG. Mitochondrial function and dysfunction in the cell: its relevance to aging and aging-related disease. *Int J Biochem Cell Biol* 34 (11): 1372-1381, 2002
- 11) Wallace DC. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283 (5407): 1482-1488, 1999
- 12) Wallace DC. Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 (19): 8739-8746, 1994
- 13) Mootha VK, Bunkenborg J, Olsen JV, Hjerrild M, Wisniewski JR, Stahl E, Bolouri MS, Ray HN, Sihag S, Kamal M, Patterson N, Lander ES, Mann M. Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria. *Cell* 115 (5): 629-640, 2003
- 14) Venkatraman A, Landar A, Davis AJ, Chamlee L, Sanderson T, Kim H, Page G, Pompilius M, Ballinger S, Darley-USmar V,

- Bailey SM. Modification of the mitochondrial proteome in response to the stress of ethanol-dependent hepatotoxicity. *J Biol Chem* 279 (21) : 22092-22101, 2004
- 15) Short KR, Nair KS, Stump CS. Impaired Mitochondrial Activity and Insulin-Resistant Offspring of Patients with Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* 350 (23) : 2419-2421, 2004
  - 16) Lambert AJ, Wang B, Yardley J, Edwards J, Merry BJ. The effect of aging and caloric restriction on mitochondrial protein density and oxygen consumption. *Exp Gerontol* 39 (3) : 289-295, 2004
  - 17) Barnes S. Soy isoflavones-phytoestrogens and what else? *J Nutr* 134 (5) : 1225S-1228S, 2004
  - 18) Naaz A, Yellayi S, Zakroczymski MA, Bunick D, Doerge DR, Lubahn DB, Helferich WG, Cooke PS. The soy isoflavone genistein decreases adipose deposition in mice. *Endocrinology* 144 (8) : 3315-3320, 2003
  - 19) Mezei O, Banz WJ, Steger RW, Peluso MR, Winters TA, Shay N. Soy isoflavones exert antidiabetic and hypolipidemic effects through the PPAR pathways in obese Zucker rats and murine RAW 264.7 cells. *J Nutr* 133 (5) : 1238-1243, 2003
  - 20) Johnson D, Lardy H. Isolation of liver or kidney mitochondria. In: *Methods in enzymology* vol 10. Oxidation and phosphorylation (Estabrook RW & Pullman ME eds) pp.94-96, NY, Academic Press, 1967
  - 21) Gwen P, Freer JH. Factors influencing the activity of succinate dehydrogenase in membrane preparations from *Micrococcus lysodeikticus*. *Biochem J* 120: 237-243, 1970
  - 22) Wharton DC, Tzagaloff A. Cytochrome oxidase from beef heart mitochondria In: *Methods in enzymology* Vol 10, Oxidation and phosphorylation (Estabrook RW & Pullman ME eds) pp.245-247, NY, Academic Press. 1967
  - 23) Peinnequin A, Mouret C, Birot O, Alonso A, Mathieu J, Clarencon D, Agay D, Chancerelle Y, Multon E. Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green. *BMC Immunol* 5 (1) : 3-12, 2004
  - 24) Meli R, Pacilio M, Raso GM, Esposito E, Coppola A, Nasti A, Di Carlo C, Nappi C, Di Carlo R. Estrogen and raloxifene modulate leptin and its receptor in hypothalamus and adipose tissue from ovariectomized rats. *Endocrinology* 145 (7) : 3115-3121, 2004
  - 25) Lemieux C, Picard F, Labrie F, Richard D, Deshaies Y. The estrogen antagonist EM-652 and dehydroepiandrosterone prevent diet- and ovariectomy-induced obesity. *Obes Res* 11 (3) : 477-490, 2003
  - 26) Okazaki K, Okazaki S, Nakamura H, Kitamura Y, Hatayama K, Wakabayashi S, Tsuda T, Katsumata T, Nishikawa A, Hirose M. A repeated 28-day oral dose toxicity study of genistein in rats, based on the 'Enhanced OECD Test Guideline 407' for screening endocrine-disrupting chemicals. *Arch Toxicol* 76 (10) : 553-559, 2002
  - 27) Scarpulla RC. Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1576 (1-2) : 1-14, 2002
  - 28) Van Itallie CM, Dannies PS. Estrogen induces accumulation of the mitochondrial ribonucleic acid for subunit II of cytochrome oxidase in pituitary tumor cells. *Mol Endocrinol* 2 (4) : 332-337, 1988
  - 29) Au HC, Ream-Robinson D, Bellew LA, Broomfield PL, Saghbini M, Scheffler IE. Structural organization of the gene encoding the human iron-sulfur subunit of succinate dehydrogenase. *Gene* 159 (2) : 249-253, 1995