

성장기 암컷 흰쥐에서 이소플라본 첨가 식이가 지질 농도와 간 LDL 수용체의 유전자 발현정도에 미치는 영향

최미자*,** · 조현주*,***

계명대학교 식품영양학과, * 세계사이버대학 약용건강식품전공**,

Effects of Isoflavones Supplemented Diet on Lipid Concentrations and Hepatic LDL Receptor mRNA Level in Growing Female Rats

Choi, Mi-Ja*,** · Jo, Hyun-Ju*,***

Department of Food and Nutrition, * Keimyung University, Taegu 704-701, Korea

Department of Health and Medicinal Food, ** World Cyber College, Kwangjoo 464-895, Korea

ABSTRACT

The purpose of this study was to examine the impact of isoflavones on lipid concentrations and hepatic LDL receptor mRNA level in growing female rats. Twenty four rats (body weight 75 ± 5 g) were randomly assigned to one of two groups, consuming control diet or isoflavones supplemented diet (57 mg isoflavones/100 g diet). All rats has been fed on experimental diet and deionized water ad libitum for 9 weeks. The concentration of triglyceride and total cholesterol were measured in serum and liver. Serum HDL cholesterol was measured. Hepatic LDL receptor mRNA level was tested by RT-PCR. Supplementation of isoflavones did not affect weight gain, mean food intake and food efficiency ratio. Serum total cholesterol and non-HDL cholesterol of isoflavones supplemented rats were significantly lower than those of control rats ($p < 0.05$). But hepatic cholesterol level was not influenced by supplementation of isoflavones. Hepatic LDL receptor mRNA level not significantly different between control group and isoflavones supplemented group. Therefore, isoflavones may be beneficial on serum cholesterol and non-HDL cholesterol lowering in growing female rats. (Korean J Nutrition 38(5): 344~351, 2005)

KEY WORDS : isoflavones, serum lipids, LDL receptor mRNA, growing female rat.

서 론

오래 전부터 여러 연구자들에 의해 식물성 단백질은 동물성 단백질에 비해 혈중 콜레스테롤 농도를 낮추어 준다고 알려져 왔다. 이러한 대두의 콜레스테롤 저하효과가 대두의 어떤 성분에 의한 것인지에 대해 많은 연구자들이 관심을 가져왔다. 대두에 함유된 여러 영양성·비영양성 물질들 중에서 혈중 콜레스테롤 감소 효과를 나타내주는 성분으로 제시된 것은 먼저 대두 단백질에 함유되어 있는 아미노산 조성의 차이 즉, 함황 아미노산 함량, lysine과 arginin의 비율을 비롯하여¹⁻³⁾ 대두 섬유소 (soy fiber),⁴⁾ 피틴산

(phytic acid),⁵⁾ 대두 사포닌 (saponin)⁶⁾과 이소플라본 (isoflavones) 등⁷⁾이 제시된 바 있다.

이소플라본은 폐놀계 화합물 (diphenolic compound)로 자연계에서의 분포가 매우 제한되어 있다. Lentil, chickpea bean과 red clover 등에서도 발견되어지나 대두와 대두로 만든 식품이 영양적 목적으로 식사를 통해 제공될 수 있는 이소플라본의 가장 풍부하고 유일한 공급원이다.^{8,9)} 여성호르몬인 17β -estradiol과 구조가 유사하여 phytoestrogen으로 불리워지고 있는 이소플라본은 전형적인 에스트로겐 수용체인 에스트로겐 수용체- α 에 대한 친화도가 estadiol 보다 유의적으로 낮기 때문에 상대적으로 매우 약한 에스트로겐으로서의 효과를 가지고 있는 것으로 간주되어왔다.¹⁰⁾ 최근 phytoestrogen은 에스트로겐 수용체- β 에 선택적으로 작용하여 에스트로겐 수용체- α 보다 에스트로겐 수용체- β 에 대하여 더 높은 결합 친화력을 가진다고 보고 된 바 있다.¹¹⁾ 에스트로겐 수용체- α 와 에스트로겐 수용체- β

접수일 : 2005년 3월 15일

채택일 : 2005년 6월 8일

* To whom correspondence should be addressed.

E-mail : hjjoworld@hanmail.net

의 분포는 조직마다 다르므로 에스트로겐 수용체- β 가 주로 분포되어 있는 조직인 갑상선, 뼈, 혈관 등에는 이소플라본이 더욱 선택적으로 작용할 것이라는 이소플라본의 조직 선택적 효과 (tissue selective effect)에 대한 가능성도 제시되었다.¹¹⁾

여성은 폐경 이후 혈청 중성지방, 총 콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 농도가 증가하는 반면 HDL-콜레스테롤은 크게 변하지 않는다. 폐경 여성에서의 이러한 혈중 지질의 변화는 에스트로겐 투여요법으로 개선될 수 있다고 보고되었으며¹²⁾ 특히, 에스트로겐과 구조가 유사한 이소플라본은 폐경 후 여성에서 혈중 콜레스테롤과 LDL-콜레스테롤 농도를 낮추어 주고,¹³⁾ 심혈관 질환에 대한 위험률을 감소시켜 주는 효과¹⁴⁾가 있는 것으로 알려지면서 에스트로겐 투여요법을 대신할 대체 방안으로 여러 각도에서 연구가 활발히 이루어지고 있다. 대두 이소플라본은 폐경 여성 뿐만 아니라 폐경 전 여성¹⁵⁾과 남성¹⁶⁾에서도 혈중 콜레스테롤 개선 효과가 있는 것으로 보고 된 바 있다.

일부 *in vitro* 실험에서는 이소플라본이 에스트로겐으로서의 효과 뿐 만 아니라 항에스트로겐으로서의 효과도 함께 나타낼 수 있음을 제안한 바 있다.^{17,18)} Dwyer 등¹⁹⁾은 이소플라본이 폐경 후 여성에서는 에스트로겐으로 작용하나 폐경기 이전 여성에서는 수용체의 결합부위에 대하여 내인성 에스트로겐과 경쟁하므로 약한 항에스트로겐으로서 작용할 수 있다고 제안하였다. 일부에서는 이러한 이론에 근거하여 이소플라본이 성장기나 젊은 여성에서 오히려 내인성 에스트로겐의 활성을 떨어뜨려 유익하지 못할 것이라는 우려를 나타낸 바 있다.¹⁸⁾ 이러한 우려에 반하여 최근의 연구에서는 대두 영아식 (soy-based infant formula)을 통한 영아기 동안의 이소플라본의 섭취는 성인기 후반에 나타날 수 있는 호르몬 의존성 질병 (암, 골다공증, 심혈관 질환 등) 발생에 대한 방어작용을 하므로 장기적인 잇점을 줄 수 있다고 하였으며,²⁰⁾ Badger 등²¹⁾도 대두 이유식의 섭취는 영아의 정상적인 성장에 영향을 미치지 않았다고 하였다. 그러나 아직 이에 대한 논란이 명확히 규명된 것은 아니다.

선행연구^{13~16)}에서 언급된 바와 같이 이소플라본이 풍부한 대두 단백질이 혈중 지질 개선과 심혈관 질환 예방에 유익한 효과가 있는 것으로 보고 된 바 있으나 이러한 대두 단백질의 효과가 이소플라본에 의한 것인지에 대한 결론은 아직 일치하지 않고 있다. 그리고 지금까지 이루어진 대두 이소플라본에 대한 연구는 이소플라본이 에스트로겐의 성질을 갖는다는 점과 에스트로겐이 결핍된 폐경 후 여성에서 심혈관계 질환의 발병률이 급증하게 된다는 점에 초점이 맞추어져 있었으므로 대부분의 연구가 폐경 후 여성들이나 난

소절제 동물을 대상으로 이루어져 왔다. 그러나 성장기 여성을 대상으로 한 연구는 거의 이루어지고 있지 않는 실정이며 phytoestrogen으로 알려진 대두 이소플라본이 성장기에 유익한 영향을 미칠지, 그렇지 않으면 유해한 영향을 미칠지에 대해서도 아직 확실하게 검증 된 바가 없다. 또한 최근 보고를 통해 성인기에 발병하게 되는 동맥경화증의 시작은 10대 때의 지질 패턴에 의해 결정 될 수 있으며,²²⁾ 아동기 동안의 혈중 콜레스테롤 상승은 성인기 심혈관 질환 발병의 중요한 예견인자로 이용될 수 있음이 제시되었다.²³⁾ 성장기동안 지속적인 혈중 지질의 관리는 심혈관 질환 발병에 대한 위험률을 낮추어 주는데 중요하므로 대두 이소플라본이 성장기의 지질대사에 미치는 영향에 대한 연구가 필요하다고 사료된다. 따라서 본 연구에서는 이소플라본 첨가식이가 성장기 암컷 흰쥐의 혈액과 간 지질농도에 미치는 영향을 알아보고, 이소플라본의 섭취가 혈중 콜레스테롤 감소의 한 기전이 될 수 있는 LDL-수용체의 유전자 발현정도에 미치는 영향을 알아보기 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 실험식이

Sprague-Dawley 암컷 쥐 (60 ± 5 g)를 대상 동물사육센터로부터 분양받아 1주일간의 적응기간 동안 고형사료 (rat chow, 삼양사)로 사육한 후 난괴법을 이용하여 각 군당 12마리씩 2군으로 나누어 9주간 실험식이를 공급하였다. 실험동물은 9주간 stainless steel wire cage에서 한 마리씩 분리 사육하였으며, 사육실의 온도는 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도는 $63 \pm 5\%$ 로 유지하였고, 매일 광주기와 암주기를 12시간이 되도록 조절하였다. 실험 기간 동안 식이와 물은 자유롭게 섭취케 하였으며 물은 모두 2차 이온교환수를 사용하였다.

실험군은 대조 (control) 군과 이소플라본 첨가 (isoflavones) 군으로 분류하였다. 대조군의 실험식이는 AIN-93G에 기준하여 조제하였다.²⁴⁾ 이소플라본 첨가군의 식이는 대조군 식이와 동일한 조성에 대두에서 분리 정제한 분리 대두 이소플라본을 첨가하였다. 실험식이에 첨가한 이소플라본의 양은 단백질 급원을 카제인 대신 soy protein isolate로 대치시켰을 때 식이에 함유된 이소플라본의 양과 동일한 양의 이소플라본 (57.8 mg isoflavones/100 g diet)을 첨가하였다.²⁵⁾ 실험식이의 조성은 Table 1과 같다.

2. 실험분석

1) 식이 섭취량 및 체중 측정

실험기간 동안 식이 섭취량은 이틀에 한 번씩, 체중은 1

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

Ingredients	Control	Isoflavones
Casein ¹⁾	200	200
Corn starch	530	528.2
Sucrose	100	100
Soybean oil	70	70
Cellulose	50	50
Min-mix ²⁾	35	35
Vit-mix ³⁾	10	10
L-cystine	3	3
Choline	2.5	2.5
Tert-butyl hydroquinone	0.014	0.014
Isoflavones ⁴⁾	—	1.8

¹⁾ Casein high protein (total protein 85%), Teklad Test Diets, Madison, Wisconsin, USA

²⁾ AIN-93G-MX, Teklad Test Diets, Medison, Wisconsin, USA

³⁾ AIN-93G-VM, Teklad Test Diets, Medison, Wisconsin, USA

⁴⁾ Isoflavones compound: Isovon (total isoflavones 32%), Pacific Chemical, Korea

주일에 한 번씩 일정한 시간에 측정하였다.

2) 시료 수집

9주간 사육 후 12시간 동안 절식시킨 후 에테르 마취 하에 복부를 절개하여 대동맥에서 혈액을 채취하였으며, 간 문맥을 통하여 차가운 식염수 20 ml를 관류시킨 후 간 조직을 적출하였다. 채취한 혈액은 30분간 방치한 후 3000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 혈청을 분리한 후 -70°C에서 냉동 보관하였다. 적출한 간 조직은 1% diethyl procarbamate (DEPC), 용액으로 2번 헹군 후 액체질소로 급속 냉동시켰으며, 분석 시까지 -70°C에서 냉동 보관하였다. 희생 과정 중 실험에 사용되는 모든 기구는 RNase 오염을 막기 위하여 멸균처리 또는 1% DEPC 용액으로 헹구어 사용하였다.

3) 시료 분석

(1) 지질분석

혈청 중성지질 분석은 TG kit (BC118, 영동제약)을 이용하였으며, 혈청 총 콜레스테롤은 콜레스테롤 E kit (BC108-E, 영동제약)을 이용하였고, HDL-콜레스테롤은 HDL-콜레스테롤 kit (BC 308-HDL, 영동제약)을 이용하여 측정하였다. Non-HDL-콜레스테롤의 농도는 총 콜레스테롤 농도에서 HDL 콜레스테롤 농도를 제한 값으로 구하였다. 총 콜레스테롤 함량에 대한 HDL-콜레스테롤의 비율 (HDL cholesterol/total cholesterol ratio, HTR)을 구하였다. Atherogenic index는 동맥경화의 위험율을 예측할 수 있는 변인으로 산출방법²⁶⁾은 다음과 같다.

Atherogenic index = {(total cholesterol-HDL cholesterol)/ HDL cholesterol}

간 조직의 중성지방과 콜레스테롤의 추출은 Folch법²⁷⁾을 사용하였으며, 지질을 추출한 후 간 조직의 중성지질과 총 콜레스테롤 분석은 효소법을 이용한 영동제약 분석용 kit으로 혈액에서와 같은 방법으로 비색정량 하였다.

(2) RT-PCR을 이용한 간 LDL-수용체 mRNA 분석

간 LDL-수용체 mRNA는 RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) 방법을 이용하여 분석하였다.²⁸⁾ 1단계로 간 조직으로부터 총 RNA를 추출하였다. 적출한 간 조직 20 mg을 균질화시킨 후 RNeasy Mini Kit (Cat. No. 74104, QIAGEN, USA)을 이용하여 총 RNA를 추출하였다. 2단계로 transcriptase (Cat. No. 205211, QIAGEN, USA)가 첨가된 master mix를 만든 후 각각의 tube에 18 μl씩 나누어 담은 후 추출한 RNA 용액를 2 μl씩 첨가하여 37°C에서 60분간 reverse transcription을 시킨 후 93°C에서 5분간 처리하여 reverse transcriptase를 불활성화 시켰다. 3단계로, 만들어진 cDNA를 template로 polymerase chain reaction (PCR)을 통해 DNA를 증폭시킨 후 전기영동을 통해 expression을 확인하였다. LDL-수용체의 PCR 반응은 94°C에서 15초, 60°C에서 15초, 72°C에서 15초간 35회 반복 수행하였고, 반응전후로 각각 94°C 3분간 pre-denaturation과 72°C 5분간 post-extentention을 실시하였다. 대조 (control)로 사용한 GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases)는 95°C에서 30초, 56°C에서 30초, 74°C에서 45초간 25회 반복 수행하였고, 반응전후로 각각 95°C 2분간 pre-denaturation과 72°C 7분간 post-extentention을 실시하였다. Taq. DNA polymerase (5U/μl)는 Neurotics Inc. 제품 (Korea)을 사용하였으며, PCR cycler는 Primus Thermal Cycler (MWG Biotech AG, Germany)를 이용하였다. Oligonucleotides는 SD종 흰쥐의 간에서 발현되는 LDL-수용체 mRNA 염기서열과 GAPDH mRNA 염기서열을 참고로 하여 제작 하였으며, Table 2에 oligonucleotides의 sequence를 표시하였다. PCR 반응이 끝난 결과물 10 μl를 취하여 dye 1.5 μl와 혼합하여 1.2% agarose gel에 전기영동 하였다. 전기영동 한 gel을 0.5 μg/ml의 ethidium bromide (EtBr) 용액에 침지하여 염색한 다음 UV transilluminator 위에서 DNA band를 확인한 후 polaroid로 사진 촬영을 하여 결과물을 보존하였다. 염색정도는 스캐닝 한 DNA band의 image를 image analyzer (NIH image 1.61)로 분석하였으며 GAPDH의 발현정도에 대한 LDL 수용체의 발현정

Table 2. List of oligonucleotides

Name	Direction	Sequence	Base number	GC%	Tm (°C)
LDL receptor	Sense	5'-CAA-GAC-GTC-CTC-CCT-GGA-TGA -GTT-CC-3'	26mer	58	66.5
	Anti-sense	5'-CCA-GTC-TTC-GTC-ACA-CAC-AAA-CTG-3'	24mer	50	63.6
GAPDH	Sense	5'-ATC-AAA-TGG-GGT-GAT-GCT-GGT -GCT-G-3'	25mer	48	66.4
	Anti-sense	5'-CAG-GTT-TCT-CCA-GGC-GGC-ATG -TCA-G-3'	25mer	60	68.2

Table 3. Effects of isoflavones on weight gains, mean food intake and food intake efficiency ratio (FER) in growing female rats

Group	Control	Isoflavones	p
Weight gains (g)	160.8 ± 12.31 ¹⁾	159.4 ± 18.00	NS ²⁾
Mean food intake (g/day)	13.75 ± 0.82	13.62 ± 1.19	NS
FER ³⁾	0.17 ± 0.01	0.18 ± 0.01	NS

¹⁾ Mean ± SD²⁾ NS: Not significantly different at p < 0.05³⁾ Food intake efficiency ratio (FER) = weight gains (g) / total food intake (g)

도로 나타내었다.

3. 자료처리 및 분석

본 실험에서 얻은 결과의 통계 분석은 SAS package를 이용하였다. 각 변인마다 각 실험 군별 평균과 표준편차를 구하였으며, 두 군 간의 유의성 검증은 Student's t-test를 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 체중 증가량, 식이 섭취량 및 식이효율

9주간의 체중 증가량, 평균 식이 섭취량 및 식이효율을 Table 3에 나타내었다. 9주간의 체중 증가량은 159.4 g과 160.8 g으로 두 군 간에 유의적인 차이가 없었다. 평균 식이 섭취량도 두 군 간에 유의적인 차이가 없었다. 식이효율도 두 군 간에 유의적인 차이가 없었다.

선행연구 중 이소플라본의 첨가가 체중 또는 식이 섭취량에 미치는 영향을 살펴보면, 폐경 모델을 대상으로 분리 대두 이소플라본인 genistin을 공급한 Arjmandi 등²⁹⁾의 실험에서 난소절제군과 sham군 모두 genistin의 농도에 따른 체중 차이는 없었다고 보고하였고, 폐경모델 흰쥐에게 6주간 대두 이소플라본을 첨가한 Kim의 실험³⁰⁾에서도 이소플라본의 첨가 수준을 달리 하였을 때 식이섭취량에 유의적인 차이가 없었다고 보고하였다. 성장기를 대상으로 한 본 논문에서도 선행연구와 같이 대두 이소플라본의 첨가가 체중증가와 식이섭취량에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 폐경의 경우에는 체중 증가량에 미치는 이소플라본의 효과에 대해 다른 견해도 있다. Picherit 등³¹⁾은 난소절제 흰

Table 4. Effects of isoflavones on serum triglyceride, total cholesterol, HDL cholesterol, non-HDL cholesterol, HDL-/total cholesterol (HTR) and atherogenic index in growing female rats

Group	Control	Isoflavones	p
TG (mg/dl)	53.11 ± 10.60 ¹⁾	34.83 ± 6.92	NS ²⁾
Total cholesterol (mg/dl)	112.10 ± 28.40	73.66 ± 9.81	<0.05 ³⁾
HDL cholesterol (mg/dl)	86.77 ± 15.08	60.66 ± 7.31	<0.05
Non-HDL cholesterol (mg/dl)	25.33 ± 5.12	13.00 ± 2.84	<0.05
HTR ⁴⁾	0.68 ± 0.19	0.73 ± 0.13	NS
Atherogenic index	0.28 ± 0.14	0.21 ± 0.10	NS

¹⁾ Mean ± SD.²⁾ NS: Not significantly different at p < 0.05³⁾ Significantly different at p < 0.05⁴⁾ HTR: HDL cholesterol/total cholesterol ratio

쥐에서 이소플라본의 첨가량이 많을수록 체중증가율이 낮아져 이소플라본 첨가량이 높은 군은 체중증가량이 유의적으로 낮아져 체중증가율이 sham군과 유사하였다고 보고하였다. 이는 이소플라본이 난소절제 쥐에서 나타나는 전형적인 체중증가 현상을 막아주었음을 의미한다고 보고하였다.

2. 혈청 지질농도

혈청 중성지질, 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, non-HDL 콜레스테롤, 총 콜레스테롤함량에 대한 HDL-콜레스테롤의 비율 (HTR) 및 atherogenic index에 대한 결과를 Table 4에 제시하였다. 혈청 중성지질의 농도는 두 군 간에 유의적인 차이가 없었다. 혈청 총 콜레스테롤 농도는 이소플라본을 첨가한 군이 대조군 보다 유의적으로 낮았다. 혈청 HDL-콜레스테롤 농도는 총 콜레스테롤 농도가 현저히 높았던 대조군이 이소플라본을 섭취한 군 보다 유의적으로 높았다. 그러나 총 콜레스테롤 함량에 대한 HDL-콜레스테롤의 비율 (HTR)을 보면, 이소플라본을 첨가한 군이 0.73, 대조군이 0.68로 유의적인 차이는 없었다. 혈청 non-HDL 콜레스테롤 농도는 대조군 보다 이소플라본을 첨가한 군에서 유의적으로 낮았다. Atherogenic index는 유의적인 차이가 없었다.

이소플라본은 에스트로겐과 구조가 유사하여 약한 에스토로겐으로서의 역할을 하여 폐경 여성의 혈중 지질을 개선시키고,^{32,33)} 동맥경화증을 예방한다고 보고^{14,34,35)} 되었다. 3개월 간 이소플라본 132 mg이 함유된 대두 단백질을 매일

섭취한 폐경 후 여성의 경우, 이소플라본 대신 셀룰로오스를 공급받은 여성들 보다 혈중 총 콜레스테롤과 LDL-콜레스테롤 농도가 낮았다.³²⁾ 폐경 후 여성은 대상으로 한 최근의 또 다른 연구에서는 이소플라본 함량이 다른 대두 단백질 (65, 132 mg isoflavones/day) 섭취시 대조군에 비해 이소플라본을 풍부하게 함유한 대두 단백질을 섭취한 군에서 혈중 LDL-콜레스테롤과 혈중 LDL/HDL 콜레스테롤 비율이 감소하였으며 이소플라본 함량이 가장 높은 군의 혈중 LDL-콜레스테롤 농도가 가장 낮았다.³³⁾ 대두 이소플라본은 폐경 여성 뿐만 아니라 폐경 전 여성^{15,36)}과 남성¹⁶⁾에서도 혈중 콜레스테롤 개선 효과가 있는 것으로 보고되었다. 폐경 전 여성에게 400 ml의 두유를 매일 섭취케 한 결과, 2개월 간의 두유 섭취로 혈청 총 콜레스테롤 농도가 11 mg/dl가 감소하였고 LDL-콜레스테롤 농도는 17 mg/dl가 감소하였다.¹⁵⁾ 폐경 전 여성은 대상으로 한 또 다른 연구³⁶⁾에서는 이소플라본이 총 콜레스테롤과 LDL-콜레스테롤을 낮추어 지질상태를 유의적으로 개선시켰다. 고콜레스테롤혈증과 정상 콜레스테롤 수준의 남성을 대상 (20~50세)으로 한 Wong 등¹⁶⁾의 연구에서는 5주간 각각의 식사에서 대두 단백질과 동물성 단백질을 공급한 결과 혈중 지질 수준과 상관없이 두 경우 모두에서 대두 단백질의 콜레스테롤 저하 효과를 나타내었는데, 이소플라본이 풍부한 대두 단백질은 LDL-콜레스테롤 수준과 LDL과 HDL 콜레스테롤의 비를 감소시켰다고 보고하여 고콜레스테롤혈증 뿐만 아니라 정상 콜레스테롤 수준의 사람에서도 콜레스테롤 감소 효과가 있었다. 고콜레스테롤혈증 남성을 대상으로 한 또 다른 연구³⁷⁾에서는 섭취 수준과 기간에 따라 대두 단백질의 콜레스테롤 감소 효과가 다르게 나타날 수 있음이 제시되었다. 흰쥐와 햄스터를 대상으로 한 동물실험³⁸⁾에서도 대두 단백질이나 대두 단백질의 알콜 추출물은 혈청 총 콜레스테롤과 LDL 콜레스테롤을 낮추는 효과가 있었다. 성장기 암컷을 대상으로 분리 대두 이소플라본만을 첨가한 본 연구에서도 선행연구들에서와 같은 혈중 콜레스테롤 감소효과를 확인할 수 있었다.

혈중 총 콜레스테롤 농도가 심장질환의 주요 위험인자이긴 하나 최근에는 혈중 콜레스테롤을 운반하는 HDL과 LDL의 비율이 더욱 민감한 진단 기준이 된다고 밝히고 있다. 따라서 혈청 총 콜레스테롤 농도에 대한 HDL-콜레스테롤의 농도비나, HDL-콜레스테롤 농도에 대한 LDL-콜레스테롤의 농도비가 심혈관 질환의 발병을 예견할 수 있는 좋은 지표가 된다.³⁵⁾ 그러므로 혈중 콜레스테롤 수준이 정상이라 하더라도 LDL-콜레스테롤 수준이 높을 경우 동맥경화증의 위험이 증가된다.¹²⁾ 혈중 총 콜레스테롤 감소는 LDL-콜

Table 5. Effects of isoflavones on hepatic triglyceride and total cholesterol in growing female rats

Group	Control	Isoflavones	p
TG (mg/g liver)	38.63 ± 6.65 ¹⁾	39.42 ± 10.92	NS ²⁾
Total cholesterol (mg/g liver)	37.75 ± 2.44	39.82 ± 1.59	NS

¹⁾ Mean ± SD

²⁾ NS: Not significantly different at p < 0.05

레스테롤 감소를 동반한다.³⁶⁾ 이러한 관점에서 대두 이소플라본의 섭취는 혈중 LDL-콜레스테롤 농도와 HDL-콜레스테롤에 대한 LDL-콜레스테롤의 비율을 감소시킴으로 심혈관 질환에 대한 예방효과가 있는 것으로 알려지고 있다.¹⁴⁾ 또한 최근 보고를 통해 성인기에 발병하게 되는 동맥경화증의 시작은 10대 때의 지질 패턴에 의해 결정될 수 있으며,²²⁾ 아동기 동안의 혈중 콜레스테롤 상승은 성인기 심혈관 질환 발병의 중요한 예전인자로 이용될 수 있음²³⁾이 제시되었다. 이러한 견해에서 볼 때, 이소플라본이 성장기 암컷 흰쥐에서 혈중 총 콜레스테롤과 non-HDL-콜레스테롤을 유의적으로 감소시켜 주었으므로 꾸준한 대두 식품의 섭취는 성장기 여성의 경우에도 성인이 되었을 때의 심혈관 질환 예방에 긍정적인 인자로 작용할 수 있을 것으로 사료된다.

3. 간 지질농도

간 중성지질과 총 콜레스테롤 농도에 대한 결과를 Table 5에 제시하였다. 간 중 중성지질과 총 콜레스테롤 수준은 두 군 간에 유의적인 차이가 없었다. 혈중 지질에서는 이소플라본의 섭취에 위한 콜레스테롤 감소 효과가 나타났으나 간에서는 총 콜레스테롤 농도에 영향을 미치지 않았다. 난소절제 모델을 대상으로 분리 대두 이소플라본을 첨가한 Kim³⁰⁾의 실험에서도 본 논문에서와 같이 혈중 콜레스테롤 감소효과는 나타났으나 간 지질농도의 변화는 나타나지 않았다고 보고하여 본 연구의 결과와 일치하였다. 이소플라본이 함유된 대두 단백질의 콜레스테롤 감소효과는 섭취 수준과 기간, 성별 및 실험대상의 실험 시작시 혈중 지질 수준에 영향을 받는다고 보고되었다.³⁹⁾ 폐경과 같은 생리주기의 변화나 실험기간의 연장 또는 고지혈증 상태에서는 또 다른 결과가 나올 수도 있을 것으로 사료된다.

4. 간 LDL 수용체 mRNA

RT-PCR로 확인한 간 LDL-수용체와 GAHDH의 전기영동 사진을 Fig. 1에 나타내었다. Fig. 2에 표시된 값은 GAHDH 발현정도에 대한 LDL-수용체의 발현정도를 image analyzer로 분석하여 나타낸 값이다. 본 연구에서 RT-PCR을 이용하여 측정한 이소플라본 첨가 군의 간 LDL-수용체 mRNA 수준은 대조군에 비해 유의적으로 증가되었으며, 이는 GAHDH mRNA 수준과 일치하였다.

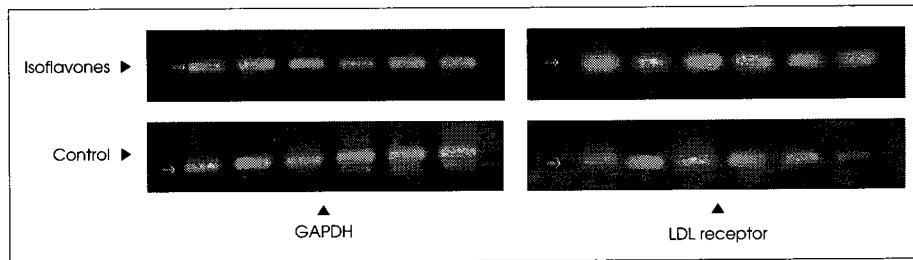


Fig. 1. Expression of GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases) and LDL receptor in the liver by RT-PCR. Arrows indicate PCR bands of GAPDH or LDL receptor.

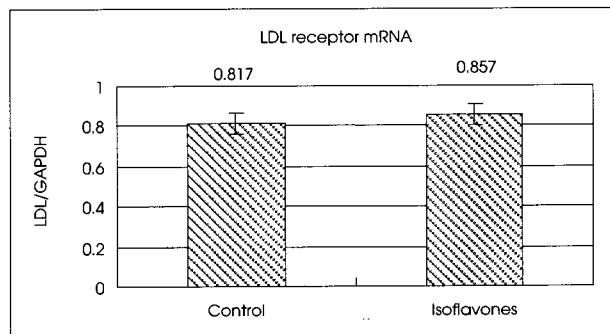


Fig. 2. Effects of Isoflavones on hepatic LDL receptor mRNA level in growing female rats.

체 mRNA의 수준은 0.857이었으며, 대조군은 이보다 5% 낮은 0.817로 나타났으며, 이소플라본 첨가로 인한 유의적인 차이는 없었다.

LDL-수용체의 증가 또는 감소는 일차적으로 전사 (transcription) 단계의 변화에 의한 조절 또는 해석 (translation) 단계에서의 변화에 의해 조절될 수 있다. 본 연구에서는 간 LDL-수용체 mRNA 수준을 직접 측정하여 본 결과, 나타난 차이가 미약하였으나 이소플라본이 성장기 암컷 흰쥐의 간 LDL-수용체 전사 (transcription) 과정에 영향을 미칠 가능성이 있다고 사료된다. 물론 LDL과 LDL-수용체가 결합하여 각 세포로 들어가고 분해되는 속도가 아주 빠르다면 하향조절 (down regulation)에 의한 가능성도 배제할 수 없다.

이소플라본이 풍부한 대두 단백질의 콜레스테롤 감소효과에 대한 기전으로 먼저 담즙산 배설을 증가시킨다는 것과 간에서의 콜레스테롤 생합성을 조절하는 효소인 HMG CoA reductase의 활성도를 증가시켜 총 콜레스테롤과 LDL-콜레스테롤 감소를 일으킨다는 제안이 있다.⁴⁰⁾ 그 외 대두 단백질의 혈중 LDL-콜레스테롤 저하능은 LDL-수용체의 증가로 인한 혈액에서의 LDL-콜레스테롤 제거에 의한 것이라는 견해가 있다.⁴¹⁾ 이와 관련한 보고들로, 혈중 LDL-콜레스테롤 수준은 수용체의 mRNA 발현정도에 의존적이며⁴²⁾ 에스트로겐은 LDL-콜레스테롤 수용체의 발현에 중요한 조절인자로 작용하여 에스트로겐 치료시 LDL 수용체 mRNA의 발현이 증가되었다.^{12,43)} 이소플라본의 한 종류인

genistein도 LDL-수용체 유전자 발현을 증가시킨다는 보고가 있었다.⁴⁴⁾ Carroll과 Kurowska는⁴⁵⁾ 콜레스테롤이 함유되지 않은 카제인 식이는 간세포에서의 LDL-수용체를 하향조절 (down regulation)함을 보고하였으며, Lovati 등⁴⁶⁾은 제2형 고지단백혈증 환자에게 있어서 대두 단백식이는 동물성 단백식이에 비해 LDL-수용체를 통한 콜레스테롤 분해를 증가시킴으로 총 콜레스테롤과 LDL-콜레스테롤을 감소시켰다고 보고하였다. Sirtori 등⁴⁷⁾은 20년 동안 1000명 이상을 대상으로 대두 단백질의 효과를 연구한 결과, 대두 단백질은 LDL-수용체를 상향조절 (up regulation)한다고 결론지었다. 그러나 실제로 성장기 여성에게서 이소플라본이 LDL-수용체 mRNA 발현에 미치는 영향에 관한 연구는 거의 드물다. 한편, Baum 등⁴⁸⁾은 폐경 후 여성을 대상으로 6개월 동안 이소플라본의 함량이 다른 대두 단백질 (isoflavones 56 mg/day과 isoflavones 90 mg/day)을 공급하였다. 그 결과, 대두 단백질을 섭취한 두 군은 대조군 보다 혈중 non-HDL-콜레스테롤 농도가 감소하였으며 혈중 단핵세포 (mononuclear cell)의 LDL-수용체 mRNA 량 역시 증가되었다. 그러나 이소플라본 56 mg 섭취군과 90 mg 섭취군 사이의 유의적인 차이는 없었다고 보고하여 LDL-수용체 mRNA 증가로 인한 LDL-콜레스테롤의 감소는 이소플라본 단독의 효과라기 보다는 대두단백질의 다른 요인에 의한 복합적인 작용에 의한 것임을 제안하였다.⁴⁸⁾ 카제인 식이에 이소플라본을 첨가한 본 실험의 결과, 이소플라본이 풍부한 대두 단백을 섭취하였을 때 나타난 혈중 총 콜레스테롤 농도의 감소와 혈청 non-HDL 콜레스테롤 농도의 감소는 유의적으로 나타나 선행연구와 일치하였으나, 간 LDL 수용체 발현 증가 수준은 매우 미약하게 나타났다. 본 실험이 이소플라본 단독의 효과를 비교하여 보았을 때 나타난 결과이므로 대두 단백질 자체의 효과 또는 대두단백질과 이소플라본의 복합작인 작용이 간 LDL 수용체 mRNA 수준에 미치는 영향에 대한 추후 연구가 필요하다고 사료된다. 또한 폐경과 성장기 여성의 생리상태의 차이도 간과할 수 없으므로 생활주기에 따른 추후연구도 요망되어진다. 또한, 이소플라본을 첨가한 군의 LDL 수용체 발현 증가 수준이 미약하여 통계적 유의성을 없었으나 대조

군에 비해 5% 높은 수준으로 장기간의 효과를 볼 때 무시할 수만은 없는 결과라고 사료된다.

요약 및 결론

본 연구에서는 이소플라본 첨가 식이가 성장기 암컷 흰쥐의 혈액과 간 지질농도 및 간 LDL-수용체의 유전자 발현정도에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. 이를 위하여 9주간 이소플라본 첨가 식이를 공급한 후 혈액과 간에서의 지질농도를 분석하였으며, 혈중 콜레스테롤을 감소의 한 기전이 될 수 있는 간 LDL-수용체 mRNA의 수준을 RT-PCR을 이용하여 분석하였다.

본 실험의 결과를 요약하면, 혈청 중성지질의 농도는 실험 군 간에 유의적인 차이가 없었다. 혈청 총 콜레스테롤 농도와 non-HDL-콜레스테롤 농도는 대조군 보다 이소플라본을 섭취한 군이 유의적으로 낮았다. 혈청 HDL-콜레스테롤 농도는 콜레스테롤 농도가 유의적으로 낮았던 이소플라본 첨가군에서 유의적으로 낮았다. 총 콜레스테롤 함량에 대한 HDL-콜레스테롤의 비율 (HTR)과 atherogenic index는 이소플라본 첨가로 인한 유의적인 차이가 없었다. 간 중성지질과 총 콜레스테롤 농도는 두 군 간에 유의적인 차이가 없었다. 간 LDL-수용체 mRNA 수준은 두 군 간에 유의적 차이는 없었다.

대부 이소플라본의 첨가는 성장기 암컷 흰쥐에서 혈중 콜레스테롤과 non-HDL-콜레스테롤을 유의적으로 감소시켜 주었으므로 성장기 동안 꾸준한 이소플라본의 섭취는 성인이 되었을 때의 심혈관 질환 예방에 긍정적인 인자로 작용할 수 있을 것으로 사료된다. 그리고, 이소플라본을 첨가한 군의 LDL-수용체 발현 증가 수준이 미약하여 통계적 유의성은 없었으나 대조군에 비해 5% 높은 수준으로 무시할 수만은 없는 결과라고 생각되며, 보다 더 장기적인 섭취 효과나 이소플라본의 섭취량과 섭취형태에 따라 다르게 반응할 것이므로 이에 대한 후속연구가 지속적으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

Literature cited

- 1) Kurowska EM, Carroll KK. Hypercholesterolemic responses in rabbits to selected groups of dietary essential amino acids. *J Nutr* 124: 364-370, 1994
- 2) Kritchevsky D. Dietary protein and experimental atherosclerosis. *Ann NY Acad Sci* 676: 180-187, 1993
- 3) Huff MW, Carroll KK. Effects of dietary proteins and amino acid mixtures on plasma cholesterol levels in rabbits. *J Nutr* 110: 1676-1685, 1980
- 4) Shorey RL, Day PJ, Willis RA. Effects of soybean polysaccharide on plasma lipids. *J Am Diet Assoc* 85: 1461-1465, 1985
- 5) Klevay LM. Coronary heart disease: the zinc/copper hypothesis. *Am J Clin Nutr* 28: 764-774, 1975
- 6) Sidhy GS, Oakenfull DG. A mechanism for the hypocholesterolemic activity of saponins. *Br J Nutr* 55: 643-649, 1986
- 7) Anthony MS, Clarkson TB, Hughes CL, Morgan TM, Burke GL. Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal rhesus monkeys. *J Nutr* 126: 43-50, 1996
- 8) Messina M, Messina V. Soyfoods, soybean isoflavones, and health: A brief overview. *J Ren Nutr* 10: 63-68, 2000
- 9) Jayo MJ, Anthony MS, Register C, Rankin SE, Best T, Clarkson TB. Dietary soy isoflavones and bone loss: a study in ovariectomized monkeys. *J Bone Mineral Res* 11: s228 (abstr), 1996
- 10) Miksick RJ. Estrogenic flavonoids: Structural requirements for biological activity. *Proc Soc Exp Biol Med* 208: 44-50, 1995
- 11) Kuiper GJM, Lemmen JG, Calssen B. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . *Endocrinology* 139: 4252-4263, 1998.
- 12) Tavia G, William BK. Menopause and coronary heart disease: Framingham study. *Ann Intern Med* 89: 157-161, 1978
- 13) Jayagopal V, Albertazzi P, Kilpatrick ES, Howarth EM, Jennings PE, Hepburn DA, Atkin SL. Beneficial effects of soy phytoestrogen intake in postmenopausal women with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 25: 1709-1714, 2002
- 14) Goodman GD, Kritz SD. Usual dietary isoflavone intake is associated with cardiovascular disease risk factors in postmenopausal women. *J Nutr* 131: 1202-1206, 2001
- 15) Takatsuka N, Nagata C, Kurisu Y, Inaba S, Kawakami N, Shimizu H. Hypocholesterolemic effect of soy milk supplementation with usual diet in premenopausal normolipidemic Japanese women. *Prev Med* 31: 308-314, 2000
- 16) Wong WW, Smith EO, Stuff JE, Hachey DL, Heird WC. Cholesterol lowering effect of soy protein in normocholesterolemic and hypercholesterolemic men. *Am J Clin Nutr* 68 (suppl): 1385s-1389s, 1998
- 17) Makela S, Davis VL, Tally WC. Dietary estrogens act through estrogen receptor mediated processes and show no anti-estrogenicity in cultured breast cancer cells. *Environ Health Perspect* 102: 572-578, 1994
- 18) Martin RM, Horwitz KB, Ryan DS, McGuire WL. Phytoestrogen interaction with estrogen receptors in human breast cancer cells. *Endocrinology* 198: 1860-1867, 1978
- 19) Dwyer JT, Goldin BR, Saul N, Gualtieri L, Barakat S, Adlercreutz H. Tofu and soy drinks contain phytoestrogens. *J Am Diet Assoc* 94: 739-743, 1994
- 20) Setchel KDR, Nechemias LZ, Cai J, Heubi JE. Isoflavones content of infant formulas and the metabolic rate of these phytoestrogens in early life. *Am J Clin Nutr* 68 (suppl): 1453s-1461s, 1998
- 21) Badger TM, Ronis MJ, Hakkak R, Rowlands JC, Korourian S. The health consequences of early soy consumption. *J Nutr* 132 (suppl): 559s-565s, 2002
- 22) Strong JP, Malcom GT, McMahan CA. Prevalence and extent of atherosclerosis in adolescents and young adults. *JAMA* 281: 727-

- 735, 1999
- 23) National institutes of health, national heart, lung, and blood institute. Report of the expert panel on blood cholesterol levels in children and adolescents. *National Cholesterol Education Program*. Bethesda. NIH Publication No. 91-27-32, 1991
 - 24) Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents. *J Nutr* 123: 1939-1951, 1993
 - 25) Choi MJ, Cho HJ. Effects of soy isoflavones on bone mineral density in growing female rats. *Korean J Nutrition* 36: 359-367, 2003
 - 26) Haglund O, Loustarinen R, Wallin R, Wibell I, Saldeen T. The effect of fish oil on triglycerides, cholesterol, fibrinogen and malondialdehyde in humans supplemented with vitamin. *Eur J Nutr* 121: 165-172, 1991
 - 27) Folch J, Lees M, Sloanstanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J Biol Chem* 226: 497-509, 1957
 - 28) Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* 29: 23-39, 2002
 - 29) Arjmandi AH, Getlinger MJ, Goyal NV, Alekel L, Hasler CL, Juma S, Drum ML, Hollis BW, Kukreja SC. Role of soy protein with normal or reduced isoflavone content in reversing bone loss induced by ovarian hormone deficiency in rats. *Am J Clin Nutr* 68(suppl): 1358s-1363s, 1998
 - 30) Kim MS. Beneficial effect of soy isoflavone on bone loss and hyperlipidemia in ovariectomized rats. *Ph D Dissertation*. Seoul National University, Seoul, 1999
 - 31) Picherit C, Bennetau-Pelissero C, Chantermne B, Lebecque P, Cavicco MJ, Barlet JP, Coxam V. Soybean isoflavones dose-dependently reduce bone turnover but do not reverse established osteopenia in adult ovariectomized rats. *J Nutr* 131: 723-728, 2001
 - 32) Hsu CS, Shen WW, Hsueh YM, Yeh SL. Soy isoflavone supplementation in postmenopausal women. Effects on plasma lipids, antioxidant enzyme activities and bone density. *J Reprod Med* 46: 221-226, 2001
 - 33) Wangen KE, Duncan AM, Xu X, Kurzer MS. Soy isoflavones improve plasma lipids in normocholesterolemic and mildly hypercholesterolemic postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 73: 225-231, 2001
 - 34) Schouw YT, Klijn MJ, Peeters PH, Grobbee DE. Phytoestrogens and cardiovascular disease risk. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 10: 154-167, 2000
 - 35) Lichtenstein AH. Soy protein, isoflavonoids, and risk of developing coronary heart disease. *Curr Taheroscler Rep* 1: 210-214, 1999
 - 36) Merz-Demlow BE, Duncam AM, Wangen KE, Carr TP, Xu X. Soy isoflavones improve plasma lipid in normocholesterolemic premenopausal women. *Am J Clin Nutr* 71: 1462-1469, 2000
 - 37) Teixeira BH. Effects of feeding 4 levels of soy protein for 3 and 6 week on blood lipids. *Am J Clin Nutr* 71: 1074-1084, 2000
 - 38) Balmir F, Staack R, Jeffrey E, Jimenz MDB, Wang L, Potter SM. An extract of soy flour influences serum cholesterol and thyroid hormones in rats and hamsters. *J Nutr* 126: 3046-3053, 1996
 - 39) Zhan S, Ho SC. Meta-analysis of the effects of soy protein containing isoflavones on the lipid profile. *Am J Clin Nutr* 81: 397-408, 2005
 - 40) Anthony MS, Clarkson TB, Williams JK. Effects of soy isoflavones on atherosclerosis: Potential mechanisms. *Am J Clin Nutr* 68 (suppl): 1930s-1933s, 1998
 - 41) Baum JA, Teng H, Erdman JW Jr. Long-term intake of soy protein improves blood lipid profiles and increases mononuclear cell low density lipoprotein receptor messenger RNA in hypercholesterolemic, postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 68: 545-551, 1998
 - 42) Brown MS, Goldstein JL. Receptor-mediated control of cholesterol metabolism. *Science* 191: 150-154, 1976.
 - 43) Li C, Briggs MR, Ahlbom TE, Kraemer FB, Liu J. Requirement of Sp 1 and estrogen receptor alpha interaction in 17 beta-estradiol mediated transcription activation of the low density lipoprotein receptor gene expression. *Endocrinology* 142: 1546-1553, 2001
 - 44) Borradale NM, de Dreu LE, Wilcox LJ, Edwards JY, Huff MW. Soya phytoestrogens, genistein and daidzein, decrease apolipoprotein B secretion from HepG2 cells through multiple mechanisms. *Biochem J* 366(Pt 2): 531-539, 2002
 - 45) Carroll KK, Kurowska EM. Soy consumption and cholesterol reduction: Review of animal and human studies. *J Nutr* 125 (suppl): 594s-597s, 1995
 - 46) Lovati MR, Manzoni C, Canavesi A. Soybean protein diet increases low density lipoprotein receptor activity in mononuclear cells from hypercholesterolemic patients. *J Clin Invest* 80: 1498-1502, 1987
 - 47) Sirtori CR, Lovati MR, Manzoni C. Soy and cholesterol reduction: Clinical experience. *J Nutr* 125(suppl): 598s-605s, 1995